



Universidad de los Andes
Departamento de Química
Grupo de Química Ecológica



EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN QUÍMICA
ENTRE EL INSECTO *Heniartes stali*
(WYGODZINSKY)

(REDUVIIDAE:HARPACTORINAE) Y EL EXUDADO
GLANDULAR DE LA MORA ANDINA *Rubus cf.*
***adenotrichos* (SCHLTDL.)**

Br. Alejandra Linssey Jiménez Pomárico

Tutores: Dr. Alberto Oliveros Bastidas

MSc. Jorge Luis Ávila Nuñez

Dr. Foción Rojas Márquez

Mérida, octubre 2017

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** primeramente que me ha dado salud y la fuerza emocional para ser resiliente a todo, me ha concedido la gracia de disfrutar todo aquello por lo cual he luchado y me ha aprobado incluso antes de que estuviese lista.

A mis padres **Carla Pomárico Barra†** y **Alberto Jiménez Ure** la cuna de mi desarrollo personal y la fuente de todas las enseñanzas más importantes de mi vida, les honro aquí y donde la muerte ya no tiene lugar, que mis obras siempre hablen bien de ustedes. A mis hermanas **Gretel Sally** y **Venus Kelly** por ser compañeras de la vida, quienes me enseñan a ser hermana, amar, cuidar y no rendirse jamás.

A mis profesores **Alberto Oliveros Bastidas** a quien considero un padre académico, me ha aconsejado oportunamente para tomar buenas decisiones, ha sido paciente y siempre estuvo dispuesto a enseñarme, aun cuando todavía no era tesista sino beca trabajo en el laboratorio, con quien he aprendido ha no dar por sentado nada y replantear siempre mas allá de lo evidente. **Jorge Ávila Núñez** quien siempre me inspiró una profunda pasión por la investigación y todo lo que nos programábamos como meta, su ojo agudo en la naturaleza me hace pensar que aun debo aprender a observar lo que me rodea. **Foción Rojas Márquez** quien con paciencia y pedagogía siempre me hizo sentir que nada era tan difícil como yo lo veía y que todo iba bien. **A los tres** gracias por confiar en mí, para el desarrollo de esta investigación, se han emocionado conmigo en cada paso del camino y han sido pacientes a todas mis

preguntas. Les veo como un regalo académico de Dios para mi vida, porque en tiempos donde no abundan los tutores yo tuve tres.

A los profesores **Yelitza Delgado** y **Francisco López** quienes fueron jurados durante el desarrollo de esta investigación, por su invaluable disposición, comprensión y aportes enriquecedores en todas las etapas del camino, considero que han amado el proyecto tanto como nosotros.

A la profesora **Celina Pérez** de la Facultad de Farmacia y la **Dra. Claudia Plaza** mujeres guerreras de la ciencia, que con alta calidad humana y hermoso corazón de enseñanza apoyaron el proyecto, gracias por toda la colaboración prestada.

Al profesor **Luis Rojas** de la facultad de farmacia y el **Lic. Julio Colmenares** del Laboratorio de Catálisis por su colaboración, disposición y servicios prestados durante el desarrollo de esta investigación.

A la profesora **María Pía Calcagno** por recibirme en el Laboratorio de Química Ecológica hace algunos años como beca trabajo, permitiendo el comienzo de un gran amor por la química ecológica y el desarrollo de habilidades y técnicas que posteriormente fueron muy útiles en el desarrollo de este trabajo.

A **mis profesores** todos únicos, brillantes y llenos de saber, me hicieron crecer y caminaron conmigo algunas millas de historia.

A la **familia del corazón** ♥ amistades que han llenado mis días de risas, alegrías y me han acompañado como un motor de apoyo incondicional, amor fraternal y aceptación, han sido fuente de inspiración y coprotagonistas de todas mis historias, les amo y

bendigo. No les nombro para no dejar a nadie por fuera, pero ustedes saben quienes son.

A mi novio **Emeric Fachola** por su corazón, siempre dispuesto a escuchar y edificar en amor, por enseñarme que el mundo no es demasiado grande y nada queda muy lejos. A quien considero más que un regalo, en este ultimo tiempo ha llenado mi vida de risas y caricias, me hace sentir grande y niña. Gracias por permitirme ver el mundo a través de tus ojos.

A la **Universidad de los Andes** por ser cuna del saber y un campo de entrenamiento para la vida, por los recursos invertidos en la población joven, aguerrida y valiente de este país. Estoy segura que vendrán tiempos de mayor bonanza y renombre donde el mundo en lugar de despreciar a Venezuela anhelara ser parte de nosotros, mi corazón espera ese tiempo.

A **todos** gracias.

RESUMEN

En la naturaleza existe un innumerable conjunto de interacciones que hacen posible la supervivencia y adaptación de las especies a su entorno, y los cambios que éste sufre. Algunas de las interacciones de este tipo se producen entre plantas e insectos como *Rubus cf. adenotrichos* y el *Heniarthe stali*, donde ambas especies se ven beneficiadas por la presencia del otro; en este caso el *R. cf. adenotrichos* posee tricomas glandulares que exudan un material pegajoso de composición desconocida, dicho material es colectado almacenado y posteriormente usado por el *H. stali* en actividades biológicas de oviposición y depredación. Este estudio evaluó la composición y estabilidad química del exudado glandular, utilizando técnicas cromatográficas convencionales para el aislamiento y purificación de sus constituyentes mayoritarios, así como técnicas espectroscópicas para la elucidación estructural. También se evaluaron la actividad fitotóxica y antifúngica, así como pruebas de capacidad antioxidante, todo con la finalidad de identificar las razones fitoquímicas por las cuales el insecto y la planta coexisten en una interacción mutualista, donde el insecto se beneficia de las propiedades pegajosas del exudado glandular y la planta se protege contra infestaciones.

Durante el desarrollo de la investigación se encontró que *R. cf. adenotrichos* posee tricomas glandulares con estructura novedosa sin antecedentes bibliográficos, lo que se constituye un aporte importante al conocimiento de tricomas glandulares. Se determinó que la composición del exudado glandular está constituido por compuestos polifenólicos más específicamente del tipo sesquiterpenos, triterpenos tetracíclicos de la familia de los

danmaranos, entre otros. También se estableció que el exudado glandular posee propiedades antioxidantes y fitotóxicas, pero no posee actividad antifúngica en presencia de *Cándida albicans*. Finalmente se abrió todo un abanico de características fitoquímicas y biológicas que posee el exudado glandular de *R. cf. adenotricos* de alto interés ecológico, a partir del cual se pueden continuar estudios mas específicos.

www.bdigital.ula.ve

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	5
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	14
I.-INTRODUCCIÓN	23
II.-JUSTIFICACIÓN	28
III.-HIPÓTESIS	29
IV.-OBJETIVO GENERAL	30
IV.1.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
V.- REFERENCIAS	31
Capítulo I. CARECTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Rubus cf. adenotrichos</i>	34
I.1.- Botánica sistemática.	34
I.1.1.-Principales grupos de clasificación en el reino vegetal de acuerdo a sus características morfológicas.	36
I.1.2.- Taxón.	37
I.1.3.- Quimiotaxonomía.	37
I.1.4.- <i>Rubus adenotrichos</i> (Schltdl).	38
I.1.5.- Tricomas.	39
I.1.5.1.- Tricomas simples.	40
I.1.5.2.- Tricomas glandulares.	40
I.1.5.3.- Morfología del tricoma glandular	41
I.1.5.4.- Clasificación de los tricomas de acuerdo al tipo de sustancia secretada	44
I.1.5.5.- Clasificación de los tricomas según su función	44
I.1.5.6.- Clasificación de los tricomas según su localización	51
I.1.6.- Mecanismos de secreción	52
I.II.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54

I.III.-METODOLOGÍA	55
I.III.1.- Recolección del material vegetal	55
I.III.2.-Preparación de la muestra	55
I.III.3.-Observación macroscópica y microscópica de <i>R. cf. adenotrichos</i>	56
I.III.4.- Mediciones	56
I.III.5.- Histoquímica	57
I.IV.- RESULTADOS	59
I.IV.1.- Características macroscópicas de <i>R. cf. adenotrichos</i> .	59
I.IV.2.- Características macroscópicas y microscópicas de los tricomas glandulares de <i>R. cf. adenotrichos</i>	72
I.IV.3.- Determinación cualitativa de taninos y fenoles	81
I.V.- REFERENCIAS	84
I.VI.- GLOSARIO I	89
Capítulo II. AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO DE TRICOMAS GLANDULARES DE <i>Rubus cf. adenotrichos</i>	92
II.1.-Criterios para la búsqueda de moléculas naturales con actividades fitotóxicas	94
II.2.-Estudio de agentes fitotóxicos de origen vegetal	96
II.3.-Evaluación de la actividad de aleloquímicos	97
II.4.-Métodos y condiciones de extracción	102
II.5.-Medidas cuantitativas de respuestas biológicas	103
II.6.-Parámetros microscópicos de crecimiento en plantas receptoras	104
II.7.-Rutas de liberación de aleloquímicos	105
II.8.-Lixiviados de la superficie de las hojas	105
II.I.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	109
II.II.- METODOLOGÍA	110
II.II.1.- Análisis químico del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i>	110
II.II.1.1.- Recolección de la planta	110

II.II.1.2.- Extracción y purificación del exudado glandular	110
II.II.1.3.- Purificación de los constituyentes fitoquímicos del exudado glandular	110
II.II.1.3.a- Cromatografía de capa fina	111
II.II.1.3.b- Cromatografía preparativa	111
II.II.1.3.c- Cromatografía de columna	111
II.II.1.4.- Caracterización estructural de los productos aislados y purificados	111
II.II.1.4.a- Espectroscopia de infrarrojo con transformada de fourier (ft-ir)	112
II.II.1.4.b.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN: 1H, 13C, COSY, MHQC, HMBC, DEPT-135)	112
II.II.1.5.- Bioensayos de actividad fitotóxica	112
II.II.1.5.a- Análisis de agrupamiento	114
II.III.-RESULTADOS	116
II.III.1.-Análisis químico del exudado glandular	116
II.III.1.a-Recolección de la muestra	116
II.III.2.-Extracción selectiva del exudado glandular	116
II.III.3.-Análisis de actividad fitotóxica de los diferentes extractos	119
II.III.4.-Separación del exudado glandular	128
II.III.5.-Pruebas de actividad fitotóxica de las fracciones preliminares obtenidas mediante cromatografía flash del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i>	131
II.IV.- ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS, FRACCIONES Y COMPUESTOS PURIFICADOS	145
II.IV.1.-Compuesto A	145
II.IV.2.-Compuesto D	162
II.IV.3.-Mezcla L	176
II.IV.4.-Mezcla J	187

II.IV.5.-Mezcla E	191
II.IV.6.-Compuestos minoritarios	195
II.V.- REFERENCIAS	201
II.VI.-GLOSARIO II	210
Capítulo III. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXUDADO GLANDULAR DE <i>Rubus cf. adenotrichos</i>	212
III.1.-Hongos	212
III.2.- <i>Cándida albicans</i>	219
III.3.- Importancia de estudiar la actividad antifúngica de productos naturales	221
III.4.-Bioensayos usados para evaluar la actividad antifúngica	223
III.5.-Potencial antifúngico del exudado de <i>R. cf. adenotrichos</i>	228
III.I OBJETIVOS ESPECÍFICOS	229
III.II.- METODOLOGÍA	229
III.6.1.- Bioensayo de actividad antifúngica	229
III.6.2.-Preparación de medios de cultivos	229
III.III.- RESULTADOS	236
III.IV.- REFERENCIAS	239
III.V.- GLOSARIO III	244
Capítulo IV.- ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXUDADO GLANDULAR DE <i>R. cf. adenotrichos</i>	247
IV.1.-Clasificación de los antioxidantes	249
IV.2.-Otra clasificación de los antioxidantes los ubica en dos grupos grandes	251
IV.3.-Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción	251
IV.4.-Métodos reportados para la evaluación de la actividad antioxidante	253
IV.5.-Cinética de reacción para la reducción de DPPH·	254
IV.6.-Compuestos reportados para <i>Rubus adenotrichos</i> con	

<i>potencial antioxidante</i>	255
IV.I.-OBJETIVO	256
IV.II.-METODOLOGÍA	256
<i>IV.II.1.-Análisis de la estabilidad química del exudado glandular de R. cf. adenotrichos y del exudado recolectado por H. stali</i>	256
<i>IV.II.2.-Recolección, extracción y análisis del exudado glandular glandular de R. cf. adenotrichos</i>	256
<i>IV.II.3.- Captura y mantenimiento de H. stali en el laboratorio</i>	257
<i>IV.II.4.-Recolección del exudado glandular almacenado por H. stali</i>	258
<i>IV.II.5.-Lavado de las patas traseras de H. stali sin exudado glandular almacenado</i>	259
<i>IV.II.6.- Examen macroscópico y microscópico de las patas traseras de H. stali</i>	259
<i>IV.II.7.-Medición de la capacidad antioxidante</i>	260
<i>IV.II.8.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)</i>	262
IV.III.-RESULTADOS	263
<i>IV.III.1.-Medición de la capacidad antioxidante</i>	263
<i>IV.III.2.-Examen macroscópico y microscópico de las patas traseras de H. stali</i>	272
<i>IV.III.3.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)</i>	274
IV.IV.-REFERENCIAS	277
IV.V.-GLOSARIO IV	285
VI. CONCLUSIONES	287
VII. RECOMENDACIONES	289

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1.- Características morfológicas de <i>Rubus cf. adenotrichos</i> .	62
Tabla II.1. Potencial alelopático de lixiviados	107
Tabla II.2.- Mezcla de solventes para la obtención de nueve fracciones de la primera columna flash, con sus respectivas masas aisladas	129
Tabla II.3.- Reunión de fracciones y masas obtenida de la cromatografía flash del extracto de tricomas de <i>R. cf adenotrichos</i>	136
Tabla II.4.- Composición de solventes y volúmenes de elusión para la separación cromatográfica del extracto de tricomas de <i>R. cf adenotrichos</i>	137
Tabla II.5.- Reunión de fracciones y masas obtenida del segundo análisis cromatográfico de la fracción 5-6* de la primera columna del exudado glandular de <i>R. cf adenotrichos</i>	138
Tabla II.6.- Reuniones obtenidas de las fracciones, según el análisis por cromatografía en capa fina de la cromatografía de las fracciones 5y6 del segundo análisis cromatográfico del extracto de tricomas glandulares de <i>R. cf adenotrichos</i>	141
Tabla II.7. – Compuestos mayoritarios purificados por preparativas y sus respectivas masas	143
Tabla II.8. Compuestos minoritarios purificados por preparativas y sus respectivas masas	143
Tabla II.9.- Productos resultantes del proceso de aislamiento biodirigido	146
Tabla II.10.- Compuesto A bandas características de los grupos funcionales presentes	147
Tabla II.11.- Características de las bandas del de RMN- ¹³ C para el compuesto A	151
Tabla II.12.- Señales en el espectro RMN-1H para el compuesto A	156
Tabla II.13.- Grupos funcionales característicos para el compuesto D	163
Tabla II.14.- Características de las bandas del de RMN- ¹³ C para el compuesto D	166
Tabla II.15.- Características de las señales RMN- ¹ H para el compuesto D	170
Tabla II.16.- Bandas de los grupos funcionales presentes en el compuesto L	177

Tabla II.17.- Características de carbonos presentes en el compuesto L	181
TABLA II.18.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ¹ H (CD ₂ Cl ₂ , 300 MHz) del Compuesto L	184
Tabla II.19.- Bandas características para la mezcla J	188
Tabla II.20.- Bandas características de los grupos funcionales de la mezcla E	192
Tabla II.21.- Mezcla B bandas características de los grupos funcionales presentes	196
Tabla II.22.- Mezcla K bandas características de los grupos funcionales presentes	197
Tabla I.23.- Mezcla H bandas características de los grupos funcionales presentes	198
Tabla I.24.- Mezcla I bandas características de los grupos funcionales presentes	199
Tabla I.25.- Mezcla C bandas características de los grupos funcionales presentes	200
Tabla III.1.- Efecto antifúngico a diferentes concentraciones y tiempos de extracción del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i> sobre <i>Candida albicans</i> usando la técnica de difusión con disco de papel	236
Tabla III.2.- Efecto antifúngico a diferentes concentraciones y tiempos de extracción del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i> sobre <i>Candida albicans</i> usando el método de pozo de difusión	237
Tabla IV.1.- Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción	252
Tabla IV.2.- Masa de exudado glandular que permanecía almacenada en las patas traseras de hembras de <i>H. stali</i> en los diferentes tiempos de medición	264
Tabla IV.3.- Principales grupos funcionales según el análisis por espectroscopia de Infrarrojo del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i> en el tiempo	275
Tabla IV.4.- Principales grupos funcionales según el análisis por espectroscopia de Infrarrojo del exudado glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i> en el tiempo	276

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1.- Tipos de tricomas simples y glandulares. Atlas de histología vegetal y animal	42
Figura I.2.- Tricoma nectario de <i>Lonicera japonica</i>	43
Figura I.3. Micrografías de microscopio electrónico de barrido de la superficie de hojas de distintas especies	47
Figura I.4.- Micrografías electrónicas de barrido de las superficies de A una hoja pubescente y B una hoja glabra de dos cultivos de pepino	48
Figura I.5.- Sección paradérmica de un tricoma hidátodo de <i>Aeschynomene ciliata</i>	50
Figura I.6.- Ilustración de los mecanismos de secreción	53
Figura I.7.- Crecimiento de <i>Rubus cf. adenotrichos</i> en forma enmarañada junto con otras especies	63
Figura I.8.- A Tallo cilíndrico y anguloso B Tallos cubiertos de tricomas simples y glandulares C Sección de tallo de <i>R. cf. adenotrichos</i> cubierta por pelos simples y tricomas glandulares	64
Figura I.9.- Tallo de <i>R. cf. adenotrichos</i> mostrando la coloración castaño oscuro en el área más expuesta al sol y verde claro en la parte menos expuesta	65
Figura I.10.- Lámina foliar ovalada con borde aserrado A. cara abaxial B. Cara adaxial	66

Figura I.11- A Inflorescencia de <i>Rubus cf. adenotrichos</i> donde se observa su forma piramidal B Cinco sépalos con pelos simples y tricomas glandulares por cada flor. C Flores blancas con tonalidades rosadas	67
Figura I.12.- Frutos maduros e inmaduros de <i>Rubus cf. adenotrichos</i>	68
Figura I.13.- Comparación de la sección de los tallos de <i>R. cf. adenotrichos</i> sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente	69
Figura I.14.- Comparación de las hojas de <i>R. cf. adenotrichos</i> sometidas a mayor y menor grado de exposición solar respectivamente	69
Figura I.15.- Acercamiento de la cara abaxial de las hojas de <i>R. cf. adenotrichos</i> sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente	70
Figura I.16.- Comparación de las caras abaxial y adaxial de las hojas de <i>R. cf. adenotrichos</i> sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente	71
Figura I.17.-A Tricomas glandulares B Pelos simples de <i>R. cf. adenotrichos</i>	74
Figura I.18.-A Tallo del tricoma pluricelular B Cabeza secretora del tricoma C Cambio en la coloración del tricoma desde el tallo hasta la cabeza para la especie en estudio <i>R. cf. adenotrichos</i>	75
Figura I.19.- A Tricomas glandulares de <i>R. cf. adenotrichos</i> con el exudado glandular expuesto y escurriendo por el tallo del tricoma B Tricoma con exudado adherido por todo el cuerpo del tricoma	76

Figura I.20.- Micrografía de microscopio de luz mostrando la cabeza secretora del tricoma glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i> . Aumento 100 x	77
Figura I.21.- Cabeza secretora del tricoma glandular de <i>R. cf. adenotrichos</i>	78
Figura I.22.- Tricomas glandulares A tricoma después de la extracción <i>R. cf. adenotrichos</i> B tricoma glandular de <i>Cordia verbenacea</i> DC con la cutícula rota y pérdida del exudado	79
Figura I.23.- Corte longitudinal y transversal de 1cm del tallo de <i>R. cf. adenotrichos</i> , diferenciando la cara más expuesta con la menos expuesta para comparar abundancia de tricomas	80
Figura I.24.- Prueba de Azul de Prusia para la detección de derivados fenólicos y/o taninos sobre muestra de tallo de <i>R. cf. adenotrichos</i>	82
Figura II.1.- A) Selección de los tallos con tricomas glandulares de <i>R. cf. adenotrichos</i> , por coloración aparente. B) Micrografía de tricomas glandulares antes y C) después de ser sometido al proceso de extracción	117
Figura II.2. Cromatografía de capa fina de los extractos de tallos con tricomas más coloreados (+), menos coloreados (-) y las hojas	118
Figura II.3.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Brassica rapa</i> L. (Nabo)	120
Figura II.4.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Daucus carota</i> L. (Zanahoria)	121
Figura II.5.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> L. (Tomate)	122

Figura II.6.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Solanun melongena</i> L. (berenjena)	123
Figura II.7.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Capsicum annum</i> L. (Pimenton)	124
Figura II.8.- Efecto de los extractos de tricomas glandulares de <i>R. adenotrichos</i> sobre el crecimiento de <i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga)	125
Figura II.9.- Agrupamiento de los extractos en función de su actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz, para las seis especies receptoras consideradas	127
Figura II.10.- Análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas del extracto de tricomas de <i>R. cf adenotrichos</i> en la primera columna flash	130
Figura II.11.- Actividad sobre el crecimiento de plántulas de <i>Lactuca sativa</i> L. de las diferentes fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del exudado glandular de <i>R. cf adenotrichos</i> mediante cromatografía <i>flash</i>	133
Figura II.12.- Agrupamiento de los extractos en función de su actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz y el tallo de <i>Lactuca sativa</i> L, para los extractos iniciales del fraccionamiento del exudado glandular de <i>R. adenotrichos</i>	134
Figura II.13.- Cromatografía de capa fina correspondiente a las fracciones obtenidas en la segunda columna de separación	140
Figura II.14.- Cromatografía de capa fina de las fracciones reunidas descritas	

en la Tabla II.5	141
Figura II.15.- Comportamiento en cromatografía de capa fina para las fracciones que se purificaron por preparativas	142
Figura II.16.- Análisis por cromatografía en capa fina de los compuestos mayoritarios del exudado glandular <i>R. cf. adenotrichos</i>	144
Figura II.17.- Análisis por cromatografía en capa fina de los compuestos minoritarios del exudado glandular <i>R. cf. adenotrichos</i> aislados con menor masa	144
Figura II.18.- Espectro IR del compuesto A	147
Figura II.19.- Espectro RMN ¹³ C del compuesto A	148
Figura II.20.- Espectro DEPT-135 de la muestra A	149
Figura II.21.- Espectro HSQC para el compuesto A	152
Figura II.22.- Espectro HSQC, para el compuesto A	153
Figura II.23.- Espectro RMN- ¹ H del compuesto A	155
Figura II.24.- Espectro COSY del compuesto A	157
Figura II.25.- Espectro COSY del compuesto A	158
Figura II.26.- Esqueletos sesquiterpenos monocíclicos posibles para el compuesto A	160
Figura II.27.- Sesquiterpenos aislados para genero <i>Rubus</i>	161
Figura II.28.- Espectro IR del compuesto D	163
Figura II.29.- Espectro RMN- ¹³ C del compuesto D	164
Figura II.30.- Espectro DEPT-135 del compuesto D	165

Figura II.31.- Espectro HSQC para el compuesto D	168
Figura II.32.- Espectro HSQC del compuesto D	169
Figura II.33.- Espectro HSQC del compuesto D	171
Figura II.34.- Espectro RMN- ¹ H del compuesto D	173
Figura II.35.- Terpenoides aislados del género <i>Rubus</i>	174
Figura II.36.- Espectro IR para el compuesto L.	177
Figura II.37A.- Espectro RMN- ¹³ C y DEPT-135 para el compuesto L	178
Figura II.38.- Espectro RMN- ¹³ C y DEPT-135 para el compuesto L	179
Figura II.39.- Espectro HSQC para el compuesto L (CD ₂ Cl ₂)	183
Figura II.40.- Espectro RMN- ¹ H del compuesto L (CD ₂ Cl ₂ , 300 MHz)	184
Figura II.41.- Espectro COSY del compuesto L (CD ₂ Cl ₂ , 300 MHz)	185
Figura II.42.- Estructura base correspondiente al compuesto L	186
Figura II.43.- Espectro IR de la mezcla J (solvente DCM 300Hz)	188
Figura II.44.- Espectro ¹³ C para compuesto J	189
Figura II.45.- Espectro ¹³ C para compuesto J	190
Figura II.46.- Espectro IR de la mezcla E (solvente DCM 300Hz).	192
Figura II.47.- Espectro RMN ¹³ C para la mezcla E (Solvente DCM 300Hz)	193
Figura II.48.- Espectro RMN ¹³ C para la mezcla E (Solvente DCM 300Hz)	194
Figura I.49.- Espectro IR de la mezcla B aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v	196
Figura I.50.- Espectro IR de la mezcla K aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v	197

Figura I.51.- Espectro IR del compuesto puro H aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v	198
Figura I.52.- Espectro IR de la mezcla I aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v	199
Figura I.53.- Espectro IR de la mezcla C aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v	200
Figura III.1.- Clasificación de los hongos	214
Figura III.2.- Ciclo evolutivo de los Basidomicetos	217
Figura III.3. Ejemplos de hongos filamentosos	217
Figura III.4.- Ejemplo de hongo dimorfico en exámen directo con azul algodón, a partir de una colonia de <i>Histoplasma capsulatum</i> . Hifas septadas, hialinas, abundantes macroconidios de pared gruesa, redondos, con tubérculos.	218
Figura III.5.- Hongo tipo seta <i>Porcelains fungus</i>	218
Figura III.6.- Micrografía de microscopio óptico mostrando el aspecto filamentoso de <i>Candida albicans</i>	220
Figura III.7.- Modelo de respuesta para actividad antifúngica, usando el método de discos de papel. El halo de inhibición es proporcional a la capacidad antifúngica de la sustancia de prueba. A La cepa fue sembrada usando la técnica de barrido superficial sobre el medio de cultivo. B la cepa fue sembrada incorporándola en la preparación del medio de cultivo	227
Figura III.8.- Proceso de preparación del bioensayo de actividad antifúngica.	

A Repicado de la cepa de *Candida albicans* **B** preparación del medio de cultivo agar Sabouraud y transvasado a la cápsula de Petri 233

Figura III.9.- Proceso de preparación del bioensayo de actividad antifúngica.

A Impregnación del disco de papel con 15µL de la solución del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* en DMSO **B** Introducción del disco de papel en la cápsula de Petri 234

Figura III.10.- Llenado del pozo en la capsula de Petri, con 5µL de la solución del exudado glandular en DMSO 235

Figura III.11.- A Resultados de la evaluación antifúngica con *Cándida albicans* para el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* de 24h y 384h en concentraciones de 90,8mg/mL, 45,0mg/mL y 22,5mg/mL. **B** Acercamiento de placa de concentración 45,0mg/mL para visualizar los dos métodos usados en la misma placa, difusión con papel y pozo de difusión 238

Figura IV.1.- Respuesta colorimétrica de la cinética de reducción del DPPH en presencia del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* proveniente de la planta y el colectado por el insecto *H. stali* 263

Figura IV.2.- Cinética de reducción del DPPH en presencia del exudado glandular de *R. cf. adenotricos* a diferentes tiempos de extracción y colección por hembras de *H. stali* 264

Figura IV.3.- Evaluación de la cinética de reacción de reducción del DPPH del lavado de las patas traseras de *H. stali* sin exudado glandular almacenado 265

Figura IV.4.- Micrográficas de la tibia posterior de una hembra de *H. stali*. **A.**

Sección mostrando la abundancia de setas y poros en el área donde se acumula el exudado glandular recolectado de *R. cf. adenotrichos* (aumento 100 x). **B.** Acercamiento donde se aprecian los poros a través de los cuales *H. stali* secreta un posible exudado que potencia las propiedades antioxidantes del exudado glandular (aumento 400x) 268

Figura IV.5.- Espectro IR del extracto proveniente de la especie vegetal *R. cf. adenotrichos* evaluado en los mismos tiempos de análisis del potencial antioxidante 269

Figura IV.7.- Espectro IR del extracto proveniente de la especie vegetal *R. cf. adenotrichos* colectado y almacenado por el insecto *H. stali* evaluados en los mismos tiempos de análisis del potencial antioxidante 273

www.bdigital.ula.ve

I.-INTRODUCCIÓN

El fascinante mundo natural que nos rodea, encierra en sí mismo, no solo la complejidad funcional y equilibrada que caracteriza los ecosistemas, sino un sin número de relaciones entre los individuos que los componen. Basta simplemente dar una mirada al comportamiento de un organismo en particular, evaluando el desarrollo natural de sus funciones; para notar, otras variedades de organismos o especies asociada directa o indirectamente a él.

Entendiendo un organismo vivo como un “sistema abierto en condición de no equilibrio con su entorno, se autoconstruye, o se autoajusta a las condiciones ambientales, y se auto perpetúa al construirse réplicas de sí mismo que tienen vida independiente (Chistopherson, 1997). Este sistema termodinámico consiste en una red multidimensional de síntesis y control sintético de compuestos de carbono, que siguen principios de máxima economía en todos los sentidos, tanto de componentes como de procesos. En tales principios no hay ninguna violación de las leyes termodinámicas conocidas, y para entender su funcionamiento no ha sido necesario hasta ahora postular nuevas leyes. Esto hace del fenómeno vital un proceso enteramente natural y espontáneo, que podrá ocurrir siempre que las condiciones de energía, materias primas y medios de reacción adecuados estén presentes” (Alonso, 1992).

Los organismos poseen una capacidad natural de transformar materiales, adquiridos de su entorno, convirtiéndolos en nuevas sustancias con propiedades distintas, con el

fin de usarlos en sus funciones biológicas de sustento, crecimiento, reproducción, entre otros (Bolton, 2009). Dicha capacidad se denomina metabolismo primario, proceso en el cual, se utilizan compuestos químicos parecidos en todos los seres vivos, como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y otras macromoléculas. Sin embargo, existe otra gran cantidad de compuestos químicos que se sintetizan más lentamente, a partir de dichos metabolitos primarios, pero suelen permanecer en el interior de los seres vivos, ser reciclados o poseer rutas sintéticas propias; a éstos se les llama metabolitos secundarios (Mazid, Khan y Mohammad, 2011; Bennett y Wallsgrove 1994).

Los metabolitos secundarios inicialmente se consideraban como desechos sintéticos, que eran almacenados por ausencia de algún mecanismo excretor dentro del sistema en estudio, como es el caso de las plantas (Hartmann, 2007). Sin embargo esto dificultaba, el poder explicar, por qué existían algunas especies con la capacidad de almacenar grandes cantidades de metabolitos secundarios en sus tejidos, con respecto a su biomasa total. Tampoco permite explicar la ubicación localizada de algunos metabolitos secundarios en estructuras específicas como tricomas glandulares, canales resiníferos o laticíferos, nectarios florales y foliares, y glándulas de excreción externa. Estas interrogantes confinaron un especial interés en el estudio de los metabolitos secundarios, y su presencia evolutiva en los organismos sometidos a condiciones ambientales específicas (Fenton et al., 2015).

En cuanto a los metabolitos secundarios se refiere, es de gran ayuda al momento de comprender su existencia y función, tomar en cuenta algunos aspectos, como lo es, la

influencia positiva sobre la capacidad adaptativa de los organismos que los poseen; ocasionando la permanencia y acentuación como caracteres genéticos dominantes (Bourgaud et al., 2011). Esto inmediatamente entra en el juego evolutivo de la especie; que a causa de la presión en el entorno, provoca la síntesis de estructuras variadas, cada vez más complejas y diversas. Esta capacidad sintética se enmarca dentro de la impresionante quimiodiversidad que permiten los compuestos de origen orgánico (Kant et al., 2015).

La quimiodiversidad de los metabolitos secundarios, pese a su extraordinaria presencia, no se ve extendida de forma infinita. Por el contrario se encuentra acotada por algunas variables importantes, como son la autotoxicidad, donde los metabolitos secundarios se sintetizarían dentro de un rango de tolerancia natural del organismo que los promueve; ya que por encima de eso, el mismo perecería. La disponibilidad de materiales de partida, necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios y el consumo energético que requieren las diferentes rutas sintéticas, se constituyen como limitantes. Y por último y más difícil de controlar, sería la variedad de rutas biosintéticas, y la convergencia de estructuras que se pueden presentar a lo largo de la metabolización (Fox y Howlett, 2008).

Aunado a toda la naturaleza metabólica que presentan los organismos vivos; entra en juego la función de los productos finales de dichos procesos, lo que sin duda implica inmediatamente a otros organismos, específicamente en el caso de los metabolitos secundarios, que surgen como respuesta adaptativa al entorno biótico (Rejeb, Pastor y Mauch, 2011). Esto nos lleva a poner la lupa en asociaciones o relaciones planta-

planta y planta-insecto, donde el lenguaje químico hace vida, procurando la permanencia y desarrollo de las especies relacionadas.

Algunas de estas relaciones son: la presencia de compuestos volátiles atraentes de insectos polinizadores, compuestos tóxicos u obstructores mecánicos, como las resinas, que funcionan como repelentes en infestaciones microbianas y de insectos. También algunos metabolitos secundarios poseen funciones protectoras a componentes abióticos del entorno, como el exceso de radiación solar, o ante disturbios hídricos del ecosistema (Alnsour y Ludwing, 2015; Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011).

Se conocen interesantes usos de productos naturales por animales con un fin específico, un ejemplo de esto son los insectos colectores, que destacan por sus curiosidades, como el escarabajo estiércol *Onthophagus taurus* que puede arrastrar una carga mil veces más pesada que su cuerpo, en este caso estiércol, donde posteriormente se aparea. También están los insectos colectores de exudados pegajosos (Leonhardt, Schmitt y Bluthgen, 2011), conocidos como los chinches de las resinas que suelen usar dichos compuestos para facilitar la captura de las presas y como recubrimiento protector de sus huevos (Eisner, 2005).

En nuestro ambiente neotropical destaca una interesante relación observada entre el chinche *Hemiptera stali* y la mora andina *Rubus cf. adenotrichos*. (Ávila et al., 2016) encontraron que en esta interacción el insecto tomaba el exudado glandular de los tricomas de la mora y lo almacenaba en sus patas traseras; para posteriormente usarlo en actividades biológicas como la captura de presas (Ávila et al., 2017) y el

recubrimiento de los huevos durante la oviposición. Este comportamiento de recolección fue observado tanto en las etapas inmaduras como en los adultos. En base a estos estudios preliminares fue diseñado este trabajo de investigación que abre una ventana a la química relacionada con la interacción entre el insecto y la planta.

www.bdigital.ula.ve

II.-JUSTIFICACIÓN

Esta investigación se enmarca dentro del interés de la química ecológica que pretende establecer relaciones funcionales desde el punto de vista químico entre los seres vivos. Las interacciones del tipo planta-insecto o planta-planta se analizan por medio de estudios de los metabolitos secundarios que biosintetizan las especies que participan en la interacción y que suelen ser útiles para la adaptación de éstas dentro de las comunidades.

La interacción del chinche de las resinas *H. stali* con la planta *R. cf. adenotrichos* representa un modelo interesante por cuanto es una relación hasta hace poco inédita para el ambiente neotropical. También, es desconocida la composición química del exudado glandular y su potencial actividad biológica. No se conocen detalles del comportamiento del exudado una vez que es recolectado por el insecto para almacenarlo en sus patas y posteriormente ser usado como herramienta en la captura de presas y protección de los huevos.

Los resultados obtenidos de esta investigación pueden contribuir al establecimiento de nuevos criterios de funcionalidad con respecto a la expresión de los tricomas en las especies de *Rubus* y aportar conocimientos de la química involucrada en la interacción con un chinche de resinas neotropical.

III.-HIPÓTESIS

- Es conocido que el fruto y las hojas de la mora *Rubus cf. adenotrichos* posee alto contenido de antioxidantes. Por esto, es posible esperar que el exudado de sus tricomas sea igualmente rico en compuestos con actividad antioxidante.
- Conociendo que el exudado glandular es característicamente pegajoso, esta propiedad, para que sea funcional al insecto, debería mantenerse en el tiempo debido posiblemente a la presencia de componentes antioxidantes o de otro tipo que impidan su endurecimiento.
- Sabiendo que las hembras de *H. stali* utilizan el exudado glandular recolectado y almacenado en sus patas traseras para recubrir los huevos, se podría suponer una función protectora suministrada por las posibles propiedades de antibiosis de este exudado.

IV.-OBJETIVO GENERAL

Estudiar desde el punto de vista fitoquímico el exudado glandular de *Rubus* cf. *adenotrichos* y la evaluación de algunas de sus propiedades químicas y biológicas que pueden estar siendo usadas por el insecto recolector *Heniarte stali* como factores adaptativos derivados de su asociación con esta planta.

IV.1.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la morfología de los tricomas glandulares de *R.cf. adenotrichos*.
- Extraer de forma selectiva, usando solventes orgánicos, el exudado ubicado en los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos*. Para ello se discriminará la naturaleza de la muestra, considerando tallos y hojas, como criterio morfológico, y coloración aparente mostrados por los tricomas por su exposición a la luz.
- Estudiar la identidad estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* mediante técnicas cromatográficas convencionales de separación y purificación, y estudios espectroscópicos básicos y bidimensionales.
- Evaluar la estabilidad o integridad fitoquímica en el tiempo del exudado secretado por *R. cf. adenotrichos* y el exudado recolectado por *H. stali*.
- Evaluar el potencial fungicida y fitotóxico del exudado glandular mediante bioensayos estandarizados para tal fin.

V.-REFERENCIAS

Alnsour M. y Ludwig J. (2015) **Potential effects of climate change on plant primary and secondary metabolism and its influence on plant ecological interactions.** *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 26: 90-99.

Alonso ME. (1992). **Biodiversidad y Quimiodiversidad.** *En: La Biodiversidad Neotropical y la Amenaza de las Extinciones.* Alonso-Amelot ME editor. Cuadernos de Química Ecológica. Meritec, Mérida, Venezuela. pp 119-156.

Avila-Nuñez JL.; Naya M.; Otero L. y Alonso-Amelot M. (2016). **A resin bug (Reduviidae: Harpactorinae: Apiomerini) harvesting the trichome secretion from an Andean blackberry.** *Neotropical Biodiversity, en prensa.*

Avila-Nuñez JL.; Naya M.; Otero L. y Alonso-Amelot M. (2017). **Sticky trap predation in the neotropical resin bug *Heniarthes stali* (Wygodzinsky) (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae).** *Journal of Ethology, en revision.*

Bennett, R. y Wallsgrave, R. (1994). **Secondary metabolites in plant defense mechanisms.** *New Phytologist* 127(4): 617-633.

Bolton M. (2009). **Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(5): 487–497.

Bourgaud F.; Gravot A.; Milesi S.; Gontier E. (2001). **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** *Plant Science* 161(5): 839–851.

Eisner Th.; Eisner M. y Seigler M. (2005). **Apiomerus flaviventris. A reduviid bug.** *En: Secret weapons: Defenses of insect, spiders, scorpions and other legged creatures.* Harvad University Press, Cambridge, MA. Capítulo 23. pp. 108-112.

Ekanayaka E.; Li C. y Jones A. (2014) **Sesquiterpenoid glycosides from glandular trichomes of the wild tomato relative Solanum habrochaites.** *Phytochemistry* 98, 223-231.

Fox E. y Howlett B. (2008). **Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology.** *Current Opinion in Microbiology* 11:481-487.

Kant M. ; Jonckheere W. ; Knecht B. ; Lemos F. ; Liu J. ; Schimmel B. ; Villarroel C. ; Ataide L.; Dermauw W. y Glas J. y Bot A. (2015). **Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities.** *Annals of Botany* 115(7):1015-1051.

Lapkin A.; Plucinski P. y Cutler M. (2006). **Reviews Comparative Assessment of Technologies for Extraction of Artemisinin** *Journal of Natural Products* 69(11): 1653-1664.

Leonhardt S.; Schmitt T. y Bluthgen N. (2011) **Tree Resin Composition, Collection Behavior and Selective Filters Shape Chemical Profiles of Tropical Bees (Apidae: Meliponini).** *Journal PLoS ONE* 6(8): 1-10.

Mazid M.; Khan T. y Mohammad F. (2011) **Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants.** *Biology and Medicine* 3 (2): 232-249.

Rejeb I.; Pastor V. y Mauch B. (2011). **Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms** *Plants* 3: 458-475.

Fenton A.; Speed M.; Jones M.; Ruxton G.; Brockhurst M. (2015). **Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants.** *New Phytology* 208(4):1251-1263.

Hartmann T. (2007). **"From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism."** *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo I.-CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *Rubus* cf. *adenotrichos*.

La evolución humana se ha caracterizado por la especialización de todas las cosas, no escapa de esto el conocimiento y comprensión del entorno, por su capacidad de proveer oportunamente beneficios para el sustento de la vida humana. Desde el hombre primitivo, la comprensión del mundo ha ido acompañada con sistemas de tipificación y categorización del mundo vegetal y animal; inicialmente separando lo que era consumible de lo que no es, y lo que representaba peligro inminente de lo que no. Así, durante el desarrollo y la evolución del conocimiento humano, se fueron especializando los sistemas de clasificación. La sistemática moderna tiene como objetivos la clasificación ordenada de la riqueza vegetal y animal utilizando una terminología comprensible y utilizable por todos. Aplica las leyes de la evolución para ayudar en la identificación de plantas y animales. Además, establece las relaciones de parentesco que presentan las especies entre sí (Marzocca, 1985).

1.1.-Botánica sistemática

La botánica sistemática como ciencia se encarga del estudio de la diversidad de las plantas y las relaciones que existen entre ellas (Benítez, 2006), incluye dos importantes áreas: la taxonomía que describe y establece las relaciones filogenéticas de la planta y la nomenclatura que le asigna un nombre a la misma (Marzocca, 1985). La sistemática no es una ciencia descriptiva, sino que tiene por objetivo principal establecer la relaciones

filogenéticas evolutivas de las especies y las entidades evolutivas reales que han estado presentes en las especies (Benítez, 2006). Sin embargo, para ello es necesario hacer énfasis en la descripción detallada de fenotipos propios de un grupo de plantas.

La Sistemática tiene varios enfoques como son: la Sistemática Clásica que incluye investigación de herbario y campo, la Biosistemática que desarrolla investigaciones ecológicas, citológicas, genéticas y bioquímicas; así como estudios ambientales de poblaciones en ambiente natural, parcelas experimentales, laboratorios o invernaderos. Taxonomía numérica que involucra estudios taxonómicos por programas computarizados. La Quimiosistemática estudia las características químicas de las plantas en el desarrollo de las clasificaciones. La Sistemática Molecular establece las relaciones y parentesco genético de las plantas, utilizando la información de secuenciación proteínica, de aminoácidos o nucleótidos, aportada por el ADN y ARN (Benítez, 2006).

La clasificación de los vegetales consiste en reconocer la existencia de caracteres comunes a los descendientes de un mismo grupo. Algunos de los caracteres con los que puede ordenarse el reino vegetal son:

- Morfológicos: las plantas que pertenecen al mismo grupo presentan caracteres similares.
- Histológicos: existen grupos con diferencias estructurales respecto a otros grupos.
- Cariológicos: según el número y estructura de los cromosomas.
- Genéticos: por estudio de descendencia y caracteres hereditarios.

- Serológicos: según la composición, calidad y efectos del protoplasma (proteínas) celular.
- Fitogeográficos: según el área de dispersión (Marzocca, 1985).

1.1.1.-Principales grupos de clasificación en el reino vegetal de acuerdo a sus características morfológicas

1.1.1.1.-Plantas con diferencias morfológicas y anatómicas profundas. Son llamadas traqueófitas o plantas vasculares que incluyen:

1.1.1.1.a.- Fanerógamas: plantas con flores y semillas. Las hay de dos tipos:

1.1.1.1.a.1.- Angiospermas: Plantas con flores y frutos. Se subdividen en: monocotiledóneas y dicotiledóneas

1.1.1.1.a.2.- Gimnospermas: No producen frutos, sus semillas son “desnudas” tales como en los como en los pinos y abetos.

1.1.1.1.b.- Criptógamas o Pteridófitas: los helechos y otros vegetales que se reproducen por esporas.

1.1.1.2.-Plantas sin sistemas vasculares complejos. Se subdividen en:

1.1.1.2.a.- Briófitas: con un sistema de conducción muy sencillo, limitado a agua y azúcares (musgos y hepáticas).

1.1.1.2.b.- Talófitas: carecen de diferenciación morfológica en tallos, hojas y raíces. Algunas de ellas son unicelulares. Comprenden a las bacterias algas, hongos y líquenes (Marzocca, 1985).

1.1.2. Taxón

Cada subdivisión en las plantas vasculares se compone de grupos subordinados llamados taxones y ordenados en forma decreciente son:

División

CLASE

SUBCLASE

Familia

Género

Especie

Subespecie

Variedad

Forma

En este sistema jerárquico la especie es la unidad básica. En palabras de Darwin es “un conjunto de individuos que se parecen mucho”, o formalmente hablando, es una población de individuos que se reproducen entre sí por lo que están estrechamente vinculados desde el punto de vista genético (Cano y Marroquín, 1994).

1.1.3.-Quimiotaxonomía

El reconocimiento específico de la especie con la que se pretende trabajar es fundamental en los estudios fitoquímicos ya que está visto que las especies vegetales producen infinidad de compuestos químicos cuyas rutas sintéticas varían de un taxón a otro. La distribución, almacenamiento y rutas sintéticas de dichos compuestos tiene amplia correspondencia con las características taxonómicas que se traducen en variaciones morfológicas de una especie a otra. Las principales categorías de compuestos útiles en

quimiotaxonomía son: **a.** metabolitos secundarios cuya síntesis proviene de rutas alternas no esenciales de la planta. Los metabolitos secundarios pueden ser de tipo alcaloides, antocianinas, terpenos, flavonoides, glucósidos, glicósidos, cianogénicos, betalaínas, entre otros. **b.** Los que contienen información de proteínas, ADN y ARN. Se conoce que el aporte quimiotaxonómico ha sido relevante en la confirmación y corrección de clasificaciones dudosas de especies (Benítez, 2006).

En la química ecológica son ampliamente estudiados los metabolitos secundarios en aspectos como la síntesis, almacenamiento y función ecológica. También se estudia su relación con otras especies animales o vegetales asociadas o de hábitad circundante a la especie en estudio.

1.1.4.-Rubus adenotrichos (Schltdl).

Es un arbusto trepador perteneciente a la familia de las Rosaceae, de 3-5 m de altura. Crece en forma enmarañada en matorrales. Posee turiones arqueados con sección transversal, terete angulosos de caras cóncavas, pubescente, con tricomas simples y capitados en tallos y peciolas. Forma de lámina folíolos ovalada, con borde aserrado y ápice acuminado, cara adaxial y abaxial de los folios pubescentes, de color verde.

Posee inflorescencia tipo panícula piramidal, es decir con forma de racimo cuyos ejes laterales se ramifican, posee más de 20 flores por inflorescencia, tálamo convexo, 5 sépalos y de 5-8 pétalos, ovales, blancos en la base y con ciertas pronunciaciones rosáceas en los bordes. Fruto ovoide de 120 drupéolos por fruto, de color negro (Mora, 2011).

Rubus adenotrichos pertenece a un grupo de moras de taxonomía complicada debido a que su marcada hibridación hace difícil la separación de las especies (Alice y Campbell, 1999). En un estudio realizado sobre el género *Rubus* en el estado Táchira (Mora, 2011) se encontró a esta especie distribuida en un rango altitudinal entre los 1.500 y 2.700 msnm. También se encontró que la presencia de tricomas glandulares era más evidente sobre los 2500 msnm, mostrándose quizás una correlación entre la altitud y la densidad de tricomas.

1.1.5.-Tricomas.

Los tricomas son estructuras celulares extensivas de la epidermis. La palabra proviene del griego *trichos* que significa pelos. La clasificación principal que reciben está relacionada con el hecho de que algunos tricomas secretan sustancias producidas en áreas subcelulares de los mismos, y otros simplemente se constituyen un apéndice epidérmico; a los cuales se les distingue como tricomas glandulares y tricomas simples, respectivamente. Los tricomas pueden presentarse de múltiples maneras como escamas, pelos, cerdas o formaciones ramificadas más complejas. (Glas et al., 2012).

En algunas especies se presentan tricomas en la superficie de las semillas y frutos pero, a diferencia de las hojas estos se encuentran internamente y cumplen funciones de abrigo y protección. Por ejemplo el fruto de la sapindácea *Acer pseudoplatanus* posee en el endocarpio pelos internos, y las semillas del árbol *Symphonia clusioides* (Clusiaceae) produce pelos fibrosos desde el endocarpio hacia el embrión. También existen estructuras de tricomas pluricelulares impresionantes como las del merey

Anacardium occidentale (Anacardiaceae) que posee cavidades secretoras (Werker, 2000).

Los tricomas localizados en partes aéreas de las plantas como tallos, hojas y frutos son de diversa formación y estructura, pero en partes subterráneas de las plantas son pelos exclusivos de las raíces. Hay una enorme variedad de tricomas en cuanto a su origen, microestructura, morfología, tamaño, capacidad secretora, tipo de secreción que producen, actividad de las sustancias secretadas y función (Werker, 2000).

1.1.5.1.-Tricomas simples.

Los tricomas no glandulares o pelos simples pueden variar entre si notablemente en tamaño, distribución, simetría y uniformidad. Pueden ser unicelulares o pluricelulares, aun cuando a simple vista sean similares. Los tricomas simples pueden clasificarse en:

- a. Unicelulares: distribuidos aleatoriamente sobre la superficie epidérmica como gránulos de longitud variable.
- b. Bicelulares: dispuestos en la cara adaxial de las hojas, preferencialmente encontrados en época de invierno.
- c. Bicelulares: dispuestos en toda la superficie principalmente de la hoja mezclados con tricomas multicelulares.
- d. Multicelulares sin glándulas secretoras (Werker, 2000).

1.1.5.2.-Tricomas glandulares.

Los tricomas glandulares son estructuras epidérmicas compuestas por diversos tipos de células que secretan, absorben o producen algún tipo de metabolitos secundario.

También pueden presentarse como estructuras unicelulares o pluricelulares uniseriados o multiseriados y de formas variadas. Se diferencian de acuerdo al tipo de sustancias que secretan y cómo se producen, según la estructura, la localización de los mismos y la función que ejercen. (Peter et al., 1998).

1.1.5.3.- Morfología del tricoma glandular.

Existen tricomas unicelulares de dos tipos: basal y apical. Si son multicelulares, los tricomas se diferencian por la disposición de las células uniseriadas que pueden ser como filamento o de forma cruzada o estrellada. Para un tricoma multicelular la morfología típica es un conjunto de células pequeñas, y una cabeza con una o más células secretoras. Sin embargo, existen numerosas variaciones en esto (Figura I.1), (Glas et al., 2012).

La pared celular del tricoma glandular consiste usualmente en una continuación de la epidermis de la planta, a esta se le conoce como pared celular principal. Sin embargo, se conoce que algunos tricomas cutinizan o suberizan la membrana celular volviéndola más delgada, ésta última se le conoce como pared celular secundaria, donde se suelen almacenar el producto final de síntesis. Dicha membrana es más sensible al contacto lo que permite la liberación del material contenido en el tricoma (Werker, 2000). La pared celular secundaria puede presentarse estructuralmente de diversas formas, como papila, retículas verrugosas, estriados, entre otros. Esas microestructuras pueden poseer a su vez otras morfologías subcuticulares y ceras epicuticulares relacionadas a compuestos químicos lo que es raro en tricomas (Figura I.2).

UNICELULARES



Papila



Filiforme



Ramificado



Estrellado

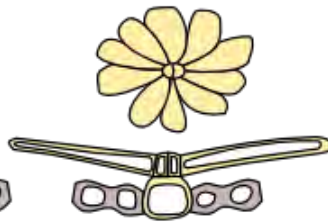
PLURICELULARES



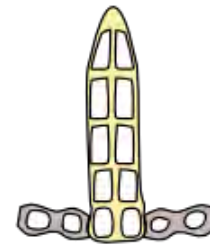
Filiforme



Ramificado



Escumiforme



Varias filas de células

GLANDULARES



Unicelular



Pluricelular
con cabeza
secretora
unicelular

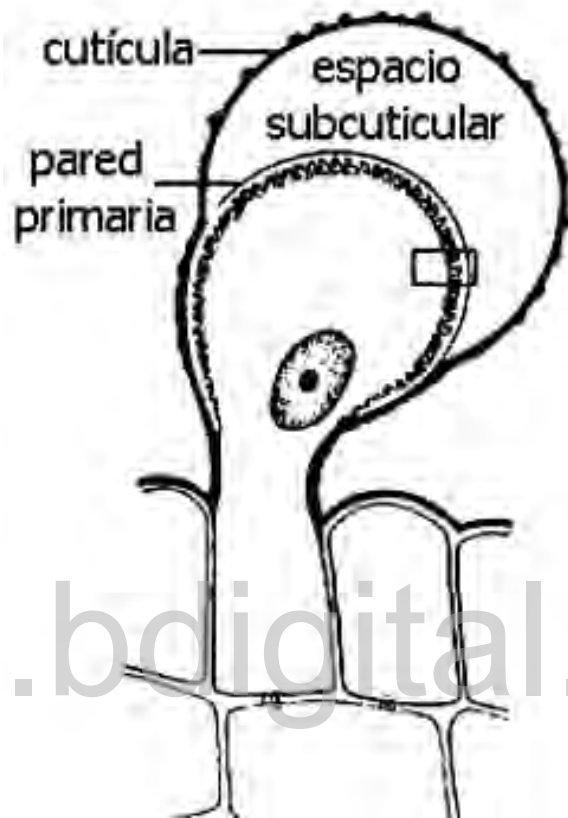


Pluricelular
con cabeza
secretora
pluricelular



Peltado

Figura I.1.- Tipos de tricomas simples y glandulares. Atlas de histología vegetal y animal http://mmegias.web.uvigo.es/1-vegetal/v-imagenes-grandes/proteccion_tricomas.php/13-09-16



www.boigital.ula.ve

Figura 1.2.- Tricoma nectario de *Lonicera japonica*. Tomado de Fanh, 1979.

1.1.5.4.-Clasificación de los tricomas glandulares según el tipo de sustancia secretada.

Existen dos tipos de tricomas glandulares secretores: **a.-** aquellos en cuyas glándulas no se producen reacciones químicas que modifiquen la estructura de las sustancias que almacenan, como es el caso de los tricomas que secretan néctar o los que absorben sales; y **b.-** los tricomas glandulares que sintetizan y secretan constantemente sustancias. Pueden ser hidrofílicos (como los que secretan mucilago, sustancia rica en enzimas digestivas) o lipofílicas (como aquellos de las familias Asteraceae, Laminaceae y Geraneaceae). El tipo de compuestos secretados comúnmente en ambos casos son: polisacáridos, azúcares, lípidos, aceites esenciales, sales, resinas, proteínas, entre otros (Werker, 2000citado de Fanh 1979).

1.1.5.5.- Clasificación de los tricomas según su función.

1.1.2.5.a.-Función protectora: Se ha observado que las especies vegetales en etapas juveniles de sus hojas y turiones poseen una mayor susceptibilidad a infestaciones de insectos, razón por la cual suelen observarse con mayor abundancia de estructuras epidérmicas como los tricomas simples y glandulares, los cuales constituyen no solo una barrera estructural sino también una barrera química (Tissier, 2012). En el caso de ser tricomas glandulares que exuden sustancias pegajosas y potencialmente tóxicas; su función se cree es evitar que los insectos se alimenten de fluidos intracelulares en tallos y hojas o engullan el material epidérmico celular. Esto ha permitido como característica evolutiva que algunas especies vegetales modifiquen su superficie microscópicamente desarrollando diversas estructuras, la mayoría

de las veces imperceptibles a simple vista (Figura I.3). Los tricomas no solo disminuyen la depredación de la especie vegetal, sino también dificultan la oviposición y la movilidad de los insectos en instares juveniles. También evitan las infestaciones parasitarias o microbianas en algunos casos. Sin embargo, el papel protector de los tricomas puede afectar también el desempeño de enemigos naturales. Por ejemplo, la pequeña avispa parasitoide *Encarsia formosa* es más eficiente para encontrar su hospedero, las larvas de las mosquitas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), cuando están en hojas glabras de pepino que cuando se hallan sobre hojas que poseen tricomas (Schoonhoven et al., 2005).

Otra característica importante de la función protectora de los tricomas está relacionada con la abundancia de los mismos asociada a las variables abióticas del ecosistema (Tissier, 2012). Es decir, suelen constituirse en una barrera efectiva contra el exceso de radiación solar y los desbalances hídricos. También actúan como reguladores térmicos y como mecanismo para tolerar metales pesados atrapándolos en enlace de coordinación con algunos de los compuestos típicos producidos en las glándulas secretoras (Schoonhoven et al., 2005 y Wagner, 1991).

