

**ACTIVIDAD INSECTICIDA SOBRE *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE LA PARTE AÉREA DE *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. Y LAS INFLORESCENCIAS DE *Piper subtomentosum* Trel. & Yunck. (Piperaceae)**

Mónica Constanza Ávila Murillo<sup>\*a</sup>, Luis Enrique Cuca Suarez<sup>a</sup> y Jairo Alonso Cerón Salamanca<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Productos Naturales Vegetales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Cr 30 45-03, Bogotá, Colombia

<sup>b</sup>Laboratorio de Biopesticidas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Cr 30 45-03, Bogotá, Colombia

Recebido em 25/06/2013; aceito em 25/10/2013; publicado na web em 10/02/2014

INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) OF METABOLITES ISOLATED FROM THE AERIAL PART OF *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. AND INFLORESCENCES OF *Piper subtomentosum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). The bioassay-guided purification of ethanolic extracts from inflorescences of *Piper subtomentosum* Trel. & Yunck and aerial part of *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. led to isolation of five flavonoids, uvangoletin (**1**), galangin (**2**), chrysin (**5**), 5-hydroxy-4',7-dimethoxy-flavone (**6**), pinostrobin (**7**); one amide, *N-p*-coumaroil-tyramine (**4**); one acylglycerol, monopalmitin (**3**); one derivative of acid, protocatechuic acid (**8**); and glycosydated sterol, daucosterol (**9**). Their structures were elucidated on the basis of spectroscopy and spectrometry data and by comparison with data reported in the literature. The isolated compounds were tested against *Spodoptera frugiperda*. The results showed galangin and protocatechuic acid to be the most active (LC<sub>50</sub> 13.63 and 17.16 ppm, respectively).

Keywords: Piperaceae; insecticidal metabolites; *Spodoptera frugiperda*.

## INTRODUCCIÓN

Con el transcurrir de los años y la evolución, la presión medioambiental ha provocado que las especies solucionen el problema de la supervivencia, lo que ha generado gran cantidad de familias de plantas con diferentes morfologías, adaptaciones bioquímicas, y diversidad en el contenido de defensas químicas.<sup>1</sup> Ejemplo de esto son las especies pertenecientes a la familia Piperaceae, las cuales hacen parte del grupo denominado angiospermas basales conformado por cinco familias de plantas, y reconocido por tener una amplia distribución, importancia económica, utilidad etnobotánica, diversidad química y acciones biológicas comprobadas.<sup>2</sup>

Las Piperaceas se han utilizado tradicionalmente como fuente de insecticidas, condimentos y fitomedicamentos.<sup>3</sup> El uso de estas especies en la protección de cultivos data del antiguo Egipto en donde se usaba el fruto seco de *Piper nigrum* como repelente en cultivos de cereales; muchos años después, estudios fitoquímicos y de actividad biológica realizados sobre esta y otras especies del género *Piper* demostraron la existencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios con actividades insecticidas comprobadas principalmente sobre insectos de los órdenes Coleóptera, Himenóptera y Lepidóptera.<sup>4-7</sup>

*Spodoptera frugiperda*, más conocido como gusano cogollero, pertenece al orden de los Lepidópteros, es una plaga de importancia económica en cultivos de maíz, sorgo, algodón, arroz, y pasto en Mesoamérica;<sup>8</sup> en donde se estima que puede llegar a causar pérdidas cercanas a 60% en maíz, 35% en algodón y 20% en arroz. Los métodos comúnmente usados para el control del gusano cogollero involucran el uso de insecticidas químicos, cuyos ingredientes activos son organofosforados, carbamatos y piretrinas,<sup>9</sup> que en la mayoría de los casos tienen problemas de acumulación y toxicidad. Adicionalmente existen métodos de control biológico que a pesar de que son menos efectivos son ampliamente usados y comercializados por su bajo

impacto ambiental; ejemplo de estos métodos son las toxinas obtenidas de *Bacillus thuringiensis*, los productos de fermentación de *Saccharopolyspor spinosa* y algunas especies vegetales pertenecientes a las familias Leguminosae, Asteraceae y Meliaceae.<sup>10</sup>

El reconocimiento cada vez mayor de las pérdidas ocasionadas por insectos plaga, las dificultades encontradas en su tratamiento y las tendencias actuales orientadas al desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles y amigables con el ecosistema, han estimulado la búsqueda de nuevas formas de control. Las plantas son una importante alternativa, por lo que la investigación fitoquímica ha tomado un gran impulso hacia encontrar los compuestos responsables de la actividad insecticida presentada por algunas especies, con el fin de obtener sustancias con aplicación a nivel agrícola. Este trabajo presenta el estudio fitoquímico bioguiado realizado sobre las inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium*, con el objeto de determinar los compuestos responsables de la actividad insecticida frente a larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimientos experimentales generales

