



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN QUÍMICA ENTRE  
*Ceroplastes albolineatus* (Coccidae) Y SU PLANTA  
HOSPEDERA *Pittocaulon praecox* (Asteraceae).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. JUAN CAMILO MARÍN LOAIZA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. CARLOS LEONARDO ARMANDO CÉSPEDES ACUÑA**



**MÉXICO, D.F.  
2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Carlos L. Céspedes Acuña por el apoyo incondicional para la conclusión de este proyecto, por su fe inquebrantable en que todo iba a salir bien y por encima de todo por brindarme su amistad. Mil gracias.
- Ich möchte Prof. Dr. Thomas Hartmann für seine großartige Hilfe, Anregungen und Ideen danken. Vielen Dank, ich werde immer dankbar für diese unschätzbare Unterstützung sein.
- Großer dank gebührt auch Claudine Theuring für ihre Unterstützung, für alles was sie mir über PA beigebracht hat, ihre Freundschaft und für die schöne Zeit die wir zusammen gearbeitet haben. Danke ist nicht genug.
- Vielen dank an Dr. Till Beuerle für seine Freundschaft und seine Hilfe zu jeder Zeit. Zusätzlich vielen dank an seine liebenswerte Familie für die großartigen Momente die wir zusammen erlebt haben.
- Ich möchte besonders Prof. Dr. Ludger Ernst erwähnen, der mich in der NMR-Analyse unterstützt und mir mit seiner positiven Einstellung bei meinen “last minute“ Problemen geholfen hat.
- Zum Schluß bedanke mich beim Personal des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig für die freundliche Aufnahme. Besonders bei Loretta Heise, Rainer Lindigkeit and Dietrich Ober.
- A la Dra. Regina Montero del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por haberme abierto las puertas de su laboratorio y brindarme su apoyo en la realización de este trabajo a través del comité tutorial. Asimismo a todo el personal que trabaja con ella.
- Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química de la UNAM por brindarme su apoyo en la realización de este trabajo a través del comité tutorial.
- Al Dr. Mark Olson del Instituto de Biología de la UNAM, por la identificación de las especies y brindarnos la información botánica concerniente al género *Pittocaulon* y los lugares de recolección de las especies.
- Al M. En C. Antonio Nieto Camacho (Toño) del Instituto de Química de la UNAM por su gran amistad y colaboración en la realización de las pruebas de actividad antioxidante.
- A las Dras. Margarita Canales y Tzasná Hernández de la UBIPRO, FES Iztacala-UNAM por realizar las pruebas de actividad antimicrobiana y su disposición a colaborar en todo momento.

- A la Dra. Patricia Dávila Aranda de la UBIPRO, FES Iztacala-UNAM por su colaboración en la recolección de las plantas.
- Al Dr. Víctor Manuel Dávila del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por estar siempre dispuesto a colaborar, a pesar de sus múltiples tareas.
- A la UNAM por el apoyo económico otorgado a través del proyecto DGAPA-PAPIIT IN211105-3 y la beca doctoral del DGEF (01-febrero-2005 a 01-enero-2007).
- Al DAAD por el apoyo económico otorgado a través de una beca de estancia corta en el Instituto de Biología Farmacéutica de la Universidad Técnica Carolo Wilhelmina de Braunschweig, Alemania.
- A la Dra. Mariana Domínguez por su gran amistad, por ser tan buena compañera y persona. Que el futuro te depare muchos éxitos.
- A Lina Andrea Rivillas, “chiquiloca”, quien siempre estuvo a mi lado, me aconsejó y animó en los momentos difíciles, y sobretodo por que siempre me dio todo su amor. Te deseo siempre lo mejor, a mi lado por supuesto. Te amo.
- Al comité evaluador de esta tesis conformado por la Dra. Ana Luisa Anaya y los Drs. Manuel Jiménez Estrada, Ricardo Reyes Chilpa, José Guillermo Ávila Acevedo y Francisco Javier Espinosa García por sus sugerencias y comentarios.