Algunos tricomas glandulares son atractivos de insectos polinizadores debido a la producción de sustancias volátiles y carbohidratos que les sirven de alimento, lo que los convierte en elementos fundamentales para la reproducción de muchas especies vegetales. A este tipo de relaciones planta-

insecto, donde ambos salen de una u otra manera beneficiados suele llamarse mutualismo. Un ejemplo de esto son las hormigas *Wasmannia auropunctata* que favorecen la polinización de las flores del cacao (*Theobroma cacao*) porque libran a la planta de infestaciones de otros insectos ya que una de las características de las hormigas es que son altamente defensoras de su territorio (Goitia et al., 1992).

Otros ejemplos de asociaciones con plantas que poseen tricomas glandulares son las arañas *Peucetia* que suelen asociarse con plantas de los géneros *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Melastomataceae*, cuyos tricomas glandulares son una trampa efectiva contra insectos, inhabilitándolos en sus funciones motoras debido a las propiedades pegajosas de las sustancias que secretan. Esto facilita a las arañas la captura de las presas, por lo que las hace hospederas habituales de plantas productoras de tricomas glandulares (Morais, 2009).

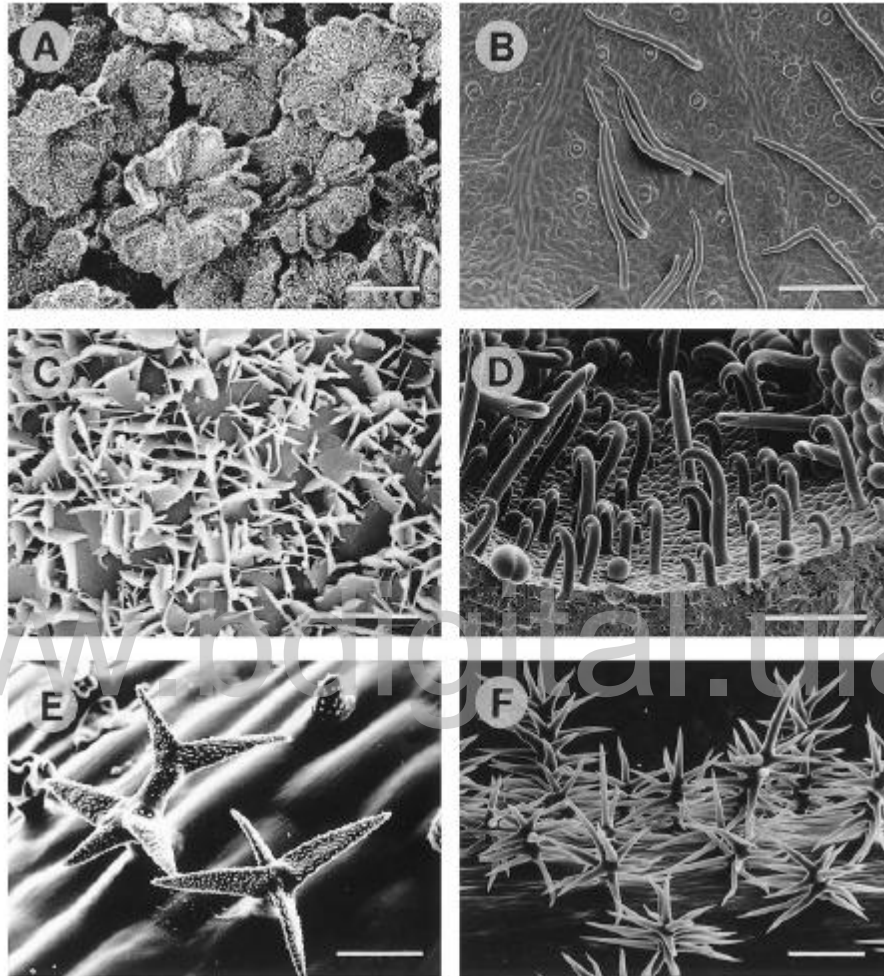


Figura I.3. Micrografías de microscopio electrónico de barrido. **A.** Tricomas peltados en la cara abaxial de las hojas de *Rhododendron callostrotum*; **B.** Tricomas de las hojas de *Fagus sylvatica* que le dan una apariencia sedosa; **C.** Cara abaxial de las hojas de *Quercus pubescens* mostrando las placas de cera epicuticular cristalinas; **D.** Tricomas en forma de gancho de la cara abaxial de *Phaseolus vulgaris*; **E.** Tricomas ramificados de *Lavandula spicata*; **F.** Tricomas en forma de árbol en la superficie de una yema de *Anigoxanthus flavidus* (Schoonhoven et al., 2005).

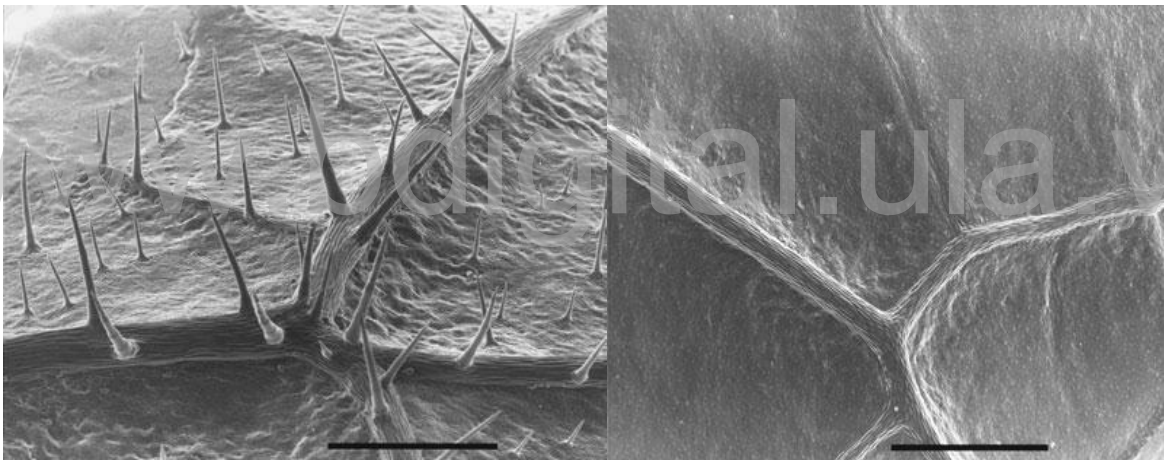


Figura I.4.-Micrográficas electrónicas de barrido de las superficies de **A** una hoja pubescente y **B** una hoja glabra de dos cultivos de pepino. (Schoonhoven et al., 2005).

I.1.2.5.b.- Absorción de agua: Los pelos o tricomas de las raíces absorben constantemente agua y minerales del suelo. Suelen ser unicelulares, alargados y de vida corta. En algunas plantas pueden actuar como estructuras secretoras, como es el caso de los tricomas de las raíces de la gramínea *Sorghum spp* que secretan gotas de un mucílago que ayuda en la fijación de la planta al suelo. En las plantas epífitas, las cuales no tienen contacto con el suelo, los tricomas sirven para la absorción y transporte de agua presentes como pequeñas gotas en la niebla (Werker, 2000).

I.1.2.5.c.- Secreción de sales: los tricomas que secretan sales minerales poseen variada morfología y diferentes formas de secretar las mismas. La mayoría de ellos tienen el ápice del tricoma con una cutícula elástica que se expande llenándose de las sales y exponiendo el material en forma de vacuola. Algunas de las especies representativas de esto son: *Phillirea latifolia* que posee tricomas con un tallo unicelular y una cabeza multicelular la cual secreta sales (Werker, 2000). También *Aeschynomene ciliate* de la familia Lamiaceae cuyos tricomas glandulares son uniseriados pluricelulares (Figura I.5) (Leme y Scremin, 2014).

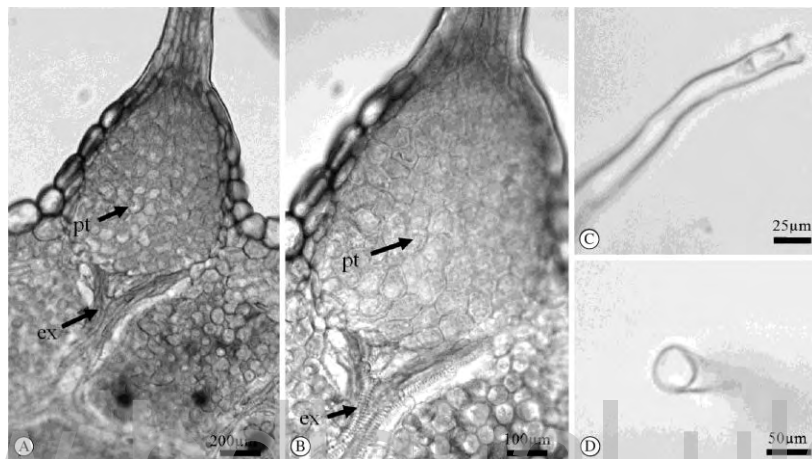


Figura 1.5.-Sección paradérmica de un tricoma hidátodo de *Aeschynomene ciliata*. **A** en la base del tricoma se observan estructuras vasculares. **B** formadas por células de pared delgada **C** parte superior del tricoma **D** poro secretor. Tomado de: (Leme y Scremin, 2014).

I.1.2.5.d.- Tricomas atrayentes: son aquellos que secretan un exudado gomoso, tal como el de algunas plantas carnívoras, que atraen a los insectos para luego ser atrapados y digeridos. Son de tipo filamentosos con una cabeza secretora que puede o no desarrollar una cutícula extendida donde es almacenado el mucílago (Figura I.2). Dichos exudados poseen enzimas que comienzan el proceso de digestión de los insectos atrapados. Ejemplo de plantas con este tipo de tricomas son las especies *Drosera rotundifolia*, *Tropaeolum* sp. y *Lonicera* sp. Estos tricomas pueden variar durante la ontogénesis de la especie, como es el caso de *Cannabis sativa*, que presenta variaciones en la cantidad de tricomas durante su desarrollo, aumentando la abundancia de un tipo de tricomas glandulares respecto a otro tipo. Se piensa que esto tiene como función la protección de flores y semillas contra la herbivoría y la desecación (Werker, 2000).

1.1.5.6.-Clasificación de los tricomas según su localización.

- Tricomas de las flores: su función varía según la especie y el lugar en el que se encuentran, pueden ser atrayentes de polinizadores cuando son glandulares y secretan sustancias volátiles. Pueden ser protectores contra infestaciones cuando son simples y se encuentran en los pétalos. Si se presentan en los sépalos, especialmente en la etapa capullo de la flor, probablemente fungen como protección contra la herbivoría (Werker, 2000).
- Tricomas en frutos y semillas: en ambos casos fungen como sistema de protección. Al fruto lo protegen contra cambios fuertes de temperatura o exceso de radiación solar y para las semillas son elementos que ayudan a la dispersión y el anclaje en el suelo, como por ejemplo las semillas de

Nymphoides y *Trigonia* cuyos tricomas son pelos llenos de aire que contribuyen con su dispersión (Werker, 2000).

I.1.6.-Mecanismos de secreción

I.1.6.1.-Secreción pasiva: por difusión si el producto de secreción tiene alta concentración en el citoplasma.

I.1.6.2.-Secreción activa: puede ser de tres tipos

I.1.6.2.a.-Secreción holocrina: el producto es liberado por la ruptura y posterior muerte celular. En este caso el contenido entero de la célula forma parte de la secreción (Alonso, 2011).

I.1.6.2.b.- Secreción merocrina: la secreción sale del protoplasto atravesando la membrana plasmática. Las sustancias polares como proteínas, glicoproteínas y glicósidos salen a través de vesículas; las sustancias apolares como lípidos difunden libremente a través de la membrana. Posteriormente la secreción atraviesa la pared celular y puede salir al exterior por medio de poros o canales que atraviesan la cutícula como hidatodos y glándulas secretoras de mucílagos y terpenos, o pueden almacenarse entre la pared y la cutícula, de donde son expuestos por acción mecánica (ruptura de cutícula por roce) y térmica (calor) (Alonso, 2011).

I.1.6.2.d.- Secreción apocrina: el término "apocrina" hace referencia a la forma en la que es excretada la sustancia. Las células de las glándulas apocrinas poseen dos polos diferentes el polo basal, donde se encuentran los elementos necesarios para la síntesis de la sustancia y el polo apical, donde se concentra poco a poco la sustancia

producida. En el momento de la secreción apocrina el polo apical se fragmenta y cada fragmento lleva en su interior un poco de la sustancia sintetizada (Figura I.6).

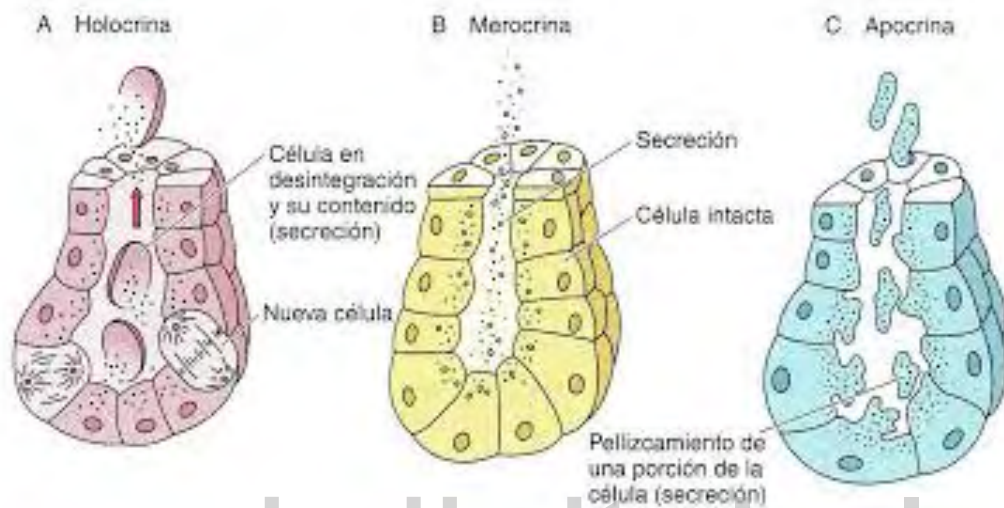


Figura I.6.- Ilustración de los mecanismos de secreción. Tomado de:

https://www.google.co.ve/search?q=mecanismos+de+secreci%C3%B3n+en+tricomas+glandulares&rlz=1C1PRFC_enVE584VE584&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiB9YD6OurSAhVeHGMKHUUMBa44MhD8BQgGKAE&biw=1280&bih=645#imgrc=8UEgrYp6_DWmoM: (22/03/17).

I.II.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir y caracterizar los principales caracteres morfológicos externos de *Rubus cf. adenotrichos*.
- Estudiar la morfología de los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos*.
- Evaluar cualitativamente la presencia de derivados fenólicos y taninos en los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos*.
- Comparar los resultados obtenidos en la observación de tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos* con los reportados en la bibliografía para tricomas glandulares de otras especies vegetales.

I.III.- METODOLOGÍA

I.III.1-Recolección del material vegetal.

El material vegetal se recolectó en el sector Monterrey (2375 msnm) de El Valle, cerca de la ciudad de Mérida, en octubre de 2015, donde se han observado poblaciones abundantes de *R. cf. adenotrichos*. En la recolección se tomó en cuenta no perjudicar de manera importante la permanencia de la especie en la zona. En ésta se seleccionó un área donde crecían conglomerados de la planta y se recolectaron, de forma aleatoria, los tallos que contenían los tricomas glandulares productores del exudado.

I.III.2- Preparación de la muestra.

Una vez colectada la muestra de *R. cf. adenotrichos* se les separó las hojas de los tallos, para luego cortar estos últimos en segmentos de 5cm aproximadamente. Seguidamente, se les retiró el exudado glandular por inmersión en Diclorometano (DCM) durante 5 min aproximadamente, hasta observar con una lupa estereoscópica, con aumento de 45x, que ya no había exudado en la superficie de los tricomas y del tallo. Todo el proceso se llevó a cabo cuidadosamente utilizando guantes y pinzas con la finalidad de no decapitar por acción mecánica los tricomas glandulares, ni alterar su abundancia natural en la superficie del tallo.

La preparación de la muestra incluyó una clasificación cualitativa inicial de acuerdo a la coloración aparente de los tricomas glandulares en el tallo, separándolos en las categorías más coloreados (Ra+c) y menos coloreados (Ra-c). Posteriormente esta discriminación se tomó en cuenta para intentar asociarla, de manera preliminar, con el grado de exposición solar de la planta, considerando que la expresión fenotípica de

una coloración intensa de los tricomas glandulares puede estar relacionada con una alta radiación solar (Wagner, 1991).

1.III.3.- Observación macroscópica y microscópica de Rubus cf. adenotrichos.

Estas observaciones se hicieron con el objetivo de poder caracterizar, lo mejor posible, la especie de *Rubus* que interviene en la interacción planta-insecto (Ávila-Nuñez et al., 2016; Ávila-Nuñez et al., 2017) que forma parte del estudio. Como ya se ha mencionado anteriormente, existe una alta hibridación en este género, lo cual conduce a que algunos de los caracteres morfológicos que han usado los taxónomos para la determinación de la especie puedan variar. Esto produce conflicto a la hora de ubicar una especie determinada, por lo tanto, parte de hacer la investigación reproducible es describir detalladamente la especie que se está estudiando. De esta manera se asegura estar trabajando siempre con el mismo morfotipo y facilita la recolección de la misma en trabajos futuros relacionados.

La observación macroscópica consistió en observar tanto a simple vista como con la ayuda de una lupa estereoscópica (entre 7x y 45x de aumento, modelo SDZ-TR-PL; Kyowa Optical Company) distintas partes de las muestras recolectadas (hojas tallos y flores). Se hicieron registros fotográficos usando una cámara digital (modelo FMA050; AmScope Company) adaptada al ocular de la lupa y también con una cámara digital (modelo T-10, Sony Cybershot) para aquellas tomas que no requerían aumento.

Usando este mismo procedimiento, se observaron los tricomas en la superficie de tallos y hojas, caracterizándolos de acuerdo a su abundancia relativa, tipo (simple y

glandular), coloración aparente de éstos y de la superficie epidérmica de los tallos. Adicionalmente, se aislaron algunas muestras de tricomas glandulares y simples utilizando una pinza y se conservaron en solución de Hoyer (Anderson, 1954) en portaobjetos, con la finalidad de transparentarlos y observarlos bajo el microscopio óptico (100x y 400x de aumento).

1.III.4.- Mediciones

Para medir la longitud de los tricomas glandulares (N=32) se utilizó la lupa estereoscópica, la cámara digital y el programa (ToupView 3.2 Image Software). La muestra de los tricomas se tomó al azar de distintos segmentos de tallos provenientes de tres especímenes de *R. cf. adenotrichos*. Estos pelos glandulares fueron fotografiados y las imágenes obtenidas se usaron posteriormente para realizar las medidas. Finalmente, esta longitud se expresará mediante el cálculo de la media y desviación estándar.

1.III.5.- Histoquímica

Se evaluó, cualitativamente, la presencia de taninos y derivados fenólicos en tricomas glandulares y la superficie de segmentos de tallos lavados de *R. cf. adenotrichos* utilizando el método de azul de prusia (Hagerman, 1994). La prueba consiste en la determinación colorimétrica de fenoles totales, donde el ferrocianuro de potasio reacciona con el sulfato de amonio férrico para dar azul de prusia. Para esta prueba solo se determinó cualitativamente, la presencia de compuestos fenólicos en secciones de tallos que contenían tricomas glandulares lavados con DCM para eliminar el exudado pegajoso.

En este procedimiento se usaron soluciones de sulfato amónico férrico 0,10 M $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2]$ en HCl 0,10 M y de ferrocianuro de potasio 0,008 M $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$. La solución de HCl 0,1 M se preparó diluyendo 8,3ml de ácido concentrado hasta 1L de agua desionizada. En esta solución de HCl 0,1M se disolvieron 48,2 g de sulfato amónico férrico dodecahidratado. Para la preparación del ferricianuro de potasio se disolvieron 2,63 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ hasta 1L de agua destilada para obtener una solución 0,008M (Oliveros, 1998).

El ensayo se llevó a cabo sumergiendo los segmentos de tallos lavados en la solución de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$. Transcurridos 5 min, se retiró el segmento y se permitió que escurriera los residuos de solución por unos pocos segundos. Luego se procedió a sumergirlo en la solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, dejando reaccionar por otros 5min. Seguidamente, se observaron si ocurrían cambios de coloración y se registró en fotografías usando una cámara digital (modelo T-9; Sony CyberShot).

Posteriormente se varió el tiempo de reacción con la finalidad de comparar si los cambios de coloración resultaban más evidentes en función del tiempo de inmersión en las soluciones. Los tiempos de reacción evaluados fueron: 3, 4, 5, 7, 8 y 10 min, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

I.IV.-RESULTADOS

*I.IV.1.-Características macroscópicas de *Rubus cf. adenotrichos**

En la tabla I.1 se presentan las principales características macroscópicas observadas en los especímenes estudiados de *R. cf. adenotrichos*. Los tallos de *Rubus cf. adenotrichos*, poseen tricomas simples y glandulares, pero para las superficies más expuestas a la radiación solar (Ra+c) se observó una abundancia mayor de tricomas glandulares que para las secciones menos expuestas (Ra-c). Cabe destacar que la descripción de la abundancia de los tricomas glandulares es una apreciación visual no rigurosa, ya que debido a la extrema abundancia de ellos, fue imposible hacer un conteo preciso del número de tricomas por unidad de área. También se observó que la coloración rojiza o castaño oscuro de los tallos es aportada por los abundantes tricomas glandulares y por la epidermis.

Las hojas de los especímenes Ra+c tenían tricomas glandulares principalmente en sus bordes, a diferencia de los individuos Ra-c, donde no se observaron. En algunas hojas Ra+c se pudo notar que los dientes que conformaban el borde aserrado eran rojizos y de apariencia más gruesa que en las hojas Ra-c (Figura I.14).

La cara abaxial de las hojas de los especímenes Ra+c poseían tricomas glandulares. En contraste, las hojas de los individuos Ra-c presentaban en su cara abaxial muy pocos y principalmente ubicados sobre las nervaduras. En ambos casos se observó la presencia de pelos simples. (Figura I.15).

En la cara adaxial de las hojas de las plantas Ra+c se observaron tricomas glandulares especialmente en las nervaduras y el borde de las hojas, en cambio para las plantas Ra-c no se observaron tricomas glandulares. (Figura I.16).

Al estimar visualmente la abundancia (cantidad aparente en una sección de tallo de 1 cm de largo) de tricomas glandulares en la zona más expuesta al radiación solar y la menos expuesta de una misma muestra de tallo se observó que la que se encontraba más expuesta poseía mayor cantidad de tricomas que la menos expuesta (Figura I.23).

La presencia mayoritaria de los tricomas glandulares en áreas de las hojas y tallos de una misma planta, más expuestas a la radiación solar, así como en individuos con diferente exposición al sol, podría estar relacionada como una respuesta adaptativa de la especie a entornos donde este factor abiótico es muy importante. Esto se combinaría con la existencia de un déficit hídrico, especialmente en el período seco, constituyéndose en dos de las principales limitaciones ambientales que enfrentaría *R. cf. adenotrichos* y a los cuales les hace frente a través de la presencia de tricomas glandulares (Wagner, 1991). Se conoce que varias especies vegetales que crecen en ambientes donde estos dos factores abióticos son importantes han desarrollado una cubierta densa de tricomas que podría ayudar a disminuir la pérdida de agua al disminuir la cantidad de luz absorbida por la hojas y la carga de calor asociada (Vogelmann, 1993).

Los flavonoides, especialmente las agliconas de flavonoides (Taleb-Contini et al., 2007), se acumulan en la superficie de las hojas de especies de hábitats áridos o

semiáridos y pueden actuar como filtros para la Radiación UV (Tattini et al., 2000; Agati y Tattini, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Tabla I.1.- Características morfológicas de *Rubus cf. adenotrichos*:

Característica	Descripción
Crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> • Es un arbusto trepador y crece en forma enmarañada en matorrales junto con otras especies vegetales (Figura I.7.-). • Los individuos más expuestos al sol poseen tallos de coloración castaño oscuro en comparación con aquellos menos insolados, que presentan un color verde claro. Esta característica también aplica para secciones dentro de un mismo individuo. Las más insoladas son más oscuras que aquellas menos expuestas a la radiación solar (Figura I.9.-).
Altura	<ul style="list-style-type: none"> • Los matorrales suelen medir entre 2 y 3 m de altura, aproximadamente (Figura I.7.).
Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • De forma cilíndrica, angulosos y con caras cóncavas (Figura I.8.A). • Poseen pelos simples, de apariencia brillante y transparente. Abundantes tricomas glandulares color vino tinto (Figura I.8.C). Al tacto resultan pegajosos. La longitud promedio de los tricomas glandulares es de $1,83 \pm 0,99$ mm. • Presentan dos coloraciones dependiendo del área que se considere: La superior es rojiza o castaño oscuro, que coincide con la mayor abundancia de tricomas. La inferior es más más verdosa por poseer menos abundancia de tricomas glandulares, y porque sus tricomas glandulares no poseen una coloración vino tinto tan marcada.
Hojas	<ul style="list-style-type: none"> • De forma ovalada y color verde oscuro. • Borde aserrado con ápice que termina en una punta. • Cara adaxial y abaxial con pelos simples y tricomas glandulares no tan abundantes como en los tallos (Figura I.10.-).
Inflorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Las flores se disponen en una forma piramidal, con sus ejes laterales ramificados (Figura I.11.A). • Poseen cinco sépalos pubescentes (Figura I.11.B). • Cinco pétalos por cada flor y veinte flores por inflorescencia (Figura I.11.C). • Pétalos blancos con tonalidades rosáceas (Figura I.11.C).
Frutos	<ul style="list-style-type: none"> • Ovalados, de color negro cuando están maduros y rojo intenso previos a la maduración (Figura I.12.).



Figura I.7.- Crecimiento de *Rubus cf. adenotrichos* en forma enmarañada junto con otras especies. Ubicación: Cerro La Bandera, Mérida 19/10/15 Foto: J.L. Ávila



Figura 1.8.- A Tallo cilíndrico y anguloso B Tallos cubiertos de tricomas simples y glandulares C Sección de tallo de *R. cf. adenotrichos* cubierta por pelos simples y tricomas glandulares. Foto: J.L. Ávila.



Figura I.9.- Tallo de *R. cf. adenotrichos* mostrando la coloración castaño oscuro en el área más expuesta al sol y verde claro en la parte menos expuesta. Foto: J.L. Ávila.

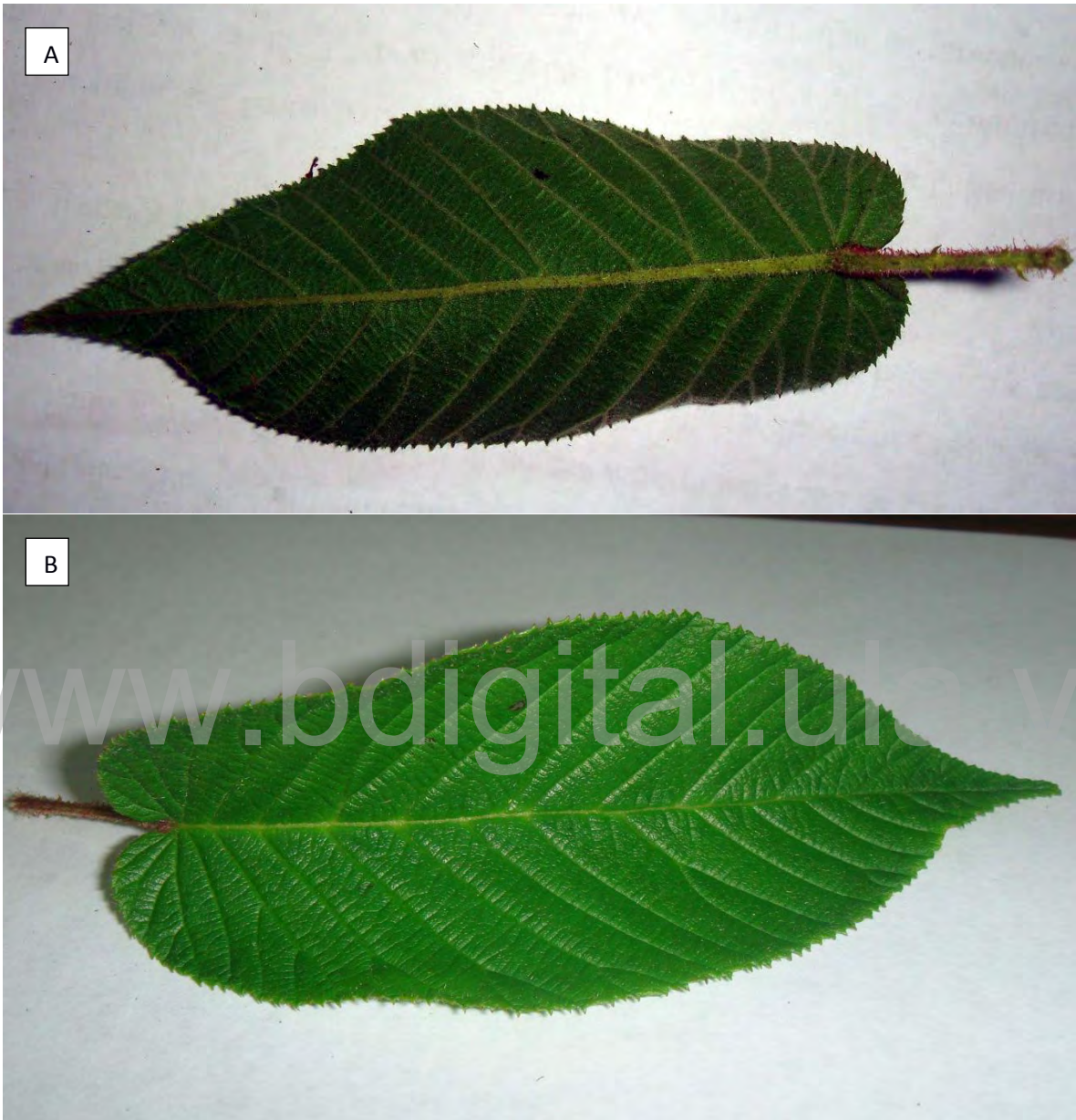


Figura I.10.- Lámina foliar ovalada con borde aserrado **A.** cara abaxial **B.** Cara adaxial.

Foto: J.L. Ávila.

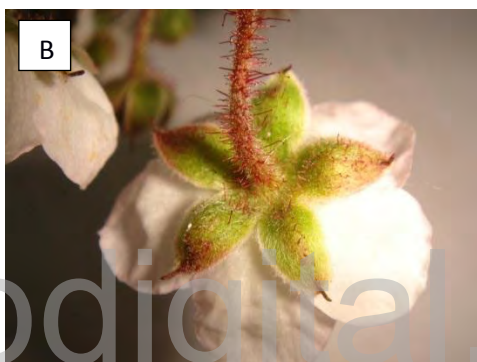


Figura I.11- A Inflorescencia de *Rubus* cf. *adenotrichos* donde se observa su forma piramidal B Cinco sépalos con pelos simples y tricomas glandulares por cada flor. C

Flores blancas con tonalidades rosadas. Fotos: J.L. Ávila.



Figura I.12.- Frutos maduros e inmaduros de *Rubus cf. adenotrichos*.

Ubicación: Cerro La Bandera, Mérida. Julio 2014. Foto J. L. Ávila

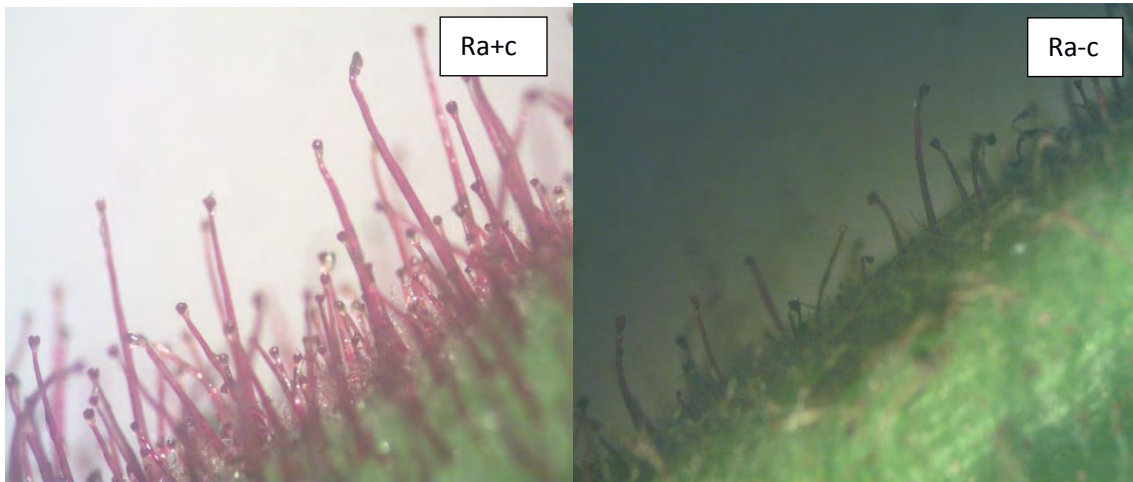


Figura I.13.- Comparación de la sección de los tallos de *R. cf. adenotrichos* sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente (Aumento 25x).

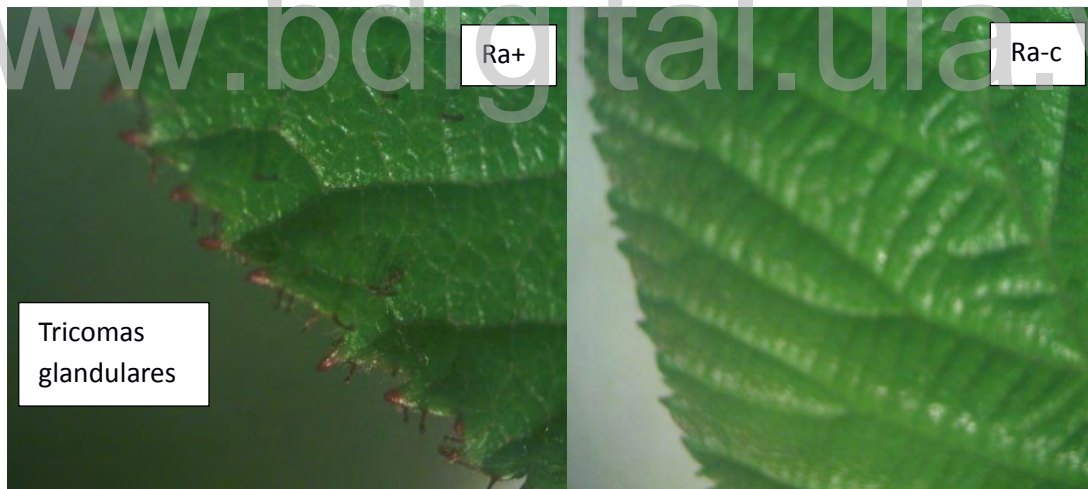


Figura I.14.- Comparación de las hojas de *R. cf. adenotrichos* sometidas a mayor y menor grado de exposición solar respectivamente. Tomadas con lupa estereoscópica.



Figura I.15.- Acercamiento de la cara abaxial de las hojas de *R. cf. adenotrichos* sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente
(Aumento 25x)



Figura I.16.- Comparación de las caras abaxial y adaxial de las hojas de *R. cf. adenotrichos* sometidos a mayor (Ra+) y menor (Ra-C) grado de exposición solar respectivamente. Tomadas con lupa estereoscópica.

I.IV.2.-Características macroscópicas y microscópicas de los tricomas glandulares de Rubus cf. Adenotrichos

Cuando se examinaron los tallos recolectados bajo el microscopio estereoscópico, la característica más evidente fue la presencia de una intrincada madeja de pelos simples y tricomas glandulares (Figura I.17). Estos últimos sobresalían en altura y abundancia sobre los primeros. Bajo el microscopio óptico se observaron constituidos por un tallo o pedicelo pluricelular, conformado por hileras de células alargadas apiladas una sobre otra que conforman, presumiblemente, haces de fibras con apariencia de tubos conductores. También se observó la presencia de una cabeza en forma de embudo de la cual brotaba una secreción pegajosa (color verde amarillento) que solía desparramarse sobre sus bordes y escurrir hacia el tallo del tricoma (Figura I.19). La coloración vino tinto era más intensa en el tallo del tricoma y más clara en la cabeza. Este característico color vino tinto puede estar asociado a la presencia de un alto contenido de antocianinas (Figura I.18) (Acosta, 2010).

El patrón de coloración antes referido fue diferente cuando se examinaron tallos de plantas Ra-c o inclusive en tallos de un mismo individuo con superficies menos expuestas al sol. En estos casos se observó que los tricomas glandulares eran de coloración vino tinto menos intensa, incluso, algunos de ellos se notaban blanquecinos o transparentes.

El examen macroscópico hecho con la lupa de las cabezas de los tricomas reveló que su parte superior, esto es, la parte más ancha del cono, pareciera ser hueca, justo como un embudo por el cual brota el exudado pegajoso. Bajo el microscopio de luz la cabeza

se visualizaba como una estructura semitransparente constituida por células poliédricas. También pudieron observarse formaciones parecidas a vesículas de color verde-amarillento dispersas en toda el área de la cabeza, presumiblemente, gotas remanentes de exudado. Es importante resaltar que, a diferencia de los tricomas glandulares de otras especies vegetales, en *R. cf. adenotrichos* no ocurrió la ruptura de las cabezas glandulares durante el proceso de extracción química. Una posibilidad, por comprobar, es que el exudado salga a través de ella por poros o por una única abertura localizada en el área superior de la cabeza (Figura I.21). Es decir, éste saldría como micro-gotas que van escurriendo por el tallo del tricoma (Figura I.20). Si este exudado es producido por células glandulares de la cabeza (como está descrito para otras especies de plantas) o es transportado por elementos conductores localizados en el tallo del tricoma desde zonas glandulares en el tallo de la planta, es una interrogante que se podrá dilucidar en estudio posteriores empleando técnicas que involucren cortes histológicos.

La descripción de la morfología de los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos* realizadas en este trabajo son las primeras reportadas para esta especie. Sobre la base de la comparación con la morfología descrita para los tricomas glandulares de otras especies vegetales, puede decirse que *R. cf. adenotrichos* posee tricomas glandulares cuya morfología y mecanismo de liberación del exudado no se parece a ningún otro. Gran parte de las descripciones de la morfología y mecanismos de secreción han sido realizados estudiando los tricomas de los géneros *Cannabis*, *Solanum*, o *Nicotiana*, donde el exudado glandular del tricoma sale al exterior por la ruptura de la

membrana cuticular de la cabeza producida por acción térmica o mecánica (Figura I.22) (Ventrella, 2008).

En cuanto a la abundancia relativa de tricomas glandulares en un mismo segmento de tallo, es evitable que las zonas más expuestas a radiación solar presentan un abundancia superior (Figura II.23). Lo que se asocia a mecanismos de adaptación respecto a componentes abióticos del sistema, en este caso radiación solar, como se describió previamente en la sección anterior (Wagner, 1991 y Volgemann, 1993).

www.bdigital.ula.ve

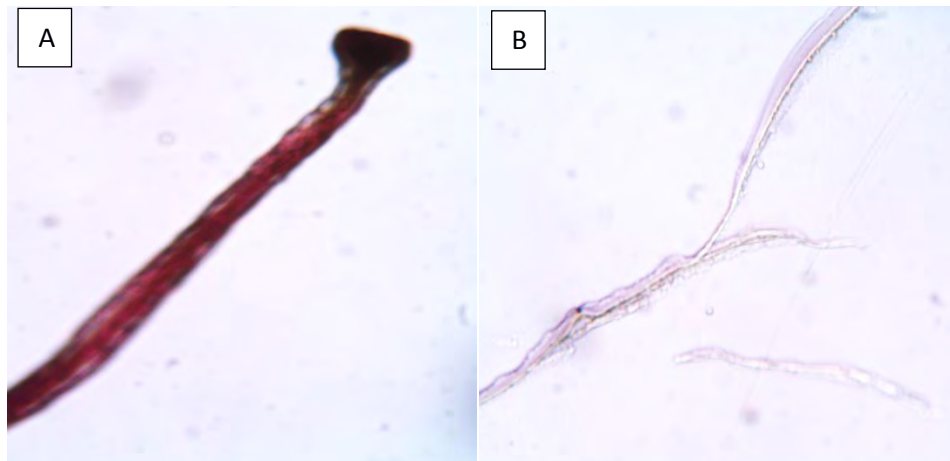


Figura I.17.-A Tricomas glandulares **B** Pelos simples de *R. cf. adenotrichos* (Aumento 100x).



Figura I.18.-A Tallo del tricoma pluricelular **B** Cabeza secretora del tricoma **C** Cambio en la coloración del tricoma desde el tallo hasta la cabeza para la especie en estudio *R. cf. adenotrichos* (Aumento 400x).

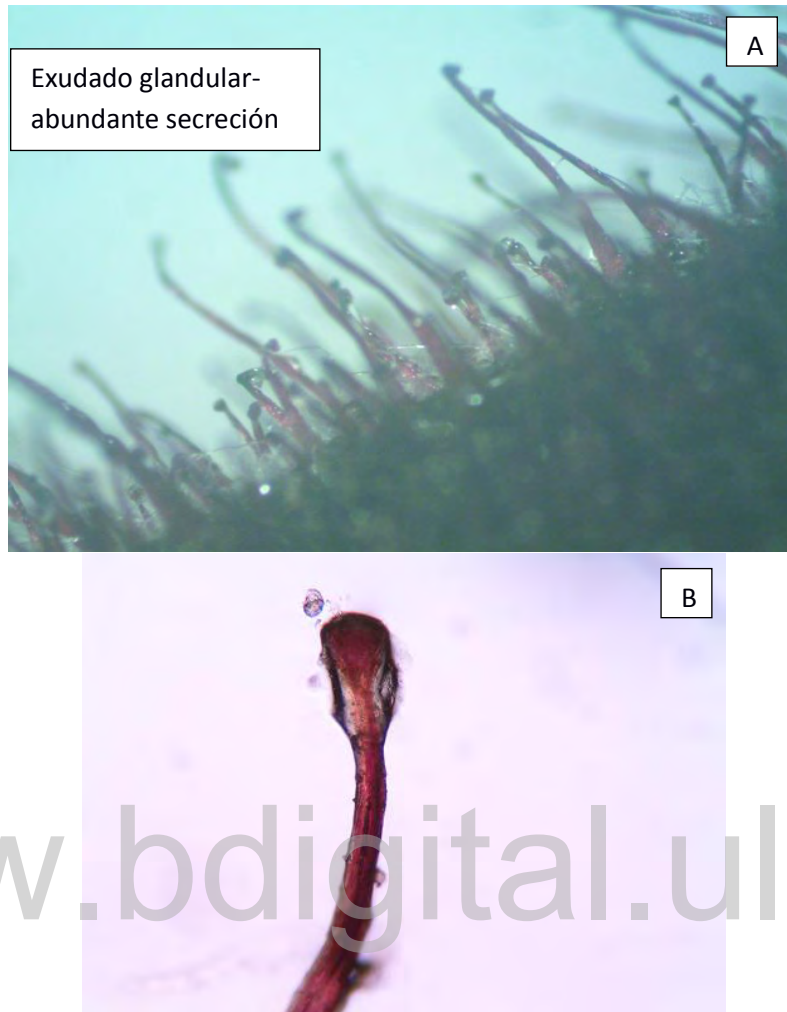


Figura I.19.- **A** Tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos* con el exudado glandular expuesto y escurriendo por el tallo del tricoma (Aumento 100x) **B** Tricoma con exudado adherido por todo el cuerpo del tricoma (Aumento 25x).



Figura I.20.- Micrografía de microscopio de luz mostrando la cabeza secretora del tricoma glandular de *R. cf. adenotrichos* (Aumento 100 x).

www.bdigital.ula.ve



Figura I.21.- Cabeza secretora del tricoma glandular de *R. cf. adenotrichos*. (Aumento 100x).

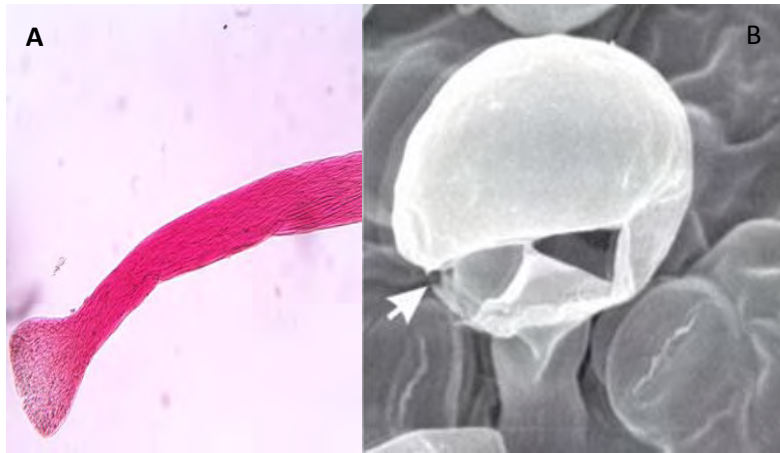


Figura I.22.- Tricomas glandulares **A** tricoma después de la extracción *R. cf. adenotrichos* (Aumento 100x) **B** tricoma glandular de *Cordia verbenacea* DC con la cutícula rota y pérdida del exudado (Ventrella, 2008).

www.bdigital.ula.ve

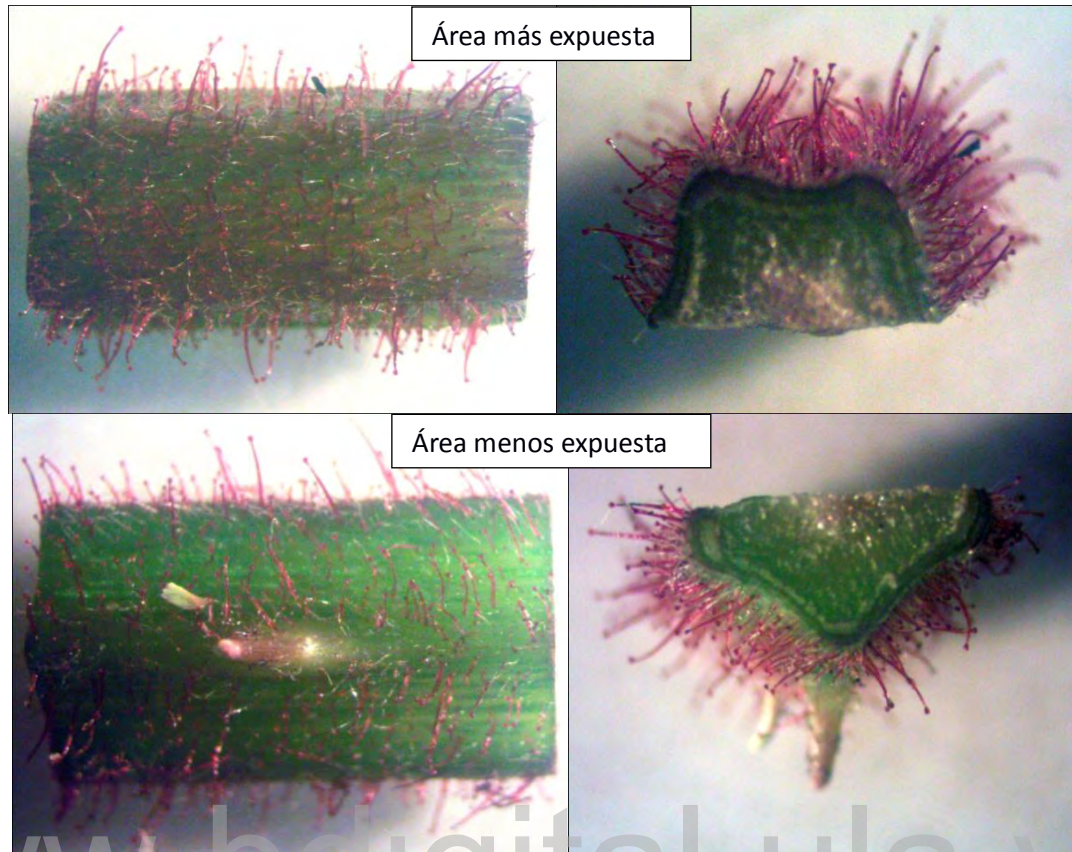


Figura I.23.- Corte longitudinal y transversal de 1cm del tallo de *R. cf. adenotrichos*, diferenciando la cara más expuesta con la menos expuesta para comparar abundancia

de tricomas. Foto: J.L. Ávila (Lupa estereoscópica)

1.IV.3.- Determinación cualitativa de taninos y fenoles en los tricomas glandulares de R. cf. adenotrichos

Tallos de *R. cf. adenotrichos* fueron sumergidos en la solución de $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2]$ y luego en $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, donde se observa el desarrollo de una coloración azul, indicando la presencia de derivados fenólicos o/y taninos en la muestra (Figura I.24). Incluso puede observarse en el corte transversal, como la sección interna entre la epidermis y la zona vascular cambia rápidamente a color azul.

Al momento de variar los tiempos de reacción no se observó ninguna diferencia, la respuesta fue siempre positiva y el cambio de coloración del tejido fue inmediato en los tiempos de reacción seleccionados 3, 4, 5, 7, 8 y 10 min.

www.bdigital.ula.ve



Figura I.24.- Prueba de Azul de prusia para la detección de derivados fenólicos y/o taninos sobre muestra de tallo de *R. cf. adenotricos* **A-** respuesta positiva en el segmento transversal de tallo, **B.-** reactivos y recipiente de prueba, **C.-** resultado de la prueba.

La evaluación de la presencia de compuestos polifenólicos en los tricomas glandulares resultó igualmente positiva, evidenciando que tanto en estas estructuras como en los tejidos internos del tallo, se produce y almacena material fitoquímico del tipo polifenólico. Estos resultados están en concordancia con los reportados por otros autores en cuanto a los componentes químicos encontrados en los tricomas glandulares, siendo normalmente identificados compuestos del tipo fenólicos, los cuales comprenden una amplia gama de compuestos (Wagner, 1991), a los cuales se les han atribuidos características antioxidantes y otras actividades o propiedades que se creen son efectivas como atenuador o protector contra diferentes fuentes de estrés, entre ellos agentes abióticos dañinos (Kâhkönen, 1999, Martínez, 2011 y Azofeifa, 2013).

En este capítulo se aportan rasgos morfológicas que son relevantes para una identificación de *R. cf. adenotrichos* proveniente de la zona donde se recolectó y con la cual se ha desarrollado toda la investigación mostrada en este trabajo. Si bien es posible corroborar similitud de algunas características que coinciden con los señalados por Mora (2011) para *Rubus adenotrichos*, se prefiere seguir conservando la denominación *R. cf. adenotrichos*. Esto indica que dicha determinación se acerca a la reportada por la literatura, pero que debido a su alta hibridación y por la carencia de estudios taxonómicos recientes de las especies de *Rubus*, a la determinación es prudente dar un margen de incertidumbre.

I.V.- REFERENCIAS.

Acosta O.; Vaillant F.; Cozzano S.; Mertz C.; Pérez A. y Castro M. (2010). **Phenolic content of antioxidant capacity of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos Schultdl.*) during three edible maturity stages.** Food Chemistry 119: 1497-1501.

Agati G; Tattini M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. New Phytologist 186.

Alonso J. 2011. **Manual de Histología Vegetal.** Editores Mundi-Prensa. Madrid-Mexico.p 69-70.

Anderson, L.E. 1954. Hoyer's Solution as a rapid mounting medium for bryophytes. Bryologist 57:242-244.

Atlas de histología vegetal y animalhttp://mmevias.web.uvigo.es/1-vegetal/v-imagenes-grandes/proteccion_tricomas.php/13-09-16

Avila-Nuñez JL.; Naya M.; Otero L. y Alonso-Amelot M. (2016a). **A resin bug (Reduviidae: Harpactorinae: Apiomerini) harvesting the trichome secretion from an Andean blackberry.** Neotropical Biodiversity.

Avila-Nuñez JL.; Naya M.; Otero L. y Alonso-Amelot M. (2017). **Sticky trap predation in the neotropical resin bug *Heniartes stali* (Wygodzinsky) (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae).** Journal of Ethology doi: 10.1007/s10164-017-0512-1

Benítez C., Cardozo A., Hernández L., Lapp M., Rodríguez H., Ruiz T. Torrecilla P. 2006. **Botánica Sistemática. Fundamentos para su estudio.** Cátedra Sistemática Botánica. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

Cano Y, C. G.; Marroquín de la F, J. S. 1994. Taxonomía de plantas superiores. Ed. Trillas. México.359 p.

Coppen J., 1995. **Gums, resins and latexes of plants origins**.Food and Agriculture Organizations.United Nations.Roma.Italia.p: 9-11.

Fahn A. 1979. **Secretory tissues in plants**.Academic Press, London.

Glas J.; Schimmel B.; Alba J.; Escobar R.; Schurink R. y Kant M. (2012).**Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores**. International Journal of Molecular Sciences 13(12): 17077-17103.

Goitia W, Bosque C. y Jaffe K. 1992. **Interacción Hormiga-Polinizador en Cacao**.Turrialba. 42: 178-186.

Hagerman A. 1994. **Tannin Analysis**.Communication Personal.Department of Chemistry.Miami University. Oxford. OH 45056.

Kâhkônén M.; Hopia A.; Rauha J.; Pihlaja K.; Kujala T. y Heinonen M. (1999). **Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds**. Journal Agriculture Chemistry 47: 3954-3962 Azofeifa G.; Quesada S.; Bourdard F.; Morena M.; Cristol J.; Pérez A. y Vaillant F. (2013). **Antioxidant and Anti-inflammatory in Vitro Activities of Phenolic Compounds from Tropical Highland Blackberry (*Rubus adenotrichos*)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 5798–5804.

Leme F. y Scremin E., 2014. **Ecological interpretations of the leaf anatomy of amphibious species of *Aeschynomene* L. (Leguminosae - Papilionoideae)**

Brazilian Journal of Biology. 74:1.

Martínez N.; Arévalo K.; Verde M.; Rivas C.; Oranday A.; Nuñez M. y Morales M. (2011).

Antocianinas y Actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichos* Schldl (zarzamora). Revista Mexicana de Ciencias FARMACÉUTIC 42(4): 66-71.

Marzocca A. 1985. **Nociones Básicas de Taxonomía Vegetal.** Instituto

Iberoamericano de Cooperación para la Agronomía. Editores Escoto B. y Sagone M.

San José- Costa Rica. 7-12p.

Mora S. (2011). **Biodiversidad y algunos aspectos de distribución biogeográfica**

de *Rubus* sp en el estado Táchira-Venezuela. Trabajo especial de grado. Universidad Nacional Experimental del Táchira. Venezuela. Capítulo V. pp. 1-18.

Morais-Filho, J. y Romero G. 2010. **Plant glandular trichomes mediate protective**

mutualism in a spiderplant system. Ecology Entomology. 35:485-494.

Oiveros A. 1998. **Dinámica de Glicósidos Cianogénicos- Taninos y Fenolicos en el**

Helecho Macho (*Pteridium aquilinum*) en el Estado Mérida. Trabajo de Ascenso.

Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Peter J. y Shanower T. (1998). **Plant Glandular Trichomes. Chemical Factories with**

Many Potential Uses. Resonance 3(3): 41-45.

Schoonhoven L.; Loon J. y Dicke M. (2005). **Insect-Plant Biology**. Oxford University Press pp. 169-173.

Taleb-Contini SH; Scherr K; Batista Da Costa F; Rodrigues de Oliveira DC. 2007. **Detection of flavonoids in glandular trichomes of *Chromolaena* species (Eupatorieae, Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 43: 315-321.

Tattini M. Gravano E. Pinelli P. Mulinacci N. y Romani A. (2000). **Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation**. Research New Phytologist 148: 69-77.

Tissier A. (2012) **A Glandular Trichomes: What come after expressed sequence tags?** The Plant Journal 70: 51-68.

Ventrella M. y Ribeiro C. 2008. **Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC.(Boraginaceae) leaves**. Revista Brasileira de Botânica. 31: 3.36570-000.

Vogelmann TC. 1993. **Plant tissue optics**. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44: 231-251.

Wagner G. (1991). **Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs**. Plant Physiology 96: 675-679.

Werker, 2000. *Advances in Botanical Research. Incorporating Advances in Plants Pathology. Plant Trichome*. Editores: D.L. Hallahan y J.C. Gray Editor de Serie J.A. Callow. Academic press. 31: 77-91.

www.bdigital.ula.ve

I.VI.-GLOSARIO I

Abaxial: en el lado opuesto, lo que se encuentra más alejado, externo o mirando hacia fuera del eje de un órgano u organismo. En botánica se considera que la cara abaxial de la hoja es el envés. Su antónimo es adaxial.