Los espectros de RMN fueron registrados en el espectrómetro Bruker Avance operando a 400 MHz (<sup>1</sup>H), 100 y (<sup>13</sup>C); empleando como solventes: cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), acetona deuterada (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD), dimetil sulfoxido deuterado (DMSO). Los análisis de masas se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosistem GCMS usando como método de ionización EI y en el espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 Plus Bruker, acoplado a un cromatógrafo líquido Agilent 1100, usando como método de ionización ESI. Para el fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (CLV) se usó sílica gel 60HF<sub>254</sub> Merck®; en la cromatografía en columna (CC) se usó sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck®, en las columnas de purificación realizadas por cromatografía

\*e-mail: mcavilam@unal.edu.co

flash (CF) se usó sílica gel 60 (230-400 mesh) Macherey-Nagel®, los estudios cromatográficos para selección de solventes, y el monitoreo de las columnas de fraccionamiento y purificación se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD), empleando cromatoplasas de sílica gel 60 HF<sub>254</sub> Merck®, utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 nm, 365 nm) y vainillina/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

### Material vegetal

El material vegetal corresponde a las inflorescencias del árbol *P. subtomentosum* Trel. & Yunck. y la parte aérea de la enredadera *P. septuplinervium* (Miq.) C. DC. Las especies fueron colectadas en la vereda San José bajo del municipio de Granada, Cundinamarca, Colombia, en agosto de 2010. Las muestras fueron determinadas por el biólogo Adolfo Jara Muñoz del Herbario Nacional Colombiano, en donde reposan los especímenes de herbario con los números de colección COL-517695 (*P. septuplinervium*) y COL-516758 (*P. subtomentosum*).

### Material biológico

Las larvas de *S. frugiperda* fueron colectadas en el municipio del Espinal, Tolima, Colombia; en cultivos de sorgo y maíz sin aplicación previa de insecticidas. El mismo día de la recolección fueron llevadas a un cuarto de cría ubicado en el Laboratorio de Biopesticidas-entomología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Las larvas se mantuvieron en dieta artificial<sup>11</sup> en condiciones controladas correspondientes a 28 ± 2 °C y 65 ± 5% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz-oscuridad).<sup>12</sup>

### Determinación de actividad insecticida

Los extractos, fracciones, y compuestos puros fueron evaluados frente a larvas de primer instar de *S. frugiperda* en diferentes rangos de concentraciones dependientes de la muestra evaluada. En cajas de 24 pozos de poliestireno se colocó dieta artificial, y sobre cada pozo se aplicó un volumen constante de la disolución a ensayar a la concentración deseada. Dieciséis larvas neonatas fueron analizadas por concentración de muestra por triplicado. Una larva de primer instar se añadió por pozo y la lectura de la mortalidad se registró después de siete días de incubación a 28 ± 2 °C y 65 ± 5% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz-oscuridad). La concentración a la que el 50% de las larvas sobrevivieron fue estimada por análisis Probit.<sup>13</sup> Como controles positivos del ensayo se usaron dos insecticidas comerciales Lorsban® y Xen Tari®, como controles relativos se usaron DMSO R.A., acetona R.A: y como control absoluto se usó dieta artificial.

### Extracción y aislamiento de compuestos

#### *Piper septuplinervium*

La parte aérea seca y molida de *P. septuplinervium* (980 g) se sometió a extracción por percolación con etanol 96 % a temperatura ambiente, el solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida obteniéndose 70 g de extracto crudo. De este extracto, 40 g se fraccionaron por CC sobre sílica gel con la mezcla tolueno (φ-CH<sub>3</sub>): acetato de isopropilo (AcOiPr) en polaridad creciente (90:10 → 0:100) obteniéndose 18 fracciones (F1-F18); las cuales fueron sometidas al ensayo de determinación de actividad insecticida, en el que las fracciones F4 (CL<sub>50</sub> = 468 ppm), F5 (CL<sub>50</sub> = 405 ppm), F6 (CL<sub>50</sub> = 515 ppm), F8 (CL<sub>50</sub> = 350 ppm), y F18 (CL<sub>50</sub> = 53.8 ppm), fueron seleccionadas para continuar con el estudio fitoquímico.

Teniendo en cuenta el comportamiento en CCD con varios sistemas de eluyentes se reunieron las fracciones F4 (1,2691g), F5 (6,3573 g) y F6 (3,8683 g) para su posterior purificación; la fracción resultante denominada F4-6(11,4947 g), fue sometida a CC con la mezcla éter de petróleo (EdP): acetato de etilo (AcOEt) en polaridad creciente (70:30 → 0:100), y CF repetitivas con hexano-AcOEt-ácido fórmico (80:20:2) y hexano-acetona-ácido fórmico (85:15:2) obteniendo la dihidrochalcona conocida como Uvangoletina **1** (578 mg) y el flavonol conocido como Galangina **2** (6 mg). La fracción F8 (1.555 g) fue purificada mediante CC con el sistema de elución diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) - metanol (MeOH) en polaridad creciente (95:5 → 30:70), y CF sucesivas con las mezclas cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) - MeOH (95:5), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-ácido fórmico (95:5:2), hexano-acetona (70:30) (75:25); para obtener Monopalmitato de glicerilo **3** (46 mg) y *N-p*-Cumaroil-tiramina **4** (60 mg). De la fracción F18 por CC y CF eluyendo con los sistemas EdP-AcOiPr-ácido fórmico (50:50:1), y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona-ácido acético (90:10:2) con posteriores lavados sucesivos con metanol se obtuvo el flavonoide Crisina **5** (150 mg).

