

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS FRENTE A *TENEBRIO MOLITOR* L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Oscar S. Giordano\*, Marta E. Sosa y Carlos E. Tonn

INTEQUI (CONICET - Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis). Chacabuco y Pedernera, (5700) San Luis, Argentina. \*E-mail: ogiord@unsl.edu.ar.

### Resumen

Actualmente el estudio de la interacción entre metabolitos secundarios de plantas e insectos es un importante aspecto de la ecología química. Es conocido que las plantas han desarrollado elaborados mecanismos de defensa contra los ataques de insectos. Esta situación da lugar al interés creciente por conocer nuevos productos biológicamente activos procedentes del reino vegetal.

Como parte de nuestras investigaciones sobre productos naturales de plantas, se ha realizado un estudio sistemático de las interacciones aleloquímicas entre compuestos provenientes de las familias Asteraceae y Labiatae frente a larvas de *Tenebrio molitor* L.

Se han determinado relaciones entre la estructura y la actividad antialimentaria de furanoditerpenos de núcleo clerodano, encontrándose que sistemas  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturados o sistemas oxiranos sobre C-4-C-18, aciloxi en C-19, C-6 y C-12, son necesarios para elicitación de la actividad antialimentaria y repelente.

Se ha evaluado la actividad tóxica de lactonas sesquiterpénicas y la incidencia de fenilpropanoides y alilfenoles sobre el desarrollo de *T. molitor*. Finalmente, hemos estudiado el efecto aleloquímico de un grupo de flavonoides, estableciéndose una relación entre la bioactividad y la presencia de sistemas tipo catecol en el anillo B.

Podemos concluir que *T. molitor* L. es un insecto sensible a productos naturales de plantas.

Palabras clave: Aleloquímicos; lactonas sesquiterpénicas; diterpenos; fenilpropanoides; flavonoides; *Tenebrio molitor*.

### Abstract

Nowadays the study about allelochemical interactions between insects and plant-secondary metabolites is an important subject in chemical ecology. It has been demonstrated that plants have developed highly elaborate chemical defense against insect attacks. This fact provides a rich source of plant biologically active compounds.

As part of our research on plant natural products, we started a systematic investigation about the bioactivities of secondary metabolites and chemical derivatives from Asteraceae and Labiatae families toward *Tenebrio molitor* L. larvae.

Trabajo presentado con motivo de la entrega del premio "Venancio Deulofeu" en Química de Productos Naturales, al Dr. Oscar S. Giordano, el 12 de noviembre de 1999.

A structure-antifeedant activity relationship study on several clerodane type diterpenes has been carried out. Results suggested that among the furanditerpenes tested, the possession of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone moiety or a C-4-C-18 epoxy with C-19 acetyloxy or C-12 acyloxy substitution are essential for imparting both, antifeedant and repellent activities.

The toxicity of sesquiterpene lactones was determined. The comparison showed that both, conjugated  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone system and  $\alpha,\beta$ -cyclopentenone ring were important for the allelochemical activity.

On the other hand bioactivities of phenylpropanoids, allylphenols and chemical derivatives on the larvae-pupae metamorphosis of the mealworm aforementioned have been examined. Finally the allelochemical effect of a flavonoid series was studied; the observed results showed that the more active compounds exhibited a cathecol system on B-ring.

We can conclude that *T. molitor* L. is a plant-natural products sensitive insect at the larvae stage.

Key words: Allelochemicals; sesquiterpene lactones; diterpenes; phenylpropanoids; flavonoids; *Tenebrio molitor*.

## Introducción

La producción de metabolitos secundarios por parte de plantas superiores ha merecido distintas interpretaciones y en el pasado fueron considerados como productos de deshecho del metabolismo primario y sin importancia vital para las mismas. Sin embargo, hacia finales de la década del cincuenta se sugirió que este tipo de compuestos estaría relacionado con el comportamiento alimentario de los insectos [Fraenkel, 1959].

En la actualidad es aceptado el variado rol que estos productos desempeñan en la interacción planta-insecto, actuando como tóxicos, repelentes, inhibidores del desarrollo o agentes antialimentarios [Harborne, 1988, 1991, 1993; Ley, 1990; Nahrstedt, 1988]. Así es posible suponer que la coevolución de insectos y plantas ha dado origen a una serie de estrategias defensivas por parte de éstas que han afectado la evolución de los primeros.

La necesidad de proteger fuentes alimentarias del ataque de insectos perjudiciales mediante el uso de medios ecológicamente aceptables, ha orientado las investigaciones a la búsqueda de productos naturales modificadores del comportamiento de insectos plaga. En este camino, las investigaciones interdisciplinarias ya han aportado a los productores sistemas para la protección de cultivos

basados en el control de la alimentación de los insectos (*antifeedants*) tales como el tetranortriterpeno azadiractina (extractos de Neem), warburganal y amidas del ácido crisantémico [Frazier & Chyb, 1995].

La evaluación de una determinada actividad biológica propia de una familia de compuestos estructuralmente relacionados, permite profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad. Esta información puede ser utilizada en la programación de síntesis orgánicas de productos de selectividad comprobada, de bajo impacto ambiental y accesibles desde un punto de vista económico.

## Actividad antialimentaria de neo-clerodanos

Entre las diversas bioactividades elicitadas por los metabolitos secundarios de plantas frente a larvas de insectos (*aleloquímicos*) se encuentra su influencia en el comportamiento alimentario de los mismos. Productos que afectan a esta variable fisiológica son clasificados en dos grandes grupos: *fagoestimulantes* e *inhibidores de la alimentación*. En relación a los segundos, se utilizan, a veces en forma confusa, los términos *deterrente*, *antialimentario*, *repelente gustatorio* e *inhibidores de la alimentación*. En la práctica las expresiones fagoestimulante y antialimen-

tario son los términos más comunmente utilizados. Sin embargo, estas expresiones no pueden ser aplicadas en forma categórica a un producto químico ya que su comportamiento dependerá, entre otras variables, de la concentración, las condiciones del ensayo, del estado fisiológico del insecto y especie utilizada en la evaluación. Tan es así que un producto, dependiendo de las condiciones señaladas, puede actuar como deterrente, fagoestimulante o no poseer bioactividad detectable alguna [Lewis & van Emden, 1986]. Si bien los diterpenoides ocurren asiduamente en la familia Asteraceae son también frecuentes en la familia Labiatae. En el primer caso, el género *Baccharis* y en el segundo los géneros *Ajuga*, *Teucrium*, *Scutellaria* y *Salvia*, resultan ser especialmente ricos en diterpenos de tipo clerodano, **1** (Figura 1) y varios son conocidos por sus propiedades frente a insectos [Merritt & Ley, 1992]. Interesantes resultados en el estudio de la actividad antialimentaria de este tipo de diterpenos han sido alcanzados cuando se ha evaluado esta propiedad frente a larvas de algunos Noctuidos tales como *Spodoptera littoralis*, *S. exempta* y *Heliothis armigera*. En este sentido Ajugarina I, **2**, resultó ser uno de los primeros casos informados de esta actividad [Kubo & Nakanishi, 1979].

Estudios sobre diterpenos de núcleo clerodano procedentes de los géneros *Ajuga* [Belles *et al.*, 1985] y *Teucrium* [Simmonds *et al.*, 1989; Urones *et al.*, 1995] permitieron es-

tablecer relaciones estructura-actividad identificando los grupos funcionales y rasgos estructurales fundamentales para la elicitación del mecanismo antialimentario. En este contexto se ha señalado que la actividad antialimentaria en *neo-clerodanos* se relaciona con un bicyclo *trans*-decalina que presente un sistema *spiro*-epoxi en C-4 y dos grupos acetato en C-6 y C-19. En algunos casos la presencia de un anillo furofurano en la cadena lateral de C-9 coadyuva a la bioactividad mediante fenómenos sinérgicos; sin embargo, análogos sintéticos tales como **3**, incluidos en la Figura 1, no han presentado resultados similares a los alcanzados con los productos naturales.