Acuminado: que termina en punta.

Adaxial: Parte del órgano que mira hacia el eje que lo lleva, es decir, hacia arriba.

Ápice punta o extremo.

Aserrado: que tiene un contorno dentado de forma semejante a una sierra.

Brácteas: termino botánico que hace referencia al órgano foliáceo próximo a las flores.

Cutícula: es una capa cerosa externa a la planta que la protege de la desecación a la que es expuesta en la atmósfera terrestre, además de proveer una barrera para la entrada de bacterias y hongos.

Drupeolo: fruto pequeño y carnoso.

Epidermis: Membrana epitelial constituida por una única capa de células desprovistas de clorofila y que pueden ser planas, poliédricas o con contornos sinuosos.

Estomas: referente a las dos células oclusivas que forman parte de la epidermis de la planta y que delimitan entre ellas un poro.

Filiforme: que tiene forma o apariencia de hilo.

Hibridación: cruzamiento, unión sexual de individuos de diferentes géneros (híbrido intergenérico) o especies (híbrido interespecífico).

Histoquímica: son técnicas de análisis que involucran la participación de una molécula perteneciente propio tejido que se desea analizar.

Hydathode: poro específico en plantas superiores cuya función es la exudación de agua.

Inflorescencia: conjunto de flores agrupadas.

Mutualismo: interacción biológica entre individuos de diferente especie, donde ambos se benefician mejorando su aptitud biológica.

Ninfa: etapa inmadura (juvenil) en los insectos con metamorfosis sencilla.

Ontogénesis: procesos que sufren los organismos vivos desde su fecundación, hasta su plenitud y madurez.

Ovoide: Que tiene forma de huevo.

Panícula: inflorescencia cuyos ejes laterales se ramifican, formando racimos o espigas.

Peciolo: apéndice de la hoja de una planta por el cual se une al tallo.

Pedúnculo: Tallo de una hoja, fruto o flor por el cual se une al tallo de la planta.

Sépalo: pieza floral que forma el cáliz de una flor de una planta angiosperma. Los sépalos son los que envuelven a las otras piezas florales en las primeras fases de desarrollo, cuando la flor es sólo un capullo o pimpollo.

Suberizar: es el proceso de transformación de la celulosa en suberina, esta última es un polímero natural (biopolímero) producido por las paredes celulares de algunas células de las plantas. Al igual que la cutina, la suberina es formada por ácidos grasos hidróxidos y epóxidos unidos por enlaces éster. La diferencia es que la suberina contiene ácidos dicarboxílicos, una mayor cantidad de componentes de cadena larga y una cantidad significativa de compuestos fenólicos como parte de su estructura.

Tálamo: receptáculo o parte apical ensanchada del pedúnculo en donde se asientan las piezas florales.

Taxonomía: Ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación, generalmente científica; se aplica, en especial, dentro de la biología para la ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.

Terete: rollizo duro y de carne fuerte, redondeado.

Turiones: retoño o brote.

Volubles: que cambia con facilidad.

Capítulo II. AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO DE TRICOMAS GLANDULARES DE *Rubus* *cf. adenotrichos*.

Los principales “agentes activos” contenidos en una material de origen vegetal pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas, o bien pueden ser dispuestos tal como se encuentran en el material vegetal fresco, una vez triturado o previo tratamiento de secado. El objetivo de la extracción es el aprovechamiento de los subproductos orgánicos para la obtención de compuestos naturales de alto valor para la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica por sus características funcionales, antimicrobianas o antioxidantes. La materia prima empleada posee una serie de compuestos solubles (principios activos) en el líquido extractante que son los que se pretenden obtener y concentrar.

La extracción es un proceso químico, que utiliza diferentes disolventes (más o menos polares), dependiente del tipo de extracto a conseguir. El agua es uno de los disolventes más utilizados, pero tiene un poder extractivo relativamente bajo, comparada con otros disolventes también empleados. Uno de ellos y el más usado es el alcohol en diversas graduaciones, sin embargo es poco selectivo. Además, el método de extracción a utilizar depende del tipo de material (caracteres organolépticos) y de las concentraciones en que se encuentran los principios activos. En general, los métodos y técnicas operatorias a seleccionar para realizar la

extracción y/o aislamiento de principios activos de un material vegetal dependen de varios factores, como son:

- Disolvente: Agua, Etanol, Disolventes orgánicos
- Cantidad de disolvente. Cuanto mayor sea la cantidad, más elevado será el agotamiento de los principios activos.
- Temperatura: El calor favorece y acelera la extracción pero puede descomponer los principios activos.
- Tiempo de extracción: Depende de las características de la materia prima (dureza, grado de división) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros).
- El Proceso: el proceso consta de varias fases diferenciadas:
 1. Pre tratamiento de la biomasa: secado para extracción con solventes orgánicos, cuando sea necesario.
 2. Triturado o molienda según el tipo de materia prima y proceso.
 3. Tratamiento térmico de la biomasa (mejora de los procesos de extracción).
 4. Procesos de extracción continua o *batch* con solvente (agua, etanol, acetato de etilo, etc.). Aunque las tecnologías que existen actualmente van más allá del uso de este tipo de disolventes o la combinación de varias tecnologías para aumentar el rendimiento de la extracción.

En esta fase se trata de que tengan lugar las siguientes etapas, que contralán el transporte de los analitos desde la matriz hasta el seno del disolvente:

- a. Desorción desde una partícula sólida.

- b. Difusión a través del disolvente dentro del poro de la partícula.
- c. Transferencia hacia el seno del flujo de disolvente (solubilización).
- d. Purificación de los extractos por floculación y centrifugación, tratamiento con resinas, filtración tangencial, separación cromatográfica.
- e. Concentración y estabilización de los productos: Concentración a vacío, secado en spray, etc.
- f. Recuperación de disolventes: Recuperación de etanol o acetato para reintroducción a proceso, recuperación de agua para minimizar el consumo, etc.

Más concretamente existen diferentes tecnologías de aplicación en la etapa propia de extracción. Todas ellas tienen en común varios objetivos entre los que destacan:

- ✓ Extracción de compuestos bioactivos específicos del material en estudio.
- ✓ Aumentar la concentración de compuestos extraídos.
- ✓ Convertir el compuesto bioactivo en una forma más adecuada para su detección analítica y separación posterior.
- ✓ Proporcionar un método viable y reproducible.

II.1.-Criterios para la búsqueda de moléculas naturales con actividades fitotóxicas.

A partir de cualquier especie vegetal es posible extraer, aislar e identificar miles de metabolitos diferentes; algunos de ellos pueden tener efectos fitotóxicos aunque esa no sea la función ecológica que desempeñan en el organismo productor. Así, nos encontramos con que cualquier especie podría ser investigada como productora de

moléculas con efecto herbicida. Ante tantas posibilidades, podemos comenzar nuestra búsqueda de bioherbicidas considerando dos estrategias. La opción más sencilla sería seguir una estrategia ecológica, y comenzar buscando en especies de las que existan indicios de producción sustancias fitotóxicas, bien porque para ellas se han observado fenómenos alelopáticos en agrosistemas, o porque hayan sido usadas tradicionalmente como medicinal, lo que implica que posee una o varias sustancias con efectos fisiológicos.

Las plantas también pueden producir compuestos que resulten muy fitotóxicos, pero no cumplen un papel ecológico en las interacciones entre plantas porque no están disponibles de forma natural. Por ello, podríamos optar por una estrategia fitoquímica y estudiar cualquier especie. Aunque ambas estrategias pueden dar buenos resultados, en la mayoría de estudios se tiende a partir de la anterior al existir indicios previos de actividad.

Cualquiera que sea la estrategia por la que optemos, nos encontraremos con que la mayoría de las moléculas que podamos aislar no presentarán efecto fitotóxico. Para evitar esta pérdida de tiempo y de recursos, este tipo de estudios siguen de forma mayoritaria un esquema general de trabajo conocido como aislamiento biodirigido o aislamiento dirigido por bioensayo, proceso en el que intervienen tanto métodos analíticos de química orgánica como bioensayos para evaluar la actividad biológica. El proceso de aislamiento biodirigido comprende, por lo general, una extracción del material vegetal (planta, exudados, volátiles, etc.), y subsiguientes fraccionamientos

hasta obtener los compuestos puros, a los cuales se les realizarán ensayos para determinar su actividad biológica.

Los bioensayos son indispensables para realizar un seguimiento de la bioactividad en las etapas de extracción y aislamiento de compuestos. El paso de una etapa del proceso a la siguiente siempre estará condicionado por la detección de algún tipo de actividad. Una vez que se obtienen extractos de la planta completa o de alguno de sus órganos, estos extractos son bioensayados. Se seleccionan los que resultan más activos y se fraccionan en mezclas más simples de compuestos. Cada una de estas fracciones es de nuevo bioensayada, y las más fitotóxicas siguen el proceso de fraccionamiento hasta que se aíslan los compuestos que las constituyen. Estos compuestos vuelven a ser bioensayados, si resultan activos se procede a su identificación y caracterización estructural.

II.2.-Estudio de agentes fitotóxicos de origen vegetal.

La mayoría de las especies vegetales son productoras de moléculas con efecto fitotóxico con mayor o menor grado; y en algunos casos dichas moléculas son liberadas al medio en cantidad suficiente para resultar efectivas controlando el desarrollo de otras plantas, por lo que la especie productora se considerará alelopática (Weston, 1996). Sin embargo, el hecho de que una especie produzca y acumule en sus tejidos una sustancia fitotóxica no implica necesariamente que la libere al medio, o que la produzca en una cantidad suficiente para resultar efectiva. Muchos estudios sobre el potencial alelopático de especies vegetales se orientan a la búsqueda de metabolitos secundarios cuyo efecto fitotóxico se evalúa midiendo su

actividad biológica. Este tipo de estudios comprende un aislamiento e identificación de compuestos acompañados por bioensayos de bioactividad, según el esquema de aislamiento biodirigido. La caracterización de estas moléculas es útil cuando buscamos modelos para el desarrollo de sustancias bioherbidas (Duke et al., 2000); sin embargo, desde un punto de vista ecológico la validez de estos estudios es discutible si los métodos de extracción empleados no reproducen las condiciones que se dan en la naturaleza. Por ello, el método que adoptemos para extraer los compuestos a partir de nuestro material vegetal condiciona el enfoque de nuestro trabajo, básicamente destinando el método de extracción a los constituyentes metabólicos alojados en los tricomas glandulares de *R. cf adenotrichos*. De esta manera, cualquier actividad registrada debe de ser asociada a los compuestos hallados en estos tricomas, que mediante algún mecanismo natural son liberados al medio ambiente, y puede ser asociado a dicha actividad.

II.3.-Evaluación de la actividad de aleloquímicos.

II.3.1.-Diseño de Ensayos biológicos:

En términos generales, estos bioensayos están basados en objetivos bien específicos, siendo dependiente de la naturaleza dual planta receptora/planta donadora y a las características del agente potencialmente alelopático. Colectivamente, estos objetivos incluyen algunas de las siguientes características del fenómeno de la alelopatía:

- Presencia y liberación de aleloquímicos en la planta denominada donadora.
- Inhibición de los parámetros de crecimiento de la planta denominada receptora e interferencia del aleloquímico con sus procesos fisiológicos.

- Destino final del aleloquímico en el suelo.
- Movimiento del aleloquímico en el suelo, y su absorción por la planta donadora.
- Fenómenos de detoxificación del aleloquímico absorbido por la planta receptora.
- Efecto del aleloquímico sobre la ecología del suelo y dinámica de nutrientes.
- Interacción con promotores, inhibidores y sustancias neutras en el ambiente suelo.

Bajo estas directrices, se han desarrollado una gran diversidad de bioensayos para el estudio de los efectos de los aleloquímicos aislados o liberados por plantas, sobre el crecimiento y distribución poblacional de otras en su vecindad, donde se incluyen los microorganismos. En esta dirección, la mayoría de los bioensayos se han centrado en la identificación de aleloquímicos potenciales, evaluar sus efectos fitotóxicos o su efecto en el crecimiento de plantas, asociadas o no a la productora (plantas receptoras estándares o malas hierbas), con el objetivo de implementar relaciones estructura-actividad, que incluyen metabolitos secundarios, aleloquímicos y análogos sintéticos. Todo ello con la filosofía de que puedan ser aplicados como herbicidas, o como aditivos en agentes químicos reguladores del crecimiento (Oliveros, 2008).

Las interacciones alelopáticas son ampliamente conocidas en diferentes grupos de plantas tales como algas, líquenes, cultivos, y malezas anuales y perennes. Aquellos que diseñan un bioensayo alelopático deberían tener en mente el grupo al cual la planta, sospechosa de ser alelopática, pertenece. La biomasa de los sistemas radiculares de las malezas anuales no es suficiente para mantener una concentración

activa de aleloquímicos, mientras que la biomasa radicular si juega un rol importante en las malezas perennes (por ejemplo, *Cyperus rotundus*, *Pluchea lanceolata*, *Imperata cylindrical*). Por lo tanto, el hábitat de la planta debería ser considerado cuando se diseñan los bioensayos alelopáticos (Inderjit & Dakshini, 1995).

En muchos estudios alelopáticos, el material de la plantas es molido para valorar la actividad alelopática o para identificar y aislar los aleloquímicos. Esta molienda resulta en la liberación de ciertas enzimas, sales, aminoácidos, y compuestos nitrogenados los cuales pueden no ser liberados bajo circunstancias naturales. Los bioensayos alelopáticos con material vegetal macerado de esta manera son de poca relevancia ecológica pues el procedimiento de extracción causa cambios cualitativos y cuantitativos en el perfil fitoquímico. Además, relacionar la alelopatía a tales extractos es un problema debido a que algunos compuestos que afectan el crecimiento de la planta pueden no ser naturalmente lixiviados o exudados y por lo tanto pueden no ser fisiológicamente importantes, aun cuando ellos pueden ser significativos en los bioensayos de laboratorio. Por lo tanto, la molienda del material de la planta en estudios alelopáticos debería ser evitado (Inderjit & Dakshini, 1995).

Muchos investigadores han probado el potencial alelopático de los compuestos colocando los compuestos patrones ya sea en solución acuosa o en suelo estéril. Sin embargo, para probar el potencial alelopático de los químicos, es más conveniente ya sea añadir los compuestos patrones a los suelos o aislar los compuestos del suelo asociado con la planta alelopática (Inderjit & Dakshini, 1995).

Se ha sugerido los bioensayos en agar modificado, los cuales son adecuados para las cantidades más bajas de compuestos solubles en agua. Sin embargo, no toman en consideración el suelo, lo cual es necesario para reducir la diferencia entre los bioensayos de laboratorio y las interacciones en campo. También se ha identificado ceratiolina de *Ceratiola ericoides*; sin embargo, esta se descompuso a temperatura ambiente para producir ácido hidroxicinámico, el cual tiene actividad inhibitoria más alta que ceratiolina frente a la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas de *Schizachyrium scoparium*. Por lo tanto, al destino de los aleloquímicos en el suelo debería darsele serias consideraciones.

Más recientemente, se han desarrollado bioensayos para evaluar el potencial alelopático y niveles de exudados de manera simultánea, donde la planta a la cual se evaluará el potencial alelopático (denominada especie donadora) es mantenida en un cocultivo con una especie (denominada especie receptora) que servirá de modelo para estudiar los efectos causados por la presencia de la especie donadoras (Inderjit & Dakshini, 1995). Para el diseño del bioensayo de cocultivo; aunque más próximo a una situación real, con el crecimiento de dos especies, con el objetivo de dar un seguimiento a los compuestos involucrados en la interacción, han de considerarse diferentes variables, dependientes de las características de las planta seleccionadas y del agente químico. Características de la especies donadora como velocidad de crecimiento, niveles de aleloquímicos liberados mediante exudado de raíz, densidad de plantas, etc., son variables fundamentales para el registro del aleloquímico en todo el sistema, incluyendo esto a la especie receptora (Oliveros, 2008). A pesar de que en un diseño de cocultivo muchas variables pueden ser controladas de tal manera que

solo opere la interferencia gobernadas por compuestos químicos, donde competencia por nutrientes, luz, o el efecto de cambios de otros parámetros tales como el pH, sean anuladas; el estudio es extremadamente complicado, pero este diseño representa uno de los que mayormente refleja una condición natural (Oliveros, 2008).

El reto que hoy día se presenta es estudiar este sistema con el objetivo de seguir el aleloquímico desde la especie receptora hasta la donadora, de una manera dinámica; es decir, durante el tiempo en que las dos especies estén enfrentadas. El poder determinar toda la ruta del aleloquímico, significaría dar una evidencia contundente de la traslocación de un aleloquímico sintetizado por una especie, liberado al ambiente, detectado en los tejidos de la especie receptora, donde además se registren efectos anormales en sus parámetros de crecimiento. Todo ello representaría una evidencia del fenómeno alelopático, hoy día pendiente de ser demostrado (Oliveros, 2008).

Además de probar los compuestos individuales, es altamente conveniente probar también la mezcla de aleloquímicos, ya que es difícil concluir y establecer si un compuesto es responsable por la reducción del crecimiento. Las interacciones que son alelopáticas son más el resultado de actividad sinérgica de varios aleloquímicos que de la actividad de uno solo de ellos. Bajo condiciones de campo, los efectos aditivos o sinérgicos de los aleloquímicos pueden estar influyendo aun a bajas concentraciones (Inderjit & Dakshini, 1995).

Muchos protocolos para establecer la alelopatía han sido sugeridos, pero para adquirir conocimientos definitivos en alelopatía a través de bioensayos de laboratorio,

se requiere un enfoque holístico. Es importante señalar que la observación de los puntos anteriores no prueba que la alelopatía solamente es operativa, solo que la alelopatía ofrece la explicación más razonable de los patrones observados (Inderjit & Dakshini, 1995). Consideraciones cercanas de los puntos anteriores deberían, sin embargo, ayudar en el desarrollo de un modelo para los bioensayos de laboratorio para monitorear y establecer la relevancia ecológica de la alelopatía.

II.4.-Métodos y condiciones de extracción.

La extracción de aleloquímicos es una parte integral de los bioensayos alelopáticos. Se debe ser lógico en la selección de la fuente de extracción y el extractante.

La fuente de extracción pueden ser partes vegetales de la planta alelopática sospechosa o su suelo asociado. Es necesario establecer no solamente la presencia de estos químicos en concentraciones biológicamente activas sino también una persistencia que afectaría otras plantas en su vecindad. Por lo tanto, el aislamiento e identificación de químicos del ambiente es más significativa en la alelopatía establecida. (Inderjit & Dakshini, 1995).

Han encontrado que los bioensayos clásicos con extractos de la planta completos, lavados foliares, y restos descompuestos inhibieron la germinación y crecimiento de las especies de plantas, aunque la planta no puede ser alelopática bajo condiciones naturales (Inderjit & Dakshini, 1995).

Por lo tanto, es importante aislar los aleloquímicos del ambiente/suelos de una planta alelopática sospechosa y determinar si los aleloquímicos están presentes en una

concentración activa suficiente para influenciar las especies de plantas asociadas (Inderjit & Dakshini, 1995).

Varios trabajadores como Inderjit & Dakshini (1995) extraen los fitoquímicos en fase acuosa a temperatura ambiente. Sin embargo, para evitar interferencias de los microbios, esterilización es hecha para cantidades más altas y rangos más amplios de fitoquímicos, mientras la extracción es hecha con agua caliente y solventes orgánicos tales como metanol, cloroformo, diclorometano, entre otros. Los solventes orgánicos tales como cloroformo pueden extraer los químicos de la hojarasca, materia orgánica del suelo, ácidos húmicos, y membranas microbianas. La extracción con solventes orgánicos es pues, de menor importancia ecológica. (Inderjit & Dakshini, 1995).

II.5.-Medidas cuantitativas de respuestas biológicas.

La germinación de la semilla es un parámetro ampliamente usado en los bioensayos alelopáticos. Williams y Hoagland (1982) sugirieron que la germinación de semillas puede no ser el sitio primario para las interacciones alelopáticas. Además, en comparación a la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas mostro más respuesta a ciertas categorías de aleloquímicos, tales como fenólicos. Sin embargo, algunos investigadores encontraron sobre el peso seco de la radícula, longitud de raíz y peso fresco de raíz que son estadísticamente más precisas.

Se desarrolló un bioensayo para determinar la actividad biológica de los aleloquímicos cualitativamente y cuantitativamente. Ellos evaluaron el potencial alelopático de los ácidos fenilacetico y p-etoxibenzoico usando *Echinochloa crusgalli* y *Sesbania exaltata* como especies de prueba. Se sugirió que el bioensayo de las plántulas usando los

pesos frescos de tallo más raíz fue un método apropiado para evaluar la fitotoxicidad del material biológico. Sin embargo, en muchos estudios, se encontró que el crecimiento de la raíz fue más sensible que el crecimiento del tallo. Por otra parte, las medidas del peso fresco de raíces y tallos separadamente deberían dar una mejor evaluación de la fitotoxicidad de los compuestos alelopáticos (Inderjit & Dakshini, 1995).

Aunque la respuesta del crecimiento de las plántulas es ampliamente usada para evaluar los efectos alelopáticos en los bioensayos de laboratorio, las características fisiológicas y bioquímicas son las que ayudaran a entender el mecanismo de acción de los aleloquímicos (Inderjit & Dakshini, 1995).

II.6.-Parámetros microscópicos de crecimiento en plantas receptoras.

Varios tipos de bioensayos de laboratorio han sido conducidos para investigar el potencial alelopático de los compuestos fenólicos. Para este caso en particular, la germinación de semillas es un importante parámetro para evaluar el potencial alelopático de los compuestos fenólicos. Sin embargo, usar la germinación de semillas como un parámetro de bioensayo puede ser de poco valor. Esto es porque las interacciones alelopáticas incluyen las actividades promotorias e inhibitorias de los aleloquímicos fenólicos. En el caso de 100% de germinación en situación de control, no sería posible de evaluar los efectos estimulatorios de los compuestos fenólicos (Inderjit, 1996).

Se ha reportado que los resultados alelopáticos fueron influenciados por el número de semillas en los bioensayos de germinación, en relación al volumen de solución. En los

bioensayos de cocultivo, el compromiso en el tiempo de pregerminación dependerá de la dinámica de liberación del compuesto por parte de la planta donadora y los niveles de fitotoxicidad registrados frente a la planta receptora, que permitan lograr una máxima sensibilidad en el bioensayo (Oliveros, 2008).

La susceptibilidad de una especie de planta a un aleloquímico bajo condiciones de laboratorio principalmente depende de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de cada planta. Se reportó que las diferentes sensibilidades de una planta receptora a un aleloquímico y a los extractos fitotóxicos de una planta donadora depende de los órganos de la planta y de las etapas de crecimiento (Kobayashi, 2004).

Los exudados de *Eupatorium odoratum* inhibieron la germinación y crecimiento de las plántulas de malezas a diferentes grados, mientras el crecimiento de las malezas por sí mismas fue también inhibido por los exudados. Este encuentro sugirió que los aleloquímicos presentes en *E. odoratum* tienen actividad autotóxica. Yamamoto (1995) reveló que la cumarina inhibió el crecimiento de *Zosysia japonica* pero promovió el crecimiento de *Anthoxanthum. Odoratum* (la donadora).

II.7.-Rutas de liberación de aleloquímicos.

Los compuestos secundarios de las plantas, tendrán algún significado ecológico cuando sean incorporados al ambiente por un mecanismo lo suficientemente efectivo para garantizar una concentración tóxica a la planta u organismo receptor, actuando como aleloquímicos. Ecológicamente, se han propuestos cuatro mecanismos para la excreción de los aleloquímicos al ambiente, involucrando fenómenos de volatilización, lixiviado, descomposición de partes de la planta en el suelo y exudados por raíz. Estos

mecanismos implican que los aleloquímicos pueden encontrarse en cualquier parte de la planta, y que la dinámica de su actividad es una función del mecanismo en que este pueda ser liberado. Por ejemplo, la descomposición de residuos vegetales implica material senescente, no hay una función activa de la planta, mientras que volatilización, tricomas glandulares y los exudados de raíz, son procesos extremadamente activos donde está involucrado el tejido vivo de la planta (Oliveros, 2008). Por la naturaleza del trabajo aquí desarrollado, se hará especial referencia para el caso de tricomas glandulares, que muy bien pudiese aplicarse a cualquier otro órgano que pueda estar liberando químicos en el proceso de lixiviación. Por su localización anatómica, los tricomas representan una interfase entre la planta con su entorno, de tal manera, que cualquier interacción biótica o abiótica de la planta con su entorno, o desde su entorno, tendrá que interaccionar y superar esta barrera química. Por razones obvias, la interacción que más ha llamado la atención es la relación existente entre la herbívora, densidad y química de los tricomas glandulares. En este capítulo discutiremos el potencial fitotóxico encerrado en los tricomas glandulares y su potencial acción alelopática.

11.8.-Lixiviados de la superficie de las hojas.

La lixiviación es la remoción de sustancias presentes en la superficie de la planta por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. El grado de lixivabilidad depende del tipo de tejido vegetal, la edad de la planta y la cantidad y naturaleza de la precipitación. De esta manera se liberan una gran variedad de agentes alelopáticos de diferente naturaleza tales como compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides. Se ha determinado

la toxicidad de muchos lixiviados de semillas y hojas sobre plantas silvestres y cultivadas (Tabla II.1) (Sampietro, 2000).

Tabla II.1. Potencial alelopático de lixiviados (Sampietro, 2000).

Nombre de la planta	Efecto inhibitorio sobre la especie blanco	Naturaleza química
<i>Datura stramonium</i>	Crecimiento de trigo y soja.	Escopolamina, hyoscyamina.
<i>Brassica rapa</i> (L.)	Crecimiento de cebada, centeno y rabanito.	No determinado.
<i>Brassica napus</i>	Germinación de soja	Alilisotiocianato
<i>Artemisia</i>	Crecimiento de cebada, lechuga y crisantemo.	No determinado.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Crecimiento de plantas de cultivo.	No determinado.
<i>Calamintha ashei</i>	Germinación y crecimiento de <i>Rudberkia hirta</i> y <i>Leptochloa dubia</i>	(+) Evodona y desacetil calaminthona.

Los efectos *in vitro* de los lixiviados acuosos (1%) de *Callicarpa acuminata* Kunth. (Verbenaceae) sobre el crecimiento de la radícula, expresión de la proteína, actividad de la catalasa, producción de radicales libres y peroxidación de la membrana lipídica en raíces de frijol, maíz y tomate fueron estudiados. Los extractos acuosos de *C. acuminata* inhibieron el crecimiento de la radícula del tomate en un 47%, pero no tuvo efecto sobre el crecimiento de la raíz de maíz y frijol (Cruz-Ortega, Ayala-Cordero, & Anaya, 2002).

Se ha demostrado que los extractos acuosos obtenidos de plantas como *Polygonum orientale*, *Erica vagans*, *Calluna vulgaris*, *Daboecia cantábrica*, *Vaccinium myrtillus*, *Pinus densiflora*, *Pilocarpus goudotianus* y *Echinacea angustifoli*, ricos en compuestos fenólicos, producen inhibición en la germinación de semillas y de cotiledones de diferentes especies de plantas ensayadas (Alias, 2006).

Para este estudio en particular se presume que la presencia de actividad fitotóxica en otras especies sensibles, se debe a la posible lixiviación de algunos de los compuestos mayoritarios del exudado glandular, que al ser arrastrados por el agua de lluvia llegan al suelo, esto aunado al crecimiento en forma enmarañada en matorrales, podría formar parte de la influencia a nivel ecológico de dichos productos mayoritarios; sin embargo, comprobar esto está fuera de los objetivos de este trabajo.

II.I.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer de forma selectiva, usando solventes orgánicos, el exudado ubicado en los tricomas glandulares de *R.cf. adenotrichos*. Para ello se discriminó la naturaleza de la muestra, considerando tallos y hojas, como criterio morfológico.
- Determinar la identidad estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* aislados y purificados mediante técnicas cromatográficas convencionales de separación y purificación, y finalmente asignar estructura química aplicando técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear básicos y bidimensionales para ^1H y ^{13}C .

II.II.- METODOLOGÍA

*II.II.1.- Análisis químico del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos*.*

II.II.1.1.- Recolección de la planta:

El material vegetal se colectó en el sector Monterrey (2375 msnm) de El Valle, cerca de la ciudad de Mérida, donde se han observado poblaciones importantes de *R. cf. adenotrichos*, que garantizan una recolección sin perjudicar de manera importante la prevalencia de la especie en la zona. Se seleccionó un área donde crecen conglomerados de la planta. El material recolectado fue seleccionado discriminando los tallos, diferenciándolos a su vez por la coloración aparente (más coloreada y menos coloreada), según los niveles de radiación solar los que estaban expuestos y diferenciando aquellos tricomas presentes en tallos y en las hojas.

II.II.1.2.- Extracción y purificación del exudado glandular:

La extracción se llevó a cabo con lavados con diclorometano (DCM) durante 30 s, asistido por un baño de ultrasonido, por triplicado. Utilizando como referencia el método de Valero (2011). Posteriormente, el DCM fue eliminado mediante destilación a presión reducida, obteniéndose de esta manera el extracto orgánico para estudio fitoquímico y biológico.

II.II.1.3.- Purificación de los constituyentes fitoquímicos del exudado glandular:

La separación y purificación de los constituyentes químicos mayoritarios del exudado glandular se llevó a cabo mediante la aplicación de las técnicas cromatográficas

convencionales las cuales se disponen en el laboratorio de Química Ecológica, cuyas características se describen brevemente a continuación:

II.II.1.3.a- Cromatografía de capa fina:

Todos los análisis mediante cromatografía de capa fina se realizaron utilizando placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ sobre láminas de aluminio de dimensiones de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor de las marcas Merck y Macheney-Nagel.

II.II.1.3.b- Cromatografía preparativa:

En la cromatografía preparativa se utilizó gel de sílice PF₂₅₀ con un 9% de CaSO₄ (tamaño de partícula entre 2,5-25 µm), el cual se colocó uniformemente en láminas de vidrio de 20 x 20 cm. El espesor de cada placa se estima de 0,5 mm; y antes de ser utilizadas, las mismas son sometidas a un proceso de activación, consistiendo éste en un calentamiento en una estufa a 150 °C durante un período de 2 horas.

II.II.1.3.c- Cromatografía de columna:

Para la cromatografía de columna *flash* se utilizó gel de sílice de la misma marca, pero el tamaño de partícula en este caso varía entre 0,063 y 0,300mm.

II.II.1.4.- Caracterización estructural de los productos aislados y purificados:

Una vez obtenido los compuestos mayoritarios, que mostraron elevada pureza, serán caracterizados con los siguientes equipos:

II.II.1.4.a- Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR):

Fueron realizados en un equipo Perkin Elmer 1725-X FT-IR, en pastillas de KBr en la región de 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} , ubicado en el laboratorio de Docencia de Análisis Orgánico de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes (ULA), Laboratorio de Cinética y Catálisis, y del Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias de la ULA.

II.II.1.4.b.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, MHQC, HMBC, DEPT-135):

Fueron realizados con los siguientes equipos: Bruker de 300 MHz con una frecuencia de 300 para ^1H y 75,49 MHz para el ^{13}C , Bruker de 500 MHz con una frecuencia de 500 para ^1H y 125,74 MHz para el ^{13}C y equipo Bruker de 600 MHz con una frecuencia de 600 MHz para ^1H y 150,91 MHz para el ^{13}C , utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) o acetona deuterada (D_3CCOCD_3) según la solubilidad de los compuestos y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Para ello, se contrataron los servicios del Centro Tecnológico ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC-Altos de Pipe-Venezuela).

II.II.1.5.- Bioensayos de actividad fitotóxica:

Para los bioensayos de actividad fitotoxicidad se utilizaron capsulas de *Petri* (9 cm \emptyset) como cámaras de crecimiento y Agar[®] Power HIMEDIA como sustrato en proporciones de 0,7/100ml H_2O . Como especies receptoras se utilizaron semillas de plantas estándares (comerciales): *Daucus carota* L. (Zanahoria), *Brassica rapa* L.

(Nabo), *Solanum melongena* L. (Berenjena), *Lactuca sativa* L. (Lechuga), *Capsicum annuum* L. (Pimenton), *Solanum lycopersicum* L. (Tomate). Para este bioensayo, todas las soluciones se prepararon con agar (medio de crecimiento) y agua. El agua se calienta a 70°C para poder disolver el agar. En todos los casos se prepararon 3 soluciones:

- *Control*: fue preparada solo con agar y agua.
- *Referencia: o control positivo*, a la cual se le adicionó el herbicida derivado de la urea 3-(3,4-diclorofenilo)-1-metoxi-1-metil/urea Linurón® 50 SC 42,50% p/p en la misma concentración del extracto 200, 100, 50 y 25ppm.
- *Extracto y fracciones*: se prepararon soluciones mediante una dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) 99,9% Fisher Chemical al 2% [80 mg/ml DMSO]. Se comenzó con la preparación de una solución madre (extracto de mayor concentración 200ppm con DMSO al 2%) a una concentración de 200 ppm, a partir de la misma se realizaron las diluciones para alcanzar concentraciones de 100, 50 y 25 ppm. Para cada una se realizaron tres réplicas.

En el caso del control también se hicieron las mismas diluciones y se le adicionaron la misma cantidad de DMSO que se utiliza en el extracto vegetal, con el fin de poder descartar un posible efecto del mismo sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas.

II.II.1.5.a- Análisis de agrupamiento:

Con los datos de actividad, y con el fin de establecer un protocolo de análisis objetivo de los datos, se realizó un análisis de agrupamiento de los datos mediante análisis de bloques o grupos (*cluster*). Los análisis *cluster* incluyen actualmente una serie de algoritmos de clasificación diferentes. Su utilización nace de la necesidad en multitud de estudios científicos de organizar la gran cantidad de datos generados durante los ensayos. El uso de algoritmos de clasificación *no implica en ningún caso la utilización de pruebas de confianza estadística*. De hecho, los análisis de clúster **no son más que la clasificación de los datos en grupos similares**, y se aplican cuando no se dispone de ninguna hipótesis de partida. Para el presente estudio se ha utilizado el método de agrupamiento completo, que se presenta en cada caso en forma de árboles de jerarquía. En los árboles de jerarquía los diferentes casos son agrupados en función de su similitud. Como resultado se obtienen grupos de datos que se separan entre sí en función de sus diferencias. En un análisis de agrupamiento completo aparecen todos los datos juntos pero organizados en sucesivos grupos separados unos de otros por diferentes distancias de unión. Estas distancias vienen expresadas en los ejes verticales. Cada nudo en los gráficos (cuando se forma un nuevo cluster) indica un subgrupo dentro del cual pueden aparecer más subgrupos, de tal forma que pueden obtenerse distintas ramas con las que separar los casos de estudio. Las distancias de agrupamiento se basan en múltiples dimensiones, lo cual es útil a la hora de emplear datos de pruebas tan diferentes como dos ensayos distintos de actividad biológica. La forma más directa de obtener estas distancias es calcular las Distancias Euclidianas,

las cuáles proporcionan medidas geométricas multidimensionales. Para el presente estudio se han calculado los cuadrados de las Distancias Euclidianas, en función de:

$$\text{Distancia } (x,y)=\sum (x_i - y_i)^2$$

De esta manera, aquellos casos que sean más diferentes aparecerán separados por una distancia de unión progresivamente mayor. **Como conclusión** se puede decir que el análisis realizado de agrupamiento completo se basa en la discriminación de aquellos grupos que presentan diferencias mayores, para tratar de presentar juntos, en árboles de jerarquía, aquellos elementos que sean más similares entre sí. **Lo que se pretende es representar juntos aquellos compuestos, fracciones o extractos que presenten una actividad similar.**

www.bdigital.ula.ve

II.III.-RESULTADOS

II.III.1.-Análisis químico del exudado glandular.

II.III.1.a-Recolección de la muestra:

La planta se recolectó en noviembre de 2015 en la zona de Monterrey el Valle. El material vegetal colectado se limpió retirando cualquier resto de otras plantas y de cualquier material biológico que pudiesen estar adheridos, fenómeno muy frecuente debido a la propiedad pegajosa del exudado glandular. En el caso de los tallos, estos fueron cortados en tamaños con longitud 5-10 cm. Estos fueron pesados obteniéndose una masa total de 2690,25 g.

II.III.2.-Extracción selectiva del exudado glandular.

Para la obtención del exudado glandular el material vegetal fue sumergido en un baño de ultrasonido en porciones de aproximadamente 5,5L, usándose un total de 16 L de diclorometano (DCM), durante un tiempo de 30s, a temperatura ambiente. Este proceso se realizó por triplicado. La inspección bajo el microscopio de la superficie de los tallos luego del proceso de extracción muestra que todos los tricomas lavados por la acción del solvente (Figura II.1). Seguidamente la solución se filtró usando algodón para retirar los residuos vegetales, y luego se trató con agente desecante para eliminar la humedad por agua que se arrastró durante la extracción y se filtró por gravedad, para finalmente eliminar el solvente por destilación a presión reducida, obteniéndose 13,9179g de exudado glandular (0,52 % en peso húmedo). Este procedimiento fue aplicado para la extracción superficial de muestras de diferente naturaleza, según

órgano de la planta (Tallo y hoja) y según coloración aparente de los tricomas del tallo (Figura II.1), tricomas claros o tricomas oscuros (Figura II.2).

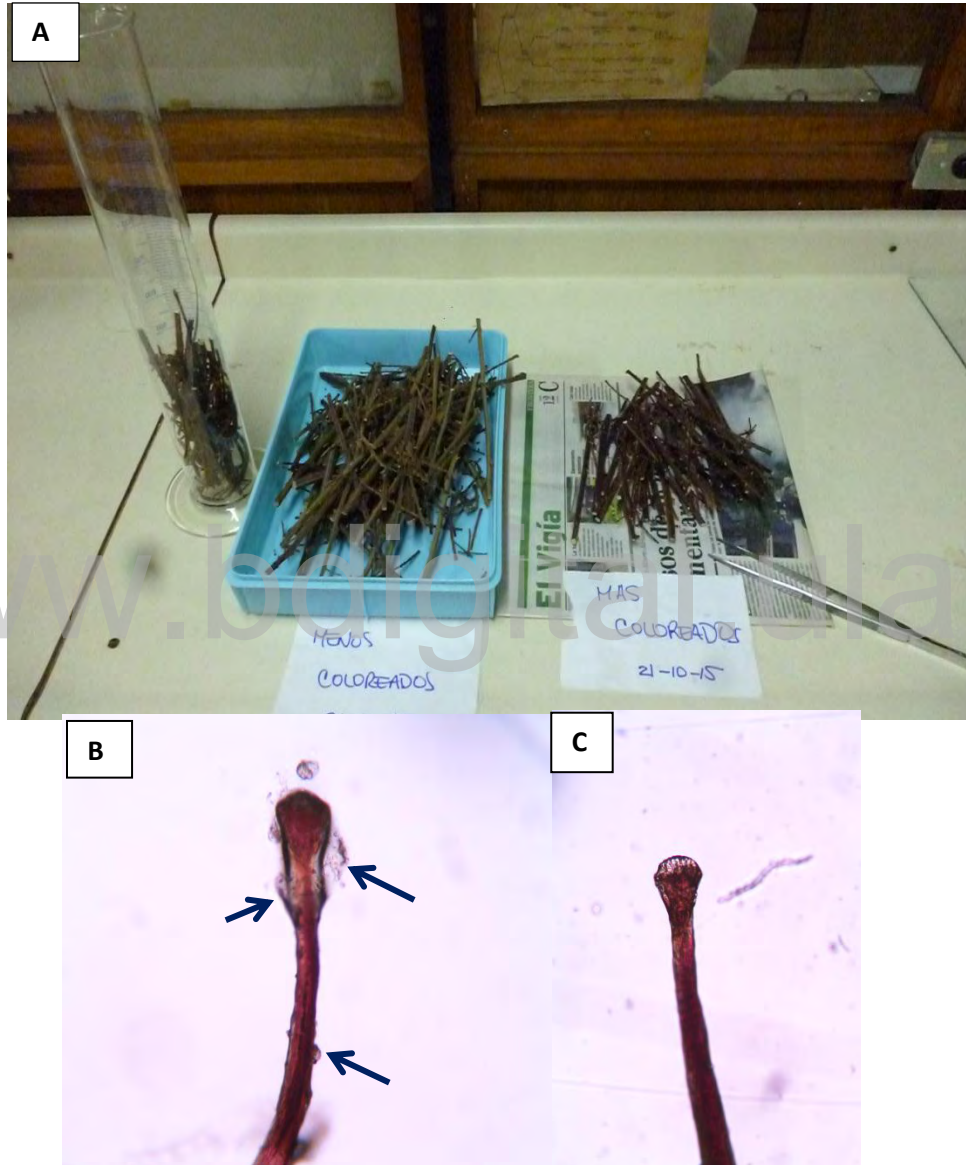


Figura II.1.- A) Selección de los tallos con tricomas glandulares de *R. cf adenotrichos*, por su coloración aparente. **B)** Micrografía de tricomas glandulares antes y **C)** después de ser sometido al proceso de extracción.

El análisis por cromatografía en capa fina (Figura II.2) muestra una composición similar para los diferentes extractos, donde al parecer los tricomas clasificados como menos coloreados, muestran una mayor concentración de los compuestos que dan respuesta al revelado. Por otra parte, las hojas muestran una menor concentración de compuestos, y al mismo tiempo, esta fracción muestra una menor complejidad de su constitución. Dicho comportamiento no puede ser comparado porque no se encontraron estudios acerca de la composición del exudado glandular, lo que constituye un aporte importante en este estudio.

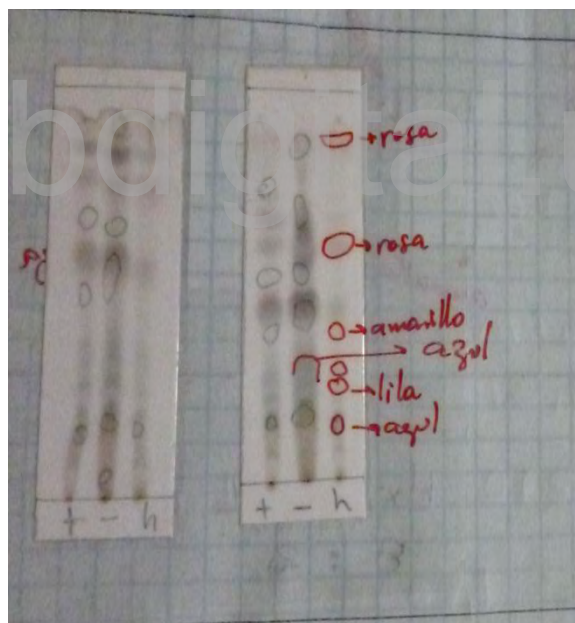


Figura II.2. Cromatografía de capa fina de los extractos de tallos con tricomas mas coloreados (+), menos coloreados (-) y las hojas. Condiciones de elución DCM/AcOET

9:1 v/v.

II.III.3.-Análisis de actividad fitotóxica de los diferentes extractos.

Muestras provenientes de los diferentes extractos fueron sometidos a pruebas de actividad fitotóxica sobre diferentes especies receptoras modelos, tales como *Daucus carota* L. (Zanahoria), *Brassica rapa* L. (Nabo), *Solanum melongena* L. (Berenjena), *Lactuca sativa* L. (Lechuga), *Capsicum annuum* L. (Pimenton), *Solanum lycopersicum* L. (Tomate). En las figuras 3 a 8 se resumen los resultados obtenidos de este estudio, donde en términos generales, un efecto fitotóxico puede ser registrado en los diferentes extractos considerados, donde cualitativamente, lechuga y nabo son las especies con resultan con mayor grado de afectación. Sin embargo, entre los extractos, al parecer aquel obtenido de las hojas (Ch) muestra un efecto estimulador de crecimiento de las especies de plántulas consideradas, aunque sin embargo, efectos inhibidores también son observados para este extracto, como lo es en el caso de nabo pimentón y lechuga.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

Con todos estos datos se realizó un análisis de agrupamiento (*cluster*) para tratar de organizar y realizar una discusión objetiva de los resultados, obteniéndose dos grupos bien diferenciados (figura II.9). El análisis realizado se denomina de agrupamiento completo y se basa en la discriminación de aquellos grupos que presentan diferencias mayores, para tratar de presentar juntos, en árboles de jerarquía, aquellos elementos que sean más similares entre sí. En los árboles de jerarquía los diferentes casos son agrupados en función de su similitud. Como resultado se obtienen grupos de datos que se separan entre sí en función de sus diferencias. En un análisis de agrupamiento completo aparecen todos los datos juntos pero organizados en sucesivos grupos separados unos de otros por diferentes distancias de unión. Estas distancias vienen expresadas en los ejes verticales.

Cada nudo en los gráficos (cuando se forma un nuevo *cluster*) indica un subgrupo dentro del cual pueden aparecer más subgrupos, de tal forma que pueden obtenerse distintas ramas con las que separar los casos de estudio. Las distancias de agrupamiento se basan en múltiples dimensiones, lo cual es útil a la hora de emplear datos de pruebas tan diferentes como dos ensayos distintos de actividad biológica. En este caso, se trata de presentar juntos aquellos compuestos que presenten una actividad similar. En el caso de considerar el análisis, tomando solamente el efecto sobre el crecimiento de la raíz, como se indicó, surgen dos grupos claramente definidos, uno grupo 1 (**G1**), que representa el efecto del herbicida (LINU) y un grupo 2 (**G2**), donde se incluyen todos los extractos de *R. adetrichos*, siendo el **G1** la situación de máxima actividad fitotóxica (Herbicida comercial).

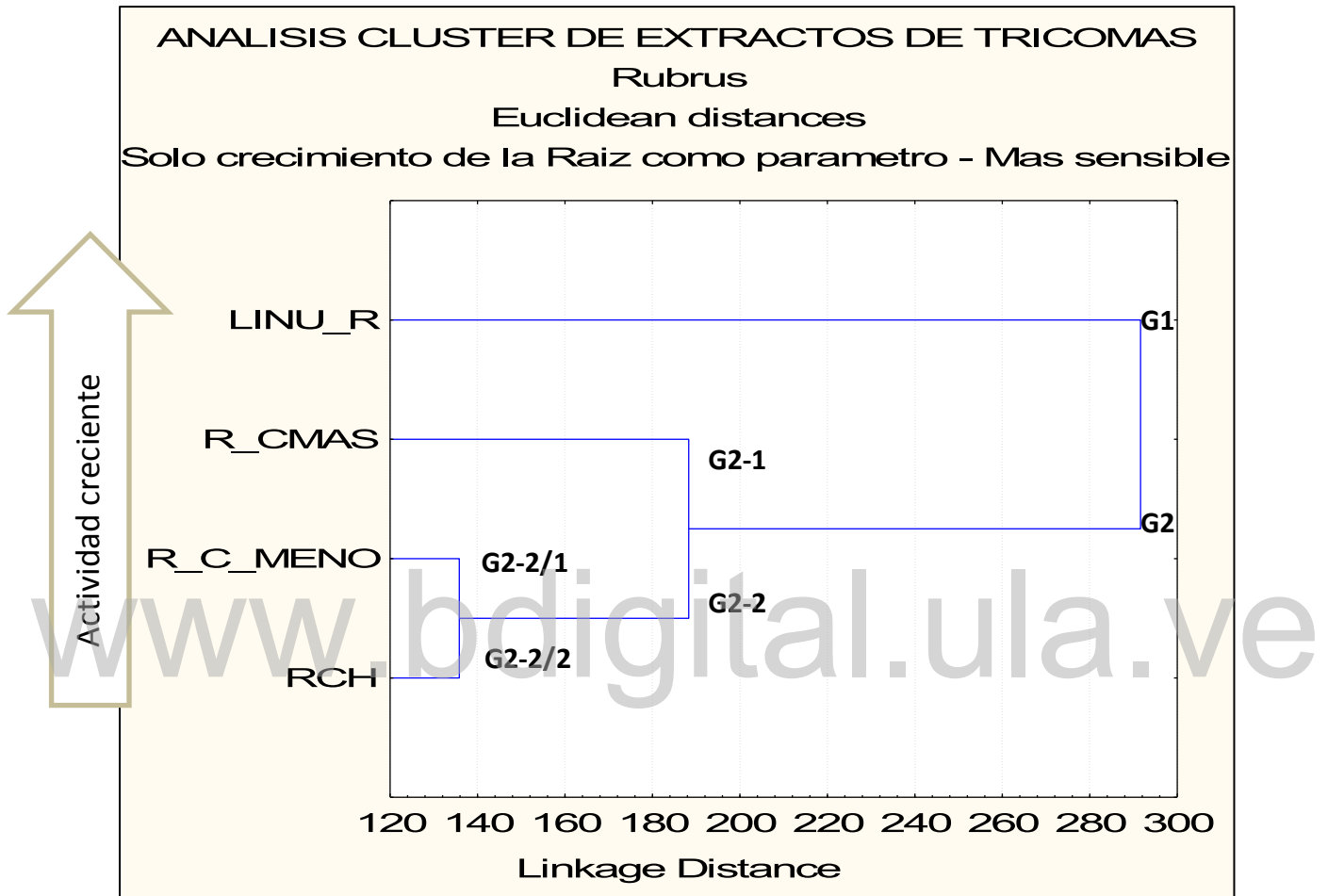


Figura II.9.- Analisis de agrupamiento de los extractos obtenidos de los tricomas glandulares de *R. adetrichos* según la actividad fitotóxica registrada sobre el crecimiento de la raíz para las seis especies receptoras consideradas. **R-CMAS**= extracto obtenido de tricomas en tallo más coloreados, **R-C-MENOS**= extracto obtenido de tricomas en tallo menos coloreados, **RCH**= extracto obtenido de hojas.

Del análisis *cluster* es posible establecer un orden de actividad fitotóxica de los extractos, siendo el extracto R-C-MAS (G2-1) el más activo, y el extracto de hojas, R-CH (G2-2/2) el que muestra menor actividad. El orden de actividad también permite establecer que la coloración debe de estar asociada a la presencia de algún compuesto, o cambios en la concentración del mismo, que hace que sean distintos en su actividad fitotóxica. Es decir, de ser posible esta distinción, la búsqueda de compuestos fitotóxicos en *R. adenotrichos* debería de ser con aquellos tallos que muestren una mayor coloración a simple inspección, y descartar extractos provenientes de las hojas. Este hallazgo podría ser una evidencia del efecto de la exposición relativa de los órganos de la planta en su química secundaria, es decir, el efecto de la radiación solar es una variable importante en la composición y concentración de los metabolitos secundarios, dentro de una misma planta y de un mismo órgano. Esta distribución diferencial de compuestos sin duda pudiese representar una estrategia adaptativa de la planta a una potencial fuente de esteres representada por la radiación solar.

II.III.4.-Separación del exudado glandular.

Para la separación de los constituyentes mayoritarios del exudado glandular proveniente de los tallos de *R. cf adenotrichos*, se procedió a la obtención de fracciones parciales de trabajo mediante la técnica de cromatografía al vacío. Para ello se construyó una primera columna *flash* con un volumen de 314mL, con un volumen de la cabeza de columna de 21,7mL; y un volumen muerto de 292,3mL; con un volumen de elución de 600mL.

Se usó una composición de solventes de elución descrito por Valero, 2011 para el aislamiento de los constituyentes fitotóxico en tricomas glandulares de *Oxylobus Glanduliferus*, el cual resultó ser eficiente en la separación preliminar de las mezcla de metabolitos contenido en su extracto inicial. De esta cromatografía se obtuvo fracciones (Tabla II.2) que mediante un análisis de cromatografía en capa fina (Figura II.10), parecieran ser que todas de composición parecida al extracto original, no observándose compuestos en las fracciones 1 y 2, a la concentración usada en las cromatografías.

Tabla II.2.- Composición de los solventes de elución para la obtención de las fracciones de la primera columna *flash*, con sus respectivas masas obtenidas.

Composición de solventes			
Fracción	Solventes	(v/v)	Masa aislada (g)
1	Hx/DCM	9:1	0,0144
2	Hx/DCM	1:1	0,1490
3	Hx/DCM	1:9	0,4086
4	DCM	10	0,7698
5	DCM/AcOEt	9:1	2,7671
6	DCM/AcOEt	1:1	4,8512
7	DCM/AcOEt	1:9	1,0696
8	AcOEt	10	0,2297
9	AcOEt	10	0,8987

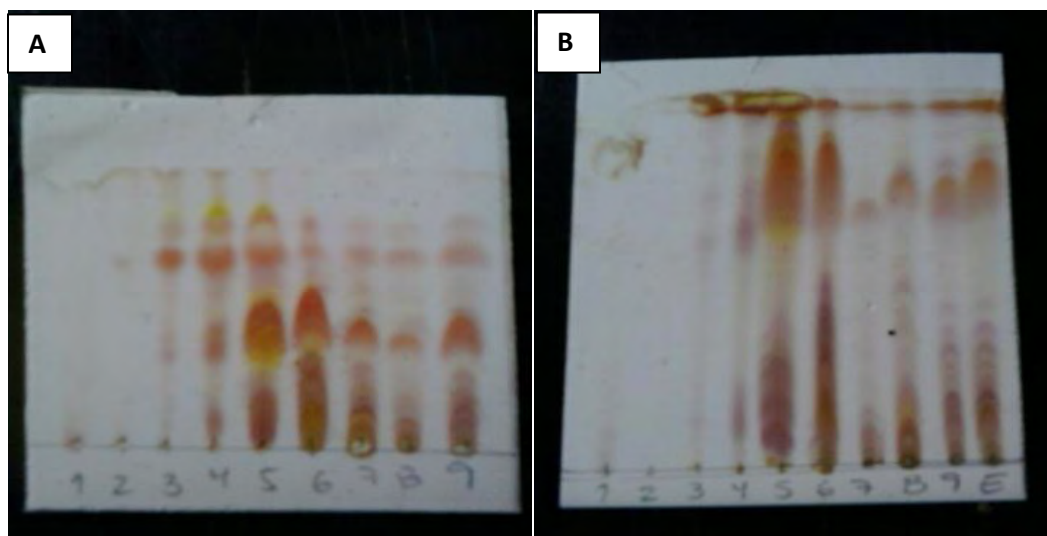


Figura II.10.- Análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas del extracto de tricomas de *R. cf adenotrichos* en la primera columna flash. Condiciones de elución Hx:DCM 1:9 v/v. E= Extracto inicial. **A** elución DCM/AcOEt 9:1 **B** DCM/Hx 9:1.

Para continuar con el proceso de aislamiento, se decidió reunir las fracciones 1 y 2, así como las fracciones 5 y 6, según su comportamiento cromatográficas. El resto de las fracciones se dejaron como fracciones puras, esto es las fracciones 7 a 9.

II.III.5.-Pruebas de actividad fitotóxica de las fracciones preliminares obtenidas mediante cromatografía flash del exudado glandular de R. cf. adenotrichos.

Luego de obtener las fracciones a partir de la cromatografía *flash* resumido en la Tabla II.2, se evaluó la actividad fitotóxica de las diferentes fracciones, de manera de seguir un aislamiento biodirigido según esta actividad, y de allí, determinar la ruta de aislamiento en busca de los constituyentes fitotóxicos del extracto. En este caso, se usó solamente *Lactuca sativa* L, lechuga, como especie receptora, pues del primer bioensayo fitotóxico realizado, se concluye que de entre las especies receptoras usadas, lechuga es la que mayor grado de afectación mostrado frente al extracto del exudado glandular, característica importante para una mayor sensibilidad del bioensayo.