#### *Piper subtomentosum*

Las inflorescencias secas y molidas de *P. subtomentosum* (530 g) fueron extraídas por maceración con etanol 96% obteniendo 25 gramos de extracto etanólico. De este extracto 20 g fueron fraccionados por CLV usando solventes de polaridad creciente (EdP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOiPr, y MeOH). Las fracciones obtenidas fueron sometidas al ensayo de actividad insecticida en el que se seleccionó a las fracciones F.CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (CL<sub>50</sub> = 650 ppm) y F. AcOiPr (CL<sub>50</sub> = 250 ppm) para continuar el estudio. De la fracción F.CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,370 g), por re-fraccionamiento mediante CLV con la mezcla tolueno-AcOiPr en gradiente de polaridad (90:10 → 0:100) y posterior purificación por CF con los sistemas de elución hexano-acetona (85:15), heptano-AcOEt-ácido fórmico (90:10:2), hexano-AcOEt (85:15), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt (98:2) se obtuvo el flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona **6** (5 mg) y la mezcla de esteroides: β-Sitosterol, Estigmasterol y Campesterol (150 mg).

De la fracción F. AcOiPr (5,6000 g), la cual fue sometida a CLV con la mezcla hexano-acetona en polaridad creciente (80:20 → 0:100) y CF sucesivas con las mezclas de elución: hexano-AcOEt (75:25), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona-ácido fórmico (90:10:2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (90:10), EdP-AcOEt-ácido fórmico (55:45:2), AcOiPr-ácido fórmico (100:2), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-ácido fórmico (90:10:2), CHCl<sub>3</sub>-MeOH (70:30); se obtuvieron las sustancias Pinostrobin **7** (85 mg), Ácido Protocatéuico **8** (9 mg), y Daucosterol **9** (140 mg).

#### *Uvangoletina (1)*

Sólido cristalino blanco. (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>). Pf. 189-190 °C. MS (ESI) *m/z* 294.99 [M+Na<sup>+</sup>]. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 2,95 (t, *J*=7,7 Hz, H-β), 3,25-3,32 (m, H-α), 5,97 (d, *J*=2,2 Hz, H-3'), 6,00 (d, *J*=2,2 Hz, H-5'), 7,14-7,21 (m, H-4), 7,27 (d, *J*=7,3 Hz, H-2/H-3/H-5/H-6), 3,86 (s, OCH<sub>3</sub>), 13,9 (brs, OH). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 32,4 (C-β), 47,4 (C-α), 92,9 (C-5'), 97,7 (C-3'), 106,7 (C-1'), 127,6 (C-4), 130,1 (C-2/C-6), 130,2 (C-3/C-5), 143,7 (C-1), 165,5 (C-6'), 166,6 (C-2'), 169,3 (C-4'), 206,0 (C=O), 57,2 (OCH<sub>3</sub>).<sup>14</sup>

#### *Galangina (2)*

Sólido amorfo blanco. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>). Pf. 214-215 °C. EIMS (70 eV) *m/z* 270[M<sup>+</sup>]. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 6,29 (d, *J*=2,0 Hz, H-6), 6,57 (d, *J*=2,0 Hz, H-8), 7,49-7,52 (m, H-3'/H-4'/H-5'), 8,26 (d, *J*=8,3 Hz, H-2'/H-6'), 12,1 (s, OH). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 146,1 (C-2), 138,0 (C-3), 177,0 (C-4), 162,4 (C-5), 99,3 (C-6), 165,2 (C-7), 94,6 (C-8), 158,0 (C-9), 104,3 (C-10), 132,1 (C-1'), 129,2 (C-2'/C-6'), 128,5 (C-3'/C-5').<sup>15</sup>

**Monopalmitato de glicerilo (3)**

Aceite. (C<sub>25</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>). EIMS (70 eV) *m/z* (int. rel) 459 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>) (5%), 371 (58%), 239 (20%), 147 (40%), 73 (100%), 57 (50%), 43 (70%).<sup>16</sup>