En nuestro laboratorio estamos abocados desde hace alrededor de veinte años al aislamiento y dilucidación estructural de diterpenos del tipo *neo-clerodano* y *ent-neo-clerodano* obtenidos en estudios fitoquímicos de especies de los géneros *Baccharis*, *Teucrium* y *Salvia*. Los *neo-clerodanos* **4-6**, que se presentan en Figura 2 fueron aislados de *Baccharis crispa* Sprengel, una Compuesta ampliamente difundida en la región centro-oeste del país [Tonn *et al.*, 1979; Tonn y Giordano, 1980; Ceñal *et al.*, 1997], el diterpeno **7** fue aislado de *Baccharis articulata* H. et A. [Gianello y Giordano, 1982] y este mismo producto conjuntamente con su 6 $\alpha$ -hidroxiderivado, a partir de *Baccharis spicata* (Lam.) Beill. [Gallardo V. *et al.*, 1996]. El diterpeno **10**, con un sistema butanólido en cadena la-

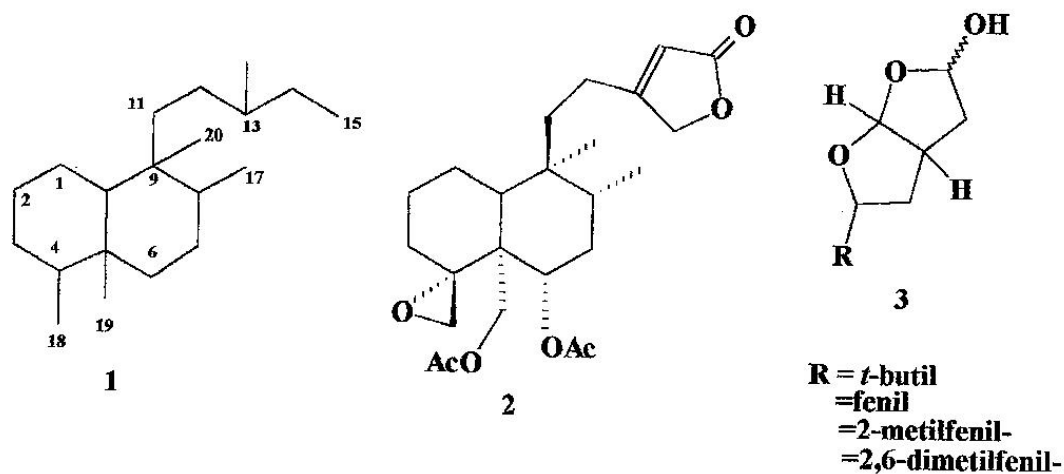


Fig. 1.

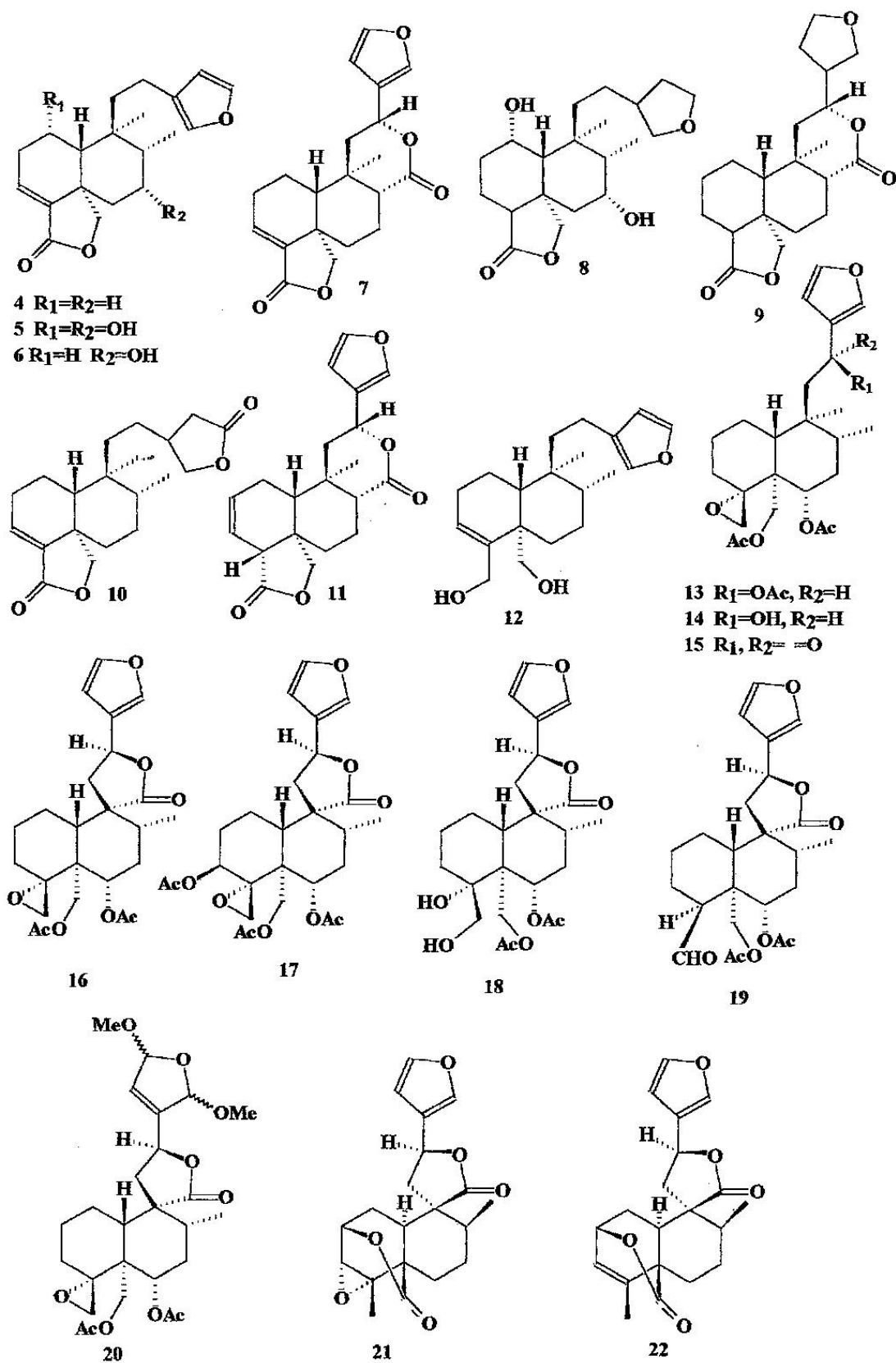


Fig. 2.

teral, fue aislado de partes aéreas de *Baccharis grisebachii* H. A. [Gianello y Giordano, 1989].

Entre los *ent-neo-clerodanos* presentes en extractos de *Salvia reflexa* Hornem., estudiada en nuestro laboratorio, se han aislado salviarina, **11**, y sus 7 $\alpha$ - y 8 $\beta$ -hidroxide-derivado, además de 7,8-didehidrorhyacofilina, un nuevo 5,6-*seco-clerodano* de esqueleto rhyacofano [Nieto *et al.*, 1996]. Los furanoditerpenos **13** y **16** fueron obtenidos en un estudio fitoquímico realizado sobre la única especie del género *Teucrium* presente en la Región de Cuyo, *T. grisebachii* H. et A. [Tonn *et al.*, 1990], mientras que el producto **17** (12 *epi-teupirina*), conjuntamente con **13** y **16**, fueron aislados como principales componentes diterpénicos de *T. nudicaule* H. proveniente de la región de Antofagasta, Chile [Gallardo V. *et al.*, 1996]. Finalmente, los *ent-neo-clerodanos* **21** y **22**, con un sistema *spiro-lactona* en C-9, fueron obtenidos a partir de hojas y tallos tiernos de *Baccharis artemisioides* H. et A. [Tonn *et al.*, 1988, 1989].

En función de la actividad antialimentaria frente a larvas de *Tenebrio molitor* L., detectada para cada uno de estos productos naturales, se planificaron diversas reacciones de transformación selectiva de grupos funcionales con el objetivo de evaluar su incidencia en la misma. Así, la hidrogenación catalítica (C-Pd, EtOAc, 2.5 atm.) de **5** y **7** permitió disponer de los productos **8** y **9**, respectivamente. La reducción con LiAlH<sub>4</sub>-THF a temperatura ambiente condujo al derivado **12** (kingidiol) idéntico al obtenido previamente en nuestro laboratorio por hidrólisis del correspondiente diéster malónico (C-18) y acetato (C-19) [Gianello y Giordano, 1982].

El tratamiento del triacetato **13** con NaH en MeOH durante unos pocos minutos a 0° C, permitió la hidrólisis selectiva del éster en C-12 recuperándose con buen rendimiento el alcohol **14** y la oxidación de éste con reactivo de Jones condujo al 12-ceto derivado **15**.