En la Figura II.11 se muestra el resultado de este ensayo, donde la principal conclusión es que todas las fracciones generadas tienen un efecto inhibitorio del crecimiento de las plántulas, salvo la fracción Fr-9, la cual muestra un efecto estimulador del crecimiento, mayor al 60% respecto al control a 25ppm. Las fracciones que menor efecto fitotóxico acusan son las denominadas F-1+2 y F-4, surgiendo como las más activas la fracciones F-5+6, F-3, F-7 y F-8, que de una manera cualitativa, pareciera sigue un orden de actividad decreciente. Debido a lo indispensable de seleccionar cuál de las fracciones son de prioridad para seguir con el proceso de fraccionamiento y aislamiento de los constituyentes fitotóxicos, además de la masa disponible para este proceso, se decidió efectuar un tratamiento *cluster*

basado en la actividad de las diferentes fracciones frente al el crecimiento de la raíz y del tallo, el cual se muestra en la figura II.12.

www.bdigital.ula.ve

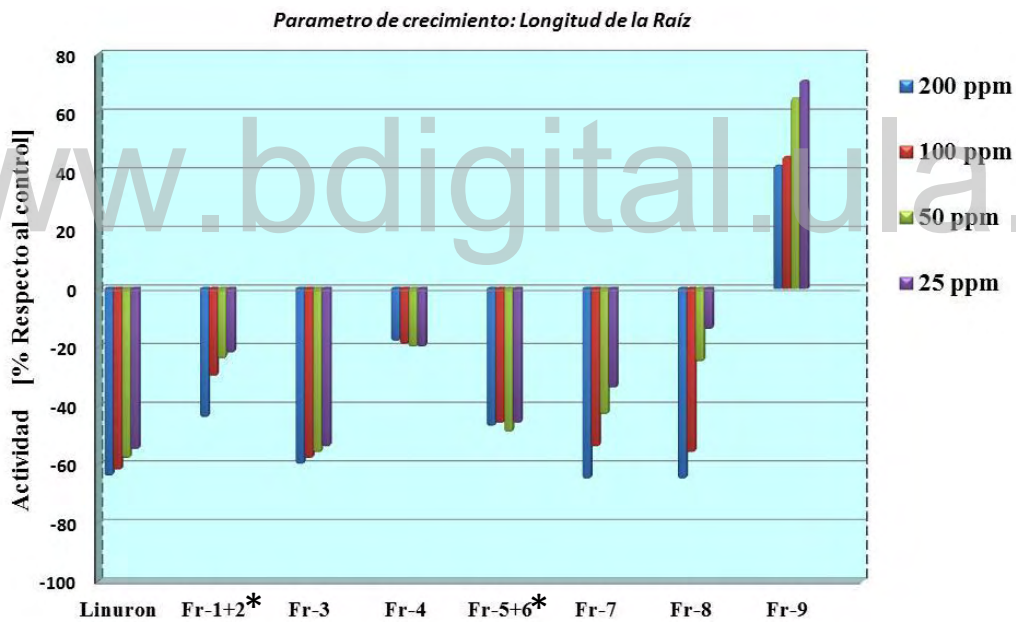
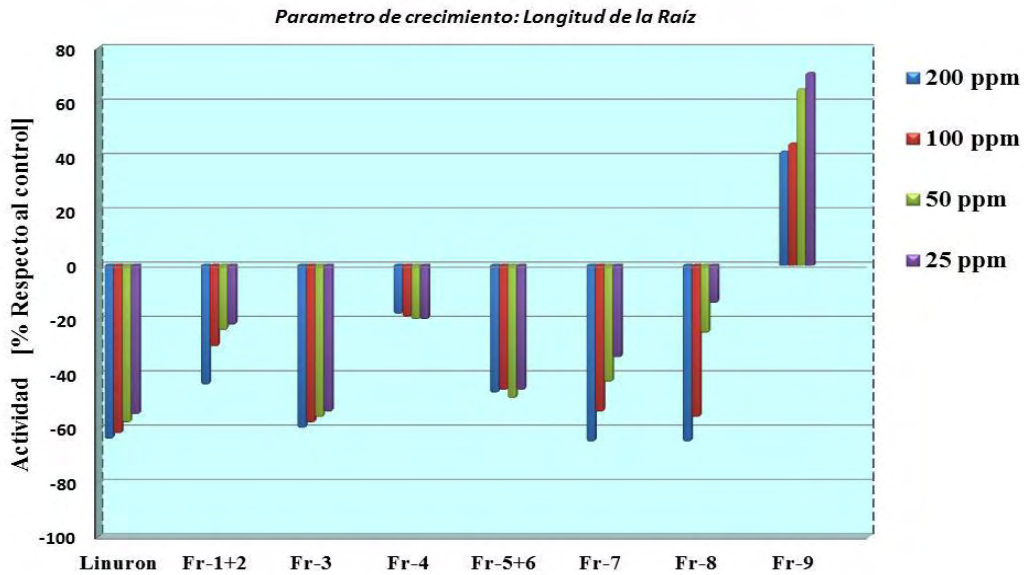


Figura II.11.- Actividad sobre el crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa* L. de las diferentes fracciones obtenidas en la separación cromatográfica del exudado glandular de *R. cf adenotrichos* mediante cromatografía *flash*.* Para este ensayo, las fracciones 1 y 2, 5 y 6 se han reunido.

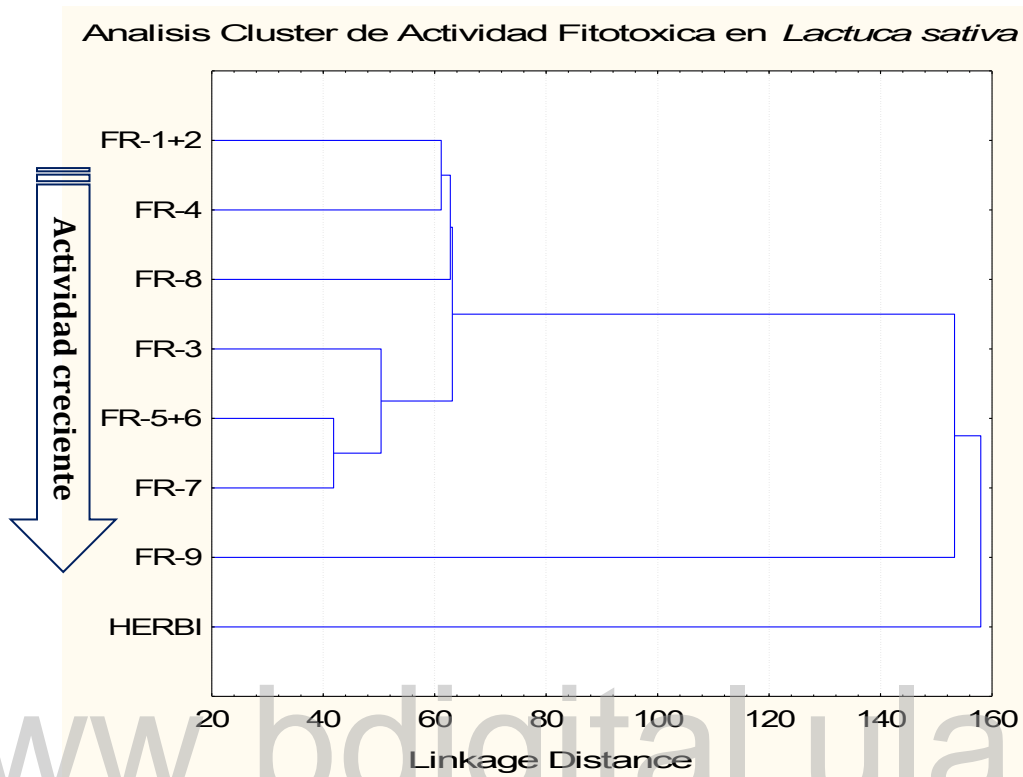


Figura II.12.-Análisis de agrupamiento de los extractos del fraccionamiento del exudado glandular de *R. adenotrichos* en función de su actividad fitotóxica sobre el crecimiento de la raíz y el tallo de *Lactuca sativa* L.

El orden de actividad fitotóxica en este análisis de agrupamiento lo define la posición del herbicida, en este caso el orden de actividad crece de arriba hacia abajo en el eje de las ordenadas. Justo sobre el Herbicida, se encuentra la fracción Fr-9, que si bien por la naturaleza del análisis *cluster*, es donde se encuentran mayores diferencias de entre los grupos generados, carece de valor para una selección de actividad, pues esta fracción es netamente estimulante del crecimiento. De esta manera, Fr-9 se descarta para los futuros análisis de purificación, siguiendo en actividad las fracciones Fr-7 y Fr-5+6, donde analizando las masas obtenidas, Fr-5+6 es la seleccionada para futura purificación, con una masa ocho veces mayor que la Fr-7. Por otra parte, de los perfiles de actividad (Figura II.11), Fr-7 pierde más rápido la actividad con la dilución del extracto que la fracción Fr-5+6, que aun diluyendo cuatro veces el extracto, registra la misma actividad (50 % de inhibición del crecimiento respecto al control). De esta manera la fracción Fr-5+6 es elegida para continuar con el proceso de separación de metabolitos en el exudado glandular. Con el análisis de actividad, las masas obtenidas y análisis por cromatografía en capa fina, las fracciones fueron reunidas obteniéndose las masas resumidas en la Tabla II.3.

Tabla II.3.- Reunión de fracciones y masas obtenida de la cromatografía *flash* del extracto de tricomas de *R. cf adenotrichos*:

Fracción	Masa (g)
1 - 2	0,1293
3 - 4	1,1784
5 - 6	7,6183
7 - 8	1,2993
9	0,8987

Condiciones de elusión: 600mL (2 volumen muerto) de cada uno de las mezclas de solventes descritas en la Tabla II.2.

El análisis de cromatografía muestra, que la separación, aunque eficiente en la separación de los constituyentes metabólicos de tricomas de otras especies de plantas, no lo fue en este caso, pudiendo indicar una naturaleza diferente en cuanto a la constitución metabólica del extracto de estos tricomas.

Así, se decidió realizar una segunda cromatografía en columna, seleccionando la fracción Fr-5+6, siendo el volumen de esta columna de 314mL, con un volumen de cabeza de columna de 21,7mL, un volumen muerto de 296,8mL y un volumen de elución de 200mL. Para ello se usó la misma composición de solventes que la anterior columna, pero con un incremento más gradual de la polaridad, usando 22 proporciones de solvente para la elución, descritos en la Tabla II.4. De este segundo análisis cromatográfico, 38 fracciones fueron reunidas, cuyas masas se resumen en la Tabla II.5, representando un 74% de recuperación de la masa.

Tabla II.4.- Composición de solventes y volúmenes de elusión para la separación cromatográfica del extracto Fr-5+6 de tricomas de *R. cf adenotrichos*:

Elución	Solvente	Composición (v/v)	Volumen de composición(ml)	Volumen de composición(ml)
1	Hx	-	200	-
2	Hx	-	200	-
3	Hx:DCM	9,5:0,5	190	10
4	Hx:DCM	9:1	180	20
5	Hx:DCM	8,5:1,5	170	30
6	Hx:DCM	8:2	160	40
7	Hx:DCM	7,5:2,5	150	50
8	Hx:DCM	7:3	140	60
9	Hx:DCM	6,5:3,5	130	70
10	Hx:DCM	6:4	120	80
11	Hx:DCM	5,5:4,5	110	90
12	Hx:DCM	1:1	100	100
13	Hx:DCM	4,5:5,5	90	110
14	Hx:DCM	3:7	70	130
15	Hx:DCM	2,5:7,5	50	150
16	Hx:DCM	2:8	30	170
17	Hx:DCM	1,5:8,5	20	180
18	Hx:DCM	1:9	10	190
19	DCM	-	-	200
20	DCM:AcOET	9,5:0,5	190	10
21	AcOET	-	-	200
22	MeOH	-	-	200

Tabla II.5.- Reunión de fracciones y masas obtenida del segundo análisis cromatográfica de la fracción Fr-5+6* de la primera columna del exudado glandular de *R. cf adenotrichos*:

Fracción #	Masa recuperada (g)	Fracción #	Masa recuperada (g)
F1	0,1630	F20	0,0314
F2	0,0190	F21	0,0255
F3	0,0193	F22	0,0186
F4	0,0336	F23	0,3840
F5	0,0117	F24	0,1888
F6	0,0106	F25	0,0213
F7	0,0409	F26	0,0456
F8	0,0070	F27	0,0517
F9	0,0288	F28	0,0532
F10	0,0041	F29	0,1462
F11	0,0076	F30	0,1204
F12	0,0730	F31	0,1625
F13	0,0825	F32	0,0644
F14	0,0160	F33	0,5147
F15	0,0181	F34	0,0866
F16	0,0139	F35	0,5094
F17	0,0119	F36	0,1217
F18	0,0124	F37	3,0034
F19	0,0256	F38	0,0624

Usando como criterio la cromatografía en capa fina (Figura II.13), se estudió la composición de las diferentes fracciones obtenidas, esto con el objeto de reunir aquellas fracciones que se comporten de manera similar. De esta forma, fue posible reunir las fracciones mostradas en la Tabla II.6, cuya cromatografía en capa fina se muestra en la Figura II.14. Simplificando así, el manejo de las fracciones para proceder a la purificación de los productos.

www.bdigital.ula.ve



Figura II.13.- Cromatografía de capa fina correspondiente a las fracciones obtenidas en la segunda columna de separación para la fracción Fr-5+6. Condiciones de elisión Hx/DCM en proporciones 2:8; 2,5:7,5 y 1:9 v/v respectivamente.

Tabla II.6.- Reuniones obtenidas de las fracciones, según el análisis por cromatografía en capa fina de la cromatografía de la fracción Fr-5+6 del segundo análisis cromatográfico del extracto de tricomas glandulares de *R. cf adenotrichos*:

Fracciones reunidas	Código	Masa (g)
F1-F8	A	0,3051
F9, F10 y F13	B	0,1154
F11 - F12	C	0,0806
F14 - F22	D	0,1734
F23 - F25	E	0,5941
F26 - F32	F	0,6440
F33 - F38	G	4,2982

www.bdigital.ula.ve



Figura II.14.- Cromatografía de capa fina de las fracciones reunidas descritas en la Tabla II.5. Condiciones de elisión Hx/DCM 2,5:7,5 v/v

Todas las fracciones aun muestran cierto grado de complejidad, aunque en grado menor, siendo las fracciones denominadas C y E, al parecer, las más simples, donde se revela un componente mayoritario. Con esta consideración, se procedió a purificar los compuestos detectados en la fracción C y E, mediante cromatografía preparativa (Figura II.15). Para esto se usó una composición de la fase móvil de Hx:DCM 2:8 v/v en ambos casos. De este análisis se logran aislar cinco compuestos cuyas masas se resumen en la Tabla II.7, que según sus análisis de cromatografía en capa fina (Figura II.16), parece indicar en un alto grado de pureza.

Por otra parte, se lograron aislar otros cinco compuestos usando una composición una de la fase móvil de Hx:AcOET 3:7 v/v, cuya cromatografía en capa fina revelan que poseen contaminantes en pequeñas proporciones (Figura II.17) y sus masas descritas en la Tabla II.8, debido a esto, no son útiles para elucidación estructural.

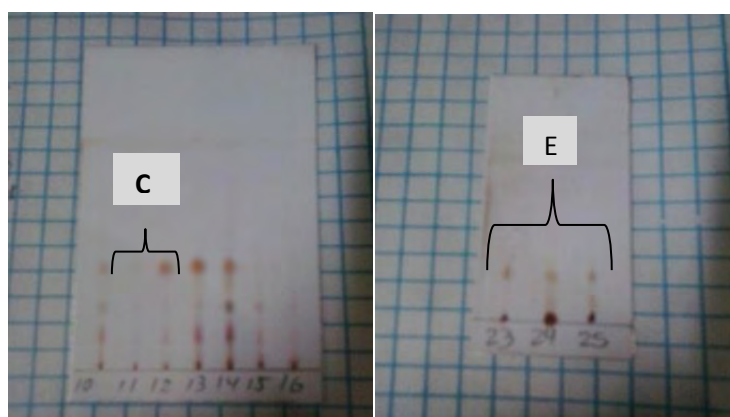


Figura II.15.- Comportamiento en cromatografía de capa fina para las fracciones que se purificaron por preparativas. Condiciones de elusión Hx:DCM 2,5:7,7 v/v.

Tabla II.7. – Compuestos mayoritarios purificados por preparativas y sus respectivas masas:

Compuesto Código	Masa (mg)
A	16,9
D	17,4
E	14,7
J	19,2
L	10,6

Tabla II.8. Compuestos minoritarios purificados por preparativas y sus respectivas masas:

Compuesto Código	Masa (mg)
H	8,2
I	4,2
K	3,0
B	4,3
C	6,6



Figura II.16.- Análisis por cromatografía en capa fina de los compuestos mayoritarios del exudado glandular *R. cf. adenotrichos*. Condiciones de elusión: Hx:DCM 1:9 v/v.

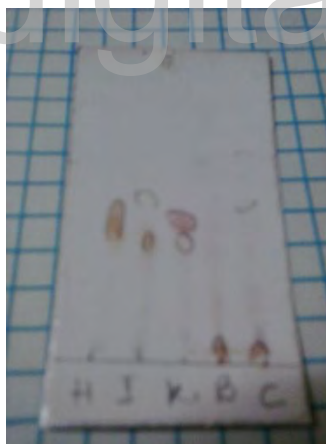


Figura II.17.- Análisis por cromatografía en capa fina de los compuestos minoritarios del exudado glandular *R. cf. adenotrichos* aislados con menor masa. Condiciones de elusión: Hx:DCM 1:9 v/v.

II.IV.-ESTUDIO ESPECTROSCOPICO DE LOS EXTRACTOS, FRACCIONES Y COMPUESTOS PURIFICADOS

Una vez que se llevó a cabo todo el proceso de fraccionamiento, purificación y aislamiento biodirigido; se procedió a la caracterización estructural de los compuestos obtenidos, utilizando para ello técnicas como: Espectroscopía Infrarroja (IR) y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT). Cada uno de los compuestos obtenidos y su procedencia se resume en la Tabla II.9.

II.IV.1.-Compuesto A

El compuesto A (16,9 mg) proviene de la reunión E (ver Figura II.15), compuesta por las fracciones 23-25 de la segunda columna flash; fue purificado por cromatografía de capa fina empleando como sistema de solventes una mezcla DCM:Hx en proporciones 8:2.

El espectro IR (Figura II.18) muestra las bandas de tensión características debidas a la presencia de grupos hidroxilos (3424,2 cm⁻¹ tensión O-H y 1282,1 cm⁻¹, tensión C-O); así como también tensión y deformación fuera del plano debida a enlaces C-H (2955,0 cm⁻¹ y 1453,0 cm⁻¹), (ver Tabla II.9).

Tabla II.9.- Productos resultantes del proceso de aislamiento biodirigido:

Fracciones de				
Reuniones	procedencia	Masa (mg)	Eluyente	Productos
E	23-25	16,9	DCM:Hx 8:2	Compuesto A
E	23-25	17,4	DCM:Hx 8:2	Compuesto D
E	23-25	14,7	DCM:Hx 8:2	Compuesto E
C	11-12	19,2	Hx:AcOET 8:2	Compuesto J
C	11-12	10,6	Hx:AcOET 8:2	Compuesto L
C	11-12	8,2	Hx:AcOET 8:2	Compuesto H
C	11-12	4,2	Hx:AcOET 8:2	Mezcla I
C	11-12	3,0	Hx:AcOET 8:2	Mezcla K
E	23-25	4,3	DCM:Hx 8:2	Compuesto B
E	23-25	6,6	DCM:Hx 8:2	Compuesto C

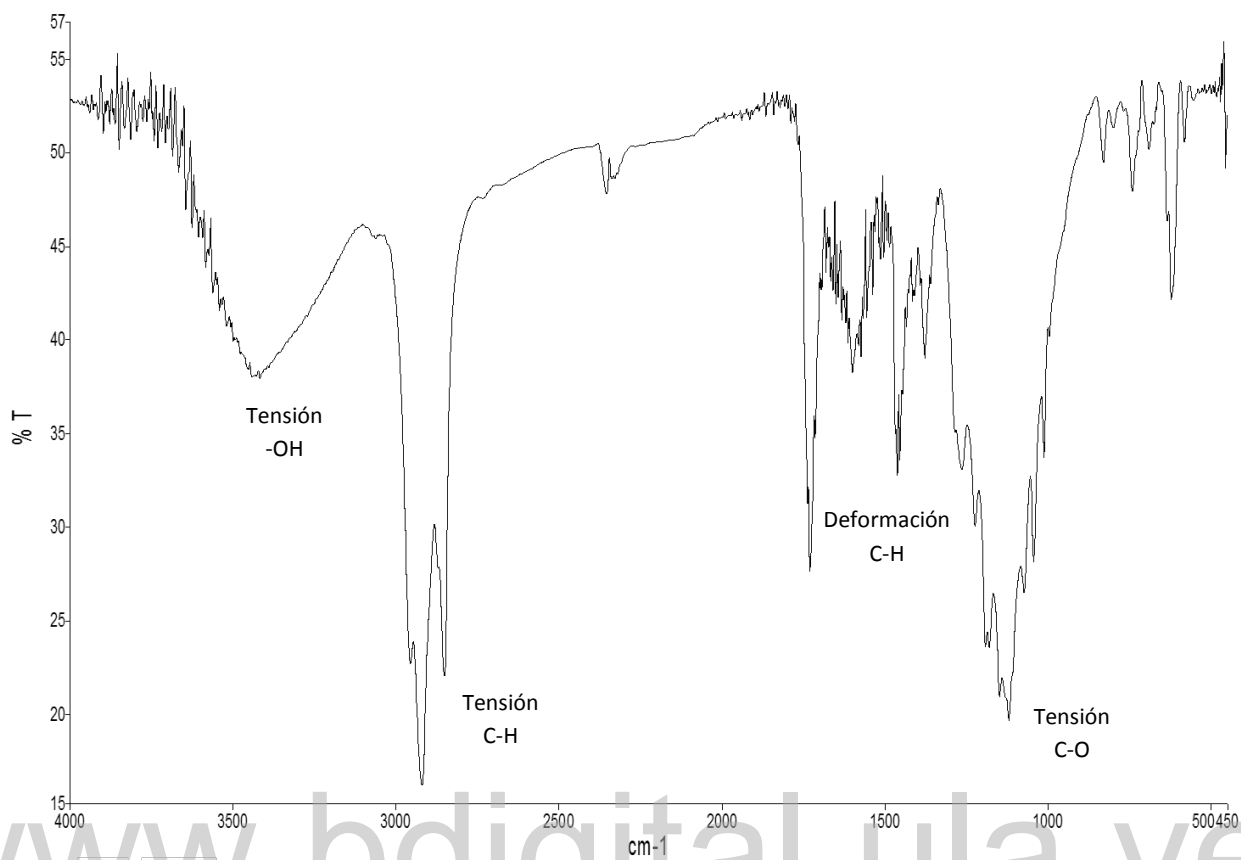


Figura II.18.- Espectro IR del Compuesto A

Tabla II.10.- Compuesto A, bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3424,2	2955,9 y 2854,6	1453,0 y 1377,1	1282,1
Grupo funcional	Tensión -OH	Tensión C-H	Deformación C-H	Tensión C-O

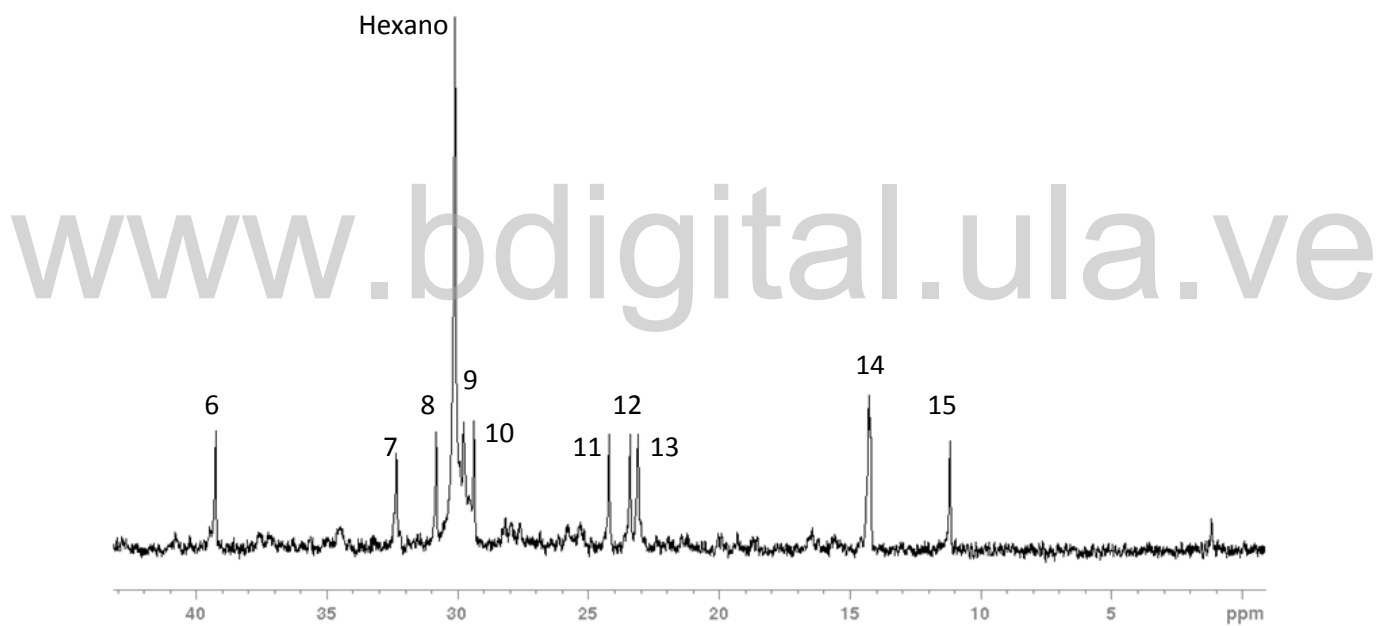
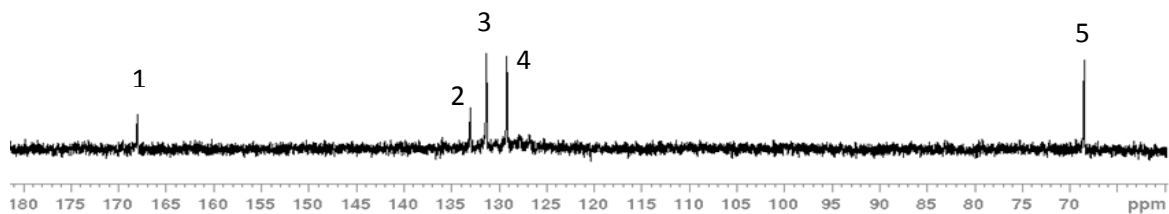
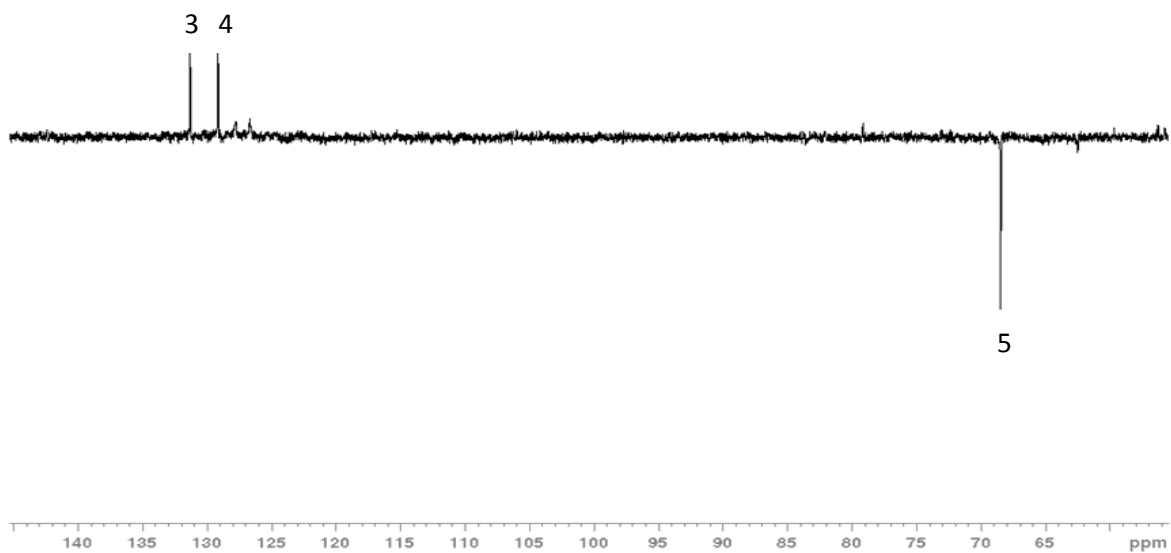


Figura II.19.- Espectro RMN ^{13}C del Compuesto A (75 MHz, CD_2Cl_2).



www.bdigital.ula.ve

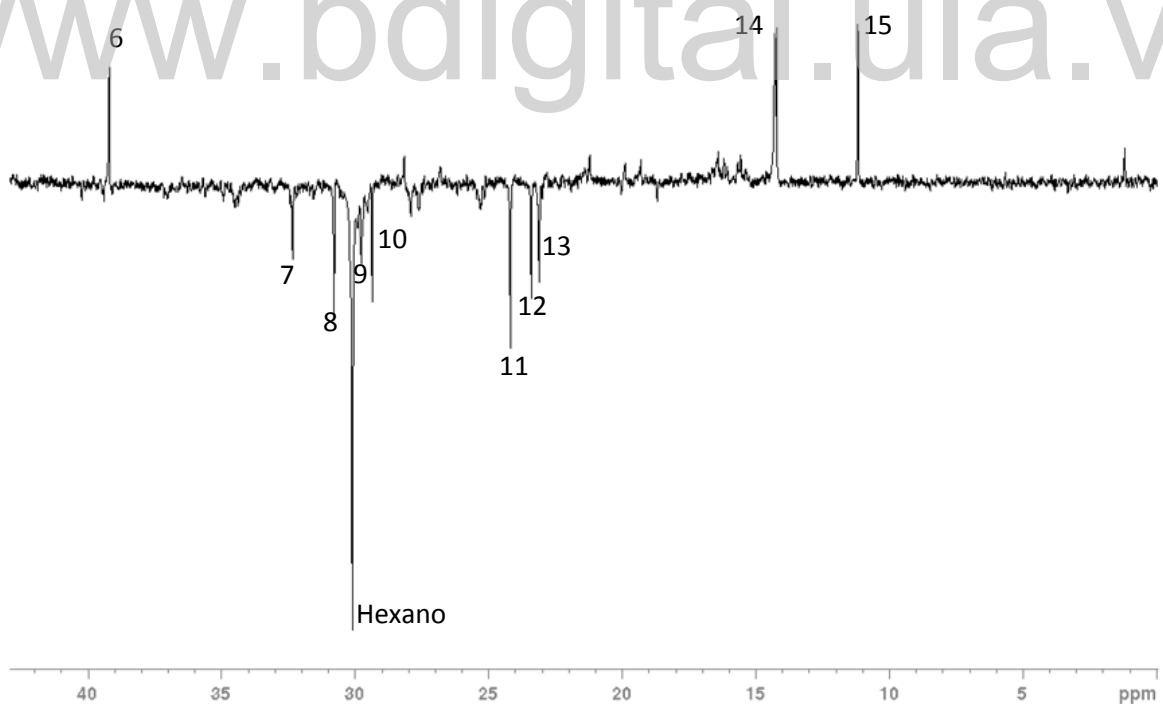


Figura II.20.- Espectro DEPT-135 del Compuesto A (75 MHz, CD_2Cl_2).

El espectro de RMN-¹³C y DEPT-135 muestra a 30 ppm una señal muy intensa en relación a las demás; la misma probablemente se corresponde a hexano (-CH₂) que pudo haber quedado como impureza remanente del proceso de extracción y purificación.

Utilizando el espectro DEPT fue posible establecer el número y tipo de carbonos presentes en este compuesto, adicionalmente se pudo corroborar la existencia de cuatro carbonos con hibridación *sp*² (C-1 = 167,9 ppm; C-2 = 132,9 ppm; C-3 = 131,3 ppm y C-4 = 129,1 ppm); los cuales deben formar parte de dos dobles enlaces; uno tetrasustituido conformado por los carbonos C-1 y C-2, el cual debe tener una función oxigenada como sustituyente tal y como lo evidencia el desplazamiento a campo bajo de C-1 (167,9 ppm). El otro doble enlace debe ser disustituido y está conformado por los carbonos C-3 y C-4 como lo demuestra la correlación en el espectro COSY (Figura II.22) de los protones olefinicos H-3 (7,55 ppm) y H-4 (7,70 ppm).

En el DEPT también se observa la presencia de 8 metilenos; uno de los cuales está sustituido con un átomo de oxígeno (señal en fase negativa a 68,4 ppm); 1 metino (C-6 = 39,2 ppm) y 2 metilos [(C-14 = 14,3 ppm) y (C-15 = 11,1 ppm)] (Tabla II.11). De esta manera se pudo determinar que el Compuesto A posee la fórmula molecular C₁₅H₂₆O₂, la cual es congruente con 3 insaturaciones. Como fue mencionado anteriormente dos de estas insaturaciones se corresponden a dos olefinas, lo que permite proponer que el compuesto en estudio se trata posiblemente de un sesquiterpeno monocíclico, cumpliendo así con los tres grados de insaturación requeridos por la fórmula molecular.

Tabla II.11.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro RMN- ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75 MHz)

del Compuesto A.

Señal	δ (ppm)	Tipo de enlace	C	H	O
1	167.9	$>\text{C}=\text{}$	1	-	1
2	132.9	$>\text{C}=\text{}$	1	-	-
3	131.3	$=\text{C}-\text{H}$	1	1	-
4	129.1	$=\text{C}-\text{H}$	1	1	-
5	68.4	$-\text{CH}_2-\text{O}-$	1	2	1
6	39.2	$-\text{CH}$	1	1	-
7	32.3	$-\text{CH}_2$	1	2	-
8	30.1	$-\text{CH}_2$	1	2	-
9	29.8	$-\text{CH}_2$	1	2	-
10	29.4	$-\text{CH}_2$	1	2	-
11	24.2	$-\text{CH}_2$	1	2	-
12	23.4	$-\text{CH}_2$	1	2	-
13	23.1	$-\text{CH}_2$	1	2	-
14	14.3	$-\text{CH}_3$	1	3	-
15	11.1	$-\text{CH}_3$	1	3	-

Fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$

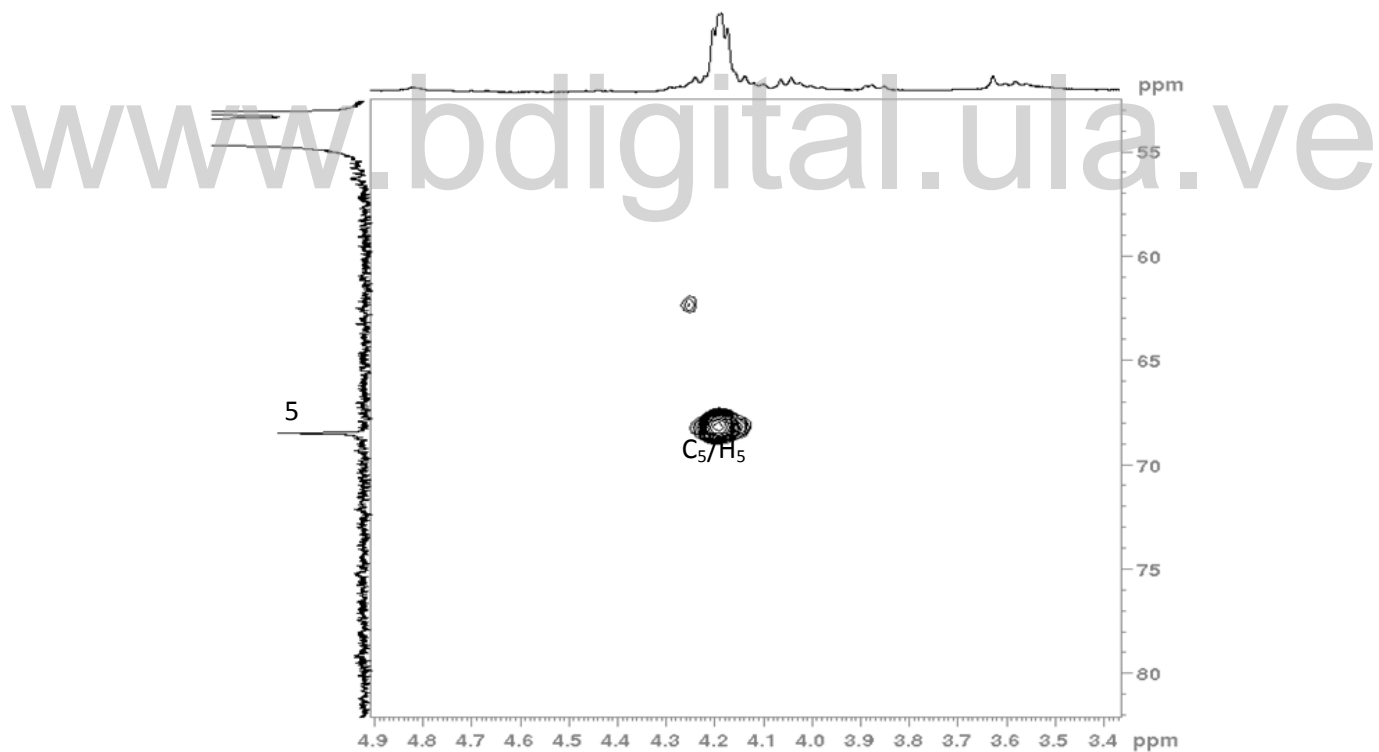
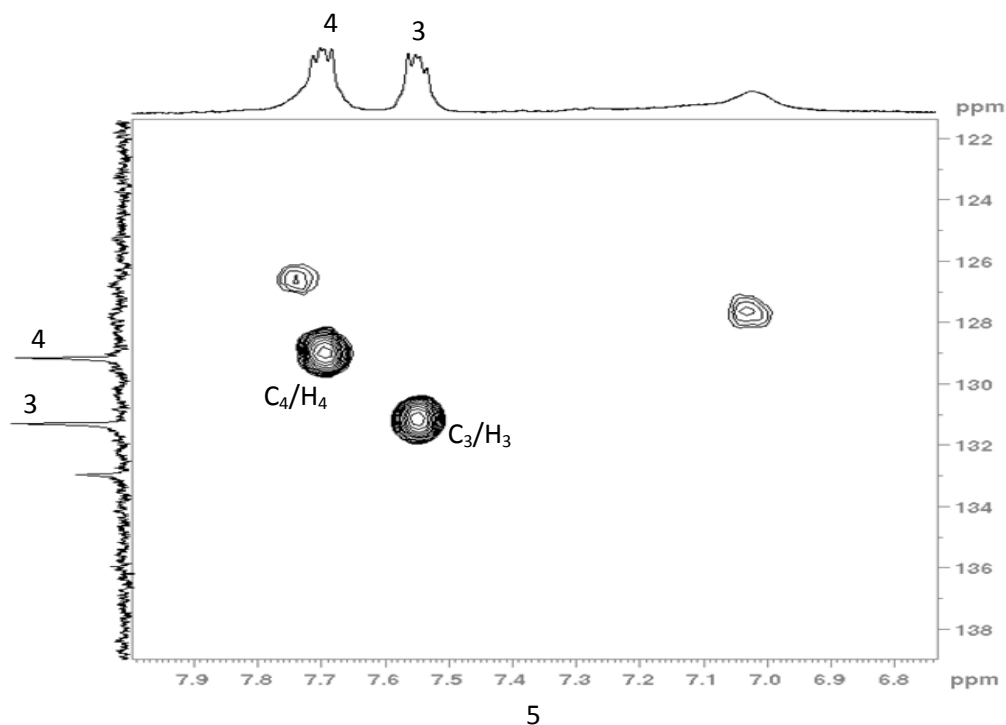


Figura II.21.- Espectro HSQC del Compuesto A.

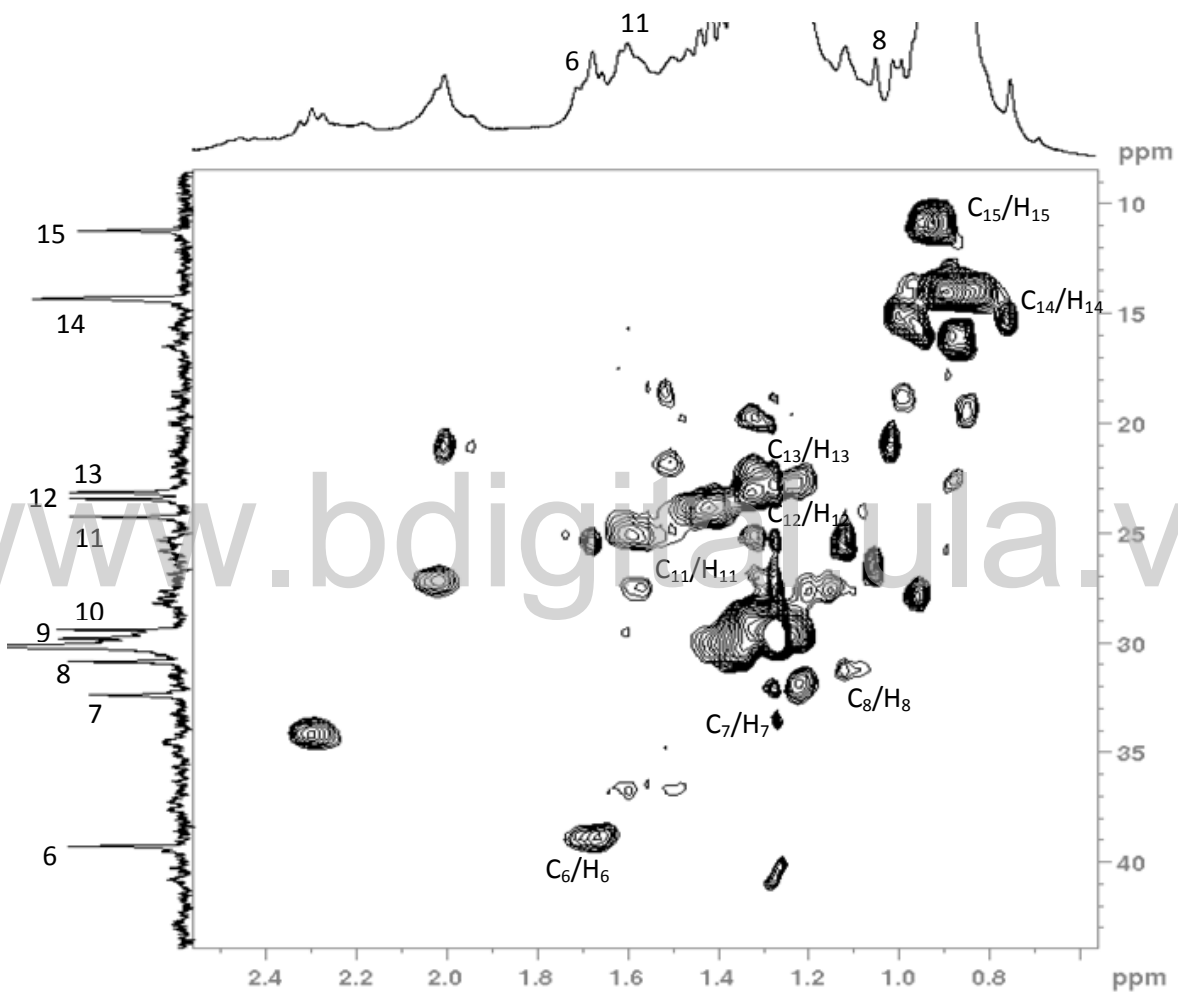


Figura II.22.- Espectro HSQC del Compuesto A.

En el espectro HSQC del Compuesto **A** (Figuras II.21 y II.22), observamos las correlaciones heteronucleares ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) a un enlace; esto permite conocer el número de hidrógenos enlazado a un determinado carbono y facilita así la posterior identificación de los protones en el espectro de RMN- ^1H .

Utilizando esta metodología fue posible asignar los desplazamientos en el espectro de RMN- ^1H (Figura II.23) de cada una de las señales correspondientes a los metilos, metilenos y metínos descritos en la tabla II.11. De igual forma se confirma la presencia de los protones olefínicos H-3 y H-4 [Correlación en el espectro HSQC de C-3 (131,3 ppm) con H-3 (7,55 ppm) y Correlación de C-4 (129,1 ppm) con H-4 (7,70 ppm)]; los cuales como se indicó, se encuentran formando parte de un doble enlace disustituido.

También se ratifica que la señal a 4,18 ppm en el espectro de RMN- ^1H se corresponde a los protones del metileno oxigenado C-5 [Correlación en el espectro HSQC de C-5 (68,4 ppm) con H-5 (4,18 ppm)].

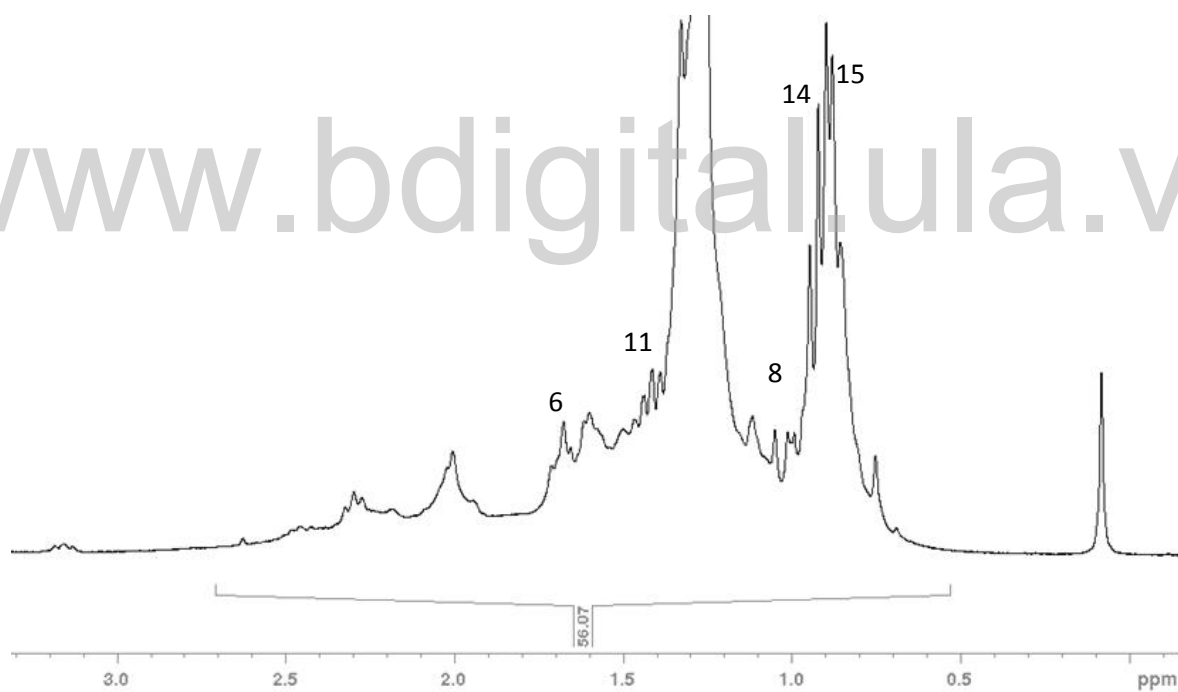
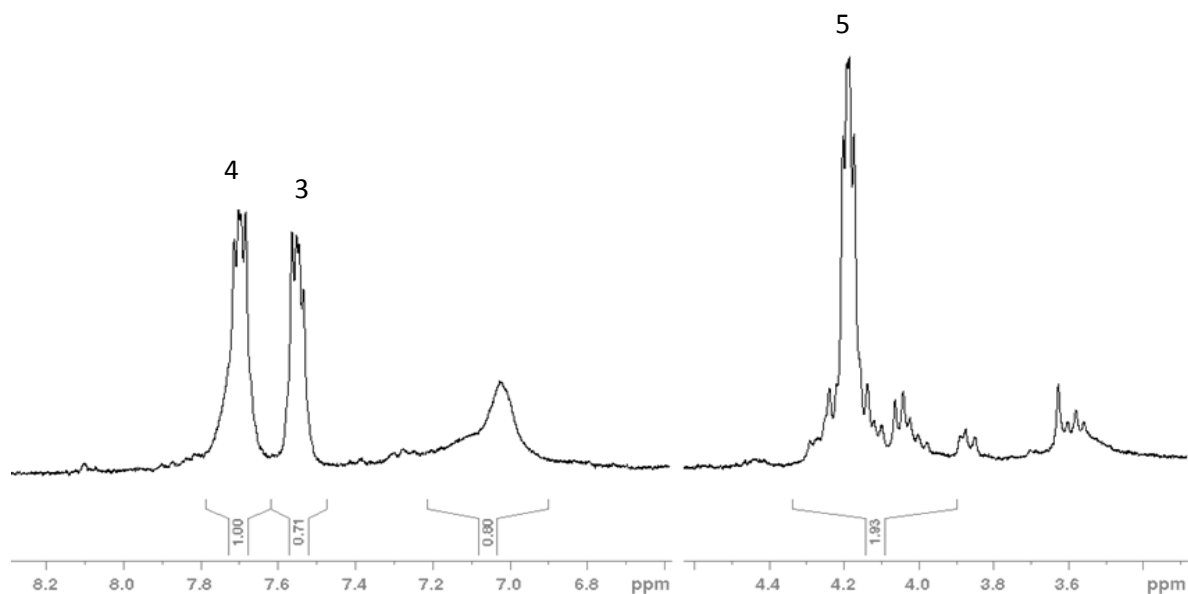


Figura II.23.- Espectro RMN-¹H del Compuesto A (300 MHz, CD₂Cl₂).

Tabla II.12.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) del Compuesto A.

H	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$\delta(\text{ppm})$	7.55	7.70	4.18	1.67	1.22	1.37	1.22	1.33	1.41	1.32	1.23	0.88	0.23
<i>M</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	-	-	-	-	-	-	<i>m</i>	-	-	<i>m</i>	<i>m</i>
<i>J</i>(Hz)	5,4 y 3,5	5,4 y 3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Como se puede apreciar en la tabla II.12 las señales de los protones H-3 y H-4 se acoplan con una constante de 5,4 Hz, esto indica que ambos se encuentran en una disposición *cis*, formando parte de este doble enlace disustituido.

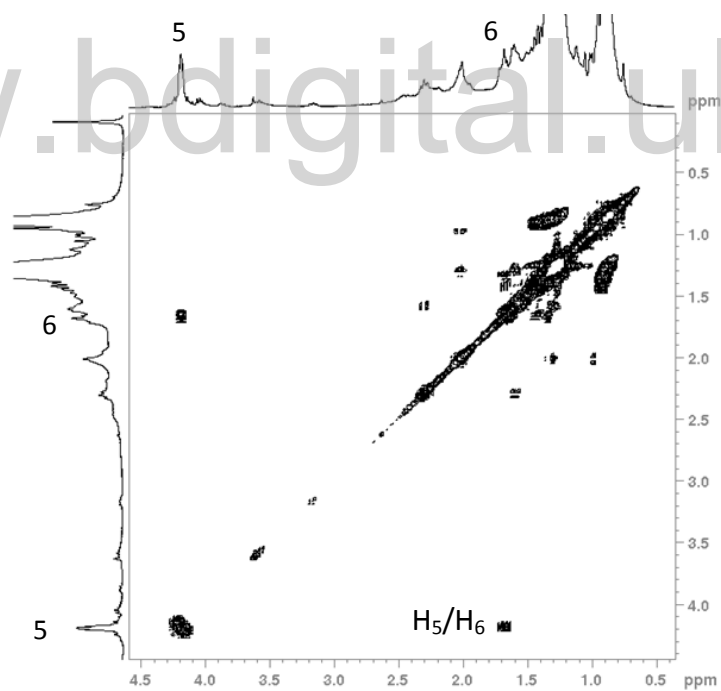
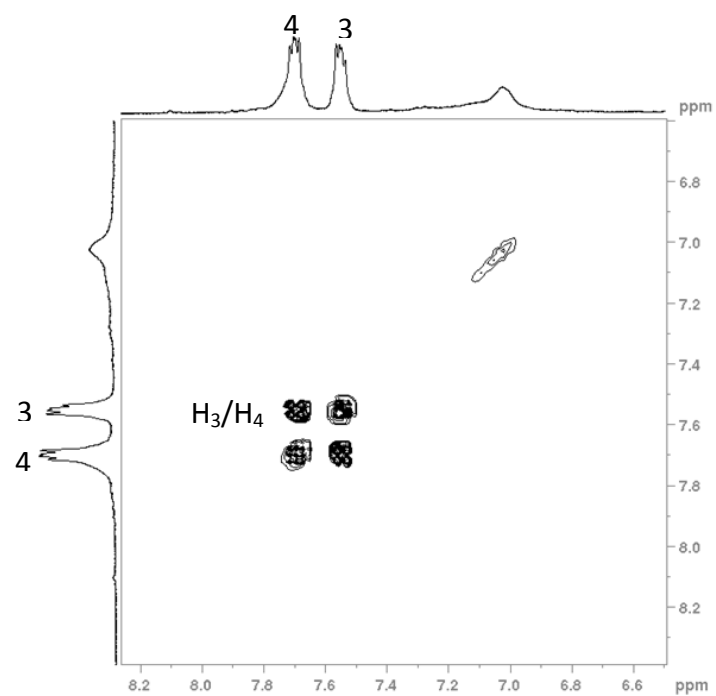


Figura II.24.- Espectro COSY del Compuesto A (300 MHz, CD₂Cl₂).

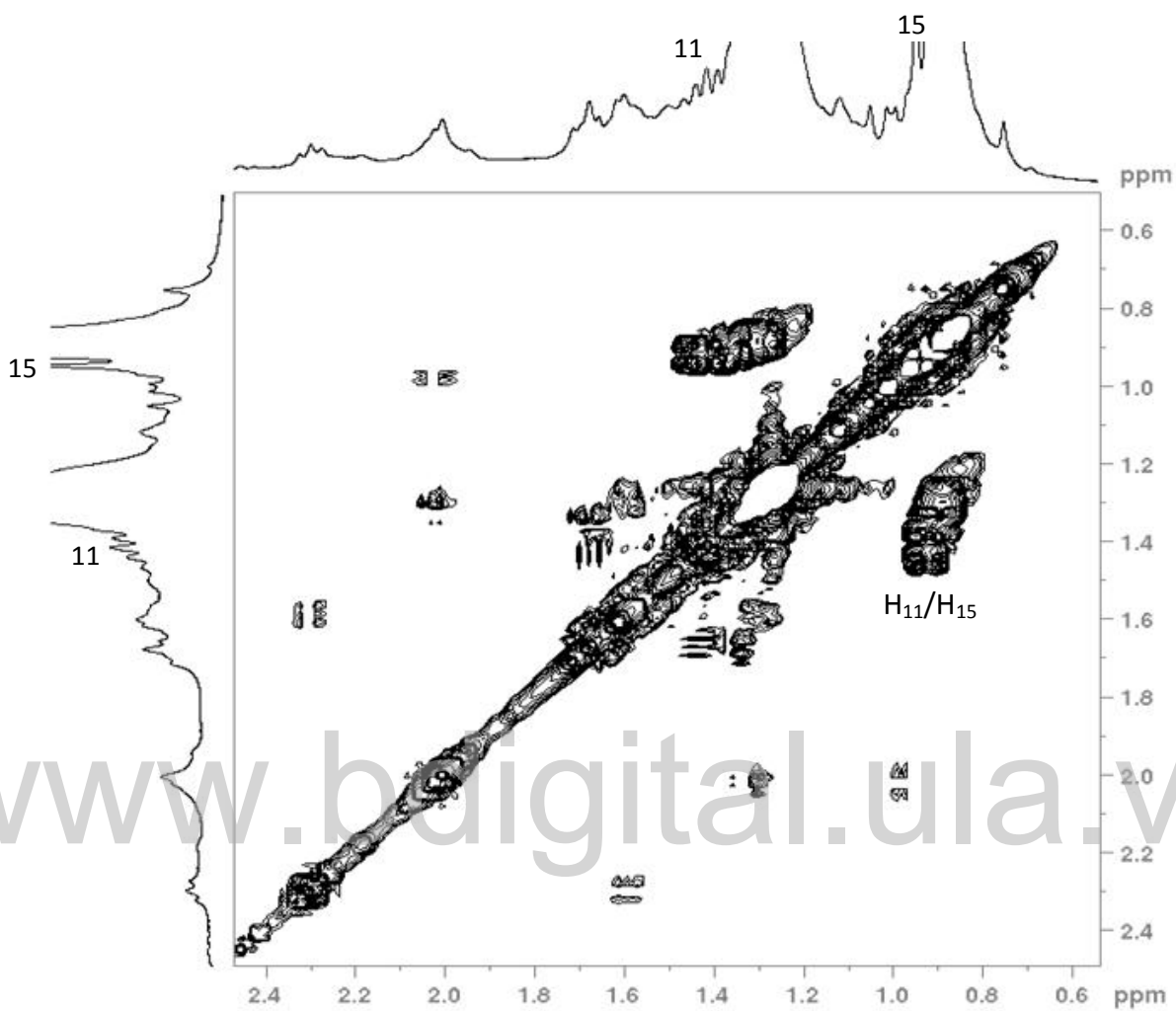


Figura II.25.- Espectro COSY del Compuesto A (300 MHz, CD₂Cl₂).

Los sesquiterpenos, constituyen un grupo muy variado de compuestos, existen identificados más de 300 esqueletos diferentes y miles derivados de plantas, algas y microorganismos (San Feliciano et al., 2008). Se forman a partir de unidades de isopreno y pueden presentar una gran variedad de esqueletos base. Se clasifican de forma general como sesquiterpenos acíclicos, como componentes de aceites esenciales en forma de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y ésteres. Así mismo los sesquiterpenos cíclicos, que son mucho más numerosos se clasifican en mono, bi, tri y tetracíclicos (Estévez-Braun A. y Compagnone R., 2008).