**N-p-Cumaroil-tiramina (4)**

Sólido amorfo. (C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>). Pf. 244-245 °C. MS (ESI) *m/z* 284.12 [M+H<sup>+</sup>]. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. CD<sub>3</sub>OD]: δ 2,75 (t, *J*=7,4 Hz, H-2''), 3,46 (t, *J*=7,4 Hz, H-1''), 6,38 (d, *J*=15,7 Hz, H-2), 7,44 (d, *J*=15,7 Hz, H-3), 6,72 (d, *J*=8.5, H-3'''/H-5'''), 6,79 (d, *J*=8,6, H-2'''/H-6'''), 7,05 (d, *J*=8.5 Hz, H-3'/H-5'), 7,40 (d, *J*=8,4 Hz, H-2'/H-6'). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz, CD<sub>3</sub>OD]: δ 36,6 (C-2''), 43,3 (C-1''), 117,0 (C-3'''/C-5'''), 117,4 (C-3'/C-5'), 119,2 (C-2), 128,4 (C-1'), 131,3 (C-2'/C-6'), 131,5 (C-2'''/C-6'''), 132,0 (C-1'''), 140,9 (C-3), 157,6 (C-4'''), 161,2 (C-5'''), 169,9 (C-1).<sup>17</sup>

**Crisina (5)**

Sólido amarillo. (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>). Pf. 261 °C. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. DMSO *d*<sub>6</sub>]: δ 6,21 (d, *J*=1,6 Hz, H-6), 6,5 (d, *J*=1,6 Hz, H-8), 6,94 (s, H-3), 7,57 (m, H3'/H4'/H5'), 8,04 (d, *J*=7,2 Hz, H-2'/H-6'), 12,8 (s, OH). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz. DMSO *d*<sub>6</sub>]: δ 163,0 (C-2), 105,1 (C-3), 181,7 (C-4), 161,4 (C-5), 98,9 (C-6), 164,3 (C-7), 94,0 (C-8), 157,3 (C-9), 103,9 (C-10), 130,6 (C-1'), 126,3 (C-2'/C-6'), 129,0 (C-3'/C-5').<sup>18</sup>

**5-Hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona (6)**

Sólido cristalino amarillo. (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>). Pf. 111-112 °C. EIMS (70eV) *m/z* 298 [M<sup>+</sup>]. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 6,37 (d, *J*=2,3 Hz, H-6), 6,49 (d, *J*=2,3 Hz, H-8), 6,58 (s, H-3), 7,02 (d, *J*=9,0 Hz, H-2'/H-6'), 7,84 (d, *J*=9,1 Hz, H3'/H5'), 3,88 y 3,89 (s, OCH<sub>3</sub>), 12,8 (s, OH). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz. (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO]: δ 164,0 (C-2), 104,3 (C-3), 182,0 (C-4), 162,0 (C-5), 98 (C-6), 165 (C-7), 92,6 (C-8), 157 (C-9), 105,0 (C-10), 123 (C-1'), 128 (C-2'), 114 (C-3'), 162 (C-4'), 114 (C-5'), 128 (C-6'), 55,5 y 55,7 (OCH<sub>3</sub>).<sup>19</sup>

**Pinostrobin (7)**

Sólido cristalino. (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>). Pf. 92-93 °C. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. CDCl<sub>3</sub>]: δ 2,80 (dd, *J*=17,2-3,1 Hz, H-3a), 3,06 (dd, *J*=17,2 y 13,0 Hz, H-3b), 5,39 (dd, *J*=13,0 y 3,0 Hz, H-2), 6,06 (d, *J*=2,3 Hz, H-6), 6,07 (d, *J*=2,3 Hz, H-8), 7,36-7,48 (m, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'), 3,79 (s, OCH<sub>3</sub>), 12,1 (s, OH). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz. CDCl<sub>3</sub>]: δ 79,2 (C-2), 43,4 (C-3), 195,7 (C-4), 164,2 (C-5), 95,2 (C-6), 168,1 (C-7), 94,3 (C-8), 162,8 (C-9), 103,2 (C-10), 138,7 (C-1'), 126,2 (C-2'/C-6'), 128,90 (C-3'/C-4'/C-5'), 55,7 (OCH<sub>3</sub>).<sup>20</sup>

**Ácido Protocatéquico (8)**

Sólido amorfo. (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>). Pf. 221. RMN <sup>1</sup>H [400 MHz. CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD]: δ 6,79 (d, *J*=8,8 Hz, H-5), 7,44 (dd, *J*=7,3 Hz y 3,4 Hz, H-6), 7,45 (d, *J*=2,9 Hz, H-2). RMN <sup>13</sup>C [100 MHz. CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD]: δ 120,5 (C-1), 116,3 (C-2), 145,4 (C-3), 151,6 (C-4), 115,4 (C-5), 122,4 (C-6), 167,8 (COOH).<sup>21</sup>