Sobre el anillo oxirano en C-4-C-18 del furanoditerpeno **16** se practicaron reacciones de apertura: la primera, inducida por BF<sub>3</sub>-eterato, dio lugar al diol **18**, mientras que el tratamiento con Et<sub>2</sub>O saturado con HCl<sub>(g)</sub> condujo al aldehído **19** siguiendo la vía del enol

correspondiente. Finalmente la bromación de **16** en metanol a -20°C, seguida de la solvólisis a 25°C del derivado dibromado, permitió obtener una mezcla de metoxicetales epímeros en C-15 y C-16 [Gallardo V. *et al.*, 1996; Browner Floyd, 1978].

## Bioensayos

### 1. Cálculo del Porcentaje de Inhibición Alimentaria (PIA)

El efecto antialimentario de algunos de los productos presentados en la Figura 2 fué determinado utilizando un método puesto a punto en nuestro laboratorio [Sosa *et al.*, 1994]. El compuesto a ensayar (a una concentración de 100 ppm) se emulsiona en una mezcla de H<sub>2</sub>O-MeOH-Me<sub>2</sub>CO 90:5:5 conteniendo 0,1 % de Tritón CS-7 con ayuda de ultrasonido [Lidert *et al.*, 1985] y con 100  $\mu$ l de esta suspensión se topican rodajas de zanahoria (*Daucus carota* L. var. *sativa* DC) de 2,5 cm de diámetro y 0,5 cm de espesor. Las rodajas control sólo se topican con el solvente. Una vez evaporado el solvente, seis rodajas control y seis experimentales son pesadas y separadamente colocadas en cajas plásticas con veinte larvas del tercer estadio de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Las rodajas son pesadas y renovadas cada 24 hs durante diez días. La actividad es expresada como *Porcentaje de Inhibición Alimentaria* (PIA) [Reed & Jacobson, 1983] según la fórmula:

$$PIA = (\% \text{ consumido en rodajas tratadas}) \times 100 / (\% \text{ consumido en rodajas tratadas} + \% \text{ consumido en rodajas no tratadas})$$

Estos experimentos fueron repetidos ocho veces, por duplicado, para cada compuesto ensayado. Los niveles de significancia estadística se determinaron por ANOVA. Un valor de PIA entre 0 y 35 se considera significativo. A mayor valor de PIA corresponde menor actividad y resultados del orden de 50 señalan carencia de actividad.

### 2. Ensayo de elección (deterrencia)

Este procedimiento se realiza usando tres rodajas tratadas y tres no tratadas las

que se colocan en cajas plásticas y, en el centro, se ubican veinte larvas. Luego de 24 hs se cuenta el número de larvas ubicadas debajo de cada tipo de rodajas. Los resultados se expresan como *Porcentaje de larvas bajo los discos tratados*. Cada valor es obtenido sobre un promedio de cinco experimentos con dos

repeticiones por compuesto. Los datos observados se tratan por el estadístico  $\chi^2$ .

### 3. Resultados

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en el bioensayo realizado para evaluar propiedades antialimentarias de los

Tabla 1

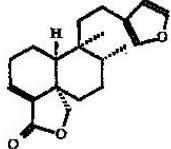
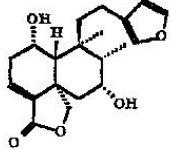
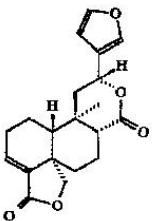
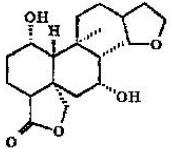
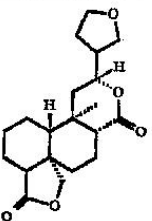
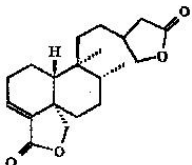
Compuesto		PIA ( $\pm$ DS) (%) <sup>*</sup>
4		30.9 (4.8)*
5		31.2 (4.2)*
7		22.6 (4.6)*
8		48.3 (6.6)
9		49.4 (2.80)
10		62.6 (3.8)

Tabla 1 (continuación)

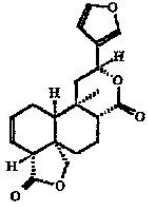
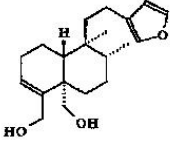
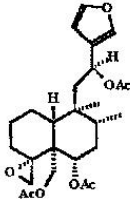
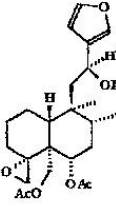
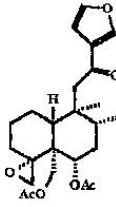
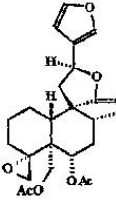
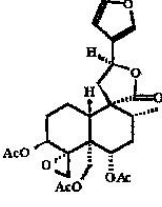
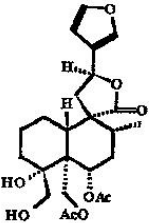
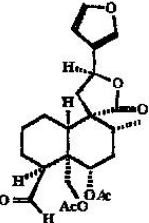
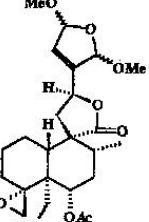
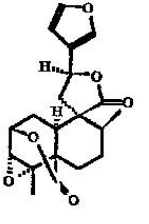
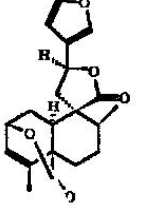
11		47.3 (4.7)
12		48.7 (5.8)
13		31.4 (3.2)*
14		62.5 (3.3)
15		57.9 (5.0)
16		25.0 (3.7)*
17		30.73 (5.2)*

Tabla 1 (continuación)

18		45.0 (4.8)
19		41.0 (4.6)
20		47.3 (3.9)
21		57.0 (3.8)
22		62.7 (6.4)
* Compuestos considerados activos		

distintos clerodanos, tanto naturales como derivados.

Como puede observarse, los diterpenos más activos pertenecen a la serie *neo*-clerodanos y en general podemos dividir a estos compuestos en dos grandes grupos de acuer-

do al tipo de funcionalización presente; en la Figura 3 se presentan los mismos. En una primera aproximación, el primer grupo bioactivo está constituido por aquellos diterpenos que presentan un sistema  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturado en el anillo A de la porción decali-



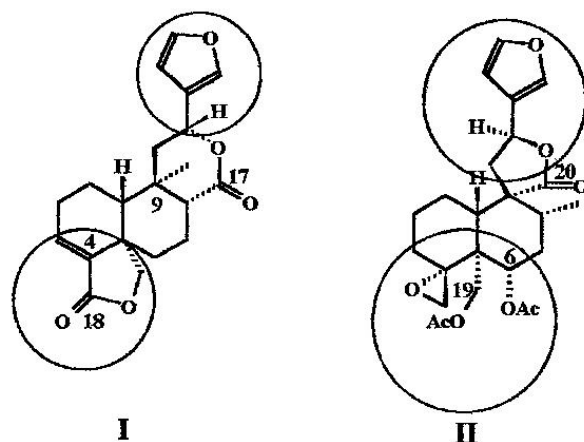


Fig. 3.

na y un sistema  $\beta$ -furilo en la cadena lateral, presentando C-12 como grupo metileno o bien oxidado formando parte de una lactona. El segundo tipo está representado por diterpenos en los que el sistema lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ha sido reemplazado por un anillo oxirano comprometiendo a C-4 $\alpha$ -C-18 en el anillo A y adicionalmente presentan grupos acetato en C-6 $\alpha$  y C-19 (II) y funciones oxigenadas en C-12.

Trabajando con los diterpenos del tipo I, en particular con **5** (bacrispina), se observa que la hidrogenación catalítica que conduce a **8**, está asociada a una pérdida de la bioactividad. Otro tanto ocurre con la hidrogenación de bacchotricuneatina A, **7**, el perhidroderivado obtenido también resulta inactivo. La necesidad de coexistencia de las funcionalidades  $\gamma$ -butirolactona- $\alpha,\beta$ -insaturada y del anillo furano como probables requisitos estructurales, comienza a ser evidenciada al observar los resultados obtenidos con el butanólido **10**, puesto que éste en lugar de actividad antialimentaria pareciera evidenciar propiedades de fagoestimulante. Pruebas adicionales han sido obtenidas al analizar el comportamiento de salviarina **11** ya si bien la funcionalización  $\delta$ -lactona entre C-17-C-12 es similar tanto en conectividad como en esteoquímica con el compuesto **7**, su inactividad obedecería a que el doble enlace en el anillo A no está conjugado con la lactona C-18-C-19. Esta observación estaría de acuerdo con

la pérdida de actividad observada en el compuesto **12**, obtenido por reducción de **4** con  $\text{LiAlH}_4$ .