## ÍNDICE TEMÁTICO

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1 Alkaloides pirrolizidínicos (APs).....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1.1 Distribución.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1.2 Estructura química.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1.3 Biosíntesis de necinas.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.1.3.1 Bases nécicas: Otonecina.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.1.4 Biogénesis de ácidos nécicos.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.1.5 Producción, transporte y almacenamiento.....</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>2.1.6 Toxicidad.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2.1.6.1 Mecanismo de toxicidad.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.1.7 Metabolismo.....</b>   | <b>22</b> |
| a) Metabolismo de los APs Pro-tóxicos.....  | 22        |
| b) Metabolismo de los APs no tóxicos (1, 2-saturados).....                                      | 24        |
| <b>2.1.8 Química ecológica.....</b>   | <b>25</b> |
| • Orden Lepidoptera.....  | 26        |
| • Orden Coleoptera.....   | 29        |
| • Orden Ortoptera.....  | 31        |
| • Orden Homoptera.....  | 32        |
| • Orden Hemiptera.....  | 33        |
| <b>2.1.9 Mecanismos de secuestro y desintoxicación de APs<br/>            por insectos.....</b> | <b>34</b> |

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>3. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.1 Género <i>Pittocaulon</i></b><br>(subtribu <i>Tussilaginatae</i> , tribu <i>Senecioneae</i> , <i>Asteraceae</i> )..... | <b>42</b> |
| <b>3.1.1 Descripción Botánica.....</b>  | <b>44</b> |
| Género <i>Pittocaulon</i> Rob & Brett.....  | <b>45</b> |
| a) <i>Pittocaulon bombycophole</i> .....  | <b>46</b> |
| b) <i>Pittocaulon filare</i> (Mc Vaugh).....  | <b>48</b> |
| c) <i>Pittocaulon hintonii</i> Rob & Brett.....   | <b>50</b> |
| • <i>Pittocaulon hintonii</i> var. <i>hintonii</i> .....  | <b>51</b> |
| d) <i>Pittocaulon praecox</i> Rob & Brett.....  | <b>52</b> |
| e) <i>Pittocaulon velatum</i> Rob & Brett.....  | <b>54</b> |
| • <i>P. velatum</i> (Greenm) Rob & Brett. var. <i>velatum</i> .....   | <b>55</b> |
| <b>3.1.2 Estudios químicos realizados en el género <i>Pittocaulon</i>.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>3.2 <i>Ceroplastes albolineatus</i> (Coccidae: Homóptera).....</b>   | <b>58</b> |
| <b>3.2.1 Orden Homóptera, Familia Coccidae.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>3.2.2 Género <i>Ceroplastes</i> Gray.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.2.3 <i>Ceroplastes albolineatus</i> Cockerell.....</b>   | <b>63</b> |
| a) Ciclo biológico del insecto <i>Ceroplastes albolineatus</i> .....  | <b>64</b> |
| b) Descripción de los estadios de desarrollo<br>de <i>C. albolineatus</i> .....   | <b>65</b> |
| c) Estudios químicos previamente realizados sobre<br><i>C. albolineatus</i> .....   | <b>66</b> |
| <b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>5. HIPÓTESIS.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>6. OBJETIVOS.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>6.1 Generales.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>6.2 Específicos.....</b>   | <b>70</b> |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>72</b>     |
| <b>7.1</b> Recolección del material vegetal.....  | <b>72</b>     |
| • <i>Pittocaulon praecox</i> .....  | <b>72</b>     |
| • <i>P. velatum, P. filare, P. hintonii, P. bombycophole</i> .....  | <b>72</b>     |