**Daucosterol (9)**

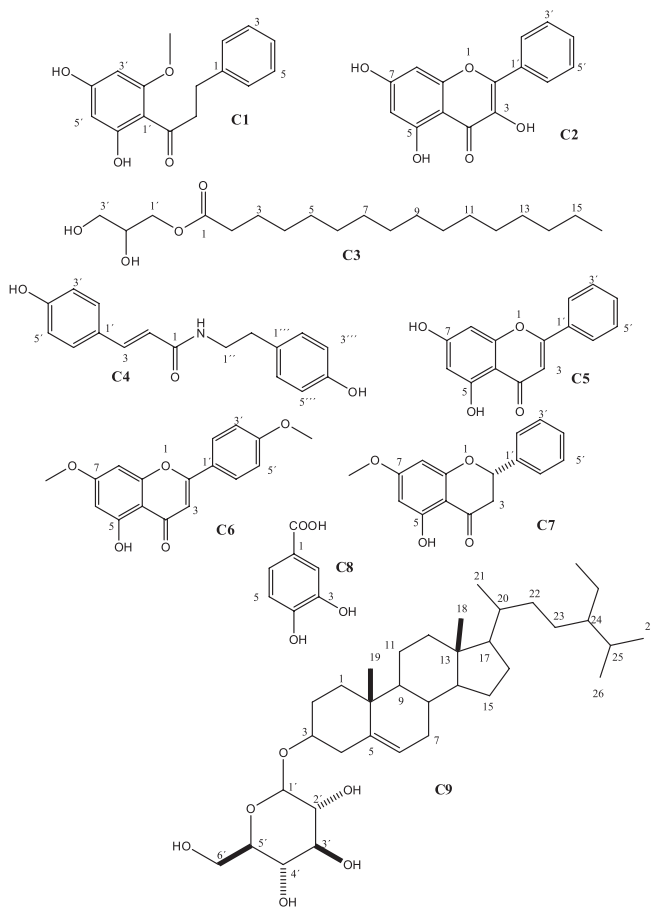
Sólido amorfo blanco. (C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>). Para la determinación estructural, los datos de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C fueron comparados con la literatura.<sup>22</sup>

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los compuestos obtenidos en este estudio son el primer reporte de composición química de las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum*; los metabolitos **3**, **4**, **6**, **7**, **8** y **9** han sido previamente aislados de especies vegetales del género *Piper*,<sup>5,20</sup> mientras que este

es el primer reporte para el género de la presencia de los compuestos **1**, **2**, y **5**.

La determinación estructural de los compuestos **1**, **2**, **4-9**, se realizó por comparación de los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con los reportados en la literatura. La apariencia física del compuesto **3** junto a su perfil de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, hacen presumir la existencia de un acil glicerol. Para la asignación correcta del número de carbonos del fragmento de acilo se preparó el derivado sililado,<sup>23</sup> el análisis del espectro de masas por impacto electrónico del derivado preparado permitió ver el fragmento *m/z*=459, correspondiente a [M-15]<sup>+</sup> ion formado por la pérdida de un grupo metilo, común en derivados sililados,<sup>16</sup> por lo que con la diferencia de 15 uma se determina que el compuesto **3** corresponde a Monopalmitina, adicionalmente se comparó el perfil de masas con el reportado en la literatura para el derivado sililado de la Monopalmitina preparado a partir del acil glicerol presente en el extracto hexánico de *Withania somnifera*.<sup>16</sup> En la Figura 1 se presentan las estructuras de los compuestos aislados de las fracciones activas de las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum*.



**Figura 1.** Compuestos aislados de *P. septuplinervium* (**1-5**) y *P. subtomentosum* (**6-9**)

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos **1**, **2**, **5**, **6** y **7** muestran una señal simple en δ 13,90, 12,10, 12,08, 12,80 y 12,10 respectivamente, lo cual es característico para un hidrógeno quelatado con un grupo carbonilo, comportamiento común en compuestos de tipo flavonoide,<sup>14</sup> el cambio observado en el desplazamiento de esta señal es dependiente de si el carbonilo está o no conjugado ya que la presencia de un carbonilo α-β insaturado produciría la protección del protón fenólico y por ende su desplazamiento hacia campo alto con respecto a la ubicación que se evidencia en ausencia del sistema insaturado en la estructura, por lo que la posición de la señal en el

espectro da un indicio del tipo de núcleo flavonoide al que corresponde el compuesto. Lo anterior es confirmado con los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **1**, **2**, **5**, **6**, y **7**, en los que se observa una señal en 206 ppm, 177 ppm, 181 ppm, 182 ppm, y 195,7 ppm respectivamente, que por comparación con los experimento DEPT corresponde a un carbono cuaternario que de acuerdo al desplazamiento es característico de un carbono carbonílico.<sup>24</sup> El valor del desplazamiento del carbono carbonílico en RMN  $^{13}\text{C}$  da un indicio del tipo de núcleo flavonoide ya que la presencia de enlaces múltiples, junto a la existencia del anillo de  $\gamma$  pirona y la O- sustitución cercana al carbonilo, hace que los efectos generados por dobles enlaces y la presencia de grupos electrodoadores protejan el carbono carbonílico y varíe así el desplazamiento de la señal de esté en el espectro. Teniendo en cuenta el valor del desplazamiento del carbonilo en los compuestos de núcleo flavonoide aislados en este trabajo se concluye que de mayor a menor desplazamiento se encuentran: dihidrochalconas (**1**) > flavanonas (**7**) > flavonas (**5,6**) > flavonoles (**2**).