Las propiedades biológicas de los sesquiterpenos es muy variada y abarca actividad antibiótica, antineoplásica, citotóxica, inmunosupresora, fitotóxica, antifúngica, disuasoria de la alimentación de insectos y actividad hormonal (San Feliciano et al., 2008). Lo anteriormente expuesto podría estar relacionado con la actividad observada del extracto glandular de *R. cf. adenotrichos* y su relación biológica con el insecto *H. stali* en actividades como depredación y oviposición (Ávila-Núñez et al., 2016).

Los datos espectroscópicos anteriormente descritos sugieren que el compuesto en estudio se trata probablemente de un sesquiterpeno monocíclico con la presencia de dos dobles enlaces (uno tetrasustituído y otro disustituído); adicionalmente se cuenta con la presencia de dos funciones oxigenadas dentro la estructura, las cuales como lo sugiere el espectro infrarrojo se tratan de posibles grupos hidroxilos. Algunos de los esqueletos de sesquiterpenos monocíclicos posibles para este compuesto se presentan en la Figura II.26.

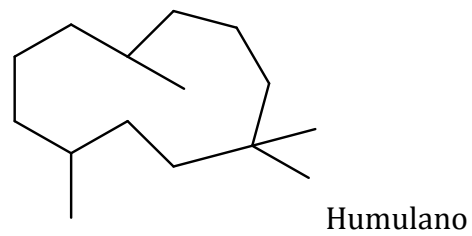
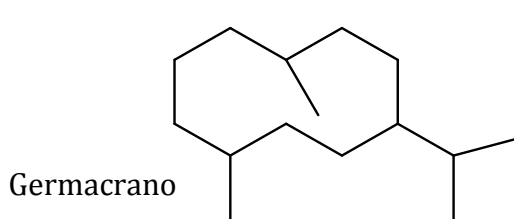
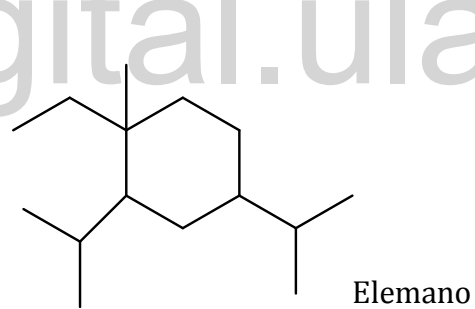
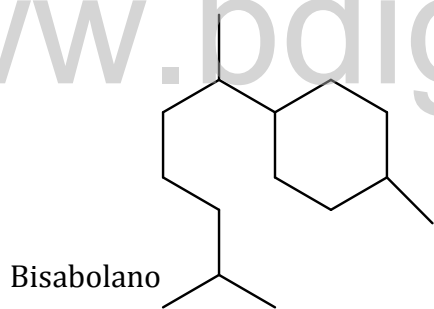
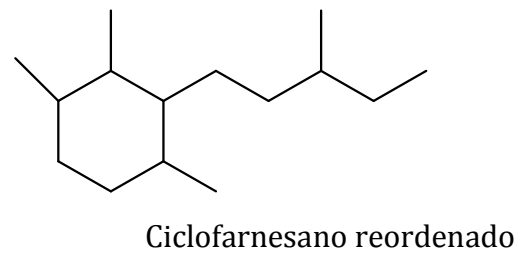
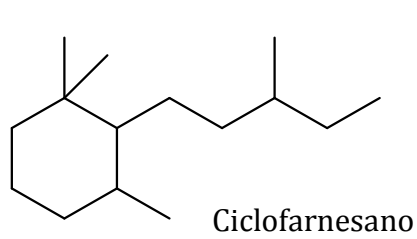
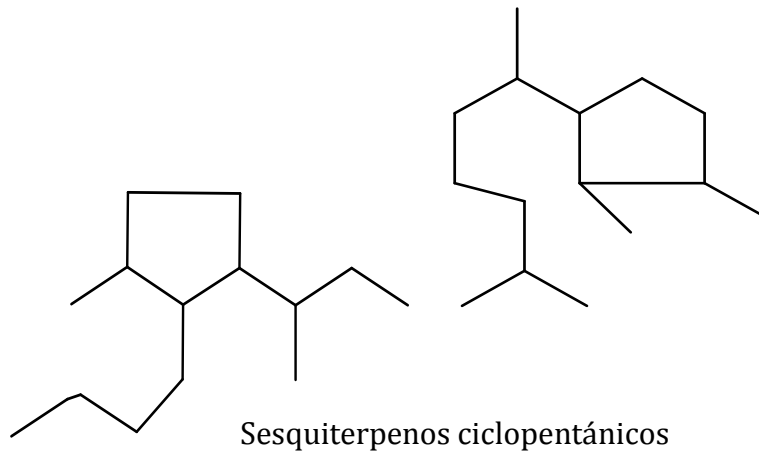


Figura II.26.- Esqueletos sesquiterpenos monocíclicos posibles para el Compuesto A.

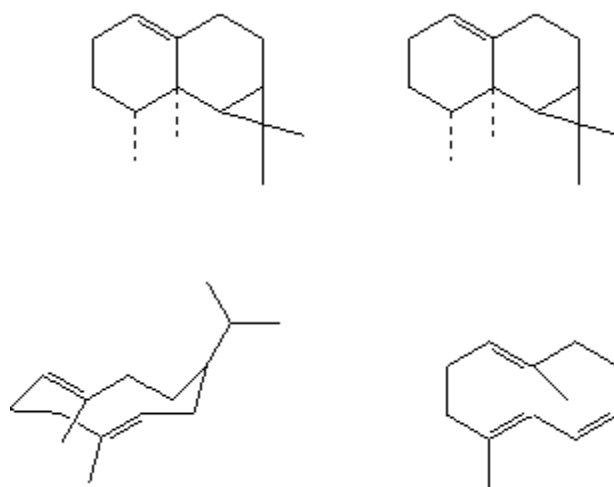


Figura II.27.- Estructuras típicas en la biogenética de sesquiterpenos en aceite esencial de *Rubus rosifolius* (Southwell I., 2007).

Se conocen algunas estructuras de sesquiterpenos que han sido identificadas en especies del género *Rubus*, algunas de ellas se describen en la figura II.28, esta información establece este tipo de compuestos en la quimiotaxonomía del generó que se está estudiando.

II.IV.2.-Compuesto D

El compuesto D (17,4 mg) se obtuvo como un sólido cristalino a partir de las fracciones 23-25 de la reunión E (ver Figura II.15). Su espectro infrarrojo (Tabla II.13 y Figura II.27) muestra bandas de tensión para grupos C=O ($1704,0\text{ cm}^{-1}$), así como también la presencia de bandas que caracterizan la presencia de dobles enlaces [Tensión =C-H ($3058,0\text{ cm}^{-1}$) y flexión fuera del plano =C-H ($746,4\text{ cm}^{-1}$)].

El análisis del espectro de RMN- ^{13}C (Banda ancha y DEPT-135) (Figuras II.28 y II.29) indicó la presencia de treinta átomos de carbono. En la tabla II.14 se observa que 8 de estas señales corresponden a grupos metilos, 10 metilenos, 5 metinos, 7 carbonos cuaternarios de los cuales uno se trata de un carbono cuaternario oxigenado y otro de un carbonilo cetónico (señales a 75,4 y 217,8 ppm respectivamente). De igual forma en el espectro de RMN- ^{13}C se observa la presencia de un doble enlace trisustituido conformado por los carbonos C₂ y C₃ (señales a 130,1 y 125,1 ppm).

Lo anteriormente expuesto permite establecer la fórmula molecular de C₃₀H₅₀O₂, la cual establece la presencia de 6 grados de insaturación; una de las cuales está contenida en el carbonilo cetónico y otra en el doble enlace, lo cual sugiere que el compuesto en estudio se trate probablemente de un triterpeno tetracíclico.

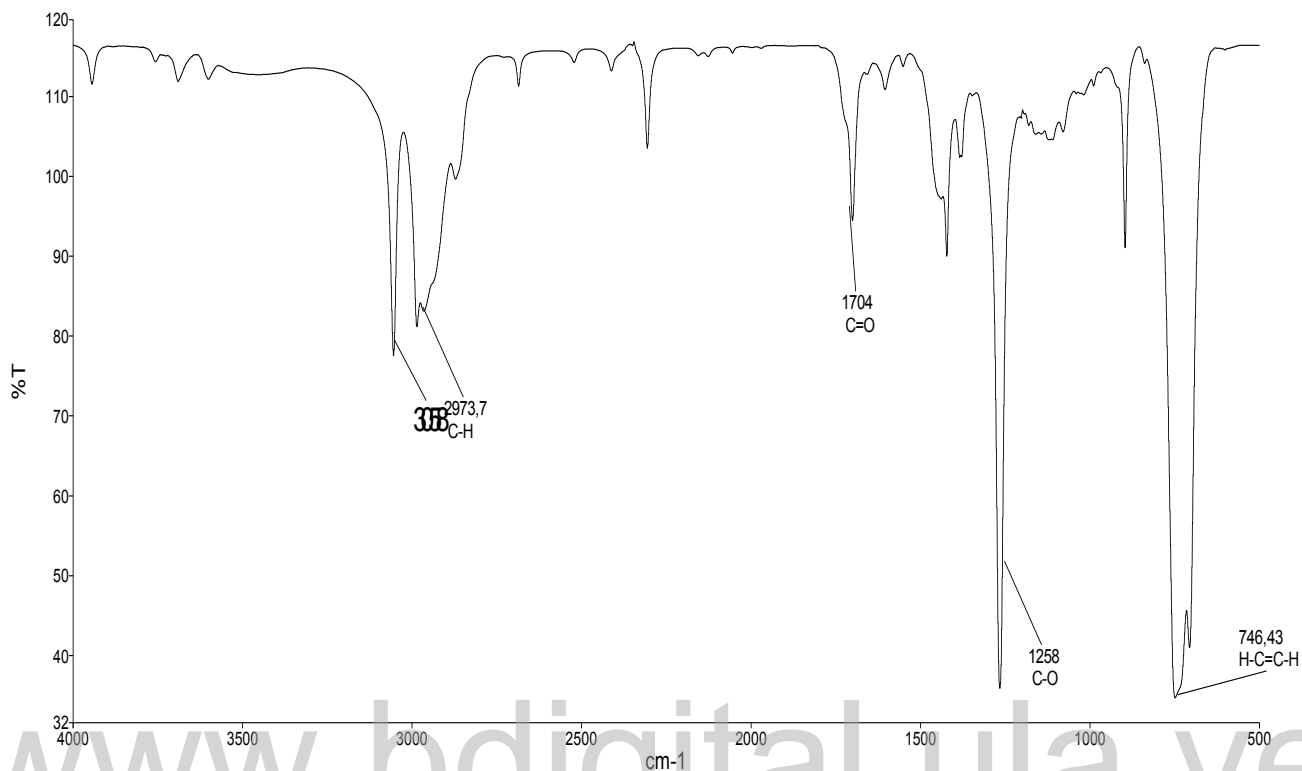


Figura II.28.- Espectro IR del compuesto D.

Tabla II.13.- Compuesto D, bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3058,0	2973,7	1704,0	1258,0	746,4
Grupo funcional	Tensión C-H sp ²	Tensión C-H sp ³	Tensión C=O	Tensión C-O	Flexión =C-H

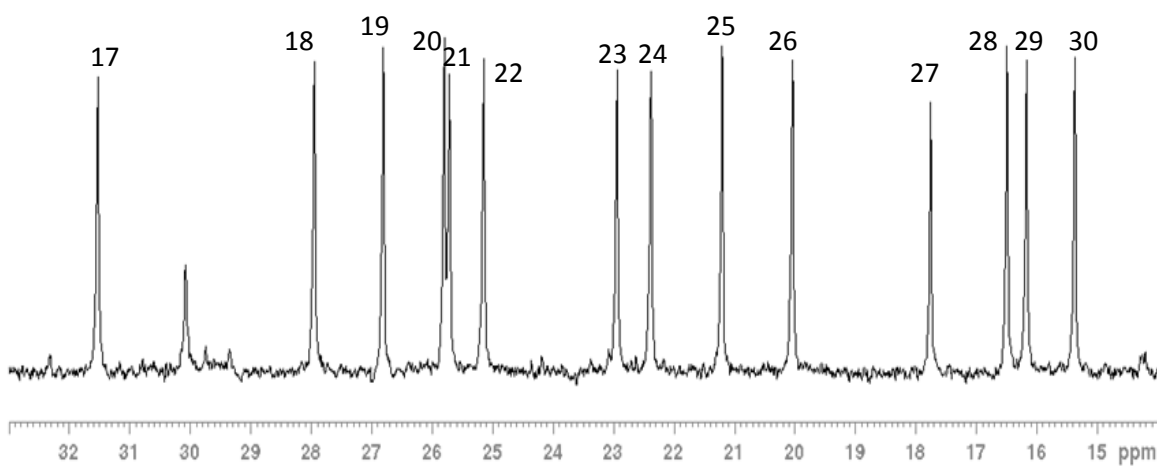
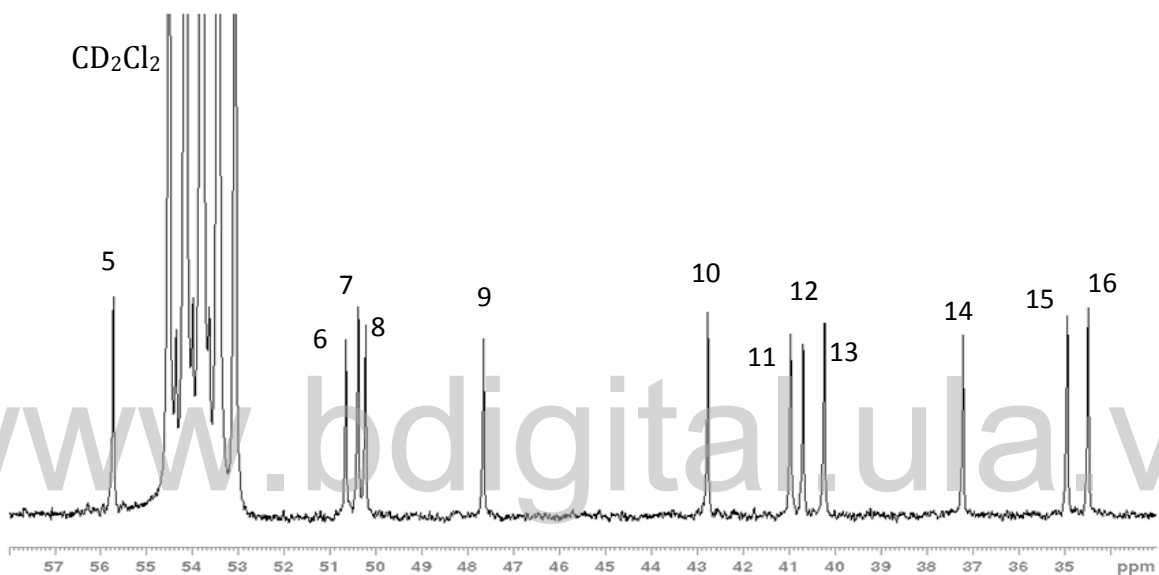
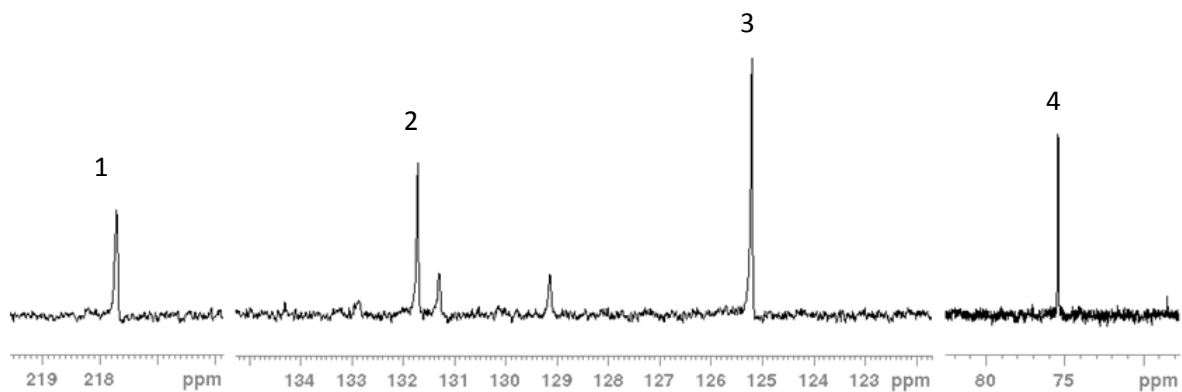


Figura II.29.- Espectro RMN-¹³C del compuesto D (75MHz solvente CD₂Cl₂).

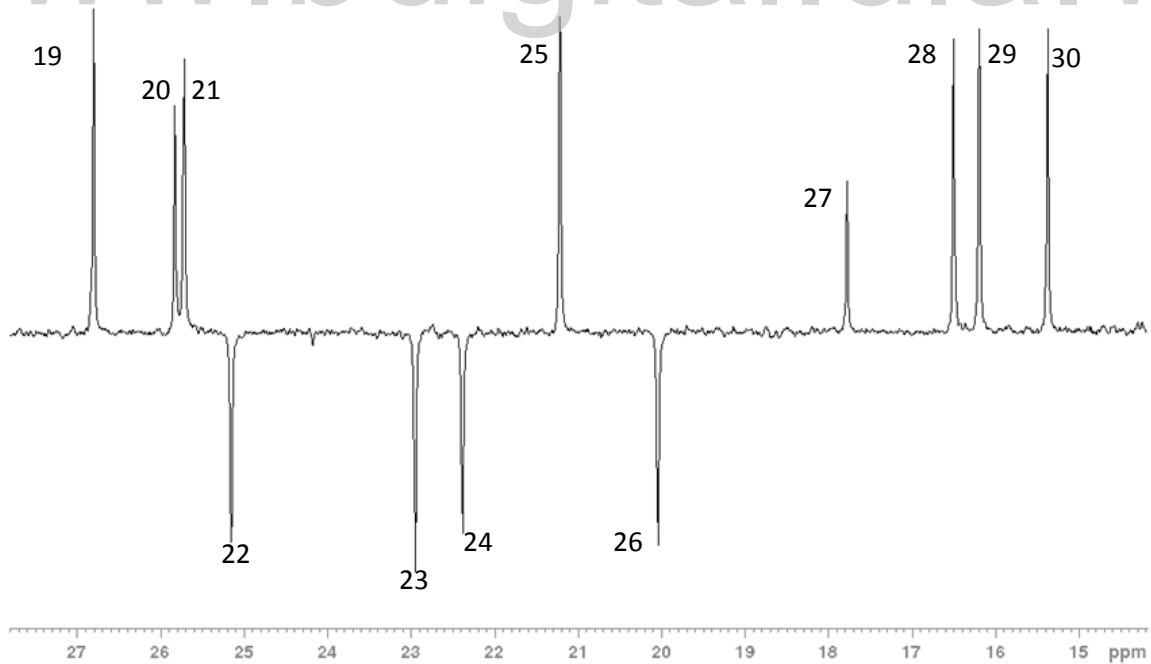
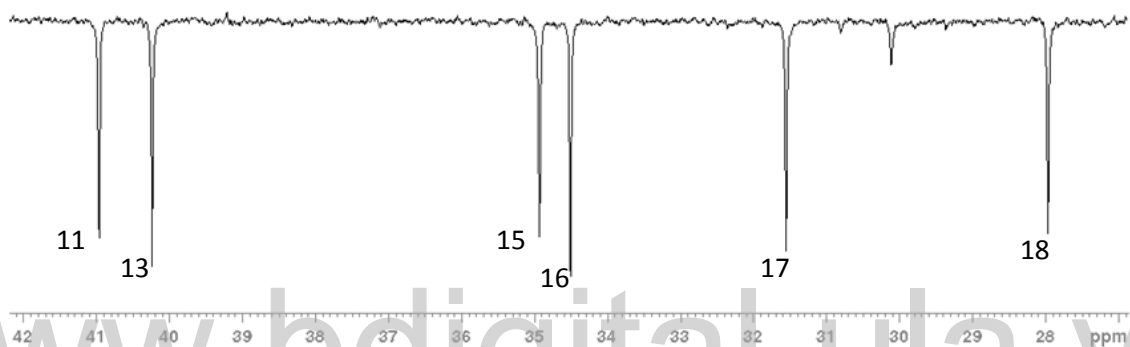
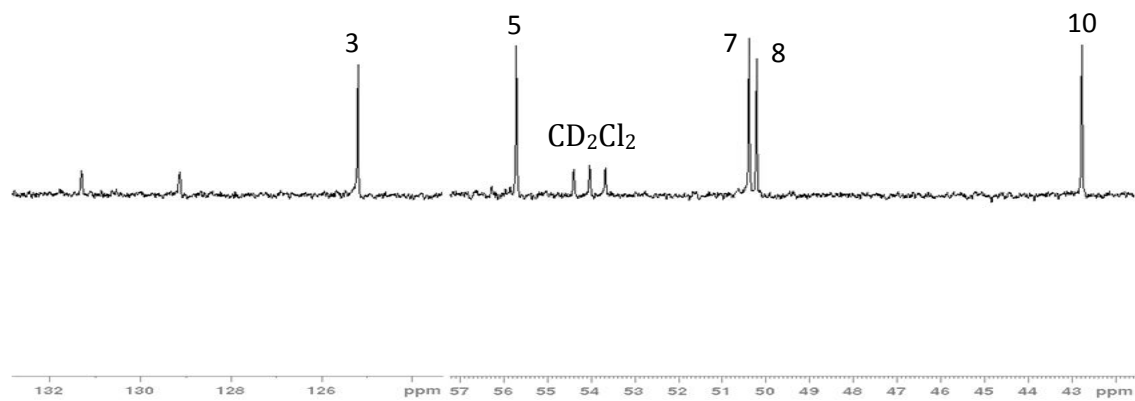


Figura II.30.- Espectro DEPT-135 del compuesto D (75MHz solvente CD_2Cl_2).

Tabla II.14.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro RMN- ^{13}C (CD_2Cl_2 , 75 MHz)

del Compuesto **D**.

Señal	δ (ppm)	Tipo de enlace	C	H	O
1	217,8	$>\text{C}=\text{O}$	1	-	1
2	131,1	$>\text{C}=\text{}$	1	-	-
3	125,1	$=\text{C}-\text{H}$	1	1	-
4	75,4	$>\text{C}-\text{O}-$	1	-	1
5	55,8	$-\text{CH}$	1	1	-
6	50,7	$>\text{C}<$	1	-	-
7	50,3	$-\text{CH}$	1	1	-
8	50,2	$-\text{CH}$	1	1	-
9	47,7	$>\text{C}<$	1	-	-
10	42,8	$-\text{CH}$	1	1	-
11	41,0	$-\text{CH}_2$	1	2	-
12	40,9	$>\text{C}<$	1	-	-
13	40,2	$-\text{CH}_2$	1	2	-
14	37,2	$>\text{C}<$	1	-	-
15	34,9	$-\text{CH}_2$	1	2	-
16	31,5	$-\text{CH}_2$	1	2	-

17	30,1	-CH ₂	1	2	-
18	27,9	-CH ₂	1	2	-
19	26,8	-CH ₃	1	3	-
20	25,8	-CH ₃	1	3	-
21	25,8	-CH ₃	1	3	-
22	25,1	-CH ₂	1	2	-
23	22,9	-CH ₂	1	2	-
24	22,3	-CH ₂	1	2	-
25	21,2	-CH ₃	1	3	-
26	20,0	-CH ₂	1	2	-
27	17,7	-CH ₃	1	3	-
28	16,4	-CH ₃	1	3	-
29	16,1	-CH ₃	1	3	-
30	15,3	-CH ₃	1	3	-

Fórmula molecular C₃₀H₅₀O₂

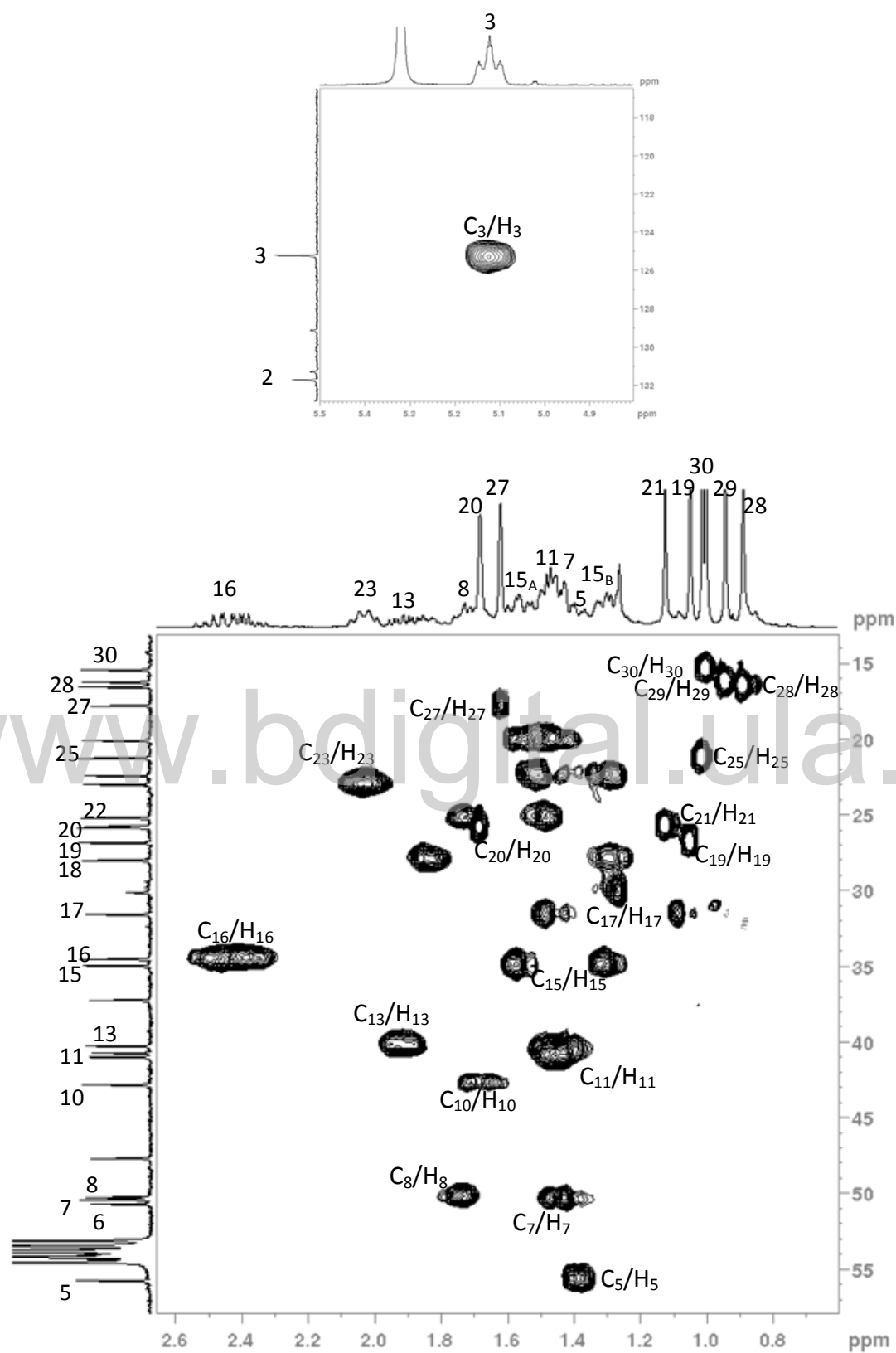


Figura II.31.-Espectro HSQC del Compuesto D.

El espectro HSQC (Figura II.30) permitió identificar las señales correspondientes a los distintos protones en el espectro de RMN-¹H (Figura II.31); de esta forma fue posible identificar los ocho metilos cuyas señales aparecen como singletes y son las más intensas del espectro; así mismo se establece que la señal a 5,12 ppm se corresponde al protón sobre el carbono C-3, el cual como se mencionó anteriormente se encuentra formando un doble enlace trisustituido junto con C-2. Este protón olefínico presenta una multiplicidad de triplete con una constante de acoplamiento de 6Hz (Tabla II.15), que en este caso coincide con un acoplamiento vecinal a un grupo metileno.

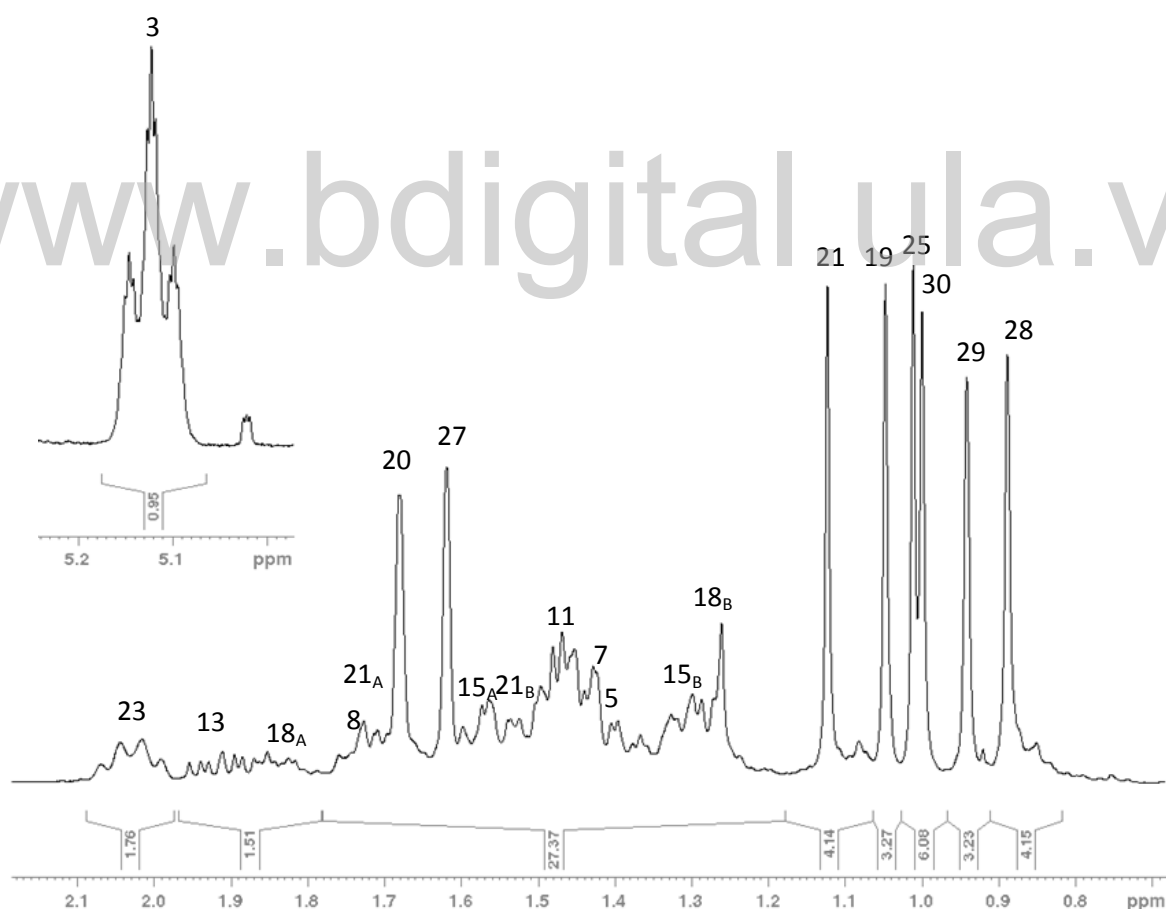


Figura II.32.-Espectro RMN-¹H del Compuesto **D** (300 MHz, CD₂Cl₂).

Tabla II.15.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H (CD_2Cl_2 , 300 MHz) del Compuesto **D**.

Señal	3	5	7	8	13	19	20	21	25	27	28	29	30
$\delta(\text{ppm})$	5,12	1,40	1,43	1,74	1,92	1,05	1,68	1,12	1,01	1,62	0,89	0,94	1,00
<i>M</i>	<i>t</i>	-	-	-	-	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En el espectro COSY (Figura II.32) se aprecia claramente las correlaciones del protón olefínico H-3 (5,12 ppm) con los protones metílicos H-20 y H-27 (1,68 y 1,62 ppm respectivamente), lo cual sugiere que estos metilos se encuentran como sustituyentes del doble enlace e igualmente explica el ligero desplazamiento a campo bajo de ambas señales. El tercer sustituyente de esta olefina lo constituye el metileno C-23 tal y como lo indica las correlaciones en el espectro COSY de la señal correspondiente a los protones H-23 con H-3, H-20 y H-27; confirmado además por el acoplamiento vecinal ($J= 6,0$ Hz) observado para el triplete de H-3.

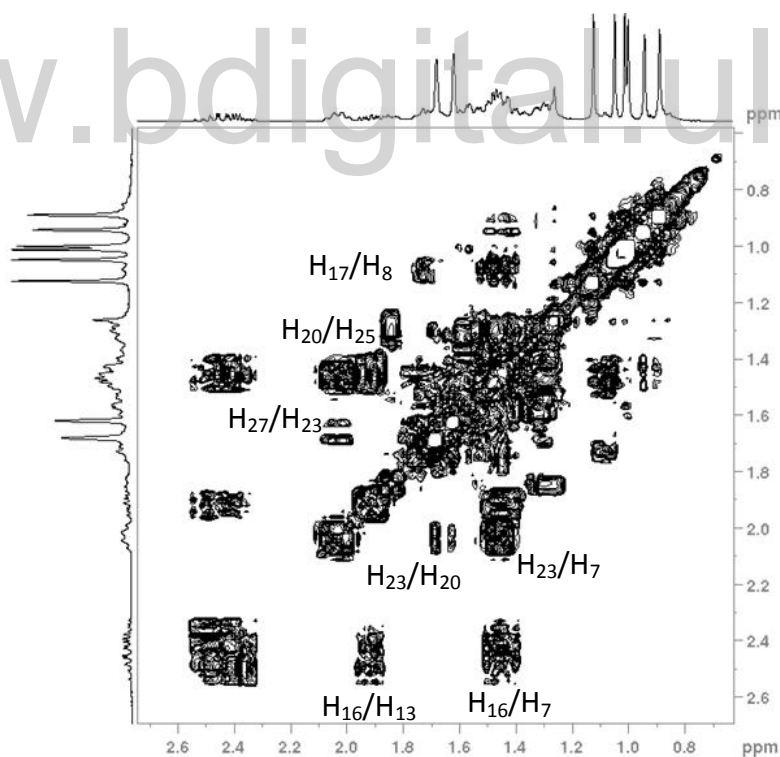
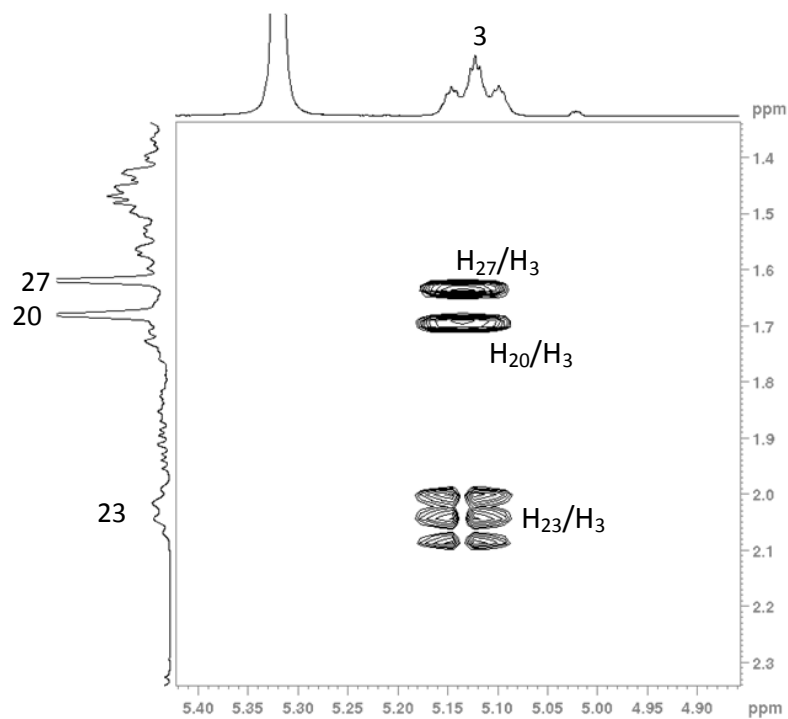


Figura II.33.-Espectro COSY del Compuesto D (300MHz, CD₂Cl₂).

Lo datos espectroscópicos evidencian que el compuesto D se trata probablemente de un compuesto triterpénico tetracíclico que cuenta con la presencia de un carbonilo cetónico y una función oxigenada (posiblemente un grupo hidroxilo), adicionalmente es posible establecer la presencia de una cadena lateral en la que se encuentra una olefina sustituida por dos grupos metilos y un metileno.

Los triterpenos constituyen un amplio grupo de productos naturales derivados del escualeno, estos se encuentran ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, y también se han detectado en el Reino Animal y en Hongos, no siendo fácil generalizar su distribución.

Una de las familias de triterpenos que coincide con la evidencia mostrada se trata de los dammaranos (Figura II.33), los cuales tienen un esqueleto tetracíclico con una cadena lateral acíclica, donde suelen variar los grupos funcionales (comúnmente oxigenados) y el número de insaturaciones presentes. Este tipo de compuestos han sido ampliamente aislados de familias vegetales como Rutáceas, Meliáceas, Betuláceas, Rubiáceas, Anacardiáceas y Celastráceas entre otras. Se han encontrado en fluidos como resinas, exudados y bálsamos. Un ejemplo de este tipo de triterpenos lo constituyen las saponinas aisladas de la raíz de droga china *Panax ginseng*, a las cuales se le atribuye un gran número de actividades biológicas entre la que destacan la actividad citotóxica, inmunosupresora y también en la comunicación hormonal como fitohormonas (San Feliciano et al., 2008).

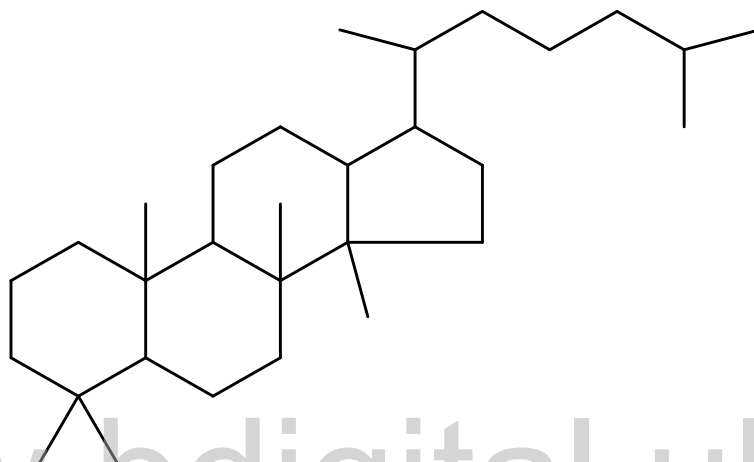


Figura II.34.- Esqueleto base del triterpeno tetracíclico Dammarano.

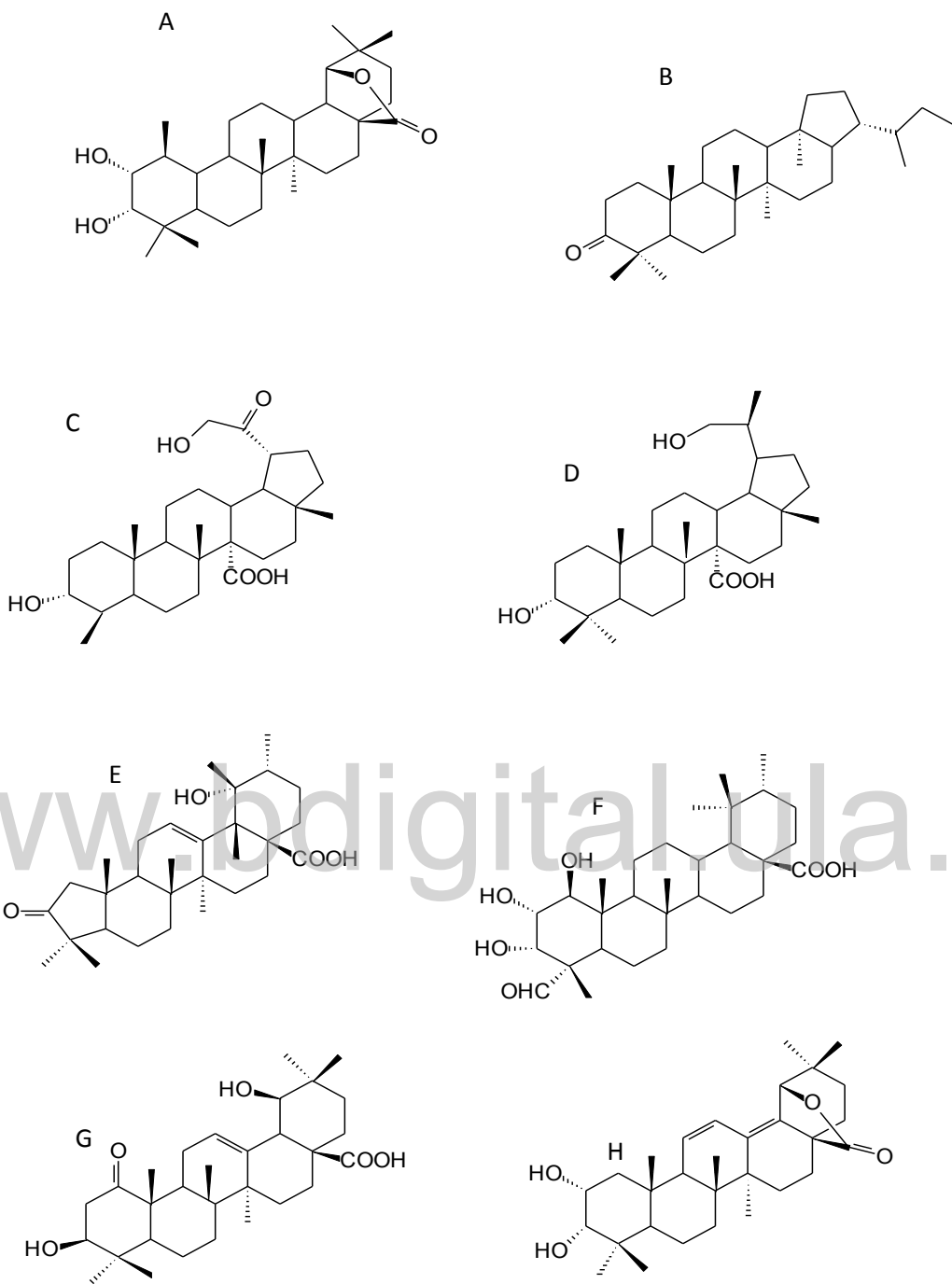


Figura II.35.- A. Terpenoide aislado de la raíz de *Rubus parvifolius* (Zhang X. et. Al., 2016) B.C.D. Terpenoides aislados del genero *Rubus* y *Potentilla*(Cheng D. et. al., 2015). E.F.G.H. Terpenoides presentes en *Rubus innominatus* (Zhenzhong C. et. Al. 2015)

Se conoce que con el esqueleto del dammarano se encuentra las saponinas aisladas de la especie *Zizyphus jujuba*, con actividad sedante para los animales. Las actividades más comunes, atribuidas a las saponinas son: anti-inflamatoria y antiviral para casi todas los triterpenoides, reducen la tensión superficial, por el tipo de estructura que poseen, generan espumas resistentes por agitación en solución acuosa. Estimulan el sistema nervioso central, tienen acción antipirética, antitísica, previenen úlceras provocadas por estrés, aceleran la movilidad intestinal, promueven la síntesis del ARN. Alteran la permeabilidad de las membranas celulares, hemólisis (descomposición de los glóbulos rojos), esta última característica asociada a la actividad antibacteriana, que sugiere la formación de complejos con el colesterol presente en la membrana celular (Marcano y Hasegawa, 2002). Existen algunas estructuras del tipo terpenoides, con esqueletos similares al dammarano provenientes de otras especies del género *Rubus*, algunas de ellas se describen en la figura II.35.

En vista de lo descrito, podría atribuirse al compuesto D parte de la actividad observada del exudado glandular de *R. cf. adenotricos*, así como su relación con el insecto *H. stali* el cual utiliza el mismo en sus actividades biológicas de depredación y oviposición (Ávila-Núñez et al., 2016). Probablemente el compuesto D posee características protectoras ante infestaciones debido a su capacidad de producir hemolisis, desnaturalizando las células vivas, esto de gran utilidad para el insecto al momento de garantizar seguridad a sus huevos durante el cuidado maternal en los 16 días de incubación.

II.IV.3.- Mezcla L

El compuesto L proveniente de la fracción 11-12 fue purificado por cromatografía TLC preparativa empleando una mezcla de solventes en proporciones 7:3 de hexano y acetato de etilo respectivamente. Este compuesto presenta algunas bandas características en su espectro IR como lo son las bandas de tensión O-H, C-H, C=C y C-O; así como la banda de flexión fuera del plano para dobles enlaces H-C=C-H (ver Tabla II.16 y Figura II.36).

Este compuesto a diferencia de los anteriores se encuentra en forma de mezcla tal y como lo revela su espectro de RMN-¹³C (Banda Ancha y DEPT-135) (Figuras II.37 y II.38), en donde se puede observar un conjunto de señales de menor intensidad que claramente indican la presencia de un segundo compuesto con un comportamiento estructural semejante. A través del análisis de las señales más intensas (compuesto mayoritario) se pudo identificar 30 carbonos, los cuales se corresponden a 6 carbonos cuaternarios, 7 carbonos metínicos, 11 carbonos metilénicos y 6 carbonos metílicos (Tabla II.17). Así mismo se pudo constatar la presencia de 1 átomo de oxígeno unido a un metileno (C-8; 68,4 ppm), el cual debe tratarse de una función hidroxilada tal y como lo sugiere el espectro infrarrojo; siendo posible plantear la fórmula molecular de C₃₀H₄₈O que implica la presencia de 7 grados de insaturación; tres de los cuales se corresponden a la presencia de dobles enlaces como lo indica sus espectros de RMN; confirmando que el compuesto mayoritario de la mezcla en estudio se trata de un triterpeno tetracíclico.

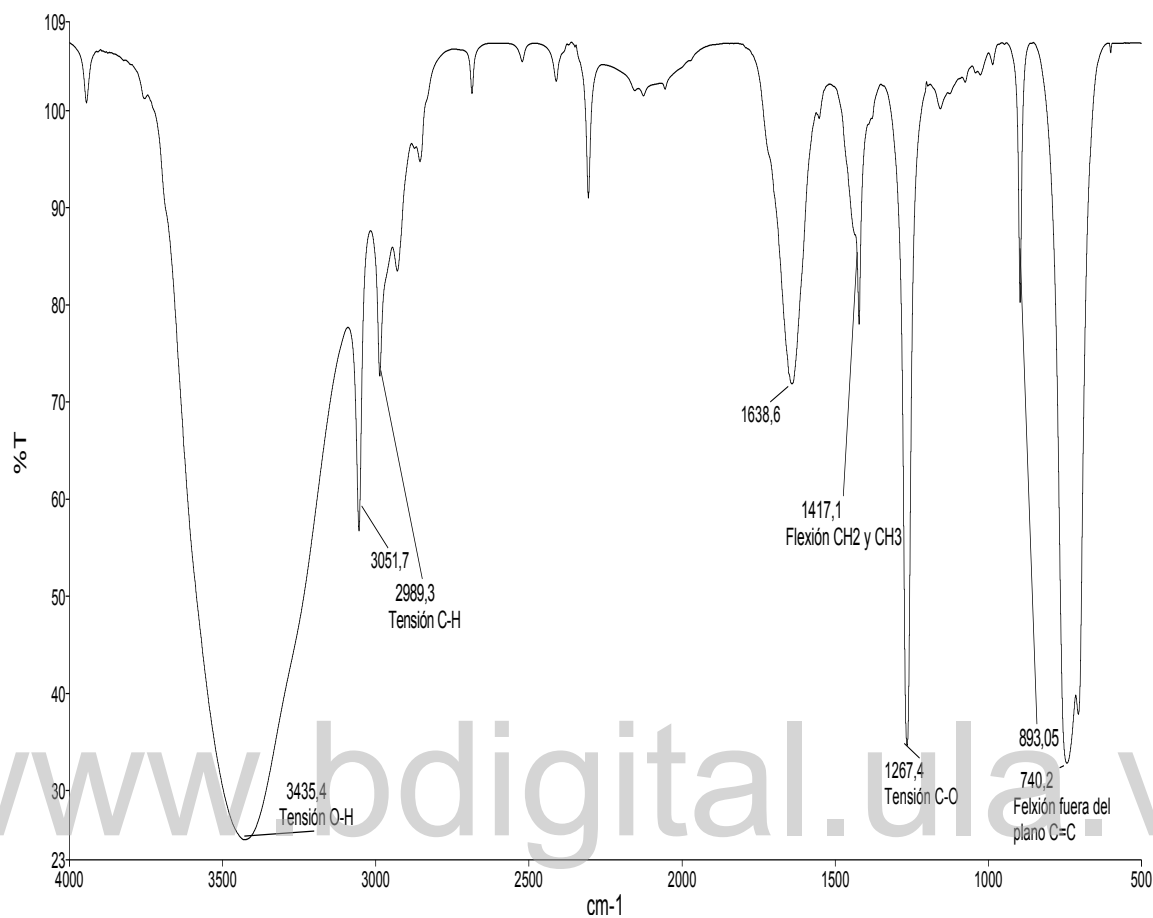
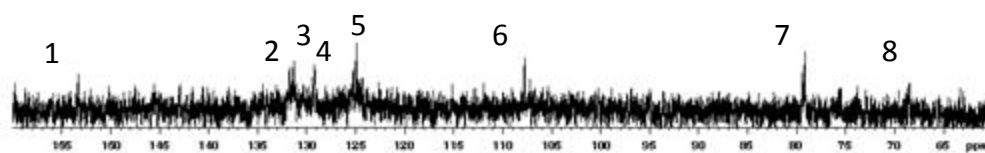


Figura II.36.- Espectro IR para el compuesto L.

Tabla II.16.- Bandas de los grupos funcionales presentes en el compuesto L:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3435.4	3051.7	1638.6	1417.1	1267.4	893.1-740.2
Grupo funcional	O-H	=C-H	C=C	Flexión CH ₂ y CH ₃	Tensión C-O	Flexión fuera del plano H-C=C-H



www.bdigital.ula.ve

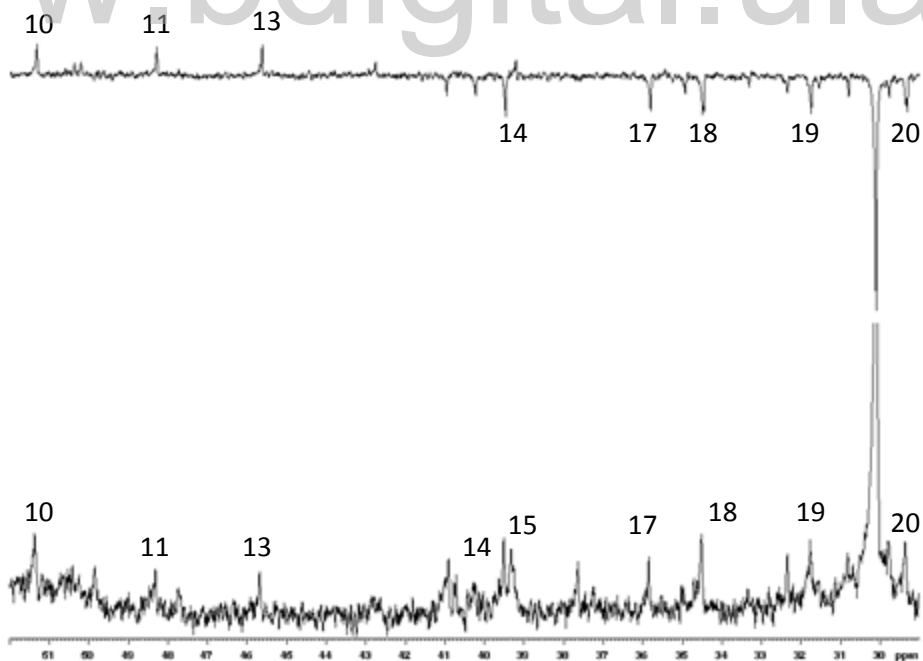


Figura II.37A.- Espectro RMN-¹³C y DEPT-135 para el compuesto L (CD₂Cl₂, 75 MHz).

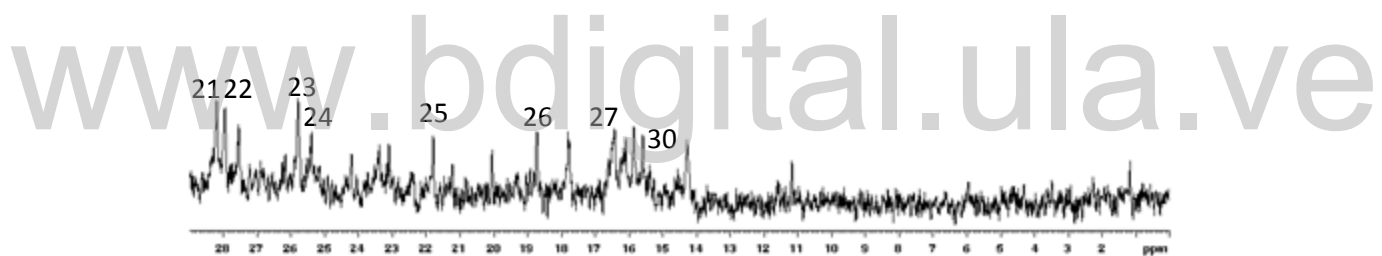
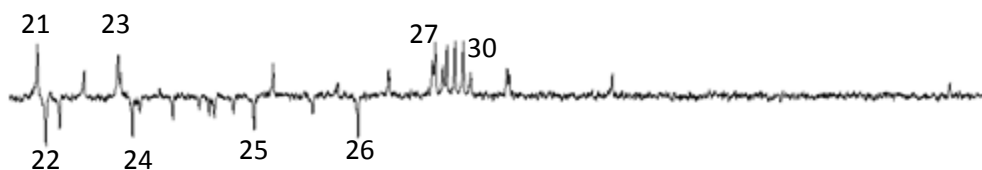


Figura II.38.- Espectro RMN- ^{13}C y DEPT-135 para el compuesto L (CD_2Cl_2 , 75 MHz).