En diterpenos del tipo II, aislados de especies del género *Teucrium*, los resultados obtenidos son acordes a los informados por otros autores sobre larvas de Noctuidos [Simmonds *et al.*, 1989; Malakov, 1994]. En todos los casos en que los valores de PIA resultan estadísticamente significativos está presente el anillo oxirano comprometiendo a C-4 $\alpha$ -C-18 conjuntamente con el anillo furano  $\beta$ -sustituído, tal como en los diterpenos **13**, **16** y **17**.

Sin embargo, cuando el anillo oxirano de **13** sufre apertura inducida por  $\text{BF}_3$ -eterato al diol **18** o bien la transformación del metileno de C-18 en un grupo formilo por tratamiento con  $\text{HCl}_{(g)}$  en  $\text{Et}_2\text{O}$  originando **19**, se observa para ambos productos una manifiesta pérdida de la bioactividad, pese a que el resto  $\beta$ -furilo permanece inalterado. Finalmente el derivado **20**, obtenido mediante un tratamiento con  $\text{Br}_2$  en  $\text{MeOH}$  [Brawner Floyd, 1978], no evidencia actividad alguna pese a mantener inalterado el anillo oxirano. Estas observaciones llevan a postular que serían necesarias dos funcionalizaciones, el anillo oxirano y el grupo  $\beta$ -furilo, para el reconocimiento molecular con el receptor.

Una situación especial la constituyen los diterpenos **14** y **15**, el primero obtenido a partir de **13** por hidrólisis selectiva del aceta-

to en C-12 y el segundo por oxidación de 14 con reactivo de Jones. Tanto el alcohol como el 12-ceto-derivado resultan no activos. Esto se ha intentado explicar mediante estudios del comportamiento electrónico y conformacional de diferentes *neo-clerodanos* [Enriz *et al.* 1994, 2000] que sugieren la necesidad de dos sitios activos separados por 10 Å y la incidencia de factores tales como la flexibilidad conformacional para el ángulo de torsión del sistema β-furilo. No se ha observado una clara correlación entre la actividad antialimentaria sobre el modelo biológico por nosotros utilizados y los coeficientes de hidrofobicidad medidos experimentalmente [Luco *et al.*, 1994].

### Actividad insecticida de lactonas sesquiterpénicas

Uno de los grupos de metabolitos secundarios que ha despertado mayor interés, tanto por el número de estructuras aisladas como por las actividades biológicas detectadas, es el de las lactonas sesquiterpénicas [Picman, 1986]. Estos productos naturales son típicos de especies de *Astereaceae* y a la fecha se conocen más de dos mil estructuras. Entre los diversos núcleos de lactonas aisladas se destacan los denominados germacranólidos, eudesmanólidos, guaianólidos y pseudoguaianólidos.

Como parte del estudio sistemático sobre el comportamiento de larvas de *T. molitor* frente a distintos metabolitos secundarios de plantas que estamos presentando, a continuación se resumen los resultados obtenidos por tratamiento crónico con seis sesquiterpenoides de tipo guaianólido y pseudoguaianólido [Sosa *et al.*, 1995].

#### Compuestos ensayados:

En Figura 4 se consignan Mexicana I, **1** y helenalina **2** que fueron obtenidas a partir de *Gaillardia megapotamica* (Spreng.) Baker var. *radiata* (Del Vitto & Petenatti N° 2841 UNSL). Hymenina, **3**, se aisló de *Parthenium hysterophorus* L. (Del Vitto N° 1672 UNSL). Ludartina, **4**, se obtuvo de *Artemisia douglasiana* (Besser) (Del Vitto N° 55 UNSL). De *Artemisia mendozaana* D.C. var. *paramilloensis* (Ambrosetti, Roig & Del Vitto N° 1442

MERL) se aislaron los sesquiterpenos desacetoximatricarina, **5**, y desacetilmatricarina, **6**.

#### Bioensayo:

La incorporación de los productos naturales en el alimento se realizó suspendiendo 50 g del mismo en 150 ml de acetona destilada que contenían 5,0 mg de la lactona correspondiente. La eliminación del solvente en evaporador rotatorio al vacío, permitió obtener una mezcla homogénea y libre de acetona con una concentración de 100 ppm del producto bajo estudio. Los controles se prepararon de igual forma sin el agregado de las sustancias a ensayar.

Las larvas sometidas a un ayuno previo de 24 hs fueron ubicadas en número de veinte en cajas plásticas tapadas con gasa, en las que previamente se había colocado el alimento correspondiente a cada ensayo. Las observaciones se realizaron cada cinco días determinándose el porcentaje de mortalidad hasta el día veinticinco. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y representan el promedio de diez experimentos por duplicado para cada uno de los productos ensayados. En todos los casos las comparaciones fueron realizadas mediante el estadístico  $\chi^2$  considerando no significativas las diferencias para  $p > 0,05$ .

Las lactonas sesquiterpénicas utilizadas corresponden a los grupos pseudoguaianólido **1-3**, y guaianólido, **4-6**. Con excepción de **5** y **6**, en todas ellas está presente un grupo funcional γ-lactona que posee en C-α un grupo metileno exocíclico. La bioactividad de lactonas sesquiterpénicas es atribuida a este tipo de funcionalización, la que puede comportarse como aceptor de grupos tioles de enzimas que poseen grupos sulfhidrilos libres. Esto ha sido demostrado por la disminución de la actividad enzimática de fosfofructoquinasa y glucógenosintetasa en presencia de lactonas sesquiterpénicas [Picman, 1986]. Sin embargo otros grupos funcionales conjugados, como el anillo ciclopentenona, pueden actuar como sustratos. Tal es el caso de tenulina **8** que si bien no presenta un sistema γ-lactona-α,β-insaturado es activa frente a larvas de *Peridroma saucia* y *Ostrinia orbicularis* [Arnason *et al.*, 1987].

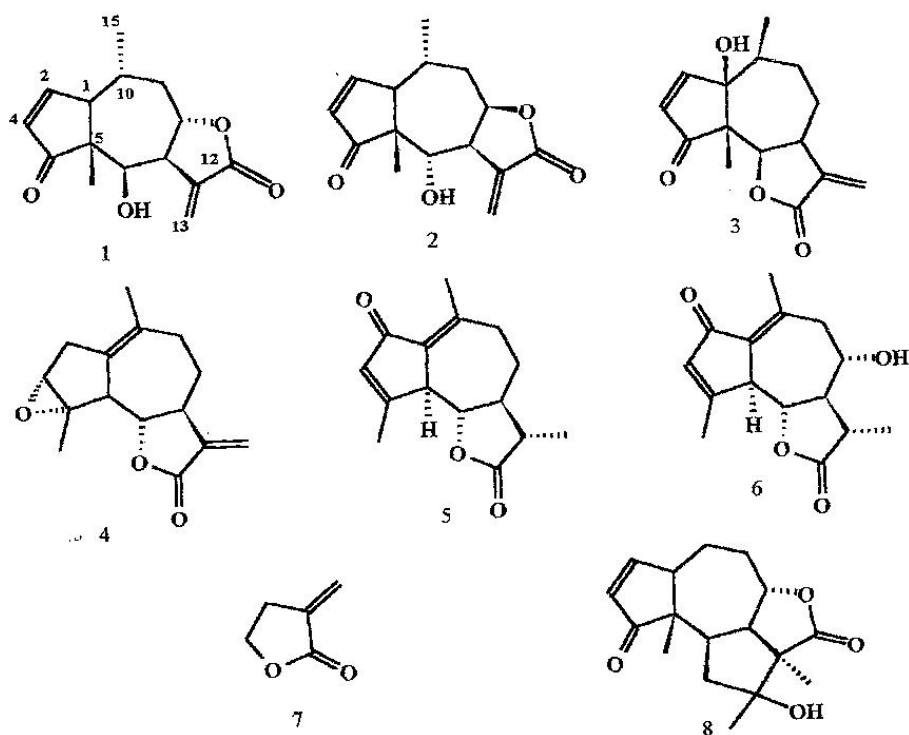


Fig. 4. (1) mexicanina I; (2) helenania; (3) hymenina; (4) ludartin; (5) desacetoximatricarina; (6) desacetilmatricarina; (8) tenulina.