Además de determinar la presencia y el tipo de núcleo flavonoide, los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y los espectros de masas permitieron establecer el tipo de sustitución de los anillos aromáticos en la estructura de los flavonoides. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos **1**, **2**, **5**, **6**, y **7** muestran en cada caso dos señales dobles en:  $\delta$  5,97 (d, 2,2 Hz, 1H) /  $\delta$  6,00 (d, 2,2 Hz, 1H);  $\delta$  6,29 (d, 2,0 Hz, 1H) /  $\delta$  6,57 (d, 2,1 Hz, 1H);  $\delta$  6,21 (d, 1,6 Hz, 1H) /  $\delta$  6,5 (d, 1,6 Hz, 1H);  $\delta$  6,37 (d, 2,3 Hz, 1H) /  $\delta$  6,49 (d, 2,3 Hz, 1H); y  $\delta$  6,06 (d, 2,3 Hz, 1H) /  $\delta$  6,07 (d, 2,3, 1H) respectivamente, las cuales teniendo en cuenta el valor de las constantes de acoplamiento indican que en todos los metabolitos en mención existen dos protones ubicados en posición meta sobre anillo aromático acoplado entre sí. El análisis de los espectros de masas por impacto electrónico de los compuestos **1**, **2**, **5**, y **7** evidenció la presencia de un ión  $m/z = 91$  correspondiente al ion tropilio, el cual se genera por la ruptura típica del enlace formado entre los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  al carbono carbonílico del flavonoide,<sup>25</sup> el valor de la masa de este ión indica que el anillo aromático proveniente biosintéticamente del fragmento de shiquimato no está sustituido, por lo que los protones con acoplamiento meta que se evidencian en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  deben ubicarse sobre el anillo aromático proveniente biosintéticamente del tricetido para la formación de flavonoide.

La actividad insecticida de los compuestos **1-9** fue evaluada usando larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda*, todos los compuestos fueron ensayados en el rango de 0,5 a 500 ppm; en el ensayo se usaron como controles relativos acetona R.A. y DMSO R.A., como control absoluto dieta artificial,<sup>12</sup> y como controles positivos dos insecticidas comerciales ampliamente usados para el control de gusano cogollero en diferentes cultivos en Colombia: Lorsban y XenTari; el primero es un insecticida químico fabricado por DOW Agrosience® y cuyo componente activo es Clorpirifos, un organofosforado neurotóxico que inhibe la acetil colinesterasa. XenTari es un insecticida biológico, cuyo componente activo es una mezcla de  $\delta$ -endotoxinas extraídas de *Bacillus thuringiensis*, activas por ingestión contra diferentes especies de insectos plagas de los órdenes Lepidoptera, Coleóptera, Díptera e Himenóptera. En la Tabla 1 se resumen los valores de  $\text{CL}_{50}$  calculados por medio del programa Probit para cada uno de los compuestos aislados y los controles utilizados en el ensayo.

Los resultados de  $\text{CL}_{50}$  calculados muestran que los compuestos que presentan la mayor actividad son en su orden el flavonol Galangina (**2**), el derivado de ácido benzoico Ácido Protocatequico (**8**), la flavona Crisina (**5**), y el esteroil glicosidado Daucosterol (**9**); es importante anotar que los dos primeros poseen una  $\text{CL}_{50}$  inferior al insecticida biológico utilizado como control positivo en el ensayo. Estudios previos han evidenciado la actividad insecticida de los

compuestos **5** y **9**; la flavona Crisina posee actividad antialimentaria contra larvas de *Spodoptera litura*,<sup>26</sup> plaga de diferentes cultivos en Europa y Asia entre los que se cuentan algodón, maíz y vegetales de la familia Cucurbitaceae. El esteroil glicosidado Daucosterol produce efecto tóxico sobre los adultos del gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera) generando altos niveles de mortalidad post ingestión.<sup>27</sup> La actividad insecticida de los compuestos **2** y **8** no ha sido previamente reportada, sin embargo compuestos con estructura muy similar flavonoles y derivados de ácido polihidroxilados han presentado actividad insecticida sobre larvas de *S. frugiperda*,<sup>28</sup> dichos compuestos comparten la característica de tener sobre su estructura más de dos OH fenólicos, lo cual es un factor determinante en el efecto que ejercen sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda* teniendo en cuenta que los estados redox de los compuestos polifenólicos parecen influir en su capacidad para inducir daño molecular oxidativo ya que pueden generar una inhibición irreversible de la enzima citostólica glutation S-transferasa (GST).<sup>29</sup> GST pertenece a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, que regula el sistema antioxidante de esta, de tal forma que dicha inhibición compromete la capacidad del insecto de protegerse en forma eficaz contra el estrés oxidativo, como efectivamente se ha comprobado en especies de Lepidópteros.<sup>30</sup>