El análisis del espectro RMN-¹H (Figura II.53), permite establecer la presencia de un doble enlace disustituído conformado por los metinos C-3 [($\delta_C = 131,3$ ppm) ($\delta_H = 7,5$ ppm)] y C-4 [($\delta_C = 129,2$ ppm) ($\delta_H = 7,7$ ppm)]; ya que sus señales se corresponden con dos dobletes de dobletes que se acoplan entre sí con una constante de 5,7 Hz, lo cual adicionalmente establece una disposición *Cis* entre ellos. Lo anteriormente expuesto también se confirma en el espectro COSY (Figura II.54) donde se puede apreciar la correlación entre ambos protones. Las otras dos olefinas se corresponden a un doble enlace trisustituído y a un doble enlace terminal como lo establece los singletes a 4,70 y 4,75 ppm que se deben a los protones geminales sobre el carbono metilénico C-6 (107,7 ppm).

www.bdigital.ula.ve

Tabla II.17.-Características de carbonos presentes en el compuesto L:

Señal	Desplazamiento (ppm)	Tipo de enlace
1	153,3	>C=
2	131,7	>C=
3	131,3	=C-H
4	129,2	=C-H
5	125,2	=C-H
6	107,7	=CH ₂
7	79,1	-CH
8	68,4	-CH ₂ -O
9	56,3	>C<
10	51,4	-CH
11	49,9	>C<
12	48,3	-CH
13	45,7	-CH
14	39,5	-CH ₂
15	39,3	>C<
16	37,6	>C<
17	35,8	-CH ₂
18	34,5	-CH ₂
19	31,8	-CH ₂

20	29,4	-CH ₂
21	28,2	-CH ₃
22	28,0	-CH ₂
23	25,8	-CH ₃
24	25,4	-CH ₂
25	21,8	-CH ₂
26	18,7	-CH ₂
27	16,4	-CH ₃
28	16,1	-CH ₃
29	15,9	-CH ₃
30	15,6	-CH ₃

Fórmula Molecular C₃₀H₄₈O₁

A través del espectro HSQC (Figura II.40 y II.41) fue posible diferenciar la mayoría de las señales en el espectro de RMN-¹H y asignarlas a sus correspondientes carbonos. Los desplazamientos de los protones más importantes se resumen en la tabla II.17.

www.bdigital.ula.ve

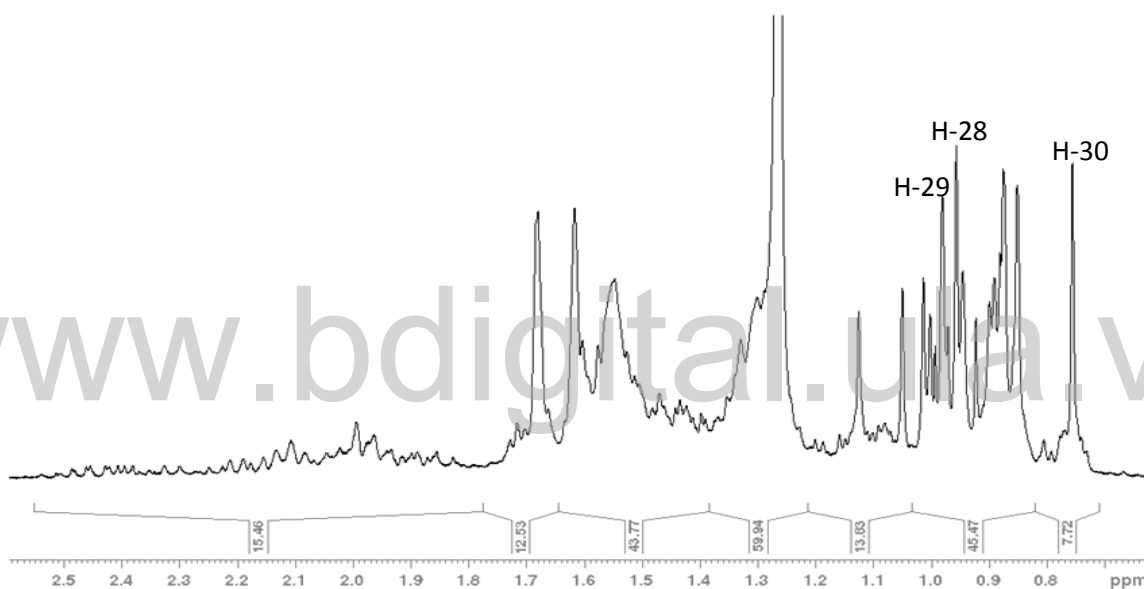
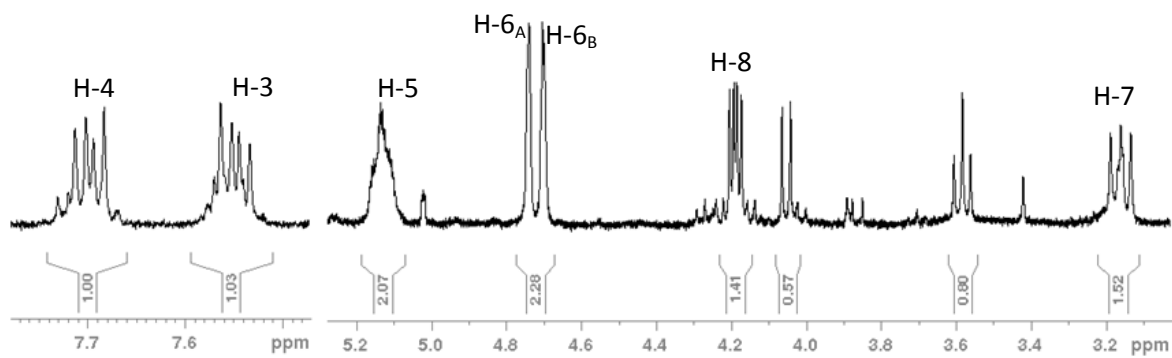


Figura II.40.- Espectro RMN-¹H del compuesto L (CD₂Cl₂, 300 MHz).

TABLA II.18.- Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN-¹H (CD₂Cl₂, 300 MHz) del Compuesto L.

H	H-3	H-4	H-5	H-6 _A	H-6 _B	H-7	H-8	H-28	H-29	H-30
δ (ppm)	7.55	7,70	5,10	4,65	4,65	3,20	4,20	0,95	1,00	0,75
M	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	5,7 y 3	5,7 y 3	-	-	-	0,05	0,05	-	-	-

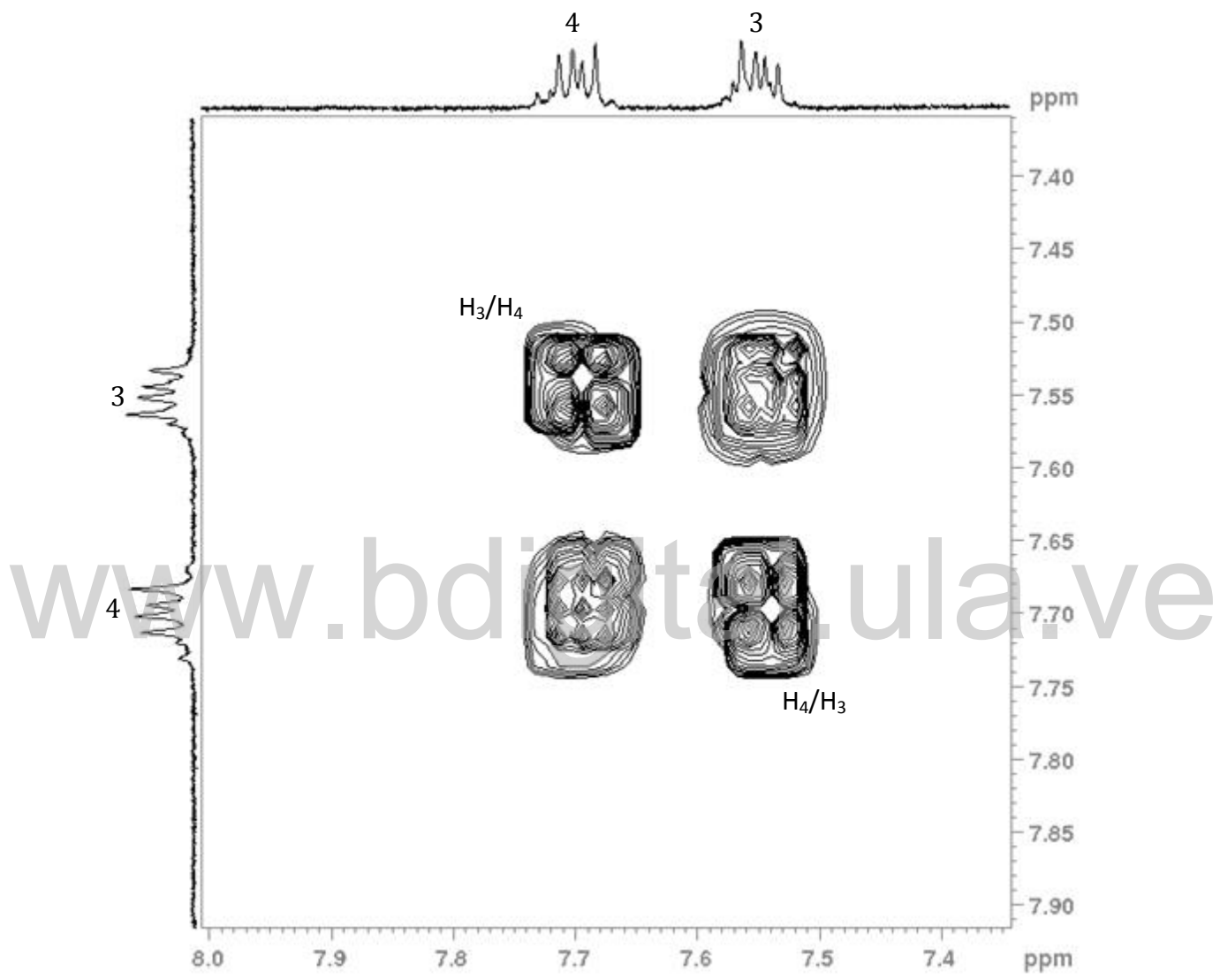


Figura II.41.- Espectro COSY del compuesto L (CD₂Cl₂, 300 MHz).

Es importante señalar que desde el punto de vista quimiotaxonómico el género *Rubus* y en particular la especie *Rubus adenotrichus*, se caracterizan por biosintetizar triterpenos de la serie del dammarano; un hecho que permite suponer que el compuesto mayoritario de la mezcla se trate de un triterpeno con un esqueleto de este tipo, en donde destacan la presencia de tres olefinas así como de un grupo hidroxilo, el cual debe encontrarse como sustituyente en uno de sus metilos angulares.

En base a lo anteriormente expuesto la estructura que se propone para el compuesto en estudio es se describe en la figura II.42.

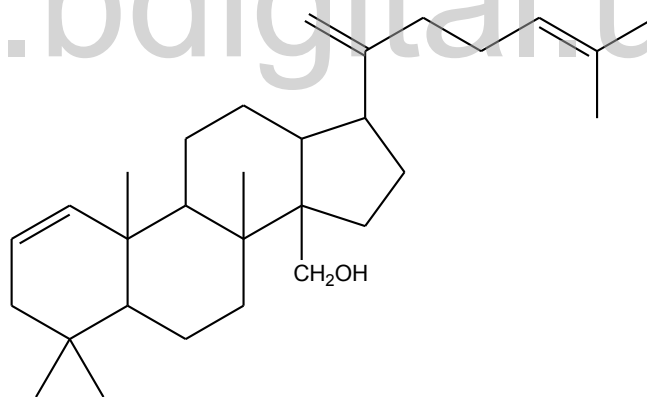


Figura II.42.- Estructura base correspondiente al compuesto L.

II.IV.4.- Mezcla J

La mezcla J proveniente de las fracciones 11-12, fue purificada por TLC preparativa empleando como mezcla de solventes Hx:AcOET en proporciones 8:2 respectivamente. Al igual que en los compuestos descritos anteriormente su espectro infrarrojo presenta bandas características de tensión -OH, C-H, C-O y flexión fuera del plano para H-C=C-H (ver Figura II.43 y Tabla II.19). Enlaces que posteriormente son confirmados con la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Su espectro RMN ¹³C (Figura II.44A y B), revela que al igual que en el caso anterior se trata una mezcla, pero en este caso de tres componentes, cuya complejidad junto a la ausencia de datos espectroscópicos adicionales (espectros de masas y HMBC) imposibilita la identificación de su constituyente mayoritario.

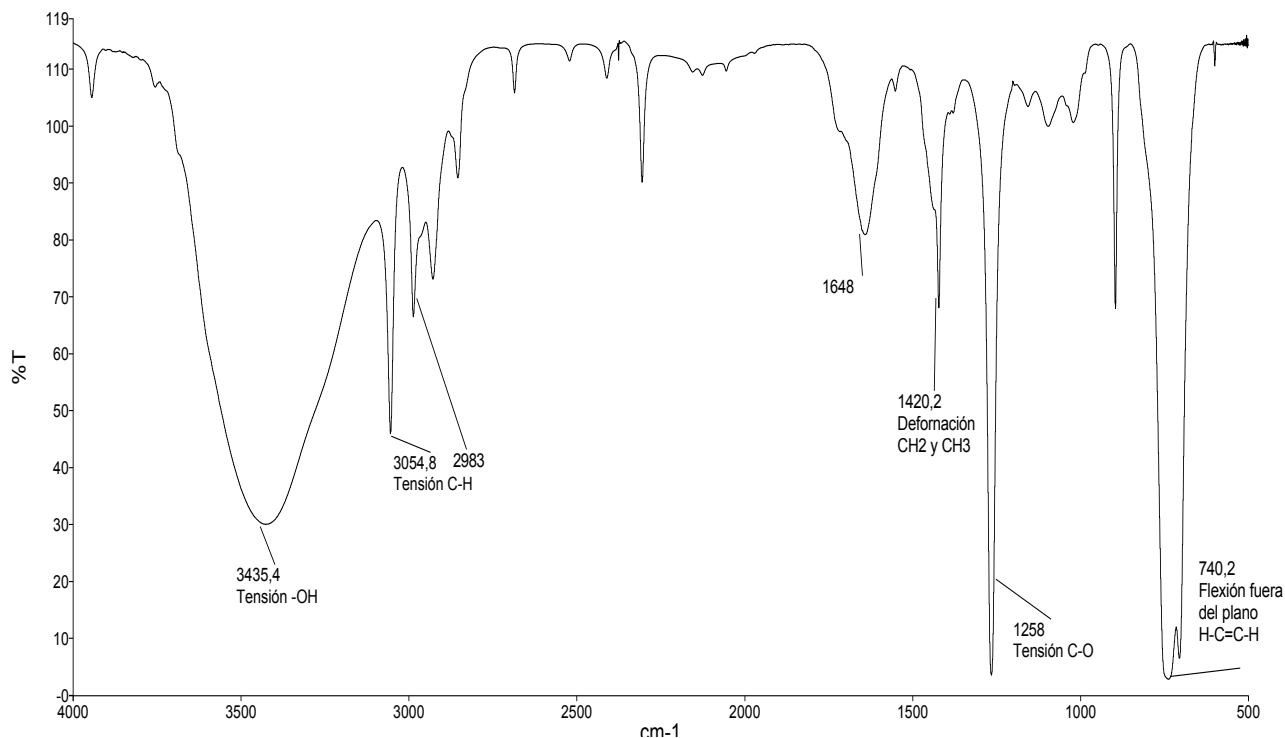


Figura II.43.- Espectro IR de la mezcla J

Tabla II.19.- Bandas características para la mezcla J:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3435.4	3054.8- 2983	1648	1420.2	1258	740.2
Grupo funcional	Tensión -OH	Tensión C-H	Tensión C=C	Deformación C-H en CH ₂ y -CH ₃	Tensión C-O banda ancha	Flexión fuera del plano H-C=C-H

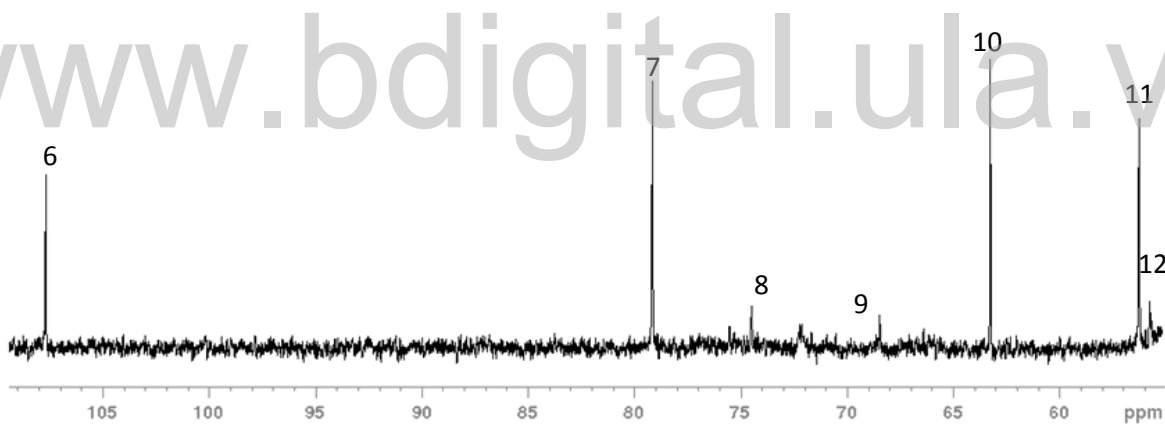
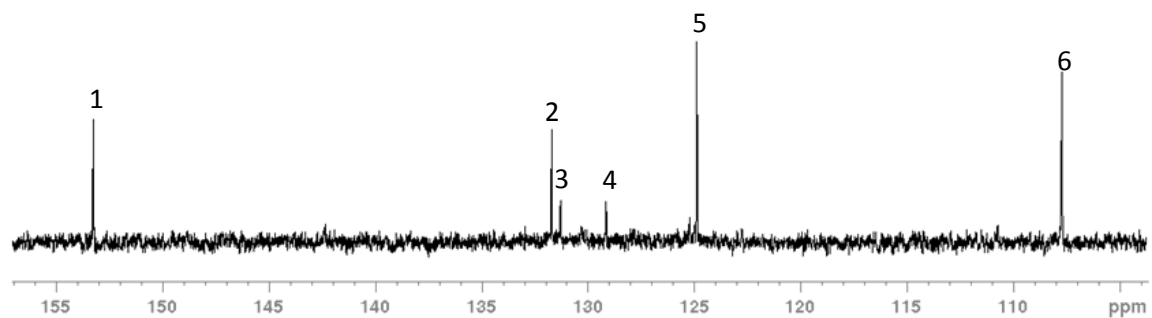
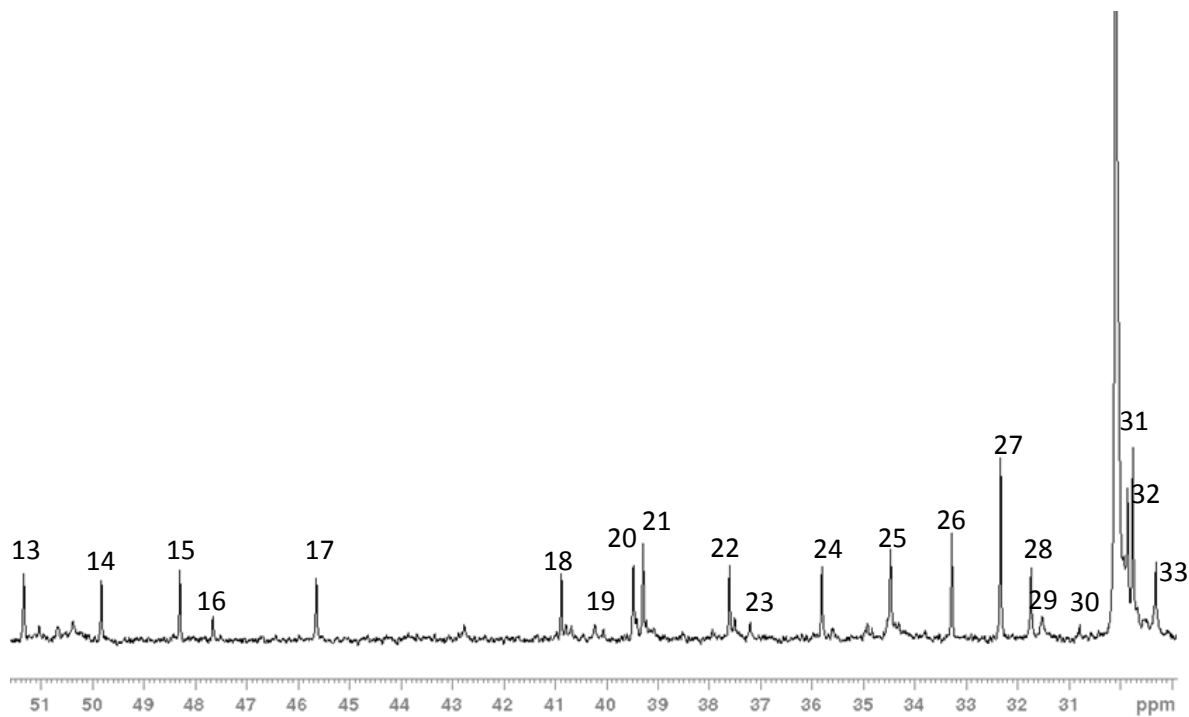


Figura II.44A.- Espectro RMN- ^{13}C para la mezcla J (CD_2Cl_2 , 75 MHz).



www.bdigital.ula.ve

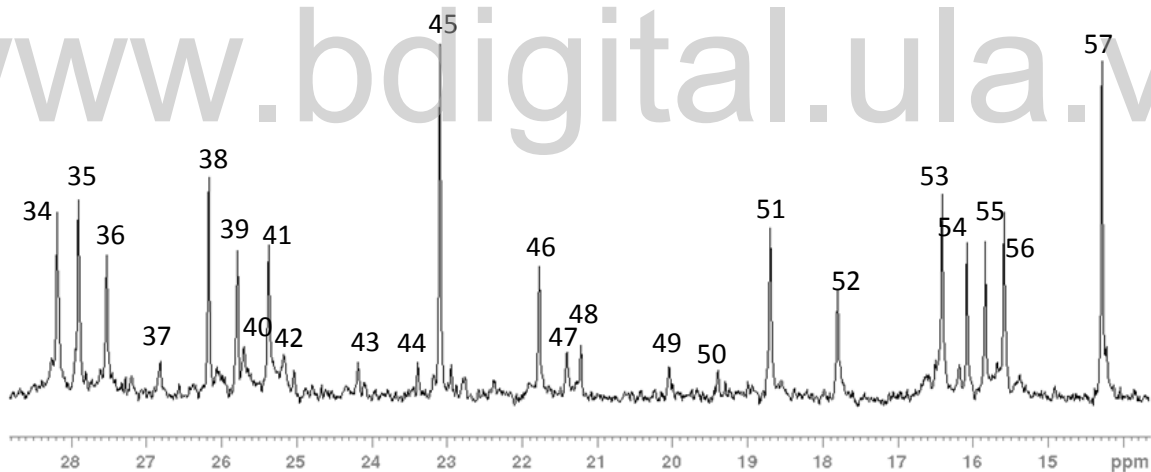


Figura II.44B.- Espectro RMN-¹³C para la mezcla J (CD₂Cl₂, 75 MHz).

II.IV.5.- Mezcla E

La mezcla E se aislo de la reunión E, específicamente de las fracciones de la 23-25 y fue purificada por TLC preparativa empleando una mezcla de solventes DCM:Hx en proporciones 8:2 (Tabla II.9), su espectro infrarrojo presenta bandas que revelan la presencia de un carbonilo cetónico, el cual adicionalmente es confirmado en el espectro de RMN-¹³C (Figuras II.48A y B), adicionalmente se observan bandas de tensión C-H y C-O; asi como bandas de flexión fuera del plano para alquenos (Tabla II.20 y Figura II.46). Al igual que en el caso anterior la complejidad de la mezcla no permitio determinar la estructura de sus componentes.

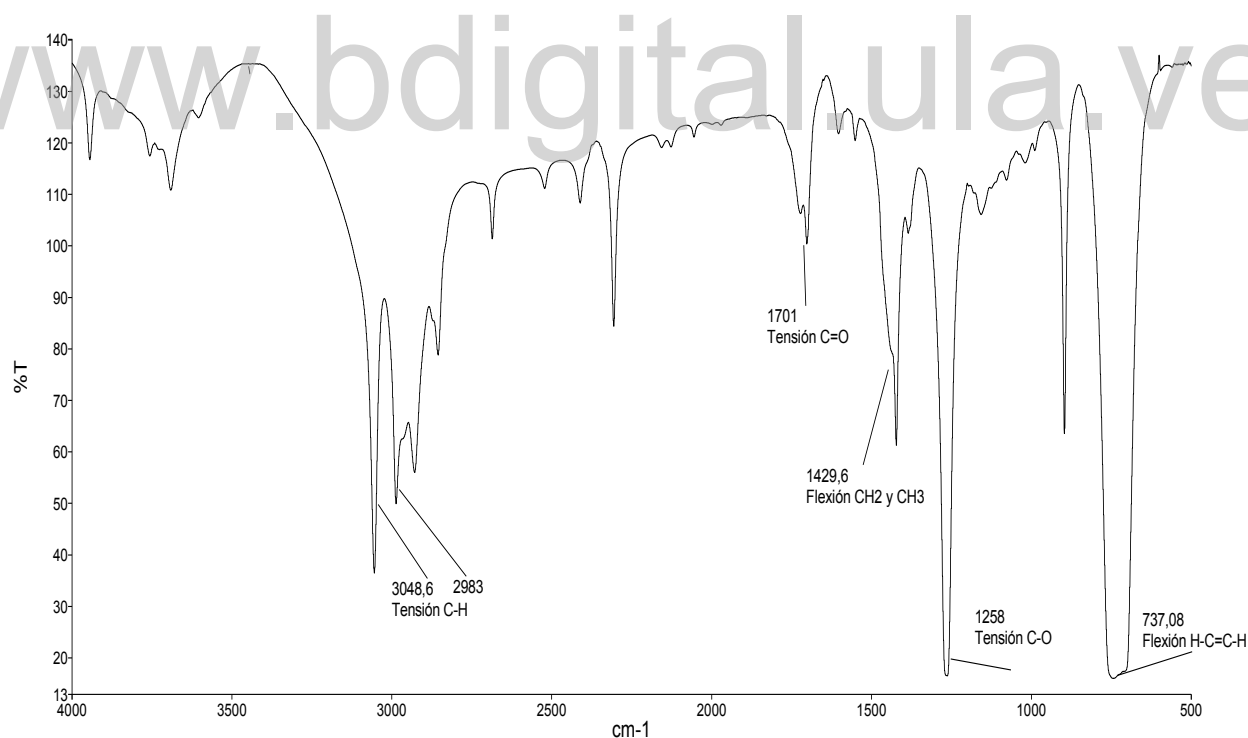


Figura II.46.- Espectro IR de la mezcla E.

Tabla II.20.- Bandas características de los grupos funcionales de la mezcla E:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3048.6-2983	1701	1429.6	1258	737.8
Grupo funcional	Tensión C-H	Tensión C=C	Deformación C-H en CH ₂ y -CH ₃	Tensión C-O banda ancha	Flexión fuera del plano H-C=C-H

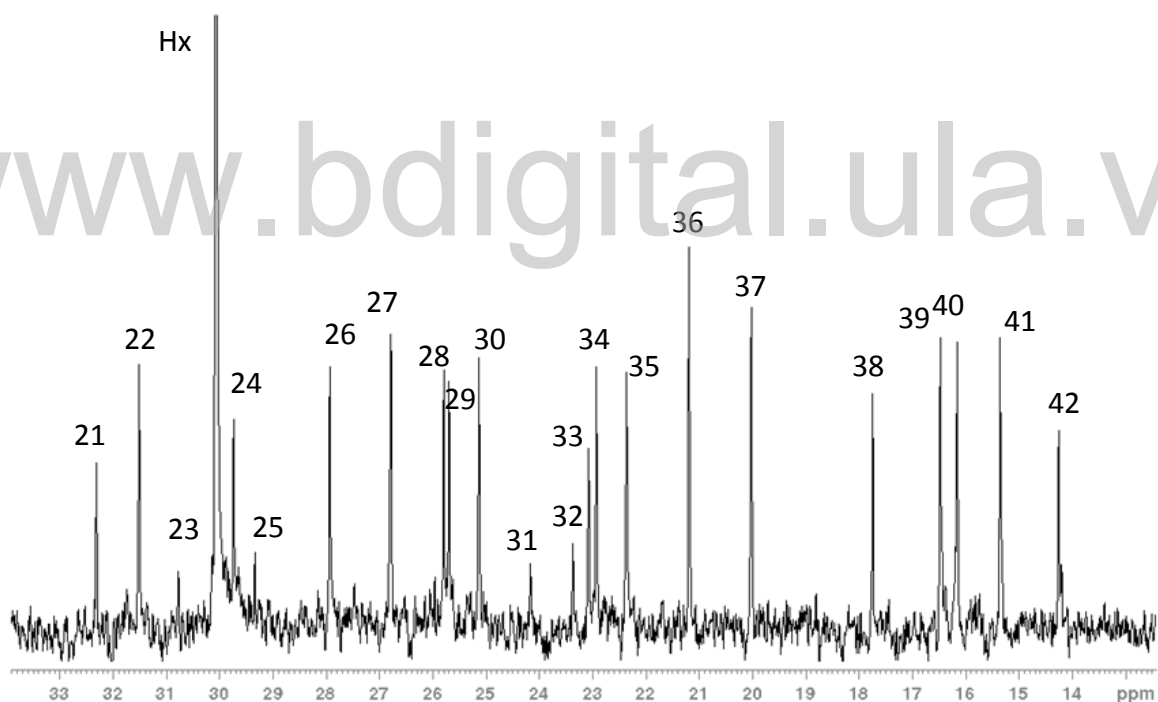


Figura II.47A.- Espectro RMN ¹³C para la mezcla E (CD₂Cl₂, 75 MHz).

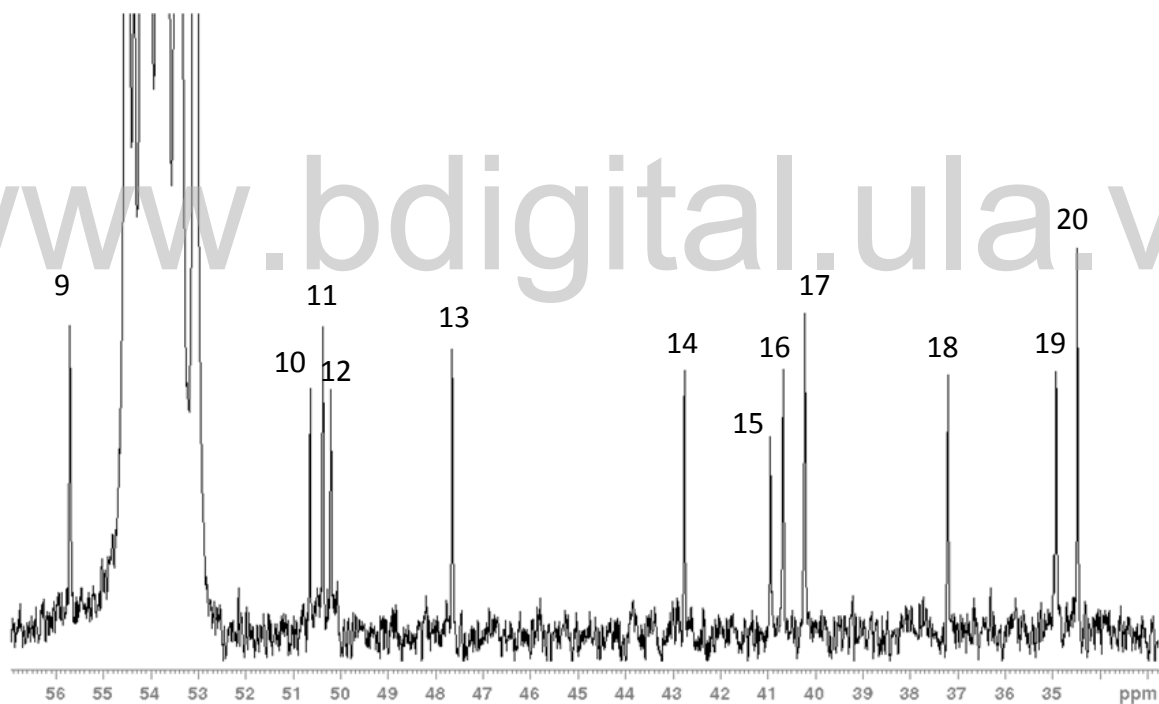
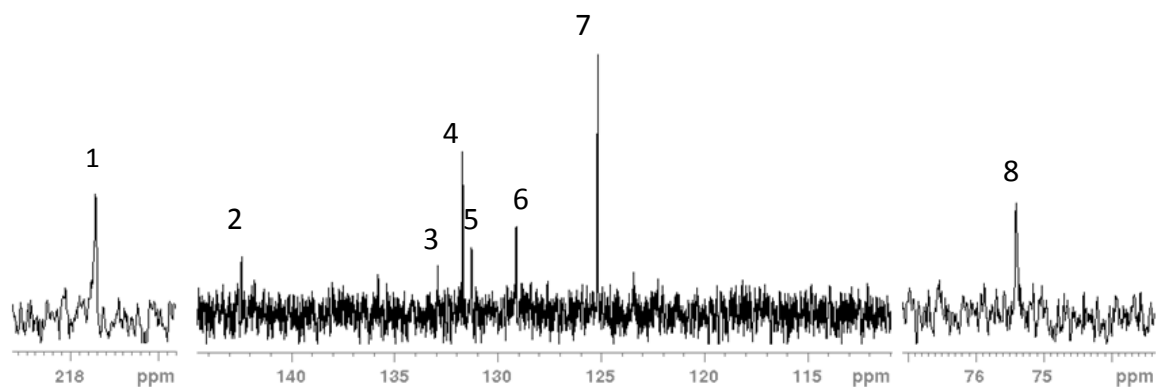


Figura II.47B.- Espectro RMN ¹³C para la mezcla E (CD₂Cl₂, 75 MHz).

II.IV.6.- Compuestos minoritarios

Para los compuestos minoritarios aislados **H, I, K, B** y **C** solo se les hizo espectroscopía IR debido a la escasa masa que se logró aislar, lo que dificulta aplicar otras técnicas como RMN (ver Tabla II.9). Sin embargo se pudo hacer una identificación de los grupos funcionales presentes para cada caso lo que se describe a continuación (ver Figuras II.49 – II.53 y Tablas II.21 –II.25).

Es importante destacar que para estos cinco compuestos el comportamiento en cromatografía de capa fina es menos limpio que para los compuestos mayoritarios, ya que dos de ellos se presentan con algún tipo de impureza, por ello se les llama mezclas.

En todos los casos la presencia de bandas características de los grupos funcionales es similar, asociada a los compuestos de tipo flavonoides, terpenoides, entre otros. Debido a que no se posee más información asociada a los compuestos minoritarios solo se presentaran sus espectros IR y la descripción de los grupos funcionales presentes.

II.IV.6.1- Mezcla B

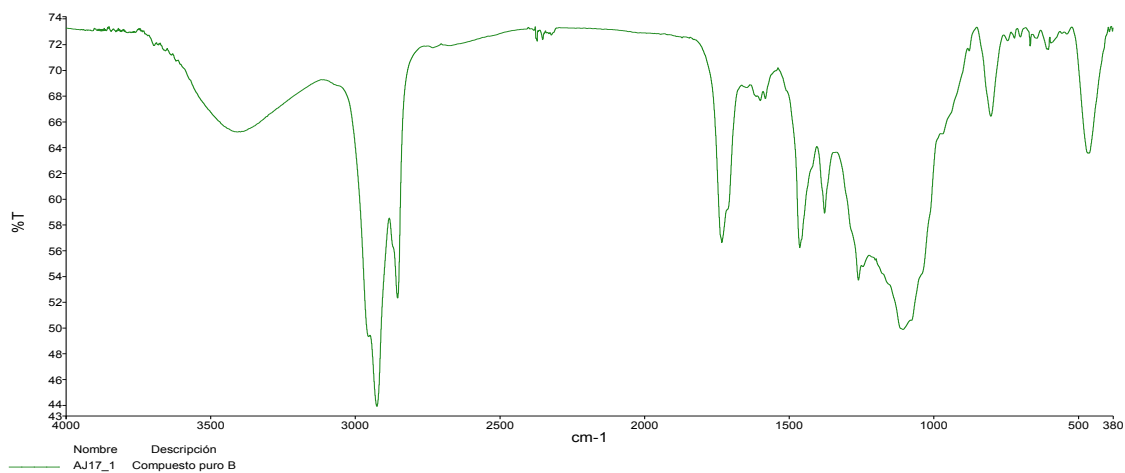


Figura I.49.- Espectro IR de la mezcla **B** aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v.

www.bdigital.ula.ve

Tabla II.21.- Mezcla **B** bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3407,51	2929,61 2855,55	1722,39	1460,99 1376,12 1262,33	1046,21	753,28
Grupo funcional	O-H	C-H	C=O	-CH ₃	C-O	Flexiones fuera del plano aromáticos

II.IV.6.2- Mezcla K

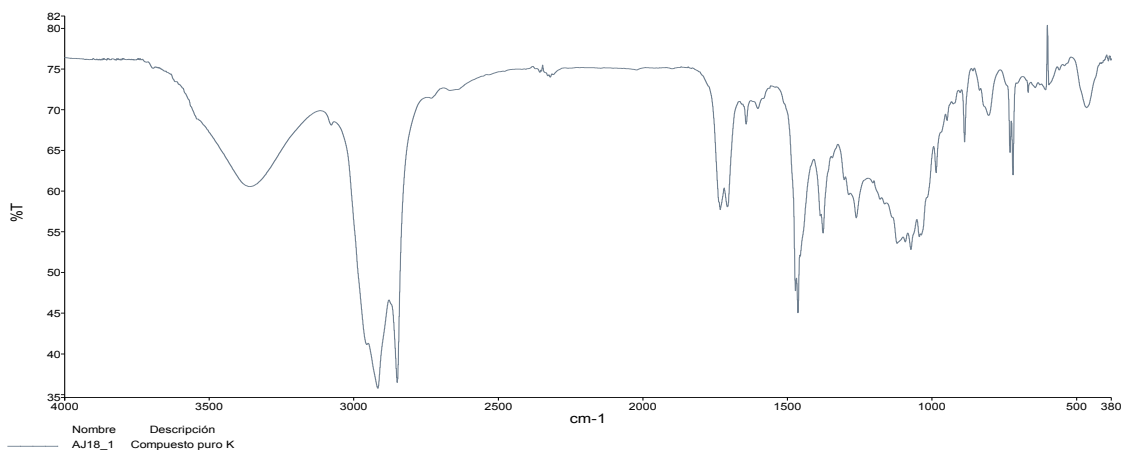


Figura I.50.- Espectro IR de la mezcla **K** aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v.

Tabla II.22.- Mezcla **K** bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3364,49	2917,49 2849,49	1732,61 1707,91	1472,39 1463,52	1376,76 1261,85 1072,86- 1043,95	881,07-719,71
Grupo funcional	O-H	C-H	C=O	-CH ₃	C-O	Flexiones fuera del plano aromáticos

II.IV.6.3- Mezcla H

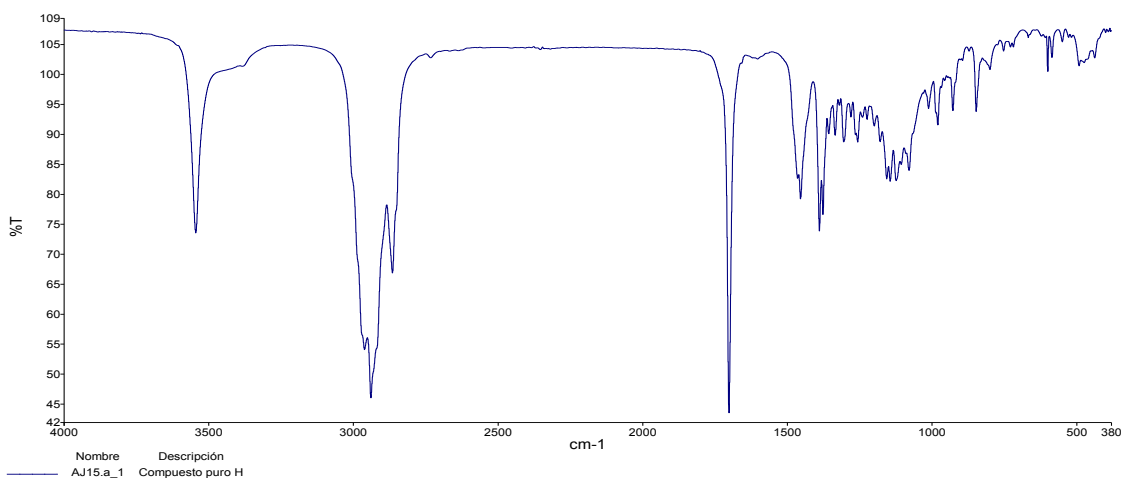


Figura I.51.- Espectro IR del compuesto puro **H** aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v.

www.bdigital.ula.ve

Tabla I.23.- Mezcla **H** bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3545,24	2961,86 2939,91 2865,25	1701,96	1454,60- 1256,99	1155,60- 1079,46	847,25- 799,77
Grupo funcional	O-H	C-H	C=O	-CH ₃	C-O	Flexiones fuera del plano aromáticos

II.IV.6.4- Mezcla I

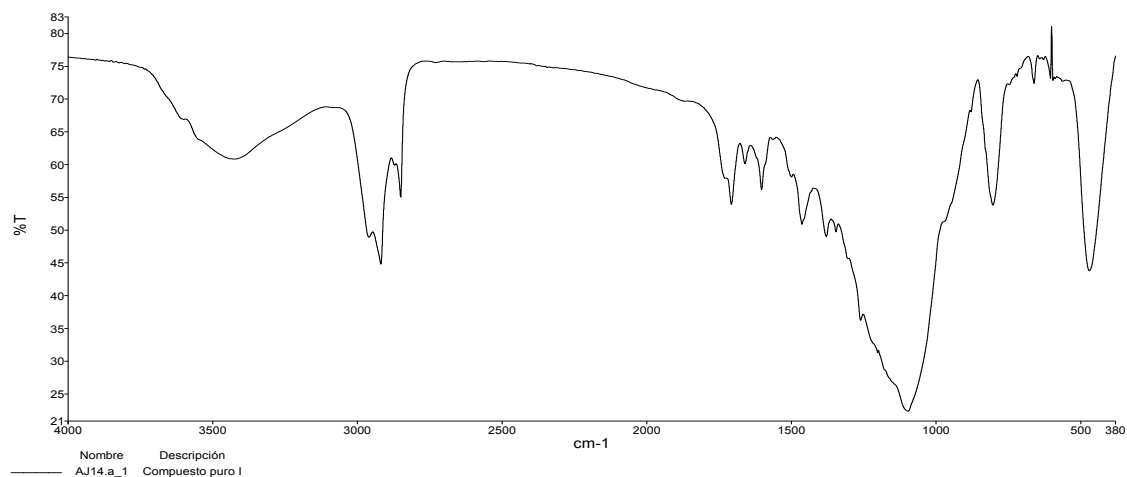


Figura I.52.- Espectro IR de la mezcla I aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v.

www.bdigital.ula.ve

Tabla I.24.- Mezcla I bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3426,97	2919,21 2850,80	1707,64 1661,56 1602,05	1463,70- 1346,05	1260,94- 1095,79	803,70 661,02
Grupo funcional	O-H	C-H	C=O	-CH ₃	C-O	Flexiones fuera del plano aromáticos

II.IV.6.- Mezcla C

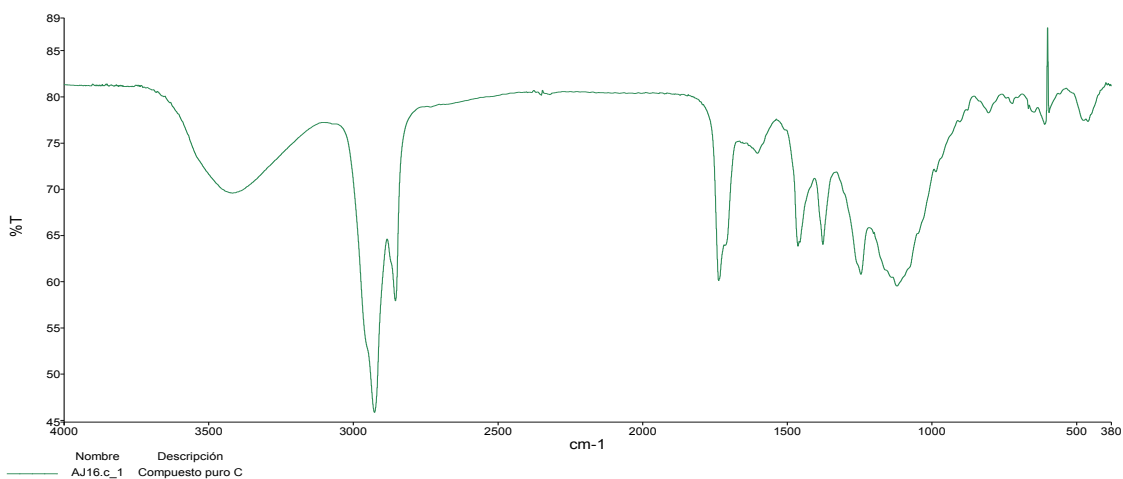


Figura I.53.- Espectro IR de la mezcla **C** aislada de la segunda columna flash y purificada por preparativa en condiciones Hx:AcOET 3:7 v/v.

www.bdigital.ula.ve

Tabla I.25.- Mezcla **C** bandas características de los grupos funcionales presentes:

Longitud de onda (cm⁻¹)	3428,32	2927,26 2854,88	1767,63	1463,11 1437,04	1245,52 1120,23	804,31-610,69
Grupo funcional	O-H	C-H	C=O	-CH ₃	C-O	Flexiones fuera del plano aromáticos

II.V.- REFERENCIAS

Acosta O.; Vaillant F.; Cozzano S.; Mertz C.; Pérez A. y Castro M. (2010). **Phenolic content of antioxidant capacity of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos Schultdl.*) during three edible maturity stages.** Food Chemistry 119: 1497-1501.

Agrawal A. (2011) **Current trends in the evolutionary ecology of plant defence.** Functional Ecology, 25, 420–432.

Akula, R. y Ravishankar, G. (2011). **Influence of abiotic stress signals on secondary**

Al-Attas A., El-Shaer N., Mohamed G., Ibrahim S. y Esmat A. (2015) **Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Costus speciosus* rhizomes.** Journal of Ethnopharmacology. 176: 365-374.

Alnsour M. y Ludwig J. (2015) **Potential effects of climate change on plant primary and secondary metabolism and its influence on plant ecological interactions.** Journal of Endocytobiosis and Cell Research 90-99.

Alonso M.; Otero L. ; Péfaur J.; La Marca E.; Duran P.; Arellano E. y Segnini S. (1992). **La Biodiversidad Neotropical y la Amenaza de las Extinciones.** Cuadernos de Química Ecológica. Meritec Mérida-Venezuela 119-156.

Anderson L. (1954). **Hoyer's Solution as a rapid mounting medium for bryophytes.** Bryologist 57, 242-244.

Antonious G. (2011). **Production and quantification of methyl ketones in wild tomato accessions.** *Journal Environmental Science and Health* 36(6):835-848.

Ávalos A. y Perez E. (2009). **Metabolismo Secundario de Plantas.** Reeducación (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2: 119-145.

Avila J.; Naya M.; Otero L. y Alonso M. (2015). **A resin bug (Reduviidae: Harpactorinae: Apiomerini) harvesting the trichome secretion from an Andean blackberry.** *Neotropical Biodiversity*, *en prensa*.

Avila J.; Naya M.; Otero L. y Alonso M. (2016). **Sticky trap predation in the neotropical resin bug *Heniartes stali* (Wygodzinsky) (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae).** *Journal of Ethology*, *en revision*.

Azofeifa G.; Quesada S.; Bourdard F.; Morena M.; Cristol J.; Pérez A. y Vaillant F. (2013). **Antioxidant and Anti-inflammatory in Vitro Activities of Phenolic Compounds from Tropical Highland Blackberry (*Rubus adenotrichos*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5798–5804.

Benítez C. y Rodríguez P. (2013). **Variación morfológica de tricomas foliares en 17 especies de *Solanum* L. sudamericanas.** *Pittieria* 37: 29-39.

Bennett, R. y Wallsgrove, R. (1994). **Secondary metabolites in plant defense mechanisms.** *New Phytologist* 127(4): 617-633.

Bolton M. (2009). **Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(5): 487–497.

Bourgaud F.; Gravot A.; Milesi S.; Gontier E. (2001). **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective**. *Plant Science* 161(5): 839-851.

Calvo L.; Syed D.; Chamcheu J.; Vilela F.; Pérez A.; Vaillant F. y Rojas M. (2013). **Protective Effect of Tropical Highland Blackberry Juice (*Rubus adenotrichos* Schlttdl.) Against UVB-Mediated Damage in Human Epidermal Keratinocytes and in a Reconstituted Skin Equivalent Model**. *Photochemistry and Photobiology* 89(5): 1199-1207.

Carretero M. (2000). **Plantas Medicinales. Compuestos Fenólicos: Taninos**. *Panorama Actual Medico* 24 (235): 633-636.

Charlwood B. y Charlwood K. (1989) **Monoterpenoids Capítulo 2 en:** Dey P. y Harborne J. *Methodos in Plant Biochemistry Terpenoids*. 7:43-99.

Cheng D., Xiao-Jie G. y Pei Gen X. (2015) 10 – *Potentilla and Rubus* medicinal plants: potential non-*Camellia* tea resources. *Chemistry, Biology and Omics*. 373-430.

Choe D. y Rust M. (2007). **Use of Plan Resin by Bee Assassin Bug, *Apiomerus flaviventris* (Hemiptera: Reduviidae)**. *Annals of the Entomological Society of America* 100(2): 320-326.

Christopherson R. (1997). **Geosystems: An Introduction to Physical Geography**. 3rd. Upper Saddle River. NJ USA: Prentice Hall Inc., ISBN 0-13-505314-5.

Cury T. y Pádua S. (2014). **Morphology and ontogeny of tannin-producing structures in two tropical legume trees**. *Botany* 92(7): 513-521.

Czégény,Z. ; Bozi, J.; Sebestyén, Z.; BlazsóM.; Jakab, E.; Barta-Rajnai, E.; Forster, M.; Nicol, J.; McAdamb, K.; Liu, C. (2016). **Thermal behaviour of selected flavour ingredients and additives under simulated cigarette combustion and tobacco heating conditions.** Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 121: 190–204.

Duke S. (2009). **Glandular Trichomes-A Focal Point of Chemical and Structural Interactions.** International Journal of Plant Sciences 155(6):617-618

Einsner Th. ; Eisner M. y Seigler M. (2005). **Secret weapons: Defenses of insect, apiders, scorpions and other legged creatures.** Harvad University Press, Cambridge, MA. En Capitulo 23 Class INSECTA, Orden HEMIPTERA, Family Reduviidae, *Apiomerus flaviventris* 108-112.

Ekanayaka E. ; Li C. y Jones A. (2014) **Sesquiterpenoid glycosides from glandular trichomes of the wild tomato relative *Solanum habrochaites*.** Phytochemistry 98, 223-231.

Estévez-Braun A. y Compagnone R. 2008. **Determinación Estructural de Sesquiterpenos. En: Manual de Determinación Estructural de Compuestos Naturales.** Editores: Arturo San Feliciano, Alice L. Pérez y Esther del Olmo. CYTED, Bogotá Vol. 1:368-375.

Fanh A. y Shimony C. (1996). **Glandular trichomes of *Fagonia L.* (Zygophyllaceae) species: structure, development and secreted materials.** Annals of Botany 77: 25–34.

Fenton A.; Speed M.; Jones M.; Ruxton G.; Brockhurst M. (2015). **Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants**. *New Phytology* 208(4):1251-1263.

Fox E. y Howlett B. (2008). **Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology**. *Current Opinion in Microbiology* 11:481-487.

Ghosh M. (1998) **Fundamentals of Experimental Pharmacology**, 2nd Edn., Scientific Book Agency, Calcutta, 174-179.

Ghosh B. ; Westbrook T. ; Jones A. (2013). **Comparative structural profiling of trichome specialized metabolites in tomato (*Solanum lycopersicum*) and *S. habrochaites*: acylsugar profiles revealed by UHPLC/MS and NMR**. *Metabolomics* 406: 171-182.

Glas J. Schimmel B. Alba J. Escobar R. Schurink R. y Kant M. (2012). **Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores**. *International Journal of Molecular Sciences* 13(12): 17077-17103.

Gross G. (1989) **Hidrolysable Tannins**. Capítulo 2 en: Dey P. y Harborne J. *Methodos in Plant Biochemistry . Enzymes of Secondary Metabolism*. 9: 25-99.

Hartmann T. (2007). **"From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism."** *Phytochemistry* 68(22-24): 2831-2846.

Hudzicki J. (2009) **Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol**. American Society for Microbiology; Washington, DC: Dec 8, Disponible en:

[http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol\(22/09/16\).](http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol(22/09/16).)

Ibrahim R. y Barron D. (1989). **Phenylpropanoids**. Capítulo 3 en: Dey P. y Harborne J. *Methodos in Plant Biochemistry . Plant Phenolics*. 1:76-111.

Jeongwoon K.; Matsuba Y.; Ning J.; Schillmiller A.; Hammar D. ; Jones A. ; Picherskyn E. y Last R. (2014). **Analysis of Natural and Induced Variation in Tomato Glandular Trichome Flavonoids Identifies a Gene Not Present in the Reference Genome**. *The Plant Cell*, 26: 3272–3285.

Kähkönen M.; Hopia A.; Rauha J.; Pihlaja K.; Kujala T. y Heinonen M. (1999). **Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds**. *Journal Agriculture Chemistry* 47, 3954-3962.

Kant M.; Jonckheere W. ; Knecht B. ; Lemos F. ; Liu J. ; Schimmel B. ; Villarroel C. ; Ataíde L. ; Dermauw W. y Glas J. y Bot A. (2015). **Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities**. *Annals of Botany* 115(7):1015-1051.

Karowe D. y Grubb C. (2011). **Elevated CO₂ increases constitutive phenolics and trichomes, but decreases inducibility of phenolics in Brassica rapa (Brassicaceae)**. *Journal Chemistry Ecological* 37(12): 1332-1340.

Keasling J.; Dae K.; Paradise E.; Ouellet M.; Fisher K.; Newman K.; Ndungu J. ; Ho K.; Eachus R.; Ham T.; Kirby J.; Chang M.; Withers S.; Shiba Y. y Sarpong R. (2006). **Production of the Antimalarial Drug Precursor Artemisinic Acid in Engineered Yeast**. *Nature*, 440, 940-943.

Lange M. y Turner G. (2013). **Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities**. Plant Biotechnology Journal 11, 2–22.

Lapkin A.; Plucinski P. y Cutler M. (2006). **Reviews Comparative Assessment of Technologies for Extraction of Artemisinin** Journal of Natural Products. 69(11), 1653-1664.

Leonhardt S.; Schmitt T. y Bluthgen N. (2011) **Tree Resin Composition, Collection Behavior and Selective Filters Shape Chemical Profiles of Tropical Bees (Apidae: Meliponini)**. Journal PLoS ONE. 6(8): e23445.

Li S.; Yuan W.; Yang P.; Antoun M.; Balick M.; Cragg G. (2010) **Pharmaceutical Crops: An Overview**. Pharmaceutical Crops, 1, 1-17.

Martínez N.; Arévalo K.; Verde M.; Rivas C.; Oranday A.; Nuñez M. y Morales M. (2011). **Antocianinas y Actividad anti radicales libres de Rubus adenotrichos Schltdl (zarzamora)**. Revista Mexicana de Ciencias FARMACÉUTIC 42(4): 66-71.

Mazid M.; Khan T. y Mohammad F. (2011) **Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants**. Biology and Medicine, 3 (2): 232-249.

metabolites in plants Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, Plant Signaling & Behavior. 6: 1720-1731.

Mora S. (2011). **Biodiversidad y algunos aspectos de distribución biogeográfica de Rubus sp en el estado Táchira-Venezuela**. Trabajo especial de grado. Universidad Nacional Experimental del Táchira. Venezuela. Capitulo V. 1-18.

Oliveros A., Rodríguez D., Calcagno M. (2011). **Estandarización de un bioensayo para la búsqueda de compuestos fitotóxicos en extractos vegetales.** CIENCIA 19(3), 187 – 202.

Peiffer M.; Tooker J.; Luthe D. y Felton G. (2009) **Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores**. New Phytologist 184: 644–656.

Perico L. (2011). **Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum*(Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad.** Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Bogotá-Colombia. pag. 28.

Peter J. y Shanower T. (1998). **Plant Glandular Trichomes. Chemical Factories with Many Potential Uses.** Resonance 3(3): 41-45.

Rejeb I.; Pastor V. y Mauch B. (2011). **Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms.** Plants 3, 458-475.

Schoonhoven L.; Loon J. y Dicke M. (2005). **Insect-Plant Biology.** Oxford University Press. 169-173.

Southwell I. (2007). **BIOGENETICALLY SIGNIFICANT SESQUITERPENOIDS FROM *Rubus rosifolius* oil.** Museum of Applied Arts and Sciences, Sydney, N.S.W. Australia.

Sumere V. (1989). **Phenols and Phenols acids.** Capítulo 2 en: Dey P. y Harborne J. Methodos in Plant Biochemistry. Plant Phenolics. Volumen 1, 29-73.

Tattini M. Gravano E. Pinelli P. Mulinacci N. y Romani A. (2000). **Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation.** Research New Phytologist 148: 69-77.

Tissier A. (2012) **A Glandular Trichomes: What come after expressed sequence tags?** The Plant Journal, Oxford 70, 51-68.

Wagner G. (1991). **Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs.** Plant Physiology 96, 675-679.

Wang G. ; Tian L.; Aziz N.; Broun P.; Dai X.; He J.; King A.; Zhao P. y Dixon R. (2008). **Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop.** Plant Physiology 148(3): 1254-1266.

Wink M. (2003) **Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective.** Phytochemistry 64(1): 3-19.

Zhenzhong C., Tong L., Feng Y., Wu J., Zhao X., Ruan H., Pi H. y Zhanga P. (2015) **Ursane-type nortriterpenes with a five-membered A-ring from *Rubus innominatus*.** Phytochemistry.

II.VI.-GLOSARIO II

Angiospermas: plantas que tienen flores y producen fruto con semillas.

Alelopatía: es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos.

Bioensayo: técnica de valoración biológica basada en el crecimiento de un organismo.

Biomasa radicular: cantidad de materia acumulada en las raíces de una planta.

Biomasa: cantidad de materia acumulada en un individuo, población o ecosistema.

Dicotiledóneas: son una clase de plantas fanerógamas angiospermas, cuyos embriones de las semillas presentan dos cotiledones u hojitas iniciales, opuestos comúnmente.

Fanerógamas: división del reino vegetal formado por todas las plantas con flores y semillas cuyo aparato vegetativo posee raíz, tallo y hojas verdaderas.

Fitotoxicidad: efecto tóxico sobre otro ser vivo a causa de alguna sustancia producida por otra especie de origen vegetal.