| <b>7.2</b> Recolección del insecto <i>Ceroplastes albolineatus</i> .....  | <b>73</b>     |
| <b>7.3</b> Tratamiento de las muestras.....   | <b>75</b>     |
| <b>7.3.1</b> Procedimiento para la obtención de los extractos alcaloides de las especies de <i>Pittocaulon</i> y el insecto <i>Ceroplastes albolineatus</i> ..... | <b>75</b>     |
| a) Material vegetal.....  | <b>75</b>     |
| b) Insecto.....   | <b>75</b>     |
| <b>7.3.2</b> Determinación de la presencia de los APs en los extractos.....   | <b>76</b>     |
| • Cromatografía de Gases (CG).....  | <b>77</b>     |
| • Cromatografía de Gases. Determinación del índice de retención (RI).....   | <b>78</b>     |
| • Cromatografía de Gases. Análisis cuantitativo.....  | <b>78</b>     |
| <b>7.3.3</b> Identificación de los APs presentes en los extractos analizados....  | <b>79</b>     |
| • Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....  | <b>79</b>     |
| <b>7.3.4</b> Purificación de los APs mayoritarios.....  | <b>80</b>     |
| • Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....   | <b>81</b>     |
| <b>7.3.5</b> Determinación de la estructura de los APs purificados.....   | <b>81</b>     |
| <b>7.3.6</b> Determinación de la presencia del sistema enzimático citocromo P450 (CytP450) en <i>C. albolineatus</i> .....  | <b>81</b>     |
| a) Recolección del insecto.....   | <b>81</b>     |
| b) Obtención de la fracción celular S-9 de <i>C. albolineatus</i> .....   | <b>82</b>     |
| c) Obtención de los microsomas de <i>C. albolineatus</i> .....  | <b>82</b>     |

|  |            |
|--|------------|
| d) Determinación del contenido proteico de <i>C. albolineatus</i> por el método de Bradford.....   | 83         |
| e) Determinación del contenido de CytP450 microsomales.....  | 83         |
| f) Determinación de la presencia de CytP450 microsomales por electroforesis en gel de poliacrilamida con marcador de peso molecular..... | 84         |
| <b>8. RESULTADOS.....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>8.1</b> Determinación de la forma en que están presentes los APs en <i>P. praecox</i> (N óxidos o terciarios).....                    | <b>85</b>  |
| <b>8.2</b> Análisis de los APs presentes en <i>Pittocaulon praecox</i> por CG-EM.....  | <b>86</b>  |
| • Raíz.....  | <b>86</b>  |
| • Tejidos aéreos de <i>P. Praecox</i> .....  | <b>89</b>  |
| <b>8.3</b> Análisis de los APs presentes en el insecto <i>Ceroplastes albolineatus</i> por CG-EM.....                                    | <b>94</b>  |
| • Experimento I.....   | <b>94</b>  |
| • Experimento II.....  | <b>95</b>  |
| • Experimento III.....   | <b>98</b>  |
| <b>8.4</b> Purificación de los 7 y 9 ésteres-d presentes en <i>P. praecox</i> .....  | <b>99</b>  |
| • Procedimiento de fraccionamiento del extracto [1+2].....   | <b>101</b> |
| • Procedimiento de fraccionamiento del extracto [3+H].....   | <b>101</b> |
| • Fracciones reunidas de las CC de [1+2] y [3+H] y purificación del extracto [2659-5172].....  | <b>102</b> |
| • Purificación de la fracción [73-165] proveniente del extracto [3+H].....   | <b>103</b> |
| • Purificación del 7-éster-d y del 9-éster-d por HPLC.....   | <b>103</b> |
| • Purificación del 7-éster-d por HPLC.....   | <b>103</b> |
| • Purificación del 9-éster-d por HPLC.....   | <b>104</b> |
| <b>8.5</b> Perfil de APs presentes en las diferentes especies de <i>Pittocaulon</i> .....  | <b>105</b> |
| • <i>P. bombycophole</i> .....   | <b>105</b> |
| • <i>P. hintonii</i> .....   | <b>108</b> |