Múltiples investigaciones sugieren que los compuestos de tipo flavonoide están involucrados en el comportamiento alimentario de diferentes órdenes de insectos,<sup>31</sup> existe evidencia de que larvas de Lepidópteros tienen receptores del gusto que responden a los compuestos fenólicos sin embargo aunque no se conoce bien la especificidad de estos receptores, es claro que los compuestos de tipo flavonoide son activos contra larvas de especies de *Spodoptera*.

**Tabla 1.**  $\text{CL}_{50}$  de los compuestos aislados de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre *S. frugiperda*

Sustancia ensayada	$\text{CL}_{50}$ (ppm)
Dieta Artificial	No se obtuvieron individuos muertos
Acetona R.A.	No se obtuvieron individuos muertos
DMSO R.A	No se obtuvieron individuos muertos
Lorban	1,702 *(0,721-2,870)
Xen Tari	28,14 *(21,64-38,14)
Uvangoletina ( <b>1</b> )	126,9 *(98,12-167,8)
Galangina ( <b>2</b> )	13,63 *(10,05-17,44)
Monopalmitina ( <b>3</b> )	257,96 (184.,17-412,30)
N- <i>p</i> -Coumaroil Tiramina ( <b>4</b> )	108,0 (85,99- 143,26)
Crisina ( <b>5</b> )	28,79 *(19,85-39,37)
5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona ( <b>6</b> )	85,77 *(66,88-110,2)
Pinostrobin ( <b>7</b> )	141 *(111,8-178,3)
Ácido Protocatequico ( <b>8</b> )	17,16 *(13,20-21,57)
Daucosterol ( <b>9</b> )	44,47 *(34,78-55,98)

\*Rango de límites de confianza 95%.



En el 2003 Morimoto y colaboradores reportaron<sup>26</sup> la actividad antialimentaria de cromonas y sus flavonas análogas contra la especie *Spodoptera litura* originaria de Europa; observando que la presencia de un sustituyente voluminoso en la posición 2 de la cromona (estructura de las flavonas) incrementa la actividad, muchos son los estudios que demuestran la actividad de los diferentes núcleos de flavonoides con diferentes sustituciones sobre larvas de *Spodoptera litura* como de *Spodoptera frugiperda* especie similar pero de origen americano.<sup>32</sup> La presente investigación es el primer reporte de flavonoides aislados de especies del género *Piper* con actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, sin embargo es importante tener en cuenta que es ampliamente reportada la potente actividad de amidas aisladas de especies de este mismo género contra diferentes tipos de insectos, entre ellos larvas de *Spodoptera spp.*<sup>5,7,33</sup>

## CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio evidencian que las especies *P. septuplinervium* y *P. submentosum* son principalmente fuente de compuestos de tipo flavonoide y polifenoles capaces de interrumpir procesos bioquímicos normales de las células produciendo la muerte de estas y por ende la muerte de las larvas de *S. frugiperda*, de tal forma que tanto los compuestos puros como los extractos de las especies vegetales objeto de estudio pueden ser candidatos para estudios más avanzados en donde se evalúen los efectos sobre el ciclo de vida del insecto, los efectos producidos escalando sobre plántulas de maíz (cultivo más afectado por el insecto plaga) en condiciones controladas y/o de invernadero.