Se observa que el producto natural más activo es **1**, presentando diferencias significativas con **2** y **3**. Es importante destacar que si bien **1** y **2** presentan la misma funcionalización, resultan tener distinta configuración en C-6 y C-8. En **1** el cierre de la lactona es C-8 $\alpha$  y el hidroxilo en C-6 ocupa una posición  $\beta$  mientras que en **2** dichos centros quirales poseen la configuración opuesta.

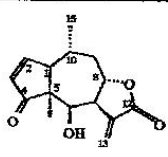
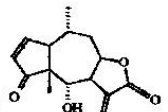
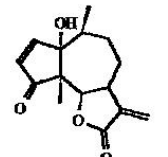
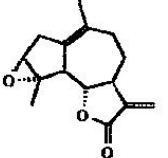
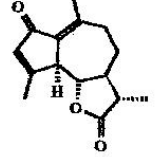
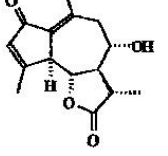
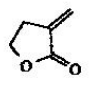
En relación a hymenina, **3**, el cierre de la lactona ocurre en posición C-6 $\beta$  y sin embargo presenta una actividad biológica comparable a helenalina, **2**, con cierre en C-8 $\beta$ . Aparentemente el cierre de la  $\gamma$ -lactona no tendría mayor incidencia en la actividad larvicida; esto ha sido observado también en compuestos análogos frente a larvas de *Heliothis zea* (Boddie) [Isman, 1983].

Cuando el bioensayo se realiza utilizando el producto comercial **7**, en concentración de 100 ppm, no se observan diferencias significativas respecto de mexicanina I, la más tóxica de las lactonas aquí ensayadas. Esto

confirma la importancia que ha sido asignada al anillo lactónico insaturado en la bioactividad.

El segundo grupo de compuestos naturales, ludartina, **4**, desacetoximatricarina, **5**, y desacetilmatricarina, **6**, pertenecen a la serie de los guaianólidos y los bioensayos no muestran diferencias significativas entre ellos. De estos tres compuestos sólo **4** posee un sistema  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona y no presenta el anillo ciclopentenona mientras que los otros dos tienen esta última funcionalización y carecen de sistema lactónico insaturado. Estos resultados no pueden ser explicados satisfactoriamente en base al carácter aceptor de grupos nucleofílicos, en particular tioles, de estos productos. El sistema ciclopentenona en **5** y **6** tiene un grupo metilo en posición  $\beta$  que dificultaría o impediría estéricamente el ataque del nucleófilo. El conocimiento de los mecanismos a través de los cuales estas lactonas sesquiterpénicas ejercen su toxicidad requiere de estudios adicionales.

Tabla 2

Compuesto	Porcentaje de mortalidad±DS				
	Días				
	5	10	15	20	25
 <p>1</p>	15.5 ±5.5	25.0±5.7	33.5±5.8	46.0±4.6	57.0±5.9 <sup>a</sup>
 <p>2</p>	9.0±3.9	17.5±3.5	26.0±3.9	32.5±5.8	44.0±6.1 <sup>b</sup>
 <p>3</p>	10.5±3.7	21.5±4.7	27.0±4.8	35.0±5.3	45.0±8.5 <sup>b</sup>
 <p>4</p>	7.5±7.2	14.0±6.1	20.0±6.2	26.0±9.1	32.5±9.2 <sup>c</sup>
 <p>5</p>	9.5±1.6	17.5±4.2	22.5±6.8	30.0±7.4	36.0±8.4 <sup>c</sup>
 <p>6</p>	9.5±2.8	17.5±4.2	24.5±8.9	30.0±6.6	35.5±8.6 <sup>c</sup>
 <p>7</p>	12.5±4.2	25.5±4.5	33.3±9.3	45.8±9.7	55.8±7.4 <sup>a</sup>
<b>Control</b>	0	0.5±1.5	1.5±2.4	2.0±4.2	3.0±4.2

En base a los datos presentados no es posible determinar si el incremento en la mortalidad en los lotes experimentales se debe a un efecto antialimentario, a una disminución en la transformación de la ingesta en biomasa, a un efecto tóxico post ingesta o a alguna combinación de ellos.

### Bioactividad de benzofuranos, derivados de cromenos y compuestos relacionados

Benzopiranos, benzofuranos y fenilpropanoides están presentes en un número importante de especies de plantas superiores, en particular Astereaceae. Han sido informadas diversas bioactividades tales como acción antitumoral, inhibidores del crecimiento bacteriano y agentes fototóxicos frente a hongos y bacterias [Hegnauer, 1977; Proksch & Rodriguez, 1983]. En este sentido, precoceno I,

1 y precoceno II, 2, Figura 5, un tipo especial de cromenos carentes del grupo metilcetona, han sido descritos como inductores de la diapausa e implicados en los fenómenos de metamorfosis cuando son aplicados por topicación o incorporados en la dieta [Harborne, 1988]. Encecalina, 3, ha sido presentada como la principal defensa química de especies del género *Encelia* [Proksch & Rodriguez, 1984; Isman & Proksch, 1985; Proksch *et al.*, 1987].

Investigaciones intensivas sobre el destino metabólico de encecalina cuando es administrada por topicación a larvas de insectos han sido llevadas a cabo utilizando técnicas de GLC-EM [Kunze *et al.*, 1996].

En nuestro laboratorio hemos evaluado, frente a *T. molitor* L., el efecto de los productos 4-18, aislados de diversas especies de Compuestas u obtenidos por transformación química [Carrizo *et al.*, 1997].

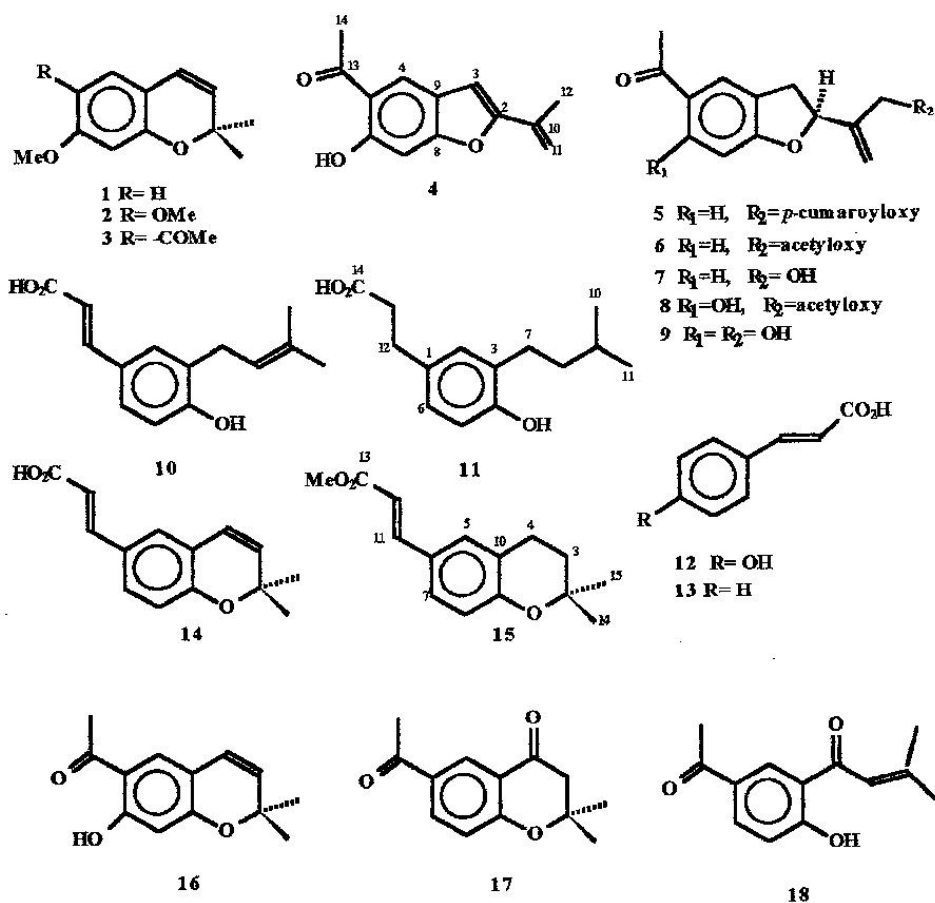


Fig. 5.