Maleza anual: especies de planta de fácil crecimiento cuyo ciclo de vida transcurre en un año, es decir crecen florecen y sucumben en periodos de anualidad.

Maleza perenne: especies de planta de fácil crecimiento cuyo ciclo de vida es mayor a dos años.

Monocotiledóneas: son un grupo de angiospermas que posee un solo cotiledón en su embrión en lugar del número ancestral de 2 como fue retenido en las dicotiledóneas.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo III.- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXUDADO GLANDULAR de *R. cf. adenotrichos*

III.1.-Hongos

Los hongos (del latín *fungus*), son organismos eucarióticos, heterotróficos y quimiotróficos, de vida libre, habitan naturalmente en agua, suelos y restos orgánicos en descomposición. En la naturaleza, existen unas 100.000 especies de hongos, de las cuales unas 200 son potencialmente patógenas para el hombre y los animales sobre los cuales muy pocas tienen un poder patógeno primario (García, 2014). Su ADN, organizado en cromosomas, se encuentra envuelto en la membrana nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, posee una membrana limitante citoplasmática rica en ergosterol, un esteroide considerado una provitamina, especialmente involucrado en la síntesis de la vitamina D. Recubriendo la misma se encuentra una pared rígida, de estructura polisacárida compleja, compuesta por quitina, mananos y glucanos, que protege la lisis osmótica y regula el paso de moléculas hacia o desde el citoplasma. El metabolismo de los hongos es tipo heterótrofo (ausencia de clorofila) absorptivo, es decir, obtienen energía de carbono absorbiendo nutrientes de materia orgánica que descomponen mediante la producción de exoenzimas. Se reproducen por medios asexuales (división binaria o producción de esporas asexuales) o sexualmente a través de esporas sexuales (Prats, 2006). Las esporas de los hongos patógenos para el ser humano no tienen motilidad y se diseminan por el viento, el agua o por contacto (Mandell, 2011).

Los hongos pueden ser unicelulares, formados por células aisladas redondas u ovaladas denominadas levaduras; o pluricelulares, constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, los cuales se tabican de forma compleja en filamentos llamados hifas que normalmente vuelven a ramificarse (Figura III.2) (Prats, 2006). De éstos últimos se dará más detalles a continuación, puesto que serán los hongos usados en los estudios aquí desarrollados.

III.1.a.-Hongos filamentosos: Son pluricelulares y forman filamentos con medidas entre 3-15 μ m de ancho y largo variable, crecen tabicándose en células que no se desprenden y van ramificándose hasta formar un conjunto entrelazado de hifas denominado micelio. Estos pueden clasificarse en superiores o inferiores. Los superiores tienen hifas de células delgadas con medidas de 2-5 μ m y las células que forman están separadas entre sí por tabiques formando espacios denominados poros, los cuales permiten el intercambio citoplasmático en células contiguas; y forman esporas. Los hongos filamentosos inferiores, por el contrario, poseen hifas de 10-15 μ m y no están tabicadas por lo que las células forman conjunto coenocítico con múltiples núcleos y un único citoplasma (Figura III.3). Cuando los hongos filamentosos crecen en un medio de cultivo sólido, una parte del micelio penetra el sustrato para absorber nutrientes y la otra se proyecta externamente formando estructuras de apariencia tenaz, algodonosa y pulverulenta (Prats, 2006).

Los hongos filamentosos superiores e inferiores se subdividen en:

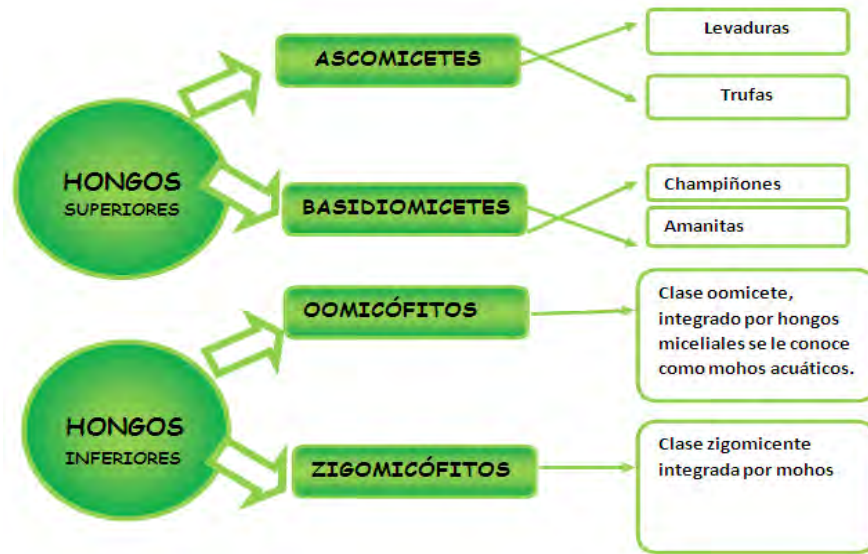


Figura III.1.-Clasificación de los hongos. Tomado de http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/11/tipos-de-hongos_25.html/20/11/16.

III.1.a.1.-Ascomicetos: el grupo más numeroso con unas 30.000 especies. Son hongos saprófitos que pueden vivir en numerosos sustratos, incluso bajo la tierra. Se incluyen los hongos parásitos y son de gran importancia económica ya que se usan en la fermentación de pan, vino, cerveza y otros comestibles como las trufas y colmenillas.

Se caracterizan por:

- Poseen un micelio con hifas septadas.
- Poseen esporas meióticas, producidas en el interior de esporocitos llamados ascas.

- En la reproducción sexual, entre la plasmogamia y la cariogamia, hay una fase dicariótica en la que los núcleos se encuentran apareados pero no fusionados.
- El crecimiento es de tipo apical y la pared celular tiene quitina.
- La reproducción asexual es de todos tipos excepto la producción de zoosporas (García, 2014).

III.1.a.2.-Basidomicetos: es el segundo grupo de importancia con aproximadamente 22.000 especies. Se caracterizan por presentar las siguientes propiedades:

- Poseen núcleo dicariótico, siendo esta fase la de mayor importancia y duración.
- Las esporas se originan después de la meiosis, no son endoesporas, sino exoesporas, que se forman en número de cuatro en la superficie de la célula esporífera.
- Talo filamentosos de tipo micelial, con hifas tabicadas o separadas, con una pared rica en quitina. Tabiques incompletos con un poro de 0.1-0.2 micras de diámetro.
- El poro posee en ambos lados unas estructuras en forma de paréntesis llamadas parentosomas o bandas de cierre. Ellas ayudan a filtrar, al igual que el tamaño del poro, el tipo de sustancias que son intercambiadas por el citoplasma.
- El ciclo vital se distingue por la corta duración del micelio que se forma al originar las basidiosporas (García, 2014).

III.1.a.3.-Oomicetos o mohos: Incluye especies tanto saprófitas como parásitas, casi siempre vinculadas a medios acuosos. Las hifas pueden estar separadas en secciones pluricelulares por septos perforados. Tienen las siguientes características resaltantes:

- Se reproducen asexualmente en la mayoría de los casos y las estructuras sexuales aparecen solo cuando las circunstancias son favorables o se encuentran micelios de distinta polaridad.
- La coloración característica se debe a las esporas asexuales, las cuales suelen desarrollarse en el extremo de las estructuras especializadas que se extienden en el aire a partir del micelio, conocidas como esporóforos.
- Las esporas pueden estar en un esporangio o suelen ser externas (García, 2014).

III.1.a.4.-Zigomicetos: son hongos terrestres formados por hifas con paredes quitinosas. Algunas de sus características son:

- Algunos son parásitos, sin embargo la mayoría son saprófitos.
- Viven en el suelo y se alimentan de materia orgánica muerta. No tienen esporas flageladas y en la reproducción sexual producen zigosporas, cigotos con pared espesa y resistente sobreviviendo en condiciones ambientales.
- Existen 750 especies, todos forman esporas en esporangios en la reproducción asexual. En la reproducción sexual forman zigoexporagios. Suelen atacar los alimentos ocasionando dificultades en la conservación de los mismos (García, 2014).



Figura III.2.- Ciclo evolutivo de los Basidomicetos. Tomado de:
<http://biologiandoando.blogspot.es/categoria/reino-fungi/23/11/16>.

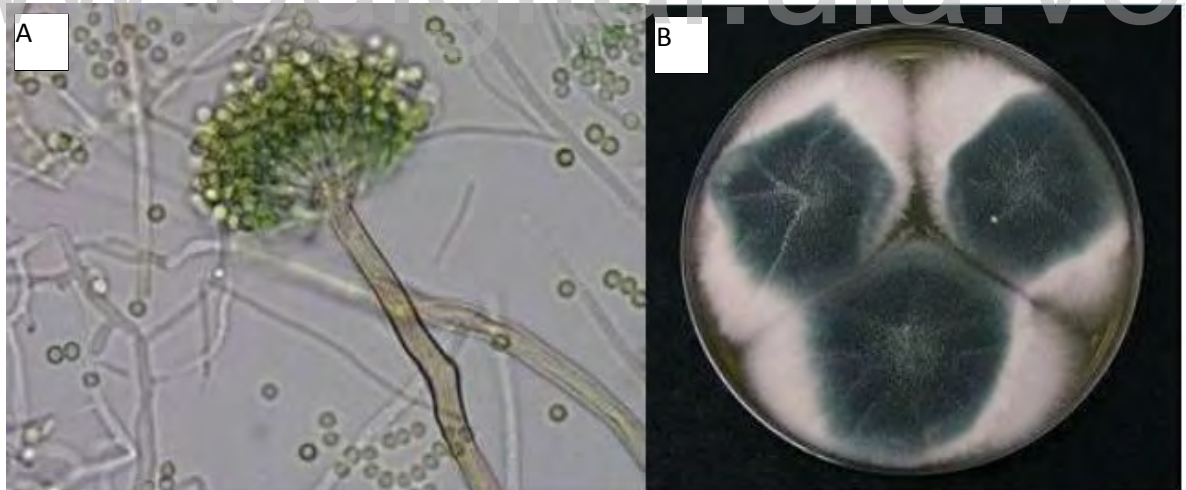


Figura III.3. Ejemplos de hongos filamentosos. A la derecha *Aspergillus* sp., a la izquierda cultivo en agar de *Aspergillus fumigatus*. Tomado de:
http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358010/exe/leccin_22_hongos.html/23/11/16.

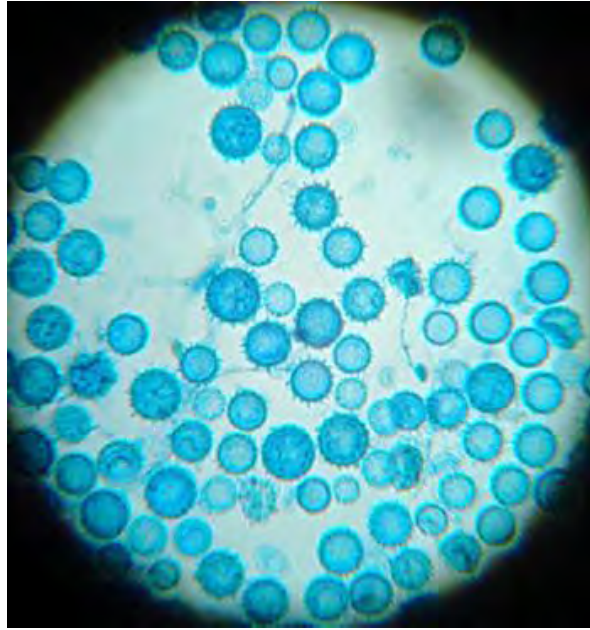


Figura III.4.-Ejemplo de hongo dimorfo en exámen directo con azul algodón, a partir de una colonia de *Histoplasma capsulatum*. Hifas septadas, hialinas, abundantes macroconidios de pared gruesa, redondos, con tubérculos. Imagen: Bazán-Mora E,

Facultad de Medicina, UNAM. Tomada de:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/histoplsmosis.html>.

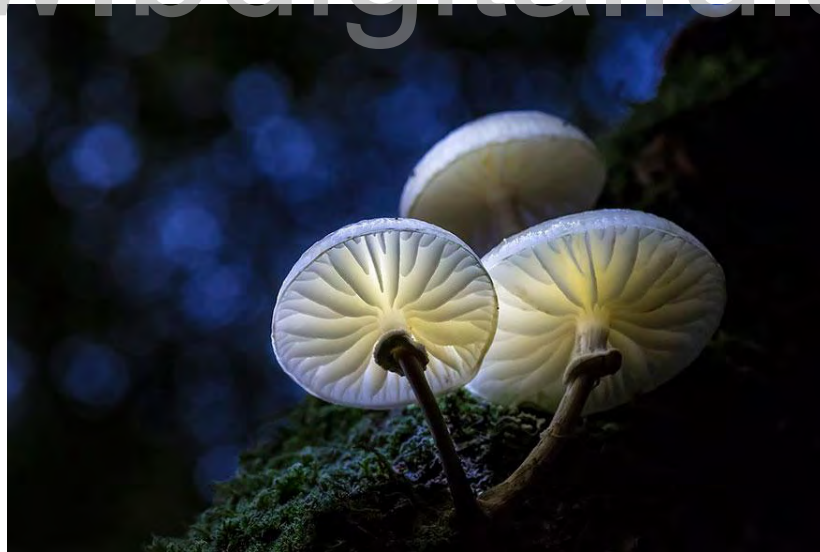


Figura III.5.- Hongo tipo seta *Porcelains fungus*. Tomada de:

<http://lavozdelmuro.net/40-impresionantes-imagenes-de-setas-que-te-dejaran-con-la-boca-abierta/23/11/16>.

III.2.-*Cándida albicans*

Es un hongo de la familia de Candidaceae del grupo de los ascomicetes, polimórfico según el medio de crecimiento temperatura, pH y nutrientes. El género *Cándida* forma colonias lisas de color blanco cremoso, brillantes y suele parecerse a los estafilococos (Mendell, 2011). La forma más común es tipo levadura blastoconidia, la reproducción asexual ocurre formando blastoconidios. Las colonias aparecen dentro de 48-72 horas cuando se cultivan en medios fúngicos tales como agar de glucosa Sabouraud a 37 ° C. Las colonias originales son arrugadas (Hazen y Howell, 2007).

Éste patógeno forma parte de la microbiota humana y animal natural con un cierto número de colonias. Sin embargo, es oportunista cuando el hospedero se encuentra débil inmunológicamente. Suele atacar el sistema gastrointestinal y genital en seres humanos, causando candidiasis localizada o sistémica. *Cándida albicans* tiene una amplia distribución y supervivencia en seres vivos, alimentos, suelos y superficies inanimadas (Ruhnke, 2006). También son contaminantes frecuentes en hospitales y ocasionales en laboratorios (Mendell, 2011).

Debido a su amplia distribución y supervivencia en seres vivos y superficies inanimadas se escogió a *Candida albicans* como sujeto experimental para evaluar, de manera preliminar, la posible actividad antifúngica del exudado glandular de *Rubus* cf. *adenotrichos*(Figura III.6).



Figura III.6.- Micrografía de microscopio óptico mostrando el aspecto filamentosos de *Cándida albicans*.

<http://microbiologiaencolombia.blogspot.com/2015/05/candida-albicans.html>

III.3.- Importancia de estudiar la actividad antifúngica de productos naturales

Existe aproximadamente un 50% de pérdida de cosechas a nivel mundial a causa de infestaciones fúngicas. En países subdesarrollados las pérdidas son a menudo más severas, debido al mal manejo y la carencia de instalaciones adecuadas para el almacenamiento de la materia prima y productos alimenticios procesados.

Los hongos en alimentos almacenados son responsables del cambio de sus características organolépticas, de la reducción del valor nutricional y la consiguiente producción de micotoxinas (Alonso-Amelot et al., 2009).

Actualmente, la actividad antifúngica de las plantas está siendo estudiada por la resistencia que presentan hongos patógenos a los diferentes fungicidas comerciales utilizados en el control de enfermedades de cultivos agrícolas y por la presencia de residuos químicos en la cadena de alimentos. Esto ha estimulado la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas de origen vegetal, las cuales han sido efectivas contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo* (Nieto-Oropeza et al., 2015). Los extractos naturales de plantas son de interés por ser sustitutos efectivos para producir sintéticamente agentes antimicrobianos y son una alternativa para evitar la contaminación de alimentos por hongos (Magro et al., 2006; Márquez et al., 2007; Centeno y Carrera, 2013).

Aunado al interés antropocéntrico de manejar información oportuna en el tratamiento de hongos y sus efectos, existe el interés ecológico relacionado a conocer cómo las especies animales enfrentan el ataque de enemigos naturales en los diferentes

estadios de su desarrollo. Tal es el caso de los huevos de los insectos que, debido a su inmovilidad, son susceptibles a ser atacados por depredadores. Así mismo, al ser colocados en sustratos donde abundan una flora de microorganismos muy variada, también están propensos a la infección por agentes patógenos tales como hongos y bacterias (Eisner et al., 2002).

Las defensas de los huevos de insectos contra los depredadores y agentes infecciosos pueden ser clasificadas en tres clases: protección por evasión, protección química y defensas mecánicas (Capinera, 2008). En el primer mecanismo protector, los huevos suelen ser depositados por las hembras en lugares de difícil acceso como tejidos internos de las plantas o en el subsuelo. La protección química está basada en la acción de sustancias tóxicas que pueden ser autógenas o adquiridas de fuentes externas para usadas como cubiertas protectoras. Las defensas mecánicas implican crear una barrera protectora de escamas, setas o líquidos pegajosos (Blum y Hilker, 2002). En este último caso, las secreciones suelen ser dispersadas sobre los huevos para hacerlos tan pegajosos que los pequeños depredadores o parasitoides atacantes resulten pegados a ellos o que sus partes bucales resulten desactivadas.

Además de la función de barrera física de las secreciones, se conoce que varias de ellas también tienen propiedades químicas defensivas. Por ejemplo, Marchini et al. (1997) reportaron que las glándulas reproductoras accesorias de las hembras de la mosquita de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) producen una secreción con actividad antibacteriana atribuida principalmente al péptido ceratotoxina. También se conoce que el material químico defensivo puede provenir de plantas o

insectos presas con propiedades tóxicas (Hinton, 1981). Tal es el caso de coleópteros de las familias Anthicidae y Pyrochroidae que secuestran el compuesto cantaridina obtenida de sus presas. Se ha comprobado que este compuesto venenoso es luego transferido a los huevos como una forma de protección (Gullan y Cranston, 2009).

Otras especies secuestran compuestos tóxicos de sus plantas hospederas y los transfieren a los huevos. Tal es el caso de la mariposa *Battus philenor* (Lepidoptera: Papilionidae) que secuestra ácidos aristolóquicos de *Aristolochia* sp. y el chinche *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) que obtiene los cardenólidos de *Asclepias* spp. (Fordyce et al., 2005; Agrawal et al., 2012 y Newcombe et al., 2013).

Otros insectos usan la sustancia que obtienen de fuentes externas para cubrirlos, creando una capa protectora. Este mecanismo ha sido señalado para los hemípteros conocidos como chinches de las resinas (Hemiptera: Reduvidae: Apiomerinae). Las hembras de *Apiomerus flaviventris* (Choe y Rust, 2007 y Forero et al., 2011) y de *Heniartes stali* (Avila-Núñez et al., 2016) han sido observadas recubriendo sus oviposturas con el exudado pegajoso obtenido de plantas ricas en tricomas glandulares. Este comportamiento se le ha denominado cuidado maternal (Gilbert y Manica, 2015) y es señalado como un mecanismo evolutivamente desarrollado para hacerle frente a los depredadores y ataques microbianos (Eisner et al., 2005).

III.4.-Bioensayos usados para evaluar la actividad antifúngica

En la creciente búsqueda de compuestos con actividad antifúngica se han desarrollado técnicas para evaluar los posibles efectos negativos de un

determinado compuesto sobre la formación y permanencia de hongos. Éstas pueden ser divididas en:

III.4.a.-Técnicas *in vivo*

Las técnicas *in vivo* involucran evaluaciones en campo y evaluaciones sobre frutos enteros o rebanados, sobre los cuales se aplican las sustancias a evaluar y a las que se les adjudica un cierto potencial antifúngico. En estos experimentos se controla la cepa del hongo y las condiciones para crecimiento de forma natural como temperatura, humedad y radiación, entre otras, procurando reproducir condiciones ambientales (Nieto-Oropeza et al., 2015).

III.4.b.-Técnicas *in vitro*

Son técnicas a nivel de laboratorio, que permiten una evaluación más sofisticada y adaptable a la naturaleza de la sustancia que se esté evaluando y al tipo de organismo que se desea inhibir. Se llevan a cabo usando medios de cultivo específicos que aseguran el crecimiento de la cepa, de no existir una potencial actividad antifúngica por parte de la sustancia en estudio. Las mismas se diferencian principalmente en el método de sembrado sobre el medio de cultivo y por la posterior evaluación de los resultados. Algunas de estas técnicas son:

- Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida.
- Técnica de macrodilución.
- Técnica de portaobjetos.
- Técnica de cromatografía en capa fina.

- Técnica por gota gruesa.
- Técnica de unidades formadoras de colonias.
- Técnica con discos de papel.
- Técnica de dilución en disco de agar.
- Técnica de pozo de difusión.
- Técnica de actividad de vapor.
- Técnica de superposición.
- Técnica de sándwich.
- Técnica de tejido natural cubierto por un líquido iónico.
- Técnica litográfica para monumentos.
- Técnica fotodinámica.
- Técnicas con kits comerciales (Nieto-Oropeza et al., 2015).

De todas las técnicas señaladas serán descritas la técnica con discos de papel y la técnica de pozo de difusión, las cuales fueron empleadas en el presente trabajo de grado.

III.4.b.1.-Técnica con discos de papel: Esa técnica conocida como método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) es utilizada rutinariamente en las pruebas de antibiogramas (Bernal y Guzmán, 1984).

Consiste en un medio de cultivo rico en carbohidratos donde se siembra la cepa de prueba, como por ejemplo *Cándida albicans*, y posteriormente se colocan discos de papel con la solución de prueba. Si la sustancia es activa se observará un crecimiento en todo el sustrato excepto en el disco de papel incluyendo cierto radio sobre el

sustrato llamado halo de inhibición. Mientras mayor sea el halo de inhibición mayor es el potencial antifúngico de la sustancia. Paralelamente se emplea el mismo procedimiento usando un antibiótico como control.

III.4.b.2.-Técnica de pozo de difusión: consiste en un medio de cultivo rico en carbohidratos donde se siembra la cepa de prueba y posteriormente se realizan orificios en el sustrato generando un pozo de tamaño determinado. En dicho pozo se coloca una gota de la solución de prueba, se espera, como respuesta positiva la formación de un halo de inhibición por causa de la difusión del líquido en el sustrato o medio de cultivo.

Para ambas técnicas la lectura de las placas se lleva a cabo a las 24h y se confirma a las 48h. Se mide el diámetro del halo de inhibición y la respuesta se puede conservar registrada por medio de una fotografía. Luego se calcula la actividad usando la siguiente expresión:

$$Inhibición(\%) = \bar{\varnothing} N o c r e c i m i e n t o / \bar{\varnothing} T o t a l \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde $\bar{\varnothing} N o c r e c i m i e n t o$ es el diámetro del halo de inhibición y $\bar{\varnothing} T o t a l$ el diámetro de la cápsula de Petri.

Un ejemplo de un bioensayo con una buena respuesta inhibitoria se presenta en la figura III.7.

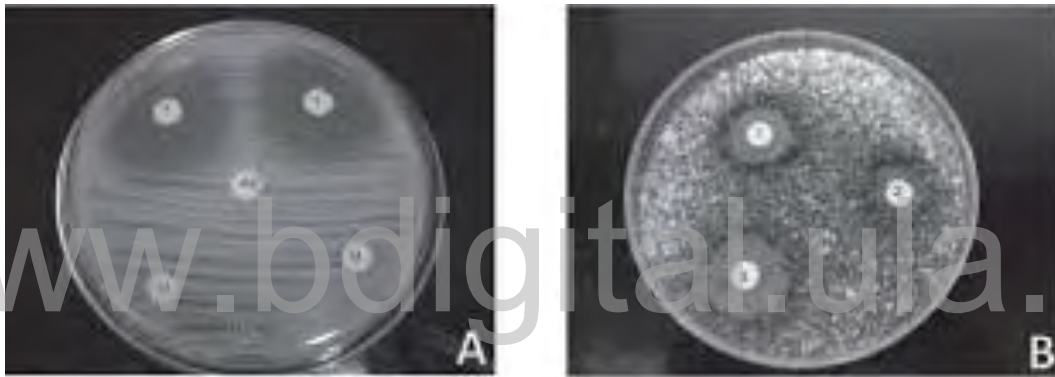


Figura III.7.- Modelo de respuesta para actividad antifúngica, usando el método de discos de papel. El halo de inhibición es proporcional a la capacidad antifúngica de la sustancia de prueba. **A** La cepa fue sembrada usando la técnica de barrido superficial sobre el medio de cultivo. **B** la cepa fue sembrada incorporándola en la preparación del medio de cultivo.

III.5.-Potencial antifúngico del exudado de *R. cf. adenotrichos*

Como ha sido señalado anteriormente, *Heniartes stali* exhibe cuidado maternal al recubrir sus huevos con el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* durante la postura lo que podría hacer pensar que lo hace como una forma de protección frente al ataque de microorganismos. Sin embargo, el potencial de antibiosis de este exudado vegetal no ha sido estudiado. Es poco lo que se conoce de las propiedades antimicrobianas de especies del género *Rubus*. Silva-Adame et al. (2013) estudiaron preliminarmente el potencial antibacteriano y antifúngico de extractos metanólicos de las hojas y tallos de las moras *Rubus adenotrichos* y *R. coriifolius* contra los microorganismos fitopatógenos *Pantoea stewartii* y *Fusarium* sp. Se encontró que la mayor actividad antibacteriana provino del extracto de tallo de *Rubus adenotrichos* alcanzando un 97.78 % de inhibición de *Pantoea stewartii*, en cuanto a la actividad antifúngica, el extracto de hoja de *Rubus adenotrichos* alcanzó un 36.335 % de inhibición de micelio de *Fusarium* sp.

En vista de estos antecedentes, y sabiendo que la interacción *Heniartes stali*-*Rubus cf. adenotrichos* recién se está conociendo, la presente sección de esta tesis evaluará, de manera preliminar, el potencial anti-fúngico del exudado de los tricomas de *R. cf. adenotrichos*, intentado relacionarlo con el comportamiento de cuidado maternal que ha sido observado en este insecto.

III.I.-OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar preliminarmente la actividad antifúngica del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* contra el hongo *Cándida albicans* mediante bioensayos *in vitro*.

III.II.- METODOLOGÍA

III.6.1.- Bioensayo de actividad antifúngica

Para este ensayo se usaron los métodos de difusión con disco de papel y el de pozo de difusión.

III.6.2.-Preparación de medios de cultivos

III.6.2.a.-Agar Sabouraud Dextrosa con antibiótico:

Agar Sabouraud Dextrosa..... 65 gr.

Cloranfenicol..... 250 mg

Agua destilada c.s.p..... 1L

Se mezclaron los compuestos en agua destilada, bajo calor, hasta disolver. Se distribuyeron en raciones de 6 ml en tubos de 15 X 150 mm. Se esterilizaron en autoclave a 121°C X 15 min y posteriormente se dejaron enfriar en superficie inclinada y posteriormente fueron conservados en el refrigerador hasta el momento de su uso.

III.6.2.b.-Medio Muller –Hinton modificado:

Agar Müeller-Hinton..... 38 g.
Glucosa.....20 g.
Solución stock de azul de metileno* 100 µl.
Agua destilada..... 1 L

Se mezclaron los compuestos en agua destilada bajo calor, hasta disolver. Luego se distribuyeron en porciones de 15 ml en tubos de 22 X 200 mm. Se esterilizaron en autoclave a 121°C X 15 min. Se dejaron enfriar, conservándolos en el refrigerador hasta el momento de su uso.

* Solución stock de Azul de Metileno: Se disolvieron 100 mg. de azul de metileno en 20 ml de agua destilada.

III.6.2.c.-Cepa a utilizar para la prueba:

Se usó una cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028), proveniente de la micoteca del Laboratorio de Micología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. La misma se repicó en medio de agar Sabouraud y se incubó a temperatura ambiente (28°C) por 24 horas (Figura III.7.A). Antes de aplicar la prueba, se preparó un inóculo a una densidad de 0.5McFarland

III.6.2.d.-Preparación del inóculo:

Se preparó el inóculo a partir del crecimiento en medio de Agar Sabouraud con antibiótico, incubado a temperatura ambiente (28°C) por 48 horas, para lo cual se mezcló la cepa en agua destilada estéril hasta ajustar la concentración a 0,5 MacFarland (10⁶ UFC/mL).

III.6.2.e.-Método de difusión en agar con discos de papel de filtro:

Se fundió el Agar Müller-Hinton modificado, manteniéndose a 56 °C, hasta su uso. A este se le agregó 1 ml del inóculo preparado, a 0,5 MacFarland, y se mezcló con ayuda del Vortex hasta homogenizar, luego se vertió la mezcla en una placa de Petri y se dejó solidificar (Figura III.8.B).

Se impregnaron los discos de papel de filtro (Wartman N° 1) de 6 mm de diámetro, con 15 µl de la solución en DMSO del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* (Ra2) en dos tiempos después de la extracción: a las 24h y a las 384h (16 días). Este último con la finalidad de evaluar si la actividad se mantenía constante en el tiempo o presentaba alguna variación. Los 16 días se tomaron como referencia porque corresponden al período promedio de duración de la fase huevo en *H. stali* (Avila-Núñez, datos no publicados), por lo que si la cobertura de exudado sobre éstos funciona como protector, su efecto debería conservarse, al menos, durante este tiempo. Las concentraciones evaluadas fueron: 90,8mg/mL, 45,0mg/mL y 22,5mg/mL. La prueba se realizó por triplicado para cada tratamiento.

Los discos se colocaron sobre la superficie de la placa de Petri y se incubaron a 28°C por 48 horas (Figura III.9).

III.6.2.f.-Método de pozo de difusión:

Para crear los pozos se utilizó un cilindro de tres milímetros de diámetro, aproximadamente, esterilizándolo en la llama al rojo vivo. Seguidamente se dejó enfriar y se introdujo en el medio de cultivo cortando el agar que posteriormente fue retirado con ayuda de una aguja esterilizada. Este proceso se repitió tres veces. Luego se llenaron los pozos con 5µL de la solución del exudado glandular en DMSO en las mismas tres concentraciones probadas con el método de disco de papel y probando los mismos tiempos de extracción 24h y 384h (Figura III.10).

III.6.2.g.- Lectura e Interpretación de la prueba:

Los resultados se medirán de forma cualitativa, con dos tipos de respuesta posibles:

- Si hay presencia de un halo de Inhibición del crecimiento de la cepa alrededor del extracto evaluado se dirá que *Candida albicans* es *Susceptible* al extracto del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos*, bajo las condiciones experimentales suministradas.

-Si hay ausencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del extracto, indica que *Candida albicans* es *Resistente* a este exudado glandular.



Figura III.8.- Proceso de preparación del bioensayo de actividad antifúngica. **A** Repicado de la cepa de *Candida albicans* **B** preparación del medio de cultivo agar Sabouraud y transvasado a la cápsula de Petri.

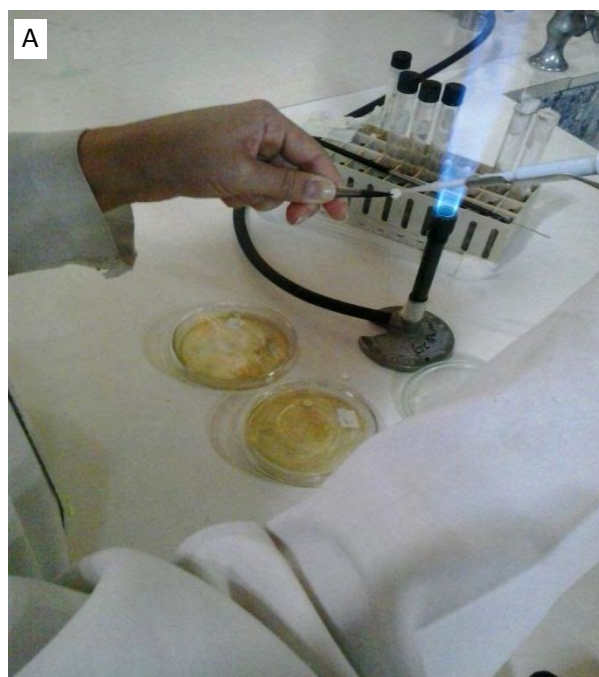


Figura III.9.- Proceso de preparación del bioensayo de actividad antifúngica. **A** Impregnación del disco de papel con 15 μ L de la solución del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* en DMSO. **B** Introducción del disco de papel en la cápsula de Petri.



Figura III.10.- Llenado del pozo en la capsula de Petri, con 5 μ L de la solución del exudado glandular en DMSO.

III.III.-RESULTADOS

Las tablas III.1 y III.2 muestran que la cepa de *Cándida albicans* usada en los bioensayos para evaluar la actividad antifúngica del exudado glandular de *R. cf adenotrichos* fue resistente a las diferentes concentraciones, tiempos de extracción y métodos de prueba empleados. En la Fig. III.11 se observa el crecimiento homogéneo del hongo alrededor de los discos y pozos de difusión, indicando que el microorganismo no fue afectado por la presencia del exudado de *R. cf. adenotrichos*.

Tabla III.1.-Efecto antifúngico a diferentes concentraciones y tiempos de extracción del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* sobre *Candida albicans* usando la técnica de difusión con disco de papel:

Tiempo de extracción (días)	Concentración (mg/mL)		
	90,83	45,0	22,5
1	Resistente	Resistente	Resistente
16	Resistente	Resistente	Resistente

Tabla III.2.-Efecto antifúngico a diferentes concentraciones y tiempos de extracción del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* sobre *Candida albicans* usando el método de pozo de difusión.

Tiempo de extracción (días)	Concentración (mg/mL)		
	90,83	45,0	22,5
1	Resistente	Resistente	Resistente
16	Resistente	Resistente	Resistente

De acuerdo a estos resultados, la posibilidad de que el exudado de los tricomas de *R. cf. adenotrichos* pudiera actuar como un agente que prevenga el crecimiento de hongos *in vivo* podría ponerse en duda, al menos con *Cándida albicans*. Sin embargo, el posible efecto antifúngico contra otras especies no debería ser excluido. En futuros estudios más completos se deberían usar otras especies de hongos, que permitan determinar con mayor amplitud el poder antifúngico de este extracto, esto debido a que se ha probado que la respuesta de las plantas y sus productos de secreción defensiva varían dependiendo del tipo de hongo al cual sean expuesta, así como la susceptibilidad de los mismos a exudados de un tipo sobre otro (Anaya, 2003). De esta manera, poder relacionarlo con el comportamiento de cuidado maternal que muestran las hembras de *H. stali* al usarlo como cobertura de los huevos.

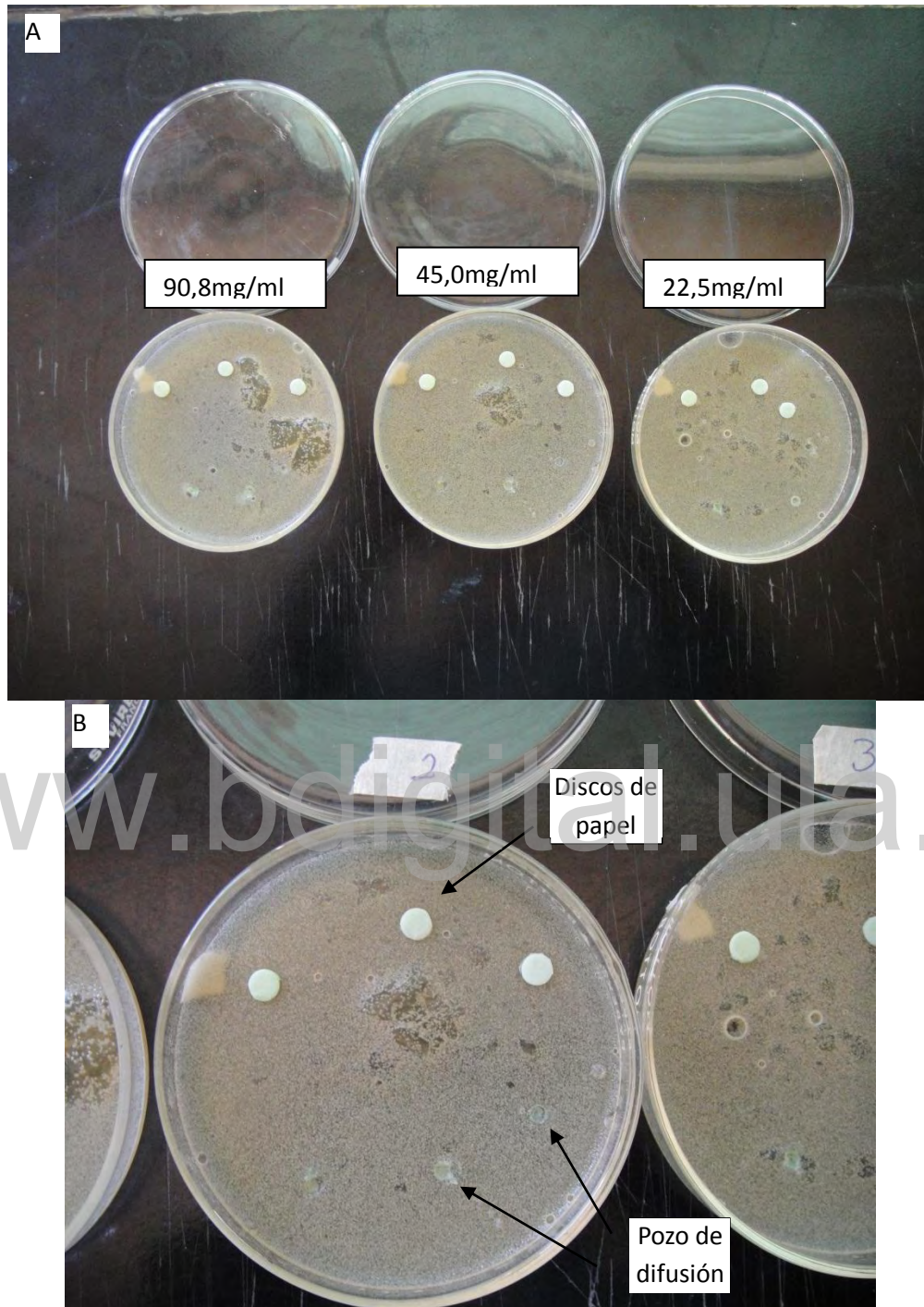


Figura III.11.- A Resultados de la evaluación antifúngica con *Cándida albicans* para el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* de 24h y 384h en concentraciones de 90,8mg/mL, 45,0mg/mL y 22,5mg/mL. B Acercamiento de placa de concentración 45,0mg/mL para visualizar los dos métodos usados en la misma placa, difusión con papel y pozo de difusión.

III.IV-REFERENCIAS

Agrawal AA, Petschenka G, Bingham RA, Weber MG y Rasmann S. 2012. **Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions.** *New Phytologist* 194: 28-45.

Alonso-Amelot ME, Avila-Núñez JL, Calcagno-Pissarelli MP. 2009. **Los cereales en el trópico suramericano. Técnicas modernas de conservación.** Coedición entre el Vicerrectorado Académico ULA y Fundación Empresas Polar. 450 pp.

Anaya A. 2003 **Los Microorganismos y la Ecología Química en Ecología Química.** Plaza y Valdez editores. 1ra edición. México. 124p.

Avila-Núñez JL, Naya M, Otero LD y Alonso-Amelot ME. 2016. **A resin bug (Reduviidae:Harpactorinae: Apiomerini) harvesting the trichome secretion from an Andean blackberry.** *Neotropical Biodiversity*2: 151-158.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Bernal M, Guzman M. 1984. **El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer.** *Biomedica* 4: 112-121.

Blum MS y Hilker M. 2002. **Chemical protection of insect eggs.** En: Hilker M y Meiners T (eds.), *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition.* Blackwell Publishing, Oxford.

Werker E. 2000. **Trichomes diversity and development** in *Advances in Botanical Research.* Plant trichomes. Editores D.C. Hallahan and J.C. Gray. Series editors J.A. Callow. Academic Press. Volumen 31: 4-30.

Capinera JL. 2008. **Eggs of Insects**. En: Capinera JL. (ed.). Encyclopedia of Entomology. Springer.

Centeno S. y Carrero Y., 2013. **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIAFLATOXIGÉNICA DE EXTRACTOS DE *Melissa officinalis* (LAMIACEAE) SOBRE *Aspergillus flavus***. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 25 N° 2: 185-191.

Choe DH y Rust M. 2007. **Use of plant resin by a bee assassin bug, *Apiomerus flaviventris* (Hemiptera: Reduviidae)**. Annual Entomology Society America. 100 2: 320-326

Eisner T, Rossini C, González A, Iyengar VK, Siegler MVS y Smedley SR. 2002. **Paternal investment in eggs defense**. En: M. Hilker y T Meiners (eds.). Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition. Blackwell Publishing, Berlin.

Eisner Th, Eisner M y Seigler M. 2005. **Secret weapons: Defenses of insects, spiders, scorpions and other legged creatures**. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Fordyce JA, Marion ZH, Shapiro AM. 2005. **Phenological Variation in Chemical Defense of the Pipevine Swallowtail, *Battus philenor***. Journal Chemical Ecology. 31: 2835-2846.

Forero D, Choe DH y Weirauch C. 2011. **Resin gathering in neotropical resin bugs (Insecta:Hemiptera:Reduviidae): Functional and Comparative Morphology**. Journal Morphology. 272: 204-229.

García Q., 2014. **Microbiología**. Enlace: http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/11/tipos-de-hongos_25.html

Gilbert JDJ y Manica A. 2015. **The evolution of parental care in insects: a test of current hypotheses.** Evolution 69(5): 1255-1270.

GullanPJ yCranstonPS. 2014. **The insects: an outline of entomology (5th edition).** John Wiley and Sons, West Sussex.

Hazen, K. C., y Howell, S. A. 2007. **Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance.**In P. R. Murray (Ed.), Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C.: ASM Press. 9:1762-1788.

Hinton HE. 1981. **Biology of Insect Eggs.** Pergamon Press, Oxford.

Hudzicki J. (2009) **Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.** American Society for Microbiology; Washington, DC: Dec 8, Disponible en: [http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol\(22/09/16\)](http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol(22/09/16)).

Magro a, Carolino M, B aStoS M, M eXia a. 2006. **Efficacy of plant extracts against stored products fungi.**Revista Iberoamericana de Micología 23:176-178.

Mandell G., Dolin R. y Benett J. 2011. **Mandell, Douglas y Benett's Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas.** Editorial El SEVIER. 7ma edición Vol. 1: 3217-3220.

Marchini D, Marri L, Rosetto M, Manetti AGO y Dallai R. 1997. **Presence of antibacterial peptides on the laid egg chorion of the medfly *Ceratitis capitata*.**Biochemical Biophysical Research Community 240: 657– 663.

Márquez r, De la Rosa C, Mercado a. 2007. **Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Point (ultimorrial)**. *Sciens and Tecnology* XIII(3):155-159.

Newcombe D, Blount JD, Mitchell C y Moore AJ. 2013. **Chemical egg defence in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, derives from maternal but not paternal diet**. *Entomologia Experimentalis Applicata* 149:197-205.

Nieto-Oropeza D., Aguirre-Joya J., Zugasti-Cruz A., Rodríguez- Jasso R., Rodríguez-Herrera R. y Aguilar C. 2015. **Actividad Antifúngica: Análisis Comparativo de Ensayos In Vitro e In Vivo**. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza, s/n, esquina con LC. Salvador González Lobo, Colonia República Oriente, C.P. 25, 000.

Saltillo, Coahuila, México. P. 28-41. Enlace: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2015_2/antifungica.pdf

Prats G., 2006 **Microbiología Clínica**. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Editorial Médica Panamericana. p: 83-91.

Ruhnke, M. 2006. **Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts**. *CurrentDrug Targets*, 7(4): 495-504.

Silva-Adame MB., Pedraza-Arriola LV, García-Saucedo PA. 2013. **Zarzamoras silvestres: Plantas mexicanas con potencial antimicrobiano**. Memorias del X Encuentro de la Participación de la Mujer en la Ciencia. León, México.

<http://glosarios.servidor-alicante.com/ecologia>

<http://lavozdelmuro.net/40-impresionantes-imagenes-de-setas-que-te-dejaran-con-la-boca-abierta/23/11/16>.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/histoplsmosis.html>

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358010/exe/leccin_22_hongos.html/23/11/16

<http://biologiandoando.blogspot.es/categoria/reino-fungi/23/11/16>.

http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/11/tipos-de-hongos_25.html/20/11/16

www.bdigital.ula.ve

III.V.- Glosario III

Antibiograma: es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de un microorganismo a un grupo de antibióticos.

Autógenas: que se generan a sí mismos.

Características organolépticas: son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, según las pueden percibir los sentidos, como por ejemplo textura, olor, color, temperatura, entre otros.

Cepa: En microbiología se conoce como aquella población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias

Coenocítico: micelio continuo que no tiene tabiques y con muchos núcleos.

Dicariótico: micelio o esporas que contienen un par de núcleos sexualmente compatibles en cada célula. Común en los basidiomicetos.

Difusión: proceso mediante el cual ocurre un flujo de partículas (átomos, iones o moléculas) de una región de mayor concentración a una de menor concentración, provocado por un gradiente de concentración.

Espermatización: tipo de reproducción sexual (plasmogamia) que se produce por la unión de una estructura que se comporta como un gameto masculino

(espermacio) con una estructura receptora femenina diferenciada (tricogino).

Esporas: Células reproductivas especializadas producidas por los hongos para dispersarse o enfrentar condiciones adversas.

Eucarióticos: Organismos que constan de una o más células eucariotas las cuales se caracterizan por tener un núcleo y orgánulos.

Fitopatógenos: agentes productores de enfermedades en las plantas.

Heterotróficos: organismos vivos que requieren de otros organismos para alimentarse, ya que no pueden sintetizar sus propios alimentos.

Hifas: cada uno de los filamentos delgados semejantes a fibras de algodón, que se desarrollan a partir de las esporas de los hongos y que reunidos en una densa ramificación individual, constituyen el micelio.

Inóculo: las esporas, bacterias o fragmentos del micelio de los patógenos, que puedan infectar a las plantas o al suelo.

Levadura: célula micótica simple, usualmente ovoide, que se duplica por la formación de blastoconidias.

Micelio: conjunto de hifas que constituyen un falso tejido denominado talo en los hongos, cuyas células no contienen clorofila.

Micotoxinas: sustancias tóxicas que producen varios hongos en las semillas, alimentos o nutrientes infectados y que ocasionan enfermedades de distinta gravedad e incluso la muerte de los animales y seres humanos que las consumen.

Patógenos: agentes que producen enfermedad.

Plastogamia: La fusión de los citoplasmas de dos células sin la fusión de sus núcleos

Progenie: Descendientes de un mismo individuo que se cultivan con la finalidad de evaluar el fenotipo del progenitor.

Quimiotrópicos: Organismos que se orientan por influencia de un estímulo químico. El quimiotropismo es positivo cuando el organismo se orienta hacia el estímulo y es negativo cuando se orienta en sentido contrario.

Seta: Es la estructura reproductiva visible en los basidiomicetes.

Zigoexporangios: Estructuras reproductoras de los hongos que se originan tras la unión de las células sexuales (gametangia) y que contendrá la zigospora, es decir, el cigote.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo IV.- ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXUDADO GLANDULAR DE *R. cf. adenotrichos*.

Estudios realizados sobre el uso que *H. stali* hace del exudado recolectado de *R. cf. adenotrichos* han mostrado que éste es una herramienta importante para la captura de las presas y la protección de sus huevos (Avila-Núñez et al. 2016; Avila-Núñez et al. 2017). Para que este mecanismo de “trampa pegajosa” funcione, requiere que las propiedades pegajosas del exudado recolectado por el insecto se mantengan en el tiempo. Como ha sido revelado en capítulos anteriores del presente trabajo de grado, tal exudado contiene terpenoides, los cuales podrían ser responsables de la propiedad pegajosa del exudado (Schoonhoven et al. 2005; Simoneit et al. 2008; **Triterpenoids as Major Components...**). Es conocido que este grupo de compuestos, dependiendo de su estructura, son susceptibles a sufrir daño oxidativo o polimerización que provocan cambios en su viscosidad (Turek y Stintzing 2013; Stability of Essential Oils ; Phillips y Croteau 1999; Resin-based defenses in conifers). La presente investigación también ha mostrado la presencia en el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* de compuestos del tipo fenólicos, grupo al cual se le atribuyen destacadas propiedades antioxidantes (Martínez-Flores et al. 2002 **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**; Dai y Mumper ,2010 Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules). Tomando en cuenta estos antecedentes, resulta interesante determinar si este

exudado posee propiedades antioxidantes que le permitirían conservar su característica pegajosidad una vez que es recolectado y acumulado por *H. stali*.

Los antioxidantes son sustancias químicas que inhiben o retardan la oxidación de otras sustancias evitando la proliferación de radicales libres (Jiménez et al., 2012;).

Éstos son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Duracková 2014). Los radicales libres son

productos del metabolismo normal de las células y a moderadas concentraciones pueden tener efectos benéficos para los organismos (Kilgour y Roberts 2014). Se

producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones en los microsomas y

en cloroplastos. Participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, y favorecen la quimiotaxis

(Orjuela, 2015). Sin embargo, la alta reactividad de estas moléculas y su inclinación para iniciar reacciones en cadena de oxido-reducción, son características

determinantes de su alta toxicidad y su papel como agentes promotores de daño celular (Stavridis 2008).

Para contrarrestar el efecto deletéreo de los radicales libres, llamado estrés oxidativo,

los organismos han desarrollado evolutivamente mecanismos antioxidantes que pueden ser clasificados según varios criterios, algunos de ellos desarrollados a

continuación. .

IV.1.-Clasificación de los antioxidantes

IV.1.1.-Antioxidantes primarios: Son sistemas enzimáticos que previenen la formación de moléculas con grupos reactivos de oxígeno, convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando que se formen a partir de otros compuestos (Jiménez et al., 2012). Algunos son:

- IV.1.1.1.-Superóxido dismutasa: Es una enzima ampliamente distribuida en los organismos que se encarga de degradar el radical superóxido hasta oxígeno molecular. Se conocen variantes según el metal que actúa como co-factor y a su localización. En las células eucariotas se conocen dos formas: La dimérica Cu/Zn-SOD ubicada en el citoplasma, núcleo y mitocondrias y la tetramérica MnSODs localizada únicamente en las mitocondrias (**Gretschner et al. 2016; A common theme in extracellular...**).
- IV.1.1.2.-Catalasas: son enzimas que aceleran dos tipos de reacciones. La catalítica donde se produce la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno. Una se oxida a oxígeno molecular y la otra se reduce a dos moléculas de agua. El otro tipo de reacción es la peroxidación donde se utiliza un sustrato inespecífico para transformar una molécula de peróxido en dos de agua, esta última es la más adecuada para eliminar peróxido en altas concentraciones (Barja, *).
- IV.1.1.3.- Glutación peroxidasa: Es una enzima que interviene en una reacción que elimina hidroperóxidos. Es dependiente de la presencia de selenio para su actividad, controla la síntesis de proteína y es tetramérica. Otra versión no

dependiente del selenio es dimérica, de menor peso molecular, que solo es capaz de eliminar grupos ROOH (Barja, *).

IV.1.2.-Antioxidantes secundarios: La protección antioxidante en los seres vivos también puede ser obtenida por un grupo de compuestos no enzimáticos, químicamente muy diversos. Son divididos de acuerdo a si son hidrosolubles (tales como el ácido ascórbico, glutatión y proteínas enlazadas a metales) o liposolubles. (Tocoferoles y carotenoides, por ejemplo). Estos antioxidantes capturan radicales libres inhibiendo su reactividad en cadena (Jiménez et al., 2012).

El ascorbato o vitamina C, un antioxidante de bajo peso molecular con una gran importancia en la salud humana y algunos animales como el cobayo *Cavia porcellus*, presenta tres estados redox en los que puede existir:

- El ascorbato reducido
 - El radical semihidroascorbato (AFR), tras la oxidación monoelectrónica.
 - El dehidroascorbato (DHA), tras la oxidación bielectrónica (Barja, *).

Se conoce que buenos niveles de vitamina C o ascorbato en la dieta, reduce el daño oxidativo en lípidos y proteínas en animales y el hombre. También se sabe que con la edad disminuye la concentración de ascorbato en sangre y que se asocian concentraciones más altas en mujeres que hombres, juega un papel importante (junto con otros antioxidantes naturales) en actividad anticancerígena, enfermedades cardiovasculares, cataratas y otras enfermedades degenerativas (Barja, *). Existen numerosos estudios que describen las propiedades antimicrobianas y

antiinflamatorias de sustancias polifenólicas con capacidades antioxidantes relevantes (Kahkonen et al., 1999).

IV.1.3.-Antioxidantes terciarios: son los responsables de la bioreparación de moléculas dañadas. Algunos de ellos son las enzimas endonucleasa apurínica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN (Page, 2009).

IV.2.-Otra clasificación de los antioxidantes los ubica en dos grupos grandes:

Endógenos: sintetizados dentro del organismo como son superóxido dismutasa (destruye y bloquea producción de radicales a partir del oxígeno) y glutatión peroxidasa (bloquea producción y destruye radicales procedentes de las grasas).

Exógenos: aquellos compuestos que provienen de los alimentos que se ingieren tales como la vitamina E, vitamina C, betacarotenos, vitamina A, selenio y zinc. Los mismos actúan como defensa en las fronteras celulares, encerrando los radicales libres antes de que produzcan daños (Duracková 2014).

IV.3.-Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción.

Los oxidantes poseen diferentes mecanismos de acción de acuerdo a su estructura y grupos funciones que posee. Algunos rompen cadenas debido a la presencia de compuestos fuertemente atractores, otros descomponen hidroperóxidos sin formar radicales y otros se caracterizan por desactivar metales formando enlaces de coordinación con los mismos (ver Tabla IV.1)(Orjuela, 2015 de Emanuel E. et al., 1996).

Tabla IV.1.- Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción:

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales peroxilo	Estos son compuestos reductores con relativamente enlaces O-H y enlaces N-H débiles, que reaccionan fácilmente con los radicales peroxilo para la formación de radicales intermedios de baja actividad	Fenoles Naftoles Hidroquinonas Aminofenoles Diaminas
Los antioxidantes que rompen las cadenas por reacción con radicales alquilo	Estos son compuestos, que aceptan fácilmente los radicales alquilo. Estos antioxidantes son eficaces en concentraciones muy bajas de di-oxígeno y en polímeros sólidos.	Quinonas Nitronas Radicales estables nitroxilo y nitrocompuestos carotenoides
Antioxidantes que descomponen hidroperóxido	Estos son compuestos que reaccionan con hidroperóxidos sin la formación de radicales libres.	Sulfuros Fosfitos Carbamatos Algunos complejos de metales Proteínas Aminoácidos
Antioxidantes que desactivan metales	Ligando compuestos metálicos a compuestos inactivos	Óxidos de hidroperóxidos Diaminas Hidroxiácidos
Cadena cíclica, terminación por los antioxidantes	En otras palabras, la terminación de la cadena se produce como un proceso cíclico catalítico (los antioxidantes se regeneran en las reacciones de terminación de la cadena). La terminación de la cadena múltiple puede tener lugar, por ejemplo, en los polímeros	Aminas aromáticas radicales nitroxilo y compuestos que poseen metales de valencia variable
Los inhibidores de la acción combinada	Algunos antioxidantes pueden interactuar con los radicales R* y RO2*. Sin embargo, una molécula de inhibidor puede tener dos o más grupos funcionales, cada uno de los que puede someterse a su propia reacción	Antraceno Metilenequinona Carbonatos Tiofosfatos
Sinergismo de varios antioxidantes	Cuando dos inhibidores mutuamente mejoran sus efectos inhibitorios, es una acción sinérgica	Ácido cítrico Ácido ascórbico

IV.4.-Métodos reportados para la evaluación de la actividad antioxidante

Las reacciones de radicales libres son generalmente muy rápidas y por lo tanto, escapan en un experimento a cualquier detección directa en un proceso *in vivo* en tiempo real. Afortunadamente las constantes de velocidad absoluta son una propiedad inherente de cualquier sistema reactivo particular, por lo tanto en modelos *in vitro* se podrá determinar el recipiente biológico adecuado y la forma adecuada de identificar su presencia en este recipiente, lo que falta es saber la forma en la que ocurren e intervienen los radicales libres en los procesos biológicos. (Orjuela, 2015). Desde el punto de vista químico la reacción de un radical está asociada a otra especie antiradicalaria en una concentración específica, en vista de que los tiempos de reacción son muy cortos es necesario usar técnicas de detección rápidas cuando se quiere estudiar la cinética de reacción. También es necesario que ocurra algún cambio en sus características perceptibles que nos indique que ha ocurrido un cambio estructural pudiendo ser identificado por IR o UV. Basados en estas premisas se han desarrollado métodos que permiten estudiar la capacidad antioxidante *in vitro*. Algunos de éstos son:

- a) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (Brand-Williams *et al.*; 1995) y (Goupy *et al.*, 1999).
- b) Ensayo FRAP, (Del inglés ferric-reducing antioxidant power), (Benzie y Strain, 1996). Mide la capacidad de reducción.
- c) Método ORAC, (Del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao *et al.*, 1997). Cada antioxidante analizado presenta comportamientos muy dispares.

d) Método del 6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina (ABTS) (Re *et al.*, 1999). La capacidad de captura de radicales libres en este método no es un reflejo de su verdadera actividad antioxidante.

e) Método del N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) (Fogliano *et al.*, 1999). Método con reproducibilidad interensayo alta, útil para medios no lipídicos.