## REFERENCIAS

- Macías, F.; Galindo, J. L.; Galindo, J. C.; *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2917.
- Dyer, L.; Palmer, A.; *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution*, 1<sup>st</sup> ed.; Kluwer Academic Plenum Publishers: New York, 2004.
- Regnault-Roger, C.; Philogene, B.; Vincent, C.; *Biopesticidas de origen vegetal*, 1<sup>st</sup> ed., Ed. Tec&Doc-Lavoisier: Paris, 2003.
- Scott, I.; Jensen, H.; Philogene, B.; Arnason, J.; *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 65; Bernard, C. B.; Krishnamurthy, H. G.; Chauret, D.; Durst, T.; Philogene, B. J. R.; Sanches-Vindas, P.; Hasbun, C.; Poveda, L.; San Roman, L.; Arnason, J. T.; *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 801; Chauret, D.; Bernard, C.; Arnason, J.; Durst, T.; *J. Chem. Ecol.* **1996**, *59*, 152.
- Parmar, V.; Jain, S.; Bisht, K.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.; Prasad, A.; Wengel, J.; Olsen, C.; Boll, P.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 597.
- Srivastava, S.; Gupta, M.; Prajapati, V.; Tripathi, A.K.; Kumar, S.; *Pharm. Biol.* **2001**, *39*, 226; Jensen, H.; Scott, I.; Sims, S.; Trudeau, V.; Arnason, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1289; Park, B.; Lee, S.; Choi, W.; Jeong, C.; Song, C.; Cho, K.; *Crop Protection* **2002**, *21*, 249.
- do Nascimento, J. C.; de Paula, V. F.; David, J. M.; David, J. P.; *Quim Nova* **2012**, *35*, 2288.
- Monnerat, R.; Martins, E.; Queiroz, P.; Orduz, S.; Jaramillo, G.; Benintende, G.; Cozzi J.; Real, D.; Martinez-Ramirez, A.; Rausell, C.; Cerón, J.; Ibarra, J.; Del Rincón, C.; Espinoza, A.; Meza, L.; Cabrera, L.; Sanchez J.; Soberon, M.; Bravo, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7026.
- <http://www.corpoica.gov.co>, visitada en Diciembre 2011; <http://www.dowagro.com/co/productos/insectici.htm>, visitada en Diciembre 2011; <http://bayercropscience.com.co/web/index.aspx>, visitada en Diciembre 2011.
- Drifjout, F.; Morgan, D.; *Comprehensive Natural Products*, Vol. 4, Cap. 11, 1<sup>st</sup> ed., El Sevier Academic Press: New York, 2010.
- López, S.; Rojas, A.; Ospina, S.; Cerón, J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *302*, 93.
- Cerón, J.; Bravo, A.; *Bacillus thuringiensis* en el control biológico, 1<sup>st</sup> ed., Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, 2004.
- Finney, D. J.; *Probit analysis*; Cambridge University Press: Cambridge UK, 1971.
- Ávila, M.; Patiño, O.; Prieto, J.; Delgado, W.; Cuca, L.; *Rev. Col. Quím.* **2011**, *40*, 25.
- Facundo, V.; Morais, S.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 111.
- Bhathia, A.; Bharti, S.; Tewari, S.; Sidhu, P., Roy, R.; *Phytochemistry* **2013**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.013>.
- Singh, S.; Prasad, C.; Olsen, C.; Jha, A.; Jain, S.; Parmar, V.; Wengel, J.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1355.
- Shimura, H.; Matsuura, M.; Takada, N.; Kodo, Y.; *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1442.
- Plazas, E.; Cuca, L.; Delgado, W.; *Rev. Col. Quím.* **2008**, *37*, 135.
- Abdelwahab, S.; Mohan, S.; Abdulla, M.; Sukari, M.; Abdul, M.; Taha, M.; Syam, S.; Ahmad, S.; Lee, K.; *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *137*, 963.
- An, L.; Guan, S.; Shi, G.; Bao, Y.; Duan, Y.; Jiang, B.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 436.
- Viqar, A.; Anwer, B.; *Spectroscopy data of Steroid Glycosides*, Springer, 2007. D.O.I. 10.1007/978-0-387-39571-5\_552.
- Herebian, D.; Hanisch, B.; Marner, F. J.; *Metabolomics* **2005**, *1*, 317.
- Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M.; *Organic Structure Analysis*; Oxford University Press: New York, 2010.
- Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H.; *The Flavonoids*; Chapman and Hall: London, 1980.
- Morimoto, M.; Tanimoto, K.; Nakano, S.; Ozaki, T.; Komai, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 389.
- Sosa, M.; Tonn, C.; *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 3.
- Yu, S.; Abo-Elghar, G.; *Pestic. Biochem. Physiol.* **2000**, *68*, 173.
- Sahu, S.; Gray, G.; *Cancer Lett.* **1996**, *104*, 193.
- Summers, C.; Felton, G.; *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *24*, 943.
- Simmonds, M.; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 245.
- Romanelli, G.; Virla, E.; Duchowicz, P.; Gaddi, A.; Ruiz, D.; Bennardi, D.; Del Valle, E.; Autino, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6290; Gallo, M.; Rocha, W.; da Cunha, U.; Diogo, F.; da Silva, F.; Vieira, P.; Vendramim, J.; Fernandes, J.; da Silva, F.; Batista-Pereira, L.; *Pest Management Science* **2006**, *62*, 1072; Diaz, G.; Carpinella, M.; Palacios, S.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3669; Wu, X.; Song, Z.; Xu, H.; Zhang, H.; Chen, W.; Liu, H.; *Fitoterapia* **2012**, *83*, 732.
- Kitayama, T.; Yasuda, K.; Kihara, T.; Ito, M.; Fukumoto, H.; Morimoto, M.; *Appl. Entomol. Zool.* **2013**, D.O.I. 10.1007/s13355-013-0204-4; Boonen, J.; Bronselaer, A.; Nielandt, J.; Veryser, L.; De Tré, G.; De Spiegeleer, B.; *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *142*, 563.