| • <i>P. filare</i> .....   | <b>109</b> |



|  | <b>Página</b>                                 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. velatum</i>.....</li> </ul>   | 111   |
| <b>8.6</b> Purificación del 7-éster-t.....   | 113   |
| <b>8.7</b> Base néctica de los APs presentes en las diferentes especies de <i>Pittocaulon</i> y en <i>Ceroplastes albolineatus</i> .....   | 115   |
| <b>8.8</b> Bases nécticas de la mezcla de O <sub>7</sub> -ésteres presentes en las raíces e inflorescencias de <i>P. velatum</i> .....   | 121   |
| <b>8.9</b> Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los ésteres 7-d, 9-d y 7-t aislados de <i>Pittocaulon praecox</i> y <i>Pittocaulon bombycophole</i> + <i>P. hintonii</i> .....  | 122   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación de los monoésteres de necinas 1,2-saturadas por RMN.....</li> </ul>  | 124   |
| <b>8.10</b> Determinación de la presencia del sistema enzimático CytP450 en los microsomas de <i>C. albolineatus</i> .....   | 127   |
| <b>9. DISCUSIÓN</b> .....  | 131   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides pirrolizidínicos en <i>Pittocaulon praecox</i>.....</li> <li>• Características especiales del perfil de APs de <i>Pittocaulon praecox</i>.....</li> <li>• Alcaloides pirrolizidínicos presentes en los diferentes estadios de <i>Ceroplastes albolineatus</i>.....</li> <li>• Características especiales del secuestro de APs por parte de <i>Ceroplastes albolineatus</i>.....</li> <li>• Mecanismo de desintoxicación: CytP450 vs FMO.....</li> <li>• Perfil de APs de las especies de <i>Pittocaulon</i>.....</li> <li>• APs y la defensa vegetal.....</li> </ul> | 131<br>132<br>135<br>137<br>139<br>143<br>147 |
| <b>10. CONCLUSIONES</b> .....  | 152   |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 154   |
| <b>12. APÉNDICE</b>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad antioxidante (DPPH yTBARS).....</li> <li>• Actividad antimicrobiana.....</li> <li>• Espectros de RMN.....</li> <li>• Artículo.....</li> </ul>   | 170<br>179<br>186<br>198                      |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Figura 1.</b> <i>Bases nélicas comúnmente encontradas en los APs.....</i>  | 4      |
| <b>Figura 2.</b> <i>Estructura general de los APs.....</i>  | 5      |
| <b>Figura 3.</b> <i>Clasificación estructural de los APs y distribución por clase.....</i>  | 6      |
| <b>Figura 4.</b> <i>Ruta biosintética de bases nélicas.....</i>   | 9      |
| <b>Figura 5.</b> <i>Ruta biosintética de bases nélicas tipo otonecina.....</i>  | 10     |
| <b>Figura 6.</b> <i>Aminoácidos precursores biosintéticos de ácidos nélicos de los APs.....</i>   | 12     |
| <b>Figura 7.</b> <i>Ácidos nélicos monocarboxílicos de 2, 5 y 7 carbonos más comúnmente encontrados en la estructura de los APs.....</i>                                  | 13     |
| <b>Figura 8.</b> <i>Ácidos nélicos dicarboxílicos de 8 y 10 carbonos empleados para la construcción de APs macrocíclicos de 11, 12 y 13 miembros.....</i>                 | 13     |
| <b>Figura 9.</b> <i>Estructura de los APs terciarios (bases libres) y los APs N-óxidos.....</i>   | 14     |
| <b>Figura 10.</b> <i>Requerimientos estructurales para la toxicidad de los APs.....</i>   | 19     |
| <b>Figura 11.</b> <i>Formación de los ésteres pirrólicos a partir de diferentes bases nélicas.....</i>  | 21     |
| <b>Figura 12.</b> <i>Vía metabólica de los alcaloides dehidropirrolizidínicos (ésteres pirrólicos).....</i>   | 21     |