**Compuestos ensayados:**

Euparina **4**, fue obtenida a partir de *Flourensia oolepis* [Guerreiro *et al.*, 1979], en tanto que las tremetonas **5-7** se obtuvieron de distintas especies del género *Parastrephia* [Nieto *et al.*, 1994]. Los productos **8, 9, 16-18** aislados de partes aéreas de *Ophryosporus axilliflorus* [Favier *et al.*, 1998]. La tremetona **10** fue obtenida de *Baccharis grisebachii* Hyeronimus [Gianello y Giordano, 1987] y su derivado **11** se obtuvo por hidrogenación catalítica. El cromeno **14** se preparó a partir de **10** mediante reacción con DDQ en mezcla de benceno-1,4-dioxano 1:1 a temperatura ambiente durante un día mientras que el benzopirano **15** se obtuvo vía halociclación con 2,4,4,6-tetrabromo-2,5-ciclohexadienona [Tonn *et al.*, 1988], seguido de eliminación en medio básico para conducir a **14** o de reducción con *n*-Bu<sub>3</sub>SnH /AIBN en benceno por 3 horas para la preparación de **15** (Esquema 1). Los compuestos **12-13** fueron obtenidos comercialmente.

**Bioensayo:**

Se diseñó un bioensayo que permitiera, simultáneamente, determinar el porcentaje de larvas que cumplen el proceso de metamorfosis de larva-pupa y el tiempo de duración de este último estadio. Los productos se aplicaron mediante topicación de 2 µl de una solución acetónica con una concentración de 60 mg/ml. Los controles sólo se topicaron con acetona. Los tiempos de duración del estadio

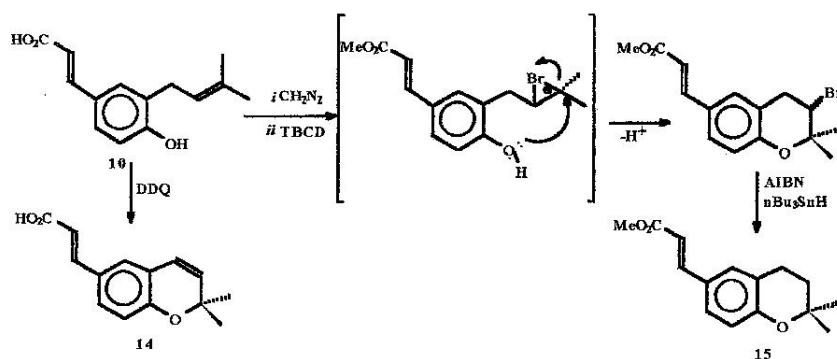
de pupa se registraron en días y se determinó el porcentaje de larvas que cumplieron satisfactoriamente la metamorfosis; asimismo se documentaron aquellos casos en que se produjeron anomalías morfológicas macroscópicas durante este proceso. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante las pruebas de  $\chi^2$  y de Dunnet; los resultados se presentan en Tabla 3.

*Tenebrio molitor* tiene un número variable de estadios larvales durante su desarrollo postembrionario. En este sentido se requiere una cuidadosa selección en base al peso de las larvas con el objeto de minimizar la proporción de estadios larvales inciertos. Se ha informado que larvas entre 120-140 mg de peso pertenecen al último estadio larval [Quennedey & Quennedey, 1993]. En nuestras experiencias se utilizaron larvas cuyo peso quedaba incluido en el intervalo 136.7±23.7 mg.

En un desarrollo normal, está establecido que el período de pupa tiene una duración de nueve días [Quennedey & Quennedey, 1993] y en nuestros experimentos control se obtuvo un valor de 8.6±1.6 días.

Con el objeto de analizar la relación estructura-actividad los compuestos fueron agrupados en tres grupos principales; derivados de benzofurano (**4-9**), derivados del ácido trans-cinámico (**10-13**) y derivados de benzopirano (**14-17**).

De una evaluación previa de la relación dosis-respuesta para el compuesto **5**,



Esquema 1.

Tabla 3

Compuesto <sup>a</sup>	Porcentaje de larvas que pupan <sup>b</sup>	Duración del estadio de pupa <sup>c</sup>
4	83.0 (3.1) <sup>d</sup>	10.5 (2.1) <sup>e</sup>
5	26.0 (0.8) <sup>f</sup>	10.5 (1.0) <sup>e</sup>
6	75.0 (6.5) <sup>f</sup>	9.8 (2.2) <sup>g</sup>
7	75.0 (7.8) <sup>f</sup>	8.6 (0.5) <sup>g</sup>
8	73.3 (2.1) <sup>f</sup>	11.2 (2.3) <sup>f</sup>
9	73.0 (8.1) <sup>f</sup>	11.6 (2.1) <sup>f</sup>
10	63.0 (3.4) <sup>f</sup>	13.0 (1.3) <sup>f</sup>
11	50.0 (8.2) <sup>f</sup>	10.2 (1.3) <sup>e</sup>
12	87.0 (3.4) <sup>g</sup>	10.0 (2.1) <sup>e</sup>
13	92.0 (5.6) <sup>g</sup>	8.7 (1.9) <sup>g</sup>
14	77.0 (6.4) <sup>f</sup>	10.2 (0.9) <sup>e</sup>
15	87.0 (7.1) <sup>g</sup>	7.0 (1.4) <sup>g</sup>
16	66.6 (1.7) <sup>f</sup>	11.5 (2.1) <sup>f</sup>
17	87.0 (1.3) <sup>g</sup>	12.1 (2.4) <sup>f</sup>
18	75.0 (3.8) <sup>f</sup>	11.4 (2.1) <sup>f</sup>
<b>Control</b>	<b>93.0 (6.1)</b>	<b>8.6 (1.6)</b>

<sup>a</sup> Dosis: 120 µg/larva; aplicación tópica.  
<sup>b</sup> Los valores son promedios (SE); n=60. Datos tratados por el test de  $\chi^2$ .  
<sup>c</sup> Los valores, en días, son promedios (SE); n=60. Datos tratados por el test de Dunnet.  
<sup>d,e,f</sup> Diferencias significativas (p<0.05, p<0.01 y 0.001, respectivamente) respecto del control mediante el test de  $\chi^2$  o de Dunnet.  
<sup>g</sup> Diferencias no significativas.

mediante un análisis de probit fue determinada la  $DE_{50}$  = 63.5 µg/larva. Con el objeto de asegurar se alcance la dosis tóxica de cada uno de los productos ensayados se utilizó una dosis de 120 µg/larva considerando que **5** resultaba el compuesto de mayor peso molecular.

En el grupo de los derivados de benzofurano (**4-9**), todos los compuestos mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje de larvas que pupan en el punto final del experimento (30 días); pero la más importante bioactividad la presentó el compuesto **5**. En este caso sólo el 26.0% de las larvas tratadas lograron alcanzar el estado de pupa; el resto típicamente murió en el curso de los diez primeros días.

El cambio en la bioactividad al pasar de **5** a los derivados **6-9** puede ser adjudicado a presencia de un grupo funcional volumino-

so en C-2 (*p*-cumaroiloxy derivado). Ha sido observado que benzofuranos con funcionalización 2-(1'-oxo-5'-metil-4'-hexenil) sobre C-2 resultan insecticidas frente a larvas de *Christoneura fumiferata* Clem. [Findlay *et al.*, 1997].

En el segundo grupo de compuestos analizados (derivados del ácido *trans*-cinámico, **10-13**) los ácidos **12** y **13**, de distribución amplia en la naturaleza, resultaron esencialmente inactivos. El compuesto **10** mostró ambas actividades, tóxico en el último periodo larval y activo sobre la duración del estadio pupal. Sin embargo, cuando el producto **10** fue hidrogenado catalíticamente, el derivado **11** mínimamente afectó la duración del estado pupal pero aumenta la toxicidad.

Teniendo en cuenta la bioactividad de **10**, se prepararon los derivados **14** y **15**. El

primero vía una reacción de ciclación con DDQ [Schmitt, A. *et al.*, 1991] y el segundo vía una halociclación para dar la mezcla de enantiómeros del 3-bromo derivado de **15** seguido de una reducción con  $n\text{Bu}_3\text{SnH}$  [Tonn, C.E. *et al.*, 1988] (Esquema 1). Estos nuevos productos pueden ser agrupados en la serie de derivados de benzopirano (**14-17**).