IV.5.-Cinética de reacción para la reducción de DPPH·

El 2,2 difenil-1-picrilhidrazil DPPH es un radical libre estabilizado por resonancia, gracias a los grupos fenil de su estructura, quienes soportan bien la deslocalización de electrones en los orbitales π del sistema, estabilizando así la carga negativa total. Esta sustancia en presencia de otra especie con disponibilidad de protones o grupos -OH, se reduce cambiando su coloración aparente del violeta a amarillo (García *et al.*, 2012) (Sagar y Singh, 2011). La reversibilidad de esta reacción es evaluada adicionando radical al sistema donde ya tenemos el DPPH-H reducido, esto incrementa el porcentaje de radical en solución, y la reacción se torna reversible una vez que se han agotado las sustancias con potencial antioxidante en el medio (Bondet, 1996). La ecuación que describe la reacción es:



Cuando se estudia la cinética los parámetros que se evalúan son la expresión de la velocidad de reacción que describe el sistema, la constante k de velocidad y las concentraciones (Bondet, 1996).

$$V = -dC_{\text{DPPH}}/(\sigma \times dt) \dots\dots\dots \text{Ec.2}$$

$$V = k \times C_{\text{DPPH}} \times C_{\text{AH}} \dots\dots\dots \text{Ec.3}$$

Donde k es la constante de velocidad, C son las concentraciones del radical y de las especies antirradicalarias, σ número de moles del DPPH.

Para este estudio se sabe que la reacción es de primer orden y que no es de carácter selectiva debido a que estamos trabajando con un extracto y sus fracciones por lo que la composición del sistema en cada caso es desconocido al momento de llevar a cabo este estudio. En vista de esto la ecuación de velocidad estará descrita por la ecuación de la recta $Y = kX + B$. Donde k es la constante de velocidad y B en punto de corte con el eje de las abscisas. Usando estos datos se determinará el comportamiento del sistema en cada caso y se compararán.

Las limitaciones reportadas para este ensayo están asociadas a decrecimientos en la absorbancia que presenta el DPPH a 517nm por razones de luz, pH, oxígeno disuelto, y tipos de solvente usados para la prueba (Sagar y Singh, 2011).

Estudios reportan la presencia de altos o variables (Calvo et al., 2013) niveles de antocianinas y elagintaninos en las moras tropicales de *Rubus adenotrichos* con elevada capacidad antioxidante (Acosta et al., 2010) (Martínez-Cruz et al., 2011).

IV.6.-Compuestos reportados para Rubus adenotrichos con potencial antioxidante

Estudios realizados con el fruto de *R. adenotrichos* han reportado la presencia de compuestos fenólicos tales como los glicósidos de quercetina y kaemferol. También son conocidos los ácidos gálico, caféico, cumárico, elagínico, felúrico y sus derivados, epicatequina, lambertanino C y sangiín H-6 (Mertz et al., 2007; Lee et al., 2012;

Azofeifa et.al., 2013), por lo que es posible que dichos extractos muestren algún potencial antioxidante.

IV.I.-Objetivo

- Evaluar la estabilidad o integridad fitoquímica en el tiempo del exudado secretado por *R. cf. adenotrichos* y el recolectado y almacenado por *H. stali*.

IV.II-Metodología

IV.II.1.-Análisis de la estabilidad química del exudado glandular de R. cf. adenotrichos y del exudado recolectado por H. stali.

Se utilizó la medición de la capacidad antioxidante junto con espectroscopia de infrarrojo como herramienta para determinar si ocurre transformación química del exudado proveniente de los tricomas y de aquel recolectado por el insecto. Ambas muestras se analizaron en paralelo con el propósito de compararlas en función del tiempo.

IV.II.2.-Recolección, extracción y análisis del exudado glandular glandular de R. cf. adenotrichos

La recolección y extracción del exudado glandular de la planta se hizo de la misma forma descrita en capítulos anteriores. Para cuantificar su capacidad antioxidante y realizar el análisis por espectroscopía de infrarrojo en función del tiempo, se colocó 1,44g del extracto obtenido con DCM con un rendimiento de 0,5% (de 288g de tallos),

en un balón de 100 ml manteniendo las mismas condiciones ambientales que se usaron para los insectos. Se estableció un esquema de intervalos de tiempo (24, 48, 96, 192 y 384 horas) en los que se realizarían los análisis de estabilidad del exudado tomando muestras en las cantidades necesarias para la determinación de la capacidad antioxidante y los estudios por espectroscopía de infrarrojo.

*IV.II.3.- Captura y mantenimiento de *H. stali* en el laboratorio*

Se realizaron visitas a La Llanada (2100 msnm, 8°36'N-71°10'W) en las cercanías de la ciudad de Mérida para recolectar los insectos a ser utilizados en los experimentos. Los especímenes fueron recolectados manualmente seleccionando los instares más avanzados de desarrollo (ninfas IV y V) que estaban posados sobre ejemplares de *R. cf. adenotrichos*. Fueron trasladados al laboratorio, donde se colocaron individualmente en jaulas de vidrio transparente (10cm x10 cm x 5 cm) mantenidas a $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 h. Para su alimentación se introdujo en las jaulas una pequeña pieza de algodón embebido con una solución de miel. Cada dos días se les suministró una larva del coleóptero *Tribolium castaneum*, para complementar con proteína su dieta. En esta etapa previa a los experimentos, los especímenes no tuvieron acceso a tallos de *R. cf. adenotrichos* para asegurar que cuando se transformaran en adultos sus patas estuvieran desprovistas de material pegajoso que pudiera interferir en los análisis. Una vez obtenidos un número suficiente de adultos, se clasificaron de acuerdo al sexo, según la forma de los últimos segmentos abdominales, siendo estos en el caso de los machos de forma redondeada en la terminal de su caja abdominal, y se mantuvieron separados. En todos los experimentos, salvo donde se exprese lo contrario, se emplearon hembras. Es conocido que son la hembras tienden a recolectar

mayor cantidad de exudado glandular que los machos (JL Ávila, datos no publicados), por lo que fueron utilizadas para obtener la mayor cantidad posible del exudado acumulado en sus patas.

*IV.II.4.-Recolección del exudado glandular almacenado por *H. stali**

A un grupo de 10 hembras de *H. stali* mantenidos en el laboratorio, se les suministraron segmentos de tallos de *R. cf. adenotrichos* para que colectaran el exudado glandular durante 9 horas. Seguidamente, se les retiró el material vegetal y se estableció un esquema de intervalos de tiempo (24, 48, 96, 192 y 384 horas) en los que se realizaron los análisis de capacidad antioxidante y análisis por IR del exudado glandular acumulado en las patas. Cuando se alcanzó el tiempo requerido para los análisis, se introdujeron un ejemplar en el congelador por un tiempo de 20 a 25 min para sacrificarlos. Seguidamente, se les disectaron las patas traseras, se registraron su peso y posteriormente se colocaron en un vial con un pequeño volumen de DCM para extraer el exudado recolectado o material pegajoso de las patas traseras con la ayuda de ultrasonido durante 1 min. Una vez que se extrajo el material, se pesaron nuevamente las patas para determinar la masa total recolectada.

La solución extraída fue llevada inmediatamente a análisis espectrofotométrico con el UV e IR usando los métodos que se describirán más adelante. Se emplearon dos hembras de *H. stali* para cada determinación.

IV.II.5.-Lavado de las patas traseras de H. stali sin exudado glandular almacenado

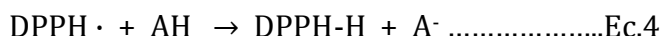
Este experimento no estaba contemplado dentro de los objetivos iniciales del presente trabajo y la necesidad de hacerlo surgió a partir de los resultados obtenidos en la sección anterior. El propósito fue estudiar la posibilidad de que *H. stali* contribuyera, a través de mecanismos propios, a que el material recolectado y acumulado en sus patas no se endureciera con el transcurrir del tiempo mediante la conservación de las propiedades antioxidantes del exudado glandular recolectado. Para esto se diseñó un ensayo en el que se usaron hembras y machos de *H. stali* que durante su fase como adultos los cuales nunca estuvieron en contacto con el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos*. A estos ejemplares se les disectó las patas traseras de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito y luego fueron lavadas por 30 seg con 0,2mL de diclorometano. El extracto obtenido se utilizó en el ensayo de actividad antioxidante descrito en la sección IV.9.7

IV.II.6.- Examen macroscópico y microscópico de las patas traseras de H. stali

Como una actividad adicional surgida de los resultados obtenidos en la sección anterior, se examinaron las patas traseras de las hembras de *H. stali* con la ayuda de una lupa estereoscópica (entre 7x y 45x de aumento, modelo SDZ-TR-PL; Kyowa Optical Company) y se hicieron registros fotográficos usando una cámara digital (modelo FMA050; AmScope Company) adaptada al ocular de la lupa. Adicionalmente, se aislaron algunas patas traseras y se conservaron en solución de Hoyer (Anderson, 1954) en portaobjetos, con la finalidad de transparentarlos y observarlos bajo el microscopio óptico (100x y 400x de aumento).

IV.II.7.-Medición de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), establecido y de uso rutinario (Goupy et al., 1999 y Ghosh, 1998). Dicho radical posee un electrón no apareado y presenta un color azul-violeta que cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante. Esta reacción puede ser seguida mediante un espectrofotómetro UV-visible a 517nm (UV-Vis, Hewlett-Packard, 8453). Para ello se prepara una solución metanólica de DPPH 6.10^{-2} mM que luego fue trasvasada a un frasco ámbar, para proteger la estabilidad del radical. Para análisis cuantitativo, se construye una curva patrón a partir de la medición de la absorbancia del radical DPPH a diferentes concentraciones. Después, una alícuota de 200 μ L de cada muestra se adicionó a 2,8mL de solución metanólica de DPPH. La reacción se sigue a 517nm después de una incubación por 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. A partir de la ecuación de la curva se determinó la concentración a la cual se redujo el DPPH. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. La reacción que describe la reducción del DPPH es:



El porcentaje de DPPH inhibido (% DPPH) fue calculado según la ecuación:

$$\% \text{ DPPH inhibido} = (\text{Ac} - \text{Am}) \times 100 / \text{Ac} \dots\dots\dots\text{Ec.5}$$

Donde Ac es la absorbancia del control, y Am es la absorbancia de la muestra. (Perico, 2011).

También se calculó el índice de estabilización del radical, por medio de la siguiente expresión:

$$\text{Índice de estabilización} = 100 * (\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra}) / \text{peso} \dots \dots \dots \text{Ec.6}$$

Una vez optimizado el método y estudiada la cinética de reacción del exudado proveniente de *R. cf. adenotrichos*, se procedió a repetir el estudio pero esta vez en paralelo con el insecto asociado *Heniartes stali*, con la finalidad de estudiar la integridad del exudado colectado y depositado en sus patas traseras, a partir de las 24 hasta las 384h de colección y comparar los resultados en función del tiempo. Los tiempos intermedios evaluados (48, 96, 192) fueron escogidos tomando en cuenta un aumento progresivo y el último tiempo de evaluación (384 h) se asoció el número promedio de días (16 días) que necesitan para incubarse los huevos de *H. stali* (Ávila-Núñez, observaciones no publicadas). Es en este período de tiempo en el que “convendría” a *H. stali*, en un contexto biológicamente adaptativo, que el material del exudado recolectado de *R. cf. adenotrichos* y que ha sido recolectado por las hembras y machos mantenga sus propiedades de pegajosidad, aportándoles una herramienta para la captura de las presas y también protección de los huevos frente a posibles ataques de depredadores y/o deshidratación.

Las muestras del exudado de la planta necesarias para estos análisis se obtuvieron a partir de tallos de *R. cf. adenotrichos* empleando el procedimiento ya descrito

anteriormente y dentro del mismo esquema de intervalos de tiempo usado para el insecto.

IV.II.8.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Para complementar el estudio de la estabilidad química del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos*, se realizó un estudio espectroscópico infrarrojo para el extracto proveniente del exudado de *R. cf. adenotrichos* y el colectado y almacenado por el insecto *H. stali* evaluados en los mismos tiempos de análisis del potencial antioxidante y se compararon los grupos funcionales presentes. Para la aplicación de esta técnica espectroscópica con las fracciones en fase líquida, se usó una placa de NaCl y DCM como solvente orgánico. Fueron realizados en un equipo Perkin Elmer 1725-X FTIR, en pastillas de KBr en la región de 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} , ubicado en el Laboratorio de Cinética y Catálisis cada uno de los extractos, tanto el proveniente de la planta como el que fue colectado por el insecto.

IV.III.-Resultados

IV.III.1.-Medición de la capacidad antioxidante

Las diez hembras tenían almacenado en sus patas traseras al momento de realizarse el experimento en promedio $1,54 \pm 0,66$ mg ($n= 10$) del exudado glandular proveniente de *R. cf. adenotrichos*. En la tabla IV.13, se observa en detalle las cantidades almacenadas del material recolectado que yacían en las patas traseras en cada una de las hembras en los tiempos establecidos para el análisis. Aunque pareciera que los insectos que fueron empleados a las 384 horas tenían menor cantidad de exudado, seguramente por el uso que hacían en la captura de presas en el transcurso de los días previos, el análisis estadístico indicó que los promedios no fueron diferentes ($p>0.05$; *Test* de Kruskal-Wallis). También pudo notarse, por tacto y por observación visual simple, que el exudado mantenía sus propiedades pegajosas (no había endurecimiento), sin un cambio perceptible en su coloración.

Tabla IV.2.- Masa de exudado glandular que permanecía almacenada en las patas traseras de hembras de *H. stali* en los diferentes tiempos de medición.

Tiempo (h) de realización del análisis	Masa colectada réplica 1 (mg)	Masa colectada réplica 2 (mg)
24	1,5	1,2
48	2,4	1,0
96	2,2	1,5
192	2,3	2,0
384	0,7	0,6

La respuesta colorimétrica de la reacción fue muy marcada de acuerdo a la procedencia de la solución de análisis, es decir, el extracto proveniente de la planta cambió de color en menor proporción que el extracto almacenado por el insecto (FiguraIV.1).

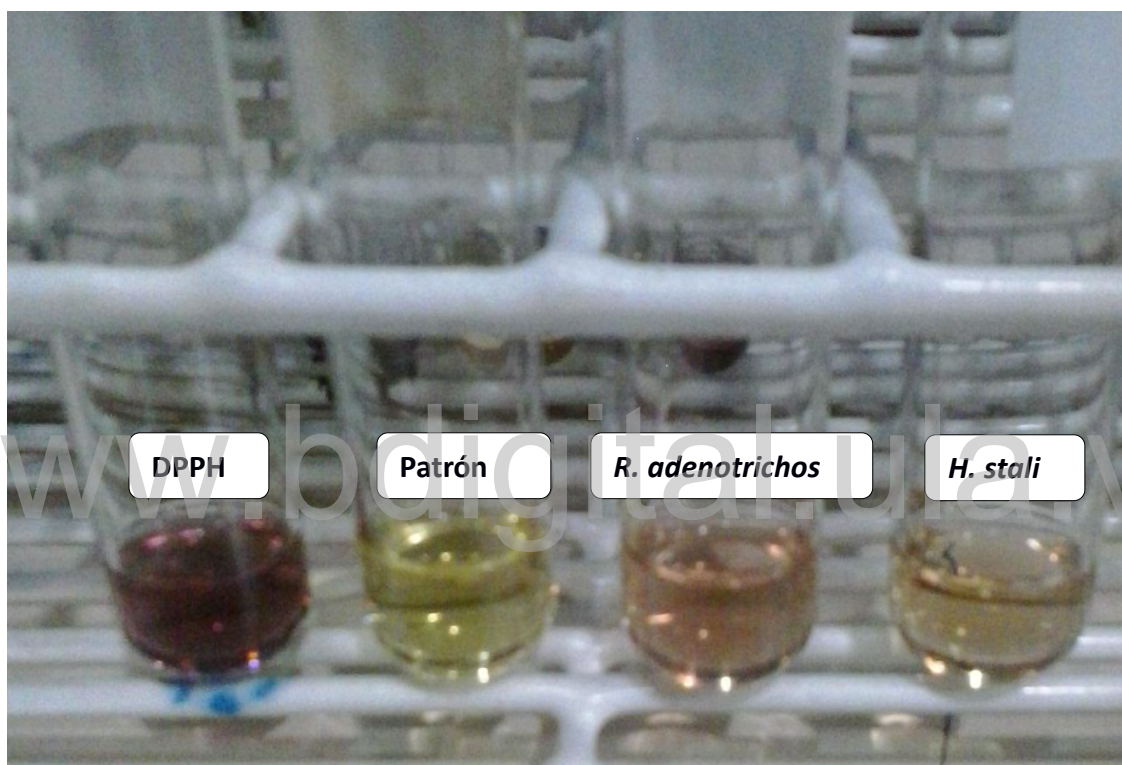


Figura IV.1.- Respuesta colorimétrica de la cinética de reducción del DPPH en presencia del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* proveniente de la planta y el colectado por el insecto *H. stali*.

A pesar de que el método de evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del DPPH radical ha sido muy bien estudiado y aplicado a una amplia variedad de especies vegetales, la experiencia en las pruebas realizadas en este trabajo arrojan diversas desviaciones que hacen del método poco confiable, al menos con la naturaleza de los extractos aquí obtenido. Las medidas de la absorbancia del DPPH• a los 30 minutos, tal y como se describe en el método, fueron muy divergentes, no pudiéndose alcanzar una reproducibilidad satisfactoria, lo que en principio debe ser un criterio para poder aplicar el método de una manera confiable.

Con este resultado en cuanto las dificultades de encontrar medidas reproducibles en las medidas de la absorbancia del DPPH, se decidió medir la cinética de reducción del DPPH, y de esta manera, se compara la propiedad antioxidante de los diferentes extractos, en función de la velocidad calculada de estas medidas cinética. De esta manera, cada valor reportado para una determinada muestra, proviene de la medición de la cinética de reacción, construida a partir de absorbancia en función del tiempo, calculando la pendiente de la curva construida de estas variables.

En relación con la comparación de la capacidad antioxidante se obtuvo que ambos extractos (Figura IV.2), tanto el de la planta como el almacenado por el insecto en sus patas traseras, presentaron un máximo de potencial antioxidante a las 24 h y un mínimo a las 48 h. En este apartado, debemos mencionar que para este estudio la cinética de la reacción de reducción del DPPH•, es decir, para cada condición se construye la ecuación de Absorbancia a 517 nm en función del tiempo, y del análisis de regresión lineal para una recta, se estima la velocidad de la reacción, representada

en este caso por la pendiente de dicha curva. De esta manera, cada punto de la Figura IV.2 representa un estudio cinético, y de cuyo análisis de regresión se estima la velocidad de reacción bajo las condiciones y tiempo específicos.

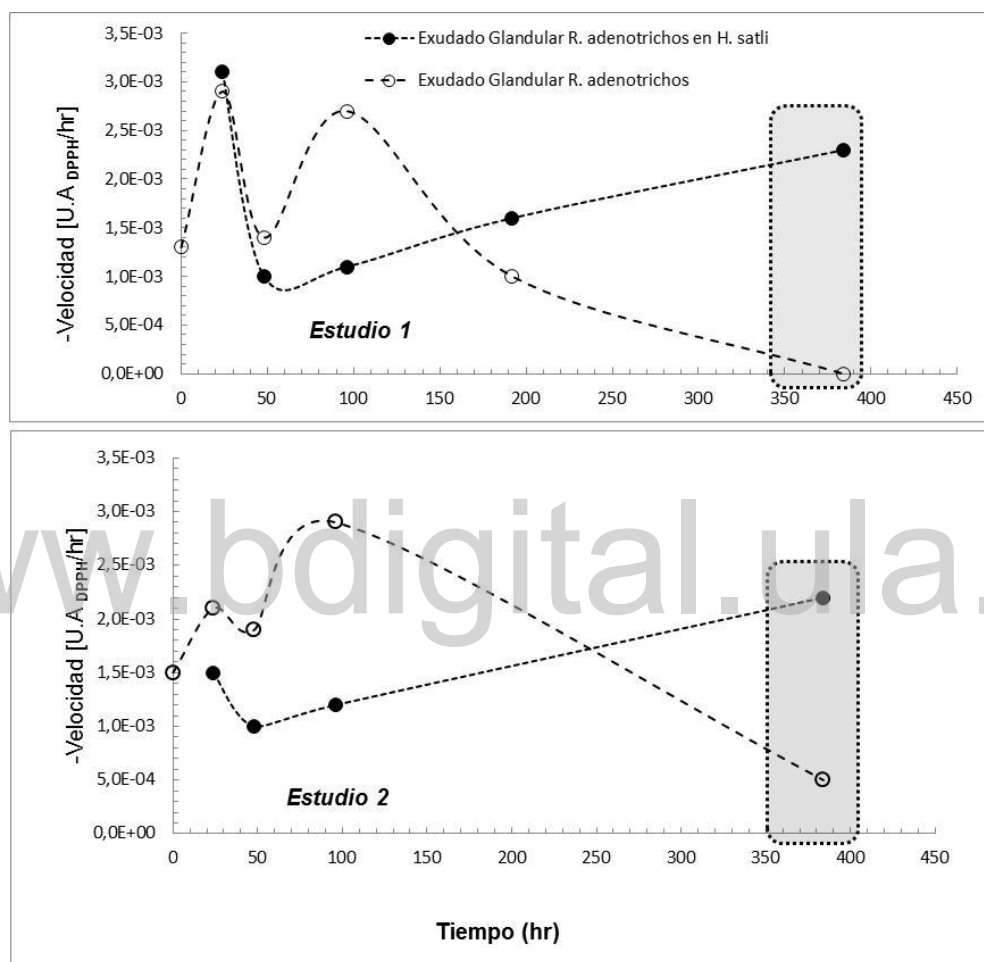


Figura IV.2.- Cinética de reducción del DPPH en presencia del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* a diferentes tiempos de extracción y colección por hembras de *H. stali*.

Después de las 48 horas, ambos extractos mostraron patrones divergentes en la actividad antioxidante. El extracto glandular sin contacto con los insectos disminuyó marcadamente hasta cero (réplica 1) o cercano a cero (réplica 2). En contraste, el exudado glandular que fue recolectado y almacenado en las patas por los insectos, exhibió un aumento progresivo de la capacidad antioxidante hasta valores cercanos a los máximos observados las primeras 100 horas del análisis. En estas primeras 100 horas ocurren variaciones en las capacidades oxidantes tanto en el extracto glandular solo como el de las patas que introducen complejidad en el análisis. Dado que los valores de la velocidad mostrados por ambos extractos en este período de tiempo son del mismo orden de magnitud, pudiera ocurrir que no sean significativamente diferentes. Es necesario que en futuros estudios los análisis puedan hacerse con un mayor número de réplicas para tener una mejor apreciación de este comportamiento. No obstante, se pueden resaltar tres aspectos importantes derivados de este análisis preliminar de la interacción química entre *H. stali* y *Rubus cf. adenotrichos*:

1. El exudado glandular de esta planta, una vez que fue extraído y mantenido en condiciones del laboratorio, perdió su capacidad antioxidante al transcurrir el tiempo.
2. El exudado glandular recolectado por *H. stali* y almacenado en sus patas, mantuvo su capacidad antioxidante y sus propiedades pegajosas durante el tiempo establecido para las observaciones. En el caso de su capacidad pegajosa, por inspección visual y sensación al tacto.

3. La capacidad antioxidante de las hembras parece ser mayor que la registrada para los machos, tal como lo muestran las curvas de velocidad de reducción del DPPH en la Figura IV.3.

La posibilidad que el insecto estuviera aportando sus propios sistemas antioxidantes puede ser sustentada por la evaluación de actividad antioxidante realizado a extractos obtenidos del lavado de las patas de los insectos (hembras y machos, ambos suelen recolectar el exudado) sin contacto con extracto glandular (Figura IV.3) y también por la presencia abundante de poros en el área donde se almacena el exudado recolectado que pudieran secretar alguna sustancia con poder antioxidante (Figura IV.3). Las diferencias en la capacidad antioxidante entre machos y hembra podría deber a una respuesta adaptativa, puesto que, aunque ambos sexos recolectan exudado, las hembras lo hacen en mayor cantidad pues deben usarlo para una función biológica que no tienen los machos, como es la oviposición.

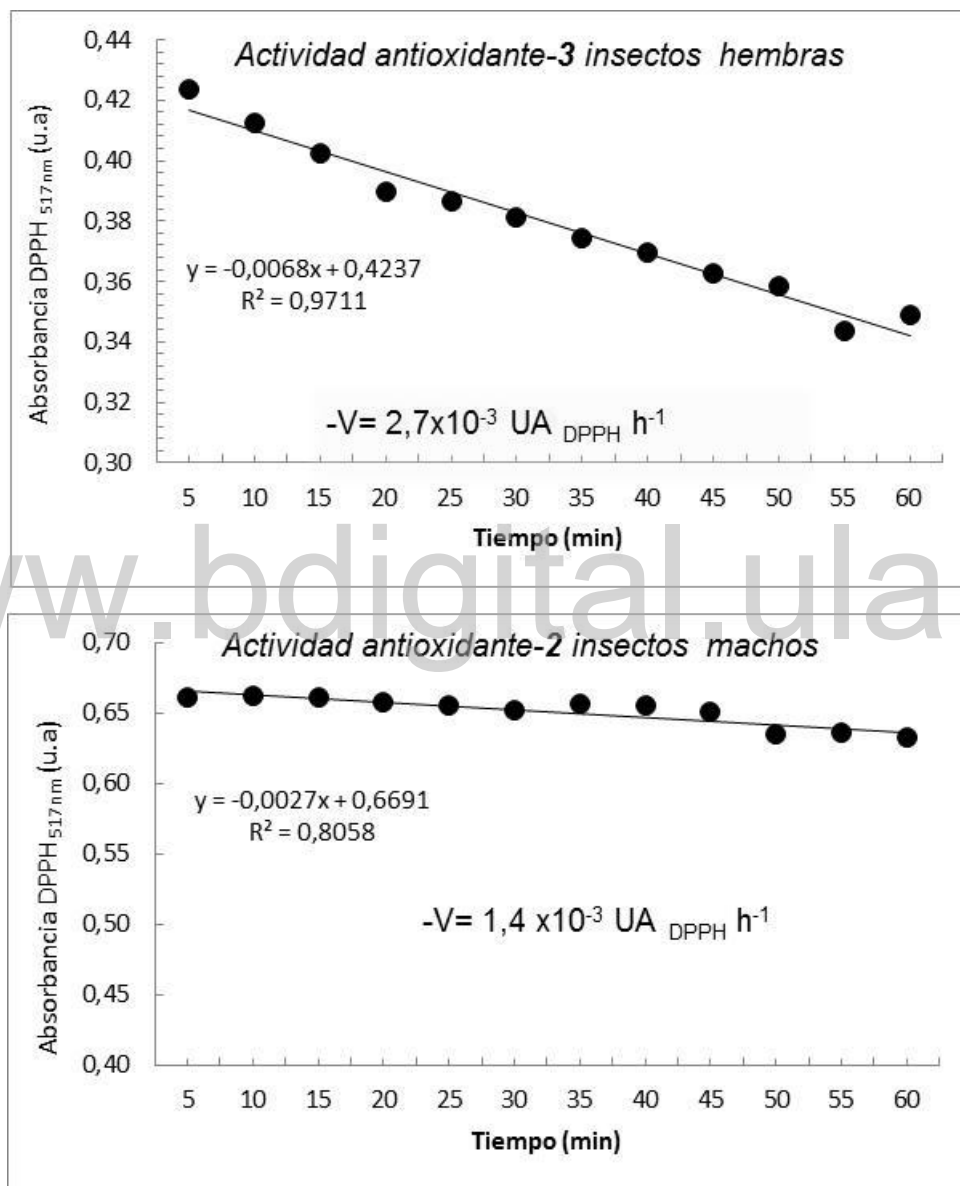


Figura IV.3.- Evaluación de la cinética de reacción de reducción del DPPH del lavado de las patas traseras de *H. stali* sin exudado glandular almacenado.

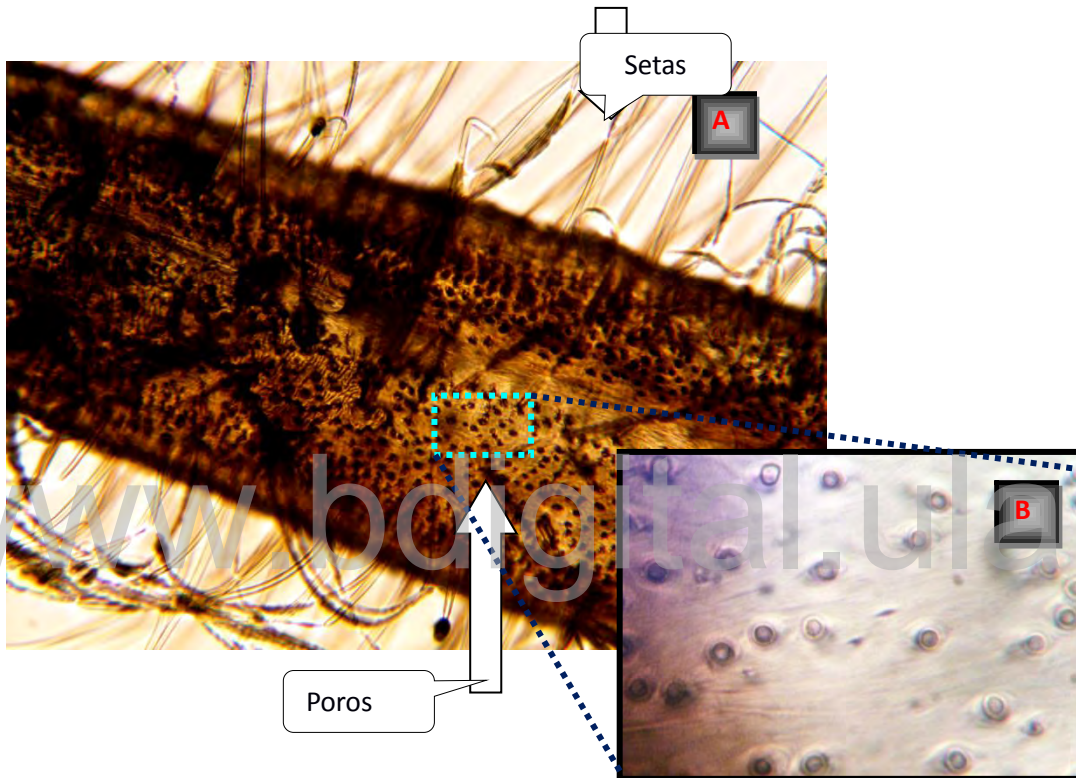


Figura IV.4.- Micrografías de la tibia posterior de una hembra de *H. stali*. **A.** Sección mostrando la abundancia de setas y poros en el área donde se acumula el exudado glandular recolectado de *R. cf. adenotrichos* (aumento 100 x). **B.** Acercamiento donde se aprecian los poros a través de los cuales *H. stali* secreta un posible exudado que potencia las propiedades antioxidantes del exudado glandular (aumento 400x).

IV.III.2.-Examen macroscópico y microscópico de las patas traseras de H. stali

Se pudo observar que las tibias posteriores de las hembras de *H. stali* poseían abundantes setas largas, delicadas y decumbentes en el aérea donde almacenan el exudado recolectado de los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos* (Figura IV.4). También se pudo notar la presencia en esta área de estructuras similares a pequeños poros que la cubrían profusamente. Estos poros tenían la apariencia de aberturas circulares con un margen exterior y otro interior ligeramente más engrosado.

Esta observación, novedosas en el campo de morfología y estudio anatómico de *H. stali*, y no reportadas a la fecha, sirve de base para sustentar la posibilidad de que estos poros sean las aberturas por las cuales se exponga algún tipo de secreción con actividad antioxidante que explicaría la mayor capacidad antioxidante observada en el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* almacenado en las patas del insecto y también las propiedades antioxidantes del lavado obtenido de las patas sin exudado acumulado (Figuras IV.2 y IV.3).

Es conocido que los insectos poseen un grupo de de enzimas y compuestos de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes que pueden actuar en conjunto para responder a la amenaza de oxidantes adquiridos con la dieta o producidos endógenamente (Felton y Summers 1995).

Al igual que en otros animales, el principal mecanismo de defensa en insectos respecto a la oxidación incluye un grupo de enzimas antioxidantes representadas por la dismutasa de superóxido de (DSO), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GSTPX), glutatión reductasa (GR) y DT-diaforasa (Ahmad 1992). Por ejemplo, la actividad de la

DSO forma parte importante de la respuesta antioxidante en la hemolinfa y secreciones defensivas en algunas especies de coleópteros (Gretschler 2016).

También se ha reportado actividad antioxidante de compuestos no enzimáticos. Estudios han revelado la presencia de fenólicos totales y flavonoides en extractos acuosos de la glándulas salivales de la termita *Macrotermes bellicosus* (Thierry et al. 2015) y de carotenoides obtenidos por insectos herbívoros a partir de plantas ricas en estos compuestos antioxidantes (Heath et al. 2013; The role of carotenoids and their derivatives in mediating).

H. stali forma parte del grupo de reduvídeos conocidos como “resin bugs” o chinches de las resinas (Hemiptera: Reduviidae: Apiomerini) caracterizados por el comportamiento de recolectar y almacenar resinas y gomas de origen vegetal para luego usarlas en actividades de depredación y protección de los huevos (Choe y Rust 2007; Forero et al. 2011; Avila-Núñez et al. 2017). Sin embargo, a pesar de la evidente utilidad de estas resinas pegajosas, ellas tienden a endurecerse rápidamente debido a la evaporación de volátiles y por polimerización oxidativa (Philips y Croteau 1999). A pesar de ello, se ha observado que especies del chinche *Apiomerus* tienen la capacidad de almacenar sustancias vegetales pegajosas sin que lleguen a endurecerse. Se ha propuesto la existencia de glándulas en las áreas donde acumulan las resinas que serían las responsables de prevenir la solidificación del material resinoso en la mayoría de los géneros de Apiomerini (Forero et al. 2011). No obstante, la naturaleza química y los mecanismos de funcionamiento de estas sustancias permanecen desconocidos. En el caso de la asociación de *H. stali* con *R. cf. adenotrichos* puede proponerse que el exudado recolectado mantiene sus propiedades adhesivas sin llegar

a endurecerse debido a su propia composición rica en compuestos antioxidantes que cuando es almacenado en las patas del insecto que lo recolecta, esta capacidad de no endurecerse se hace aún mayor debido, posiblemente, al aporte de sustancias antioxidantes secretadas por el propio insecto. Estos resultados abren nuevos caminos de investigación para la comprobación de tal hipótesis.

IV.III.3.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Complementando el estudio de la integridad del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos*, se realizó un estudio espectroscópico infrarrojo para cada uno de los extractos, tanto el proveniente de la planta como el que fue colectado por el insecto. Se tomaron espectros de IR de los extractos a los mismos tiempos del análisis antioxidante y se realiza un análisis de inferencia de grupos funcionales, obteniéndose en todos los casos los mismos picos que se describen en la tabla IV.14. Según este análisis, aparentemente no ocurren cambios estructurales en la composición del exudado glandular que generen señales que puedan ser diferenciados en los espectros de IR durante los 16 días o 384 h que corresponde al tiempo máximo de incubación de los huevos del *H. stali*. (Figura IV.6 y tabla IV.3). Así mismo se mantiene en el tiempo las características de los grupos funcionales para el exudado glandular colectado y almacenado por el insecto (Figura IV.4 y tabla IV.4).

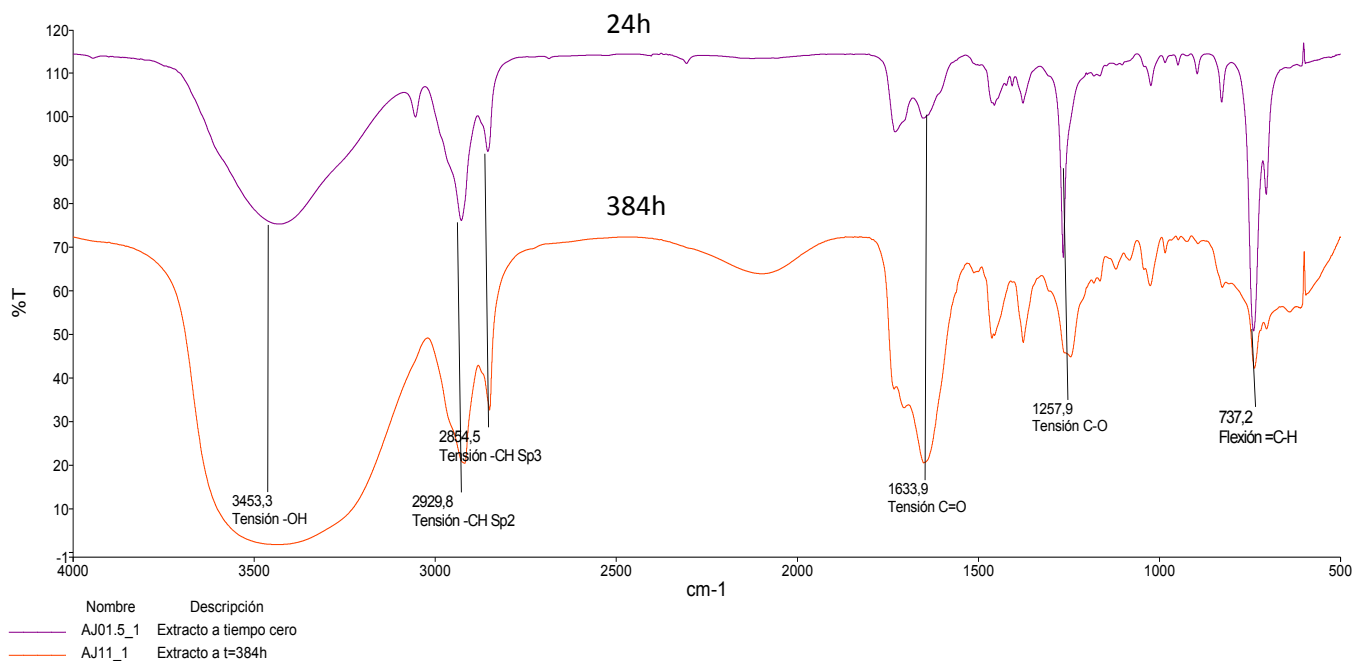


Figura IV.5.- Espectro IR del extracto proveniente de la especie vegetal *R. cf.*

adenotrichos evaluado en los mismos tiempos de análisis del potencial antioxidante.

Tabla IV.3.- Principales grupos funcionales según el análisis por espectroscopia de Infrarrojo del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* en el tiempo:

Longitud de Onda (cm⁻¹)	3453,3	2929,8	2854,5	1633,9	737,2
Inferencia	Tensión - OH	Tensión CH- Sp ²	Tensión CH- Sp ³	Tensión C-O	Flexión =C-H

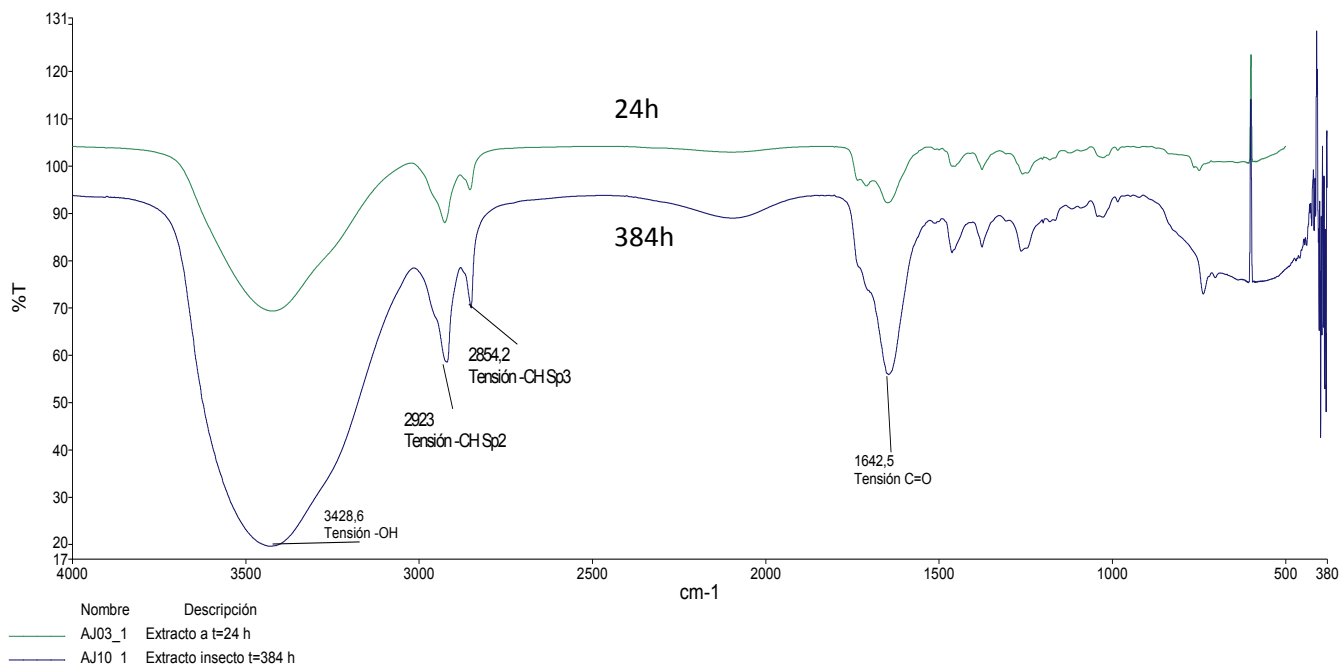


Figura IV.6.- Espectro IR del extracto proveniente de la especie vegetal *R. cf.*

adenotrichos colectado y almacenado por el insecto *H. stali* evaluados en los mismos tiempos de análisis del potencial antioxidante.

Tabla IV.4.- Principales grupos funcionales según el análisis por espectroscopia de Infrarrojo del exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* en el tiempo:

Longitud de Onda (cm⁻¹)	3428,6	2923	2854,2	1642,5
Inferencia	Tensión - OH	Tensión CH- Sp ²	Tensión CH- Sp ³	Tensión C-O

IV.IV.-REFERENCIAS

Acosta O.; Vaillant F.; Cozzano S.; Mertz C.; Pérez A. y Castro M. (2010). **Phenolic content of antioxidant capacity of tropical Highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schultdl.) during three edible maturity stages.** Food Chemistry 119: 1497-1501.

Ahmad S. 1992. **Biochemical defense of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects.** Biochem Syst Ecol 20: 269-296.

Ahmad S. (1992). Biochemical Defence Pro-oxidant Plant Allelochemicals by Herbivorous Insect. Ecology Review Paper. 4: 269-296.

Atarashi M., Manabe Y., Kishimoto H., Sugawara T. y Osakabe M. (2017) **Antioxidant Protection by Astaxanthin in the Citrus Red Mite (Acari: Tetranychidae).** Environmental Ecology. 10:1093.

Avila-Núñez JL, Naya M, Otero LD, Alonso-Amelot ME. 2016. **A resin bug (Reduviidae: Harpactorinae: Apiomerini) harvesting the trichome secretion from an Andean blackberry.** *Neotropical Biodiversity* 2:151-158.

Avila-Núñez JL, Naya M, Otero LD, Alonso-Amelot ME. 2017. **Sticky trap predation in the neotropical resin bug *Heniartes stali* (Wygodzinsky) (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae).** *Journal of Ethology* 35:213-219.

Azofeifa G.; Quesada S.; Bourdard F.; Morena M.; Cristol J.; Pérez A. y Vaillant F. (2013). **Antioxidant and Anti-inflammatory in Vitro Activities of Phenolic Compounds**

from Tropical Highland Blackberry (*Rubus adenotrichos*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 5798–5804.

Barja G. (*). **Monografía IV. Bioquímica y fisiopatía del estrés. Radicales Libres y Antioxidantes.** Departamento de Biología Animal II. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. España.
<http://analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/367/384> (7/02/2017).

Benzie IF. Y Strin JJ. (1996). **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.** Analytical Biochemistry 239(1): 70-76.

Birur r., Yarappa R., Rajan S., Ganapathy S., Surendranath A., Lakkappa B. (2015). **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF INSECT GALL EXTRACTS OF *PISTACIA INTEGERRIM*.** Acta Scientiarum Polonorum. 10: 17306.

Bondet V., Brand-Williams W. y Berset C. (1997). **Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH· Free Radical Method.** Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 30:609-615.

Calvo L.; Syed D.; Chamcheu J.; Vilela F.; Pérez A.; Vaillant F. y Rojas M. (2013). **Protective Effect of Tropical Highland Blackberry Juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) Against UVB-Mediated Damage in Human Epidermal Keratinocytes and in a Reconstituted Skin Equivalent Model.** Photochemistry and Photobiology 89(5): 1199-1207.

Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J y Vacanti CA. (1997) **Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered**

cartilage in the shape of a human ear. Plastic and Reconsgructive Surgery 100(2):297-302.

Choe DH, Rust M. 2007. **Use of plant resin by a bee assasin bug, *Apiomerus flaviventris* (Hemiptera: Reduviidae).** Ann. Entomol. Soc. Am. 100: 320-326.

Dai y Mumper . 2010. **Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.** Molecules 15:7313-52.

Duracková Z. 2014. **Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts.** En: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Ismail Laher (ed.). Springer Heidelberg New York Dordrecht London.

Felton GW; Summers CB. 1995. **Antioxidant Systems in Insects.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology 29:187-197.

Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. (1999). **Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines.** Journal of Agricola and Food Chemistry 47(3):1035-40.

Forero D, Choe DH, Weirauch C. 2011. **Resin gathering in neotropical resin bugs (Insecta:Hemiptera:Reduviidae):** Functional and Comparative Morphology. J. Morphol. 272: 204-229.

García J., Oldoni T, Alencar S., Reis A., Longuercio A. y Grande R. (2012). **Antioxidant Activity by DPPH assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth.** Brazilian Dental Journals. 23(1):22-27.

Goupy P, Hugues M, Boivin P, y Amiot M., (1999). **Antioxidant composition and activity of barley(Hordeum vulgare) and malt extracts and of isolated phenolic compounds** Journal of the Science of Food and Agriculture 79:1625-1634.

Gretsch R., Streicher P, Strauß A., Wielsch N., Stock M., Wang D., Boland W. y Burse A. (2016) **A common theme in extracellular fluids of beetles: extracellular superoxide dismutases crucial for balancing ROS in response to microbial challenge.** Scientific Report. 6: 24082.

Gretsch RR; Streicher PE; Anja Straub; Wielsch N; Stock M; Wang D; Boland W; Burse A. 2016. **A common theme in extracellular fluids of beetles: extracellular superoxide dismutases crucial for balancing ROS in response to microbial challenge.** Scientific Reports 6:1-13.

Heath JJ; Cipollini DF; Stireman JO. 2013. **The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment.** Arthropod-Plant Interactions 7:1–20.

Jiménez A.M., Sanchez M. y Martinez M. (2012). **Optimización del método captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café.** Anales de veterinaria de Murcia 28:67-78.

Kähkönen M.; Hopia A.; Rauha J.; Pihlaja K.; Kujala T. y Heinonen M. (1999). **Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds.** Journal Agriculture Chemistry 47: 3954-3962.

Kilgour J; Roberts R. 2014. **Pathophysiological Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. En: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Ismail Laher (ed.). Springer Heidelberg New York Dordrecht London.

Lee J, Dossett M y Finn C. 2012. **Rubus fruits phenolic research: The good, the bad and the confusing**. *Journal Food Chemistry*. 130: 785-796.

Markovic V., (1989). **La química de las radiaciones, una rama poco conocida de la ciencia**. Boletín del OIEA. Nro 1. 27:21-23.

Martinez J. (2007). **Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helioctopus terebinthinaceus***. Trabajo especial de grado. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajapan de León. Oaxaca México.

Martínez N.; Arévalo K.; Verde M.; Rivas C.; Oranday A.; Nuñez M. y Morales M. (2011). **Antocianinas y Actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichos* Schtdl (zarzamora)**. *Revista Mexicana de Ciencias FARMACÉUTIC* 42(4): 66-71.

Martínez-Flórez S; González-Gallego J; Culebra JM; Tuñón MJ. 2002. **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. *Nutr. Hosp.* XVII: 271-278.

Mertz C., Cheinier V, Gûnata Z., y Brat P. (2007). **Analysis of Phenolic Compounds in two Blackberry Species (*Rubus glaucus* an *Rubus adenotrichus*) by High-Perfomance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8616-8624.

Orjuela A., (2015). **DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE HOJAS DE *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson.** Trabajo especial de grado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá Colombia. P: 8-24.

Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. (2009). **Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism.** Free Radical Biology and Medicine. 46: 1109-1118.

Peréz R.M., Vargas R., Martínez F.J., García E.V., Hernández B., 2003. **Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*.** Estudio sobre seis métodos de análisis. Ars Pharmaceutica 44:1.

Perico L. (2011). **Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (*Stereocaulaceae*) y *Lobariella pallida* (*Lobariaceae*) y determinación de su potencial citotoxicidad.** Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Bogotá-Colombia 199 p.

Phillips MA; Croteau RB.1999. **Resin-based defenses in conifers.** Trends in Plant Science. 4:184-190.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice-Evans C. (1999) **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radical Biology & Medical 26:1231-1237.

Sagar B y Singh R. 2011. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.** Journal Food Science and Technology.48(4):412-422.

Schoonhoven LM; Van Loon JJ; Dicke M. 2005. **Insect-Plant biology.** 2nd. Edition. Oxford University Press.

Seabrooks L. y Hu L. (2017). **Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products.** Acta Farmaceutica Sinica B. 10.

Simoneit BRT; Medeiros PM; Wollenweber E. 2008. **Triterpenoids as Major Components of the Insect-Trapping Glue of *Roridula* Species.** Z. Naturforsch 63c: 625-630.

Stavridis JC. 2008. Oxidation: **The Cornerstone of Carcinogenesis.** Springer Science.

Tasaki E., Kobayashi K., Matsuura K. y Iuchi Y. (2016). **An Efficient Antioxidant System in a Long-Lived Termite Queen.** PLOS ONE. 10: 1371.

Thierry K, Kouadio Y, Dan CG, Gonnetty TJ, Gnanoui S, Loukou YG, Kouamé LP. 2015. **Antioxidant Activity of the Major Soldier Salivary Glands Extracts of the Termite *Macrotermes bellicosus*.** International Journal of Science and Research 5: 453-456.

Thierry K., Kouadio, CG D., TJ G., Sophie G., YG L., LP1 K. (2015) **Antioxidant Activity of the Major Soldier Salivary Glands Extracts of the Termite *Macrotermes bellicosus*.** International Journal of Sciences and Research. 5:11.

Tureck C; Stintzing FC. 2013. **Stability of Essential Oils: A Review.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 12: 40-53.

Vidhu V. y Evans D. (2015). **Ethnoentomological values of *Oecophylla smaragdina* (Fabricius)**. Current Science. 109:3.

Walker A., Weirauch C., Fry G. y King G. (2016). **Venoms of Heteropteran Insects: A Treasure Trove of Diverse Pharmacological Toolkits**. Toxins 8:43.

Zielinska E., Karas M. y Jakubczyk A. (2016). **Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects**. International Journal of Food Sciences and Technology. 10:1111.

www.bdigital.ula.ve

IV.V.-GLOSARIO IV

Dismutación: o desproporción a toda reacción de reducción-oxidación donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido cuando la suma de potenciales de los correspondientes pares redox es mayor de 0.

Fotosensibilidad: es una respuesta exagerada a la luz, generalmente luz solar, que se manifiesta minutos, horas o días después de la exposición y puede persistir durante un tiempo variable. La reacción aparece solo en las regiones expuestas a la luz. Se produce por sustancias que, previamente, han de haber sufrido fotoactivación, por absorción de la energía fotónica. Las reacciones de fotosensibilidad pueden ser causadas por agentes endógenos o exógenos:

- Agentes endógenos: moléculas del organismo, habituales en la piel, o bien que se acumulen en ella como consecuencia de una alteración metabólica, como ocurre en el caso de las porfirias, trastornos que cursan con un cúmulo de porfirinas, agentes endógenos fototóxicos.
- Agentes exógenos: medicamentos y otros productos químicos. Pueden acceder a la piel por vía tópica o sistémica.

Inespecífico: no específico, no tiene carácter propio ni exige una adaptación a normas generales.

Quimiotaxis: fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Transgénicos: célula de bacteria, animal o planta que ha sido modificada genéticamente.

Enzima: sustancia producida por las células vivas que actúa como catalizador en los procesos metabólicos.

www.bdigital.ula.ve

VI.-CONCLUSIONES

1. El estudio de los rasgos morfológicos de *R. cf. adenotrichos* proveniente de la zona de Monterrey (El Valle, Mérida) permitió caracterizar los especímenes objetos de nuestro estudio. Algunas de estas características coincidieron con las señaladas en la literatura para *Rubus adenotrichos* proveniente de otras áreas de Los Andes venezolanos, sin embargo, puesto que no existe una revisión taxonómica reciente del género *Rubus* para esta región, se prefirió seguir conservando la denominación *R. cf. adenotrichos*. El estudio morfológico de los tricomas glandulares en *R. cf. adenotrichos* reveló que son estructuras secretoras con una anatomía particular que no está relacionada con la morfología típica de un tricoma glandular descrita en la literatura especializada.
2. El aislamiento de los compuestos mayoritarios por cromatografía en columna logró obtener fracciones que mostraron actividad fitotóxica diferencial, evidenciándose un eficiente agrupamiento de compuestos durante el proceso de separación cromatográfica. De esta manera, se pudo seguir un aislamiento guiado por pruebas fitotóxicas, donde se mostró la presencia de compuestos de naturaleza polifenólica. Esta característica coincide con la riqueza de compuestos de la misma naturaleza encontrado por otros autores en los frutos de *R. adenotrichos* y otras especies del mismo género. Las familias de metabolitos identificadas incluyeron sesquiterpenos y triterpenos tetracíclicos con esqueleto del dammarano, entre otros.

3. La exploración inicial sobre la actividad antifúngica indicó que el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* no mostró ser activo contra *Cándida albicans* bajo las condiciones estudiadas.
4. El exudado glandular de esta planta perdió su capacidad antioxidante al transcurrir el tiempo. En contraste, el exudado glandular recolectado por *H. stali* y almacenado en sus patas mantuvo su capacidad antioxidante y sus propiedades pegajosas durante el tiempo de las observaciones. Estos resultados parecen indicar que el insecto contribuye con mecanismos propios a mantener las propiedades antioxidantes del exudado recolectado. El hallazgo de que el exudado glandular mantiene sus propiedades pegajosas al impedir su oxidación y eventual endurecimiento, es un resultado interesante de resaltar, puesto que esta propiedad le confiere a *H. stali* la posibilidad de utilizarlo como una herramienta en la captura de las presas y protección de los huevos.

VII.-RECOMENDACIONES

1. Es necesario continuar los estudios estructurales más profundos de los tricomas glandulares de *R. cf. adenotrichos*. Se sugiere el uso de microscopía electrónica de barrido, para conocer más detalles de su anatomía.
2. Se recomienda profundizar la identificación química estructural de los compuestos presentes en el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* empleando técnicas con mayor poder de separación e identificación, como por ejemplo CG-EM.
3. Se sugiere realizar bioensayos con un mayor número de especies de hongos para profundizar en el estudio la posible protección que el exudado glandular de *R. cf. adenotrichos* pudiera aportar a los huevos de *H. stali*.
4. Sería interesante profundizar las pruebas de actividad fitotóxica del exudado contra especies que crecen junto a *R. cf. adenotrichos*. También realizar bioensayos de lixiviados foliares de *R. cf. adenotrichos*, para evaluar el efecto sobre estas especies. Esto permitiría determinar la existencia de mecanismos ecológicamente válidos de translocación de metabolitos del exudado glandular al ambiente y su potencial interferencia en la población vegetal que coexiste con *R. cf. adenotrichos*.