| <b>Figura 13.</b> <i>Metabolismo de los APs 1,2-saturados.....</i>  | 24     |
| <b>Figura 14.</b> <i>Procesos de desintoxicación.....</i>   | 34     |
| <b>Figura 15.</b> <i>Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por <u>C. trasiens</u>, <u>T.jacobaeae</u> y <u>Z. variegatus</u>.....</i> | 36     |
| <b>Figura 16.</b> <i>Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por <u>O. cacaliae</u>.....</i>  | 38     |
| <b>Figura 17.</b> <i>Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por <u>P. boucardi</u>.....</i>  | 39     |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 18.</b> Estructura de algunos APs sintetizados por insectos a partir de APs obtenidos de plantas.....   | 40            |
| <b>Figura 19.</b> Distribución de <i>Pittocaulon bombycophole</i> en México e imágenes de la planta.....          | 46            |
| <b>Figura 20.</b> Distribución de <i>Pittocaulon filare</i> en México e imágenes de la planta.....                | 48            |
| <b>Figura 21.</b> Distribución de <i>Pittocaulon hintonii</i> en México e imágenes de la planta....               | 50            |
| <b>Figura 22.</b> Distribución de <i>Pittocaulon praecox</i> en México e imágenes de la planta....                | 52            |
| <b>Figura 23.</b> Distribución de <i>Pittocaulon velatum</i> en México e imágenes de la planta....                | 54            |
| <b>Figura 24.</b> Metabolitos secundarios aislados de <i>Pittocaulon praecox</i> .....                            | 56            |
| <b>Figura 25.</b> Diferentes estadios del insecto <i>Ceroplastes albolineatus</i> .....                           | 63            |
| <b>Figura 26.</b> Metabolitos secundarios aislados de <i>Ceroplastes albolineatus</i> .....                       | 66            |
| <b>Figura 27.</b> Procedimiento empleado para la extracción de APs.....   | 76            |
| <b>Figura 28.</b> Cromatograma de gases empleando como detectores FID y PND.....                                  | 77            |
| <b>Figura 29.</b> Perfil cromatográfico de APs para determinar el RI usando un patrón de alcanos (C12-C24).....   | 78            |
| <b>Figura 30.</b> Estructura de la heliotrina.....  | 79            |
| <b>Figura 31.</b> Cromatograma de las raíces de <i>P. praecox</i> .....   | 87            |
| <b>Figura 32.</b> Espectro de masas de cada uno de los APs presentes en las raíces de <i>P. praecox</i> .....     | 87            |
| <b>Figura 33.</b> Estructura de los APs identificados en las raíces de <i>P. praecox</i> .....                    | 89            |
| <b>Figura 34.</b> Estructura de los APs identificados en las partes aéreas de <i>P. praecox</i> .....             | 91            |
| <b>Figura 35.</b> Cromatograma de los frutos de <i>P. praecox</i> .....   | 92            |
| <b>Figura 36.</b> Espectro de masas de cada uno de los APs identificados en los frutos de <i>P. praecox</i> ..... | 93            |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 37.</b> <i>A. Espectro de masas del alcaloide denominado AP-X detectado en las hojas de <u>P. praecox</u>. B. Espectro de Masas del alcaloide neo-senkirkina detectado en las flores de <u>P. praecox</u>.....</i> | <b>93</b>  |
| <b>Figura 38.</b> <i>Estructura de los APs identificados a través de los diferentes estadios del ciclo de vida de <u>C. albolineatus</u>.....</i>  | <b>94</b>  |
| <b>Figura 39.</b> <i>Cromatograma de las hembras adultas de <u>C. albolineatus</u>.....</i>  | <b>97</b>  |