En este grupo de compuestos, el más activo resultó el cromeno **16** (demetilencecalina). Es conocido que el doble enlace C-3-C-4 en el anillo pirano es esencial para la actividad tóxica o anti-hormonal [Isman, M.B., 1989]. Este es el sitio de ataque de oxidasas de función múltiple las que producen epoxidación del doble enlace y a partir de este derivado oxigenado la apertura hidrolítica buscando el diol más soluble.

Sin embargo, la función oxirano en su posición bencílica puede ser centro de ataque de nucleófilos tales como grupos tiol de enzimas bloqueando la actividad enzimática [Kunze, A. *et al.*, 1996]. La ausencia de insaturación en el heterociclo del compuesto **15** podría ser la razón de la diferente actividad respecto de demetilencecalina.

Finalmente, un 3.0 % de las larvas tratadas con los compuestos **16-18** presentaron diferentes anormalidades morfológicas. Estas fueron adultoides mostrando tarsos y antenas parcialmente insegmentadas (**16**), severa deficiencia en el proceso de disposición de nueva cutícula (**17**) y adultoides encapsulados en la exuvia pupal pero mostrando apéndices móviles. Ninguna de las larvas control presentó alguna de estas anormalidades.

### Bioactividad de flavonoides

Este grupo de compuestos ha sido informado como responsable de bioactividades frente a insectos tales como insecticidas e inhibitoria del crecimiento. *Heliothis virescens* (Fabricius) [Hedin *et al.*, 1992], *Spodoptera exigua* (Huebner), *Heliothis zea* (Boddie) [Isman *et al.*, 1983], *Manduca sexta* (L.) [Snook *et al.*, 1992] y *Dione juno* Cramer [Echeverri *et al.*, 1991], han sido utilizados como modelos para bioensayos frente a este tipo de metabolitos secundarios de plantas. En nuestro caso utilizamos larvas de *Tenebrio*

*molitor* L., recientemente mudadas al cuarto estadio, para evaluar la bioactividad de veinte compuestos flavonoides, la mayoría de ellos aislados en el curso de estudios fitoquímicos realizados sobre especies de la región de Cuyo [Sosa *et al.*, 2000]. En la Figura 6 se presentan sus estructuras y se aclara sobre su procedencia. Utilizando una concentración para cada flavonoide de 6.0 mmoles/g de alimento se evaluó su incidencia en el desarrollo larvario. Para ello se determinó la variación del peso y longitud de las larvas hasta los sesenta días del bioensayo.

El único compuesto de los veinte evaluados que mostró una actividad significativa en cuanto a una disminución del peso fue quercetina (**1**), en tanto que sobre el crecimiento longitudinal de las larvas tuvieron una disminución significativa aquellos lotes tratados con los compuestos **1, 4, 5, 10 y 13**.

La relación *o*-dioxigenada, que ha sido atribuida como la responsable de la bioactividad en flavonas, estaría asociada a la posibilidad de participar en reacciones de tipo óxido-reducción, probablemente que involucran a radicales libres. Es conocido que el proceso de barrido radicalario ("radical scavenging") de especies oxigenadas activas, está relacionado con el número y posición de grupos hidroxilo en el anillo B (Yoshiki *et al.*, 1995), resultando más efectivo en los casos de *o*-dihidroxilación que permite el paso a la estructura *o*-quinoide correspondiente a través de un mecanismo de óxido-reducción.

Podemos concluir que a partir de estos estudios se ha podido comprobar que *Tenebrio molitor* L. es un insecto sensitivo a los productos naturales, tanto a nivel de fagorepelencia, toxicidad aguda y alteraciones del desarrollo. En todos los casos las dosis utilizadas resultaron comparables a las presentadas por otros autores frente a diferentes modelos de insectos. Sin embargo, se observa que moléculas francamente activas frente a otras especies de insectos resultan inactivas frente a este coleóptero, y recíprocamente.

Son necesarios mayores estudios para obtener información más completa que permita diseñar productos sintéticos que puedan mimetizar las bioactividades aquí informadas.



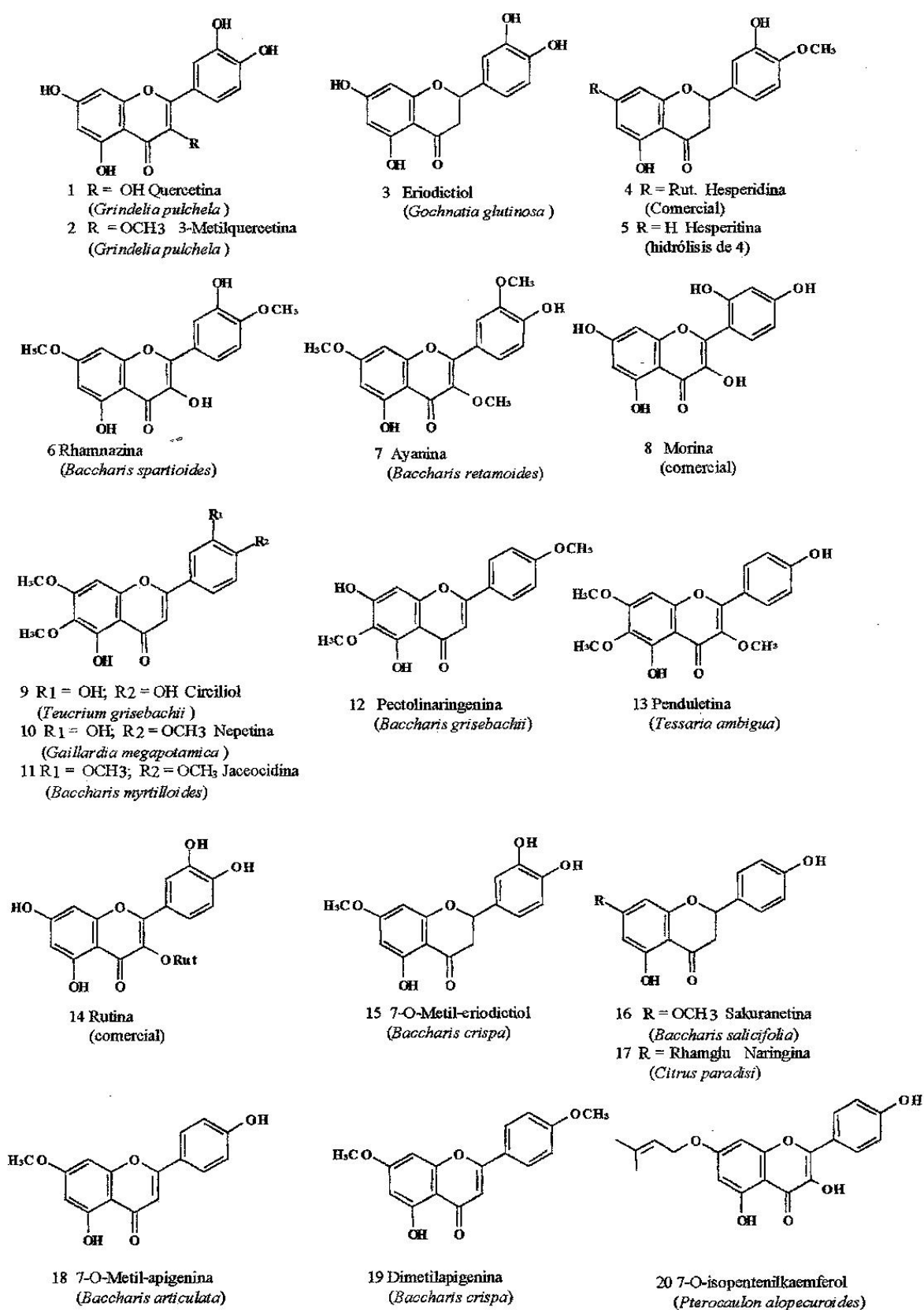


Fig. 6

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de San Luis y CONICET por los subsidios otorgados al Proyecto "Química y Aplicaciones de Productos Naturales de la Región de Cuyo". A los Dres. José Carlos Gianello y Matías Nieto, por su desinteresada colaboración en el suministro de algunos de los productos naturales ensayados. A los Dres. Pedro C. Rossomando y Carlos E. Ardanaz y al Lic. Eduardo E. García por los estudios espectroscópicos. A los Ings. Guido Mácola y José García Sáez (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo) y al Dr. Eduardo Zerba (CIPEIN-CITEFA-CONICET) por su interés en el desarrollo de esta línea de trabajo.

## Referencias

- Arnanson, J. T.; Isman, M.; Philogène, B.; Wadell, T. (1987). *J. Nat. Prod.*, 50 (4), 690.
- Belles, X; Camps, F; Coll, J.; Piulach, M.D. (1985). *J. Chem. Ecol.*, 11, 1439.
- Brawner Floyd, M. (1978). *J. Org. Chem.* 43, 1641.
- Camps, F; Coll, J. (1993). *Phytochemistry*, 32 (6), 1361.
- Carrizo Flores, R.; Sosa, M.E.; Favier, L.S.; Penna, F.; Guerreiro, E.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. (1998). *J. Nat. Prod.* 61, 1209.
- Ceñal, J.P.; Giordano, O.S.; Rossomando, P.C.; Tonn, C.E. (1997). *J. Nat. Prod.*, 60, 490.
- Echeverri, F.; Cardona, G.; Torres, F.; Pelaez, W.; Quiñones, W.; Rentería, E. (1991). *Phytochemistry* 30, 153.
- Enriz, R.D.; Baldoni, H.; Jáuregui, E.; Sosa, M.E.; Tonn, C.E.; Giordano, O.S. (1994). *J. Agric. Food Chem.*, 42 (12), 2958.
- Enriz, R.D.; Baldoni, H.A.; Zamora, M.A.; Jáuregui, E.A.; Sosa, M.E.; Tonn, C.E.; Luco, J.M. and Gordaliza, M. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48(4), 1384.
- Findlay, J.P.; Buthelezi, S.; Li, S.; Sevech, M.; Miller, J.D. (1997). *J. Nat. Prod.* 60, 1214.
- Favier, L.S.; Tonn, C.E.; Guerreiro, E.; Rotelli, A.; Peltzer, L. (1998). *Planta Medica* 64, 657.
- Fraenkel, G. (1959). *Science*, 129, 1466.
- Frazier, J.L.; Chyb, S. (1995). *Regulatory Mechanism in Insect Feeding*, Chapman and Hall, Cap. 13.
- Gallardo V. O.; Tonn, C.E.; Nieto, M.; Morales, G.; Giordano, O.S. (1996). *Natural Products Letters* 8, 189.
- Gianello, J.C.; Giordano, O.S. (1982). *Rev. Latinoamer. Química*, 13, 76.
- Gianello, J.C.; Giordano, O.S. (1987). *Anales Asoc. Química Argentina*, 75, 1.
- Gianello, J.C.; Giordano, O.S. (1989). *Anales Asoc. Química Argentina*, 77, 353.
- Guerreiro, E.; Kavka, J.; Giordano, O.S.; Gros, E.G. (1979). *Phytochemistry*, 18, 1235.
- Harborne, J. B. (1993). *Nat. Prod. Rep.*, 10, 327.
- Harborne, J.B. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*, Academic Press, London.
- Harborne, J.B.; Tomás-Barberán, F.A. (1991). *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Clarendon Press, Oxford. Cap. 16.
- Hedin, P.; Jenkins, J.; Parrol, W. (1992). *J. Chem. Ecol.* 18, 105.
- Hegnauer, R. (1977). *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, London, p. 283.
- Isman, M.B. In *Insecticides of Plant Origin*; Arnason, J.T.; Philogène, B.J.R.; Morand, P. Eds.; ACS Symposium Series 387: Washington DC, 1989; pp 44-58.
- Isman, M.B.; Proksch, P. (1985). *Phytochemistry*, 24, 1949.
- Isman, M.B.; Rodríguez, E. (1983). *Phytochemistry*, 22, 2709.
- Kubo, I.; Nakanishi, K. (1979). *Adv. Pestic. Sci. Symp. Paper 4<sup>th</sup> International Congress of Pesticide Chemistry*, Vol. 2, p.284.
- Kunze, A.; Aregullin, M.; Rodriguez, E.; Proksch, P. (1996). *J. Chem. Ecol.*, 22, 491.
- Lewis, A.C.; van Emden, H.F. (1986). *Insect Plant-Interactions*, Springer-Verlag, Cap. 4.
- Ley, S.V. (1990). *Ciba Foundation Symposium 154*, John Wiley & Sons, New York, pp. 80.
- Lidert, Z.; Taylor, D.H.; Thirugnanam, M. (1985). *J. Nat. Prod.*, 48, 843.
- Luco, J.; Sosa, M.E.; Cesco, J.; Tonn, C.E.; Giordano, O.S. (1994). *Pestic. Sci.*, 41, 1.
- Malakov, P.Y.; Papanov, G.Y.; Rodriguez, B.; de la Torre, M.C.; Simmons, M.S.J.; Blaney, W.M.; Boneva, I.M. (1994). *Phytochemistry*, 37, 147.
- Merrit, A.T.; Ley, S.V. (1992). *Nat. Prod. Rep.*, 9, 243.
- Nahrstedt, A. (1988). *Planta Medica*, 55, 333.
- Nieto, M.; Gallardo V. O.; Rossomando, P.C.; Tonn, C.E. (1996). *J. Nat. Prod.*, 59, 880.
- Nieto, M.; Gianello, J.C.; Tonn, C.E. (1994). *Anales Asoc. Química Argentina*, 82, 105.
- Picman, A.K. (1986). *Biochem. Syst. Ecol.*, 4, 256.
- Proksch, P.; Isman, M.B.; Witte, L.; Hartmann, T. (1987). *Phytochemistry*, 26, 2227.
- Proksch, P.; Rodriguez, E. (1983). *Phytochemistry*,

- 22, 2335.
- Proksch, P.; Rodriguez, E. (1984). *Biochem. Syst. Ecol.*, 12, 179.
- Quennedey, A.; Quennedey, B. (1993). *Tissue and Cell*, 25, 219.
- Reed, D.K.; Jacobson, M. (1983). *Experientia*, 39, 378.
- Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M.; Ley, S.V.; Savona, G.; Bruno, M.; Rodriguez, R. (1989). *Phytochemistry*, 28, 1989.
- Smith, A.; Telikepalli, H.; Mitscher, L. (1991). *Phytochemistry* 30, 3569.
- Snook, M.; Chori, O.; Sisson, V.; Castello, C. (1992). *Phytochemistry* 31, 1639.
- Sosa, M.E.; Tonn, C.E.; Guerreiro, E.; Giordano, O.S. (1995). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 54 (1-4) 89.
- Sosa, M.E.; Tonn, C.E.; Giordano, O.S. (1994). *J. Nat. Prod.*, 57, 1262.
- Sosa, M.E.; Guerreiro, E.; Giordano, O.S.; Tonn, C.E. (2000). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 59 (1-4), 177.
- Tonn, C.E.; Caltabiano, J.A.; Gianello, J.C.; Giordano, O.S. (1990). *Revista Latinoamer. Quím.*, 21, 52.
- Tonn, C.E.; Gianello, J.C.; Giordano, O.S. (1979). *Anales Asoc. Química Argentina*, 67, 1.
- Tonn, C.E.; Giordano, O.S. (1980). *Anales Asoc. Química Argentina*, 68, 237.
- Tonn, C.E.; Giordano, O.S.; Besalle, F.; Frolow, F.; Lavie, D. (1988). *Phytochemistry*, 27, 489.
- Tonn, C.E.; Giordano, O.S.; Delgado Martín, J.; Martín, V.S. (1989). *Phytochemistry*, 28, 1537.
- Tonn, C.E.; Palazón, J.M.; Ruiz-Pérez, C.; Rodríguez, M.L.; Martín, V.S. (1988). *Tetrahedron Letters*, 29, 3149.
- Urones, J.G.; Basabe, P.; Lithgow, A.M.; Marcos, I.S.; Jiménez, A.; Diez, D.; Gomez, A.; White, A.J.P.; Williams, D.J.; Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M. (1995). *Tetrahedron*, 51, 2117.
- Yoshiki, Y.; Okubo, K.; Onuma, M.; Igarashi, K. (1995). *Phytochemistry*, 39, 225.

*Manuscrito recibido en octubre de 2000; aceptado en noviembre de 2000.*