| <b>Figura 40.</b> <i>Espectro de masas de la acetil- senkirkina detectado en las hembras adultas de <u>C. albolineatus</u>.....</i>  | <b>97</b>  |
| <b>Figura 41.</b> <i>Cromatograma de los huevos y las ninfas de dispersión de <u>C. albolineatus</u>.....</i>  | <b>98</b>  |
| <b>Figura 42.</b> <i>Procedimiento de purificación de 7 y 9 éster-d presentes en <u>P. praecox</u>.....</i>  | <b>100</b> |
| <b>Figura 43.</b> <i>Purificación por HPLC semipreparativo. Cromatograma de la fracción [96-140] que permitió la purificación del 7-éster, 9-éster y la senkirkina.....</i>  | <b>104</b> |
| <b>Figura 44.</b> <i>Purificación por HPLC semipreparativo. Cromatograma de las fracciones [110-124] (A) y [125-145] (B), que permitió la purificación del 9-éster-d (I).....</i>  | <b>104</b> |
| <b>Figura 45.</b> <i>Cromatograma de las inflorescencias de <u>P.bombycophole</u>.....</i>   | <b>106</b> |
| <b>Figura 46.</b> <i>Espectro de masas del 7-éster-t, 9-éster-t, Petasitenina, Neopetasitenina, Neo-ligularidina, detectados en las inflorescencias de <u>P. bombycophole</u>.....</i>                                       | <b>107</b> |
| <b>Figura 47.</b> <i>Espectro de masas de la ligularidina detectada en las raíces de <u>P. hintonii</u>.....</i>   | <b>109</b> |
| <b>Figura 48.</b> <i>Cromatograma de las raíces de <u>P. hintonii</u>.....</i>   | <b>109</b> |
| <b>Figura 49.</b> <i>Cromatograma de las inflorescencias de <u>P. filare</u>.....</i>  | <b>111</b> |
| <b>Figura 50.</b> <i>Espectro de masas de la 7-angeloil retronecina detectada en las raíces de <u>P. filare</u>.....</i>   | <b>111</b> |
| <b>Figura 51.</b> <i>Espectro de masas de cada uno de los dos O<sub>7</sub>- ésteres (RI: 1810) presentes como una mezcla en las raíces e inflorescencias de <u>P. velatum</u>.....</i>                                      | <b>113</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 52.</b> <i>Cromatograma de las raíces de <u>P.velatum</u>.....</i>   | <b>113</b> |
| <b>Figura 53.</b> <i>Bases nécicas saturadas.....</i>  | <b>116</b> |
| <b>Figura 54.</b> <i>Obtención de las bases nécicas saturadas (A) dihidroxiheliotridano y (B) platynecina a partir de heliotrina y monocrotalina, respectivamente.....</i>                         | <b>118</b> |
| <b>Figura 55.</b> <i>Separación por CG de los derivados di-O-acetil de las cuatro necinas estereoisoméricas 1,2-saturadas.....</i>   | <b>120</b> |
| <b>Figura 56.</b> <i>Identificación de la necina dihidroxiheliotridano presente en los extractos hidrolizados de corteza de <u>P. praecox</u> y hembras adultas de <u>C. albolineatus</u>.....</i> | <b>121</b> |
| <b>Figura 57.</b> <i>Estructura de los monoésteres de AP identificados en el género <u>Pittocaulon</u>.....</i>  | <b>122</b> |
| <b>Figura 58.</b> <i>Determinación de la presencia del sistema Citocromo P450 en microsomas de rata y microsomas de <u>C. albolineatus</u>.....</i>  | <b>128</b> |
| <b>Figura 59.</b> <i>Gel de poliacrilamida al 10% para establecer la presencia del sistema microsomal CytP450 en <u>C. albolineatus</u>.....</i>   | <b>130</b> |
| <b>Figura 60.</b> <i>Estructura de los diferentes APs identificados en las especies del género <u>Pittocaulon</u>.....</i>   | <b>143</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación taxonómica de <u>Pittocaulon praecox</u>.....</i>   | 44     |
| <b>Tabla 2.</b> <i>Algunas especies del género <u>Ceroplastes</u> y algunos de los cultivos de importancia económica u ornamental que atacan.....</i>  | 62     |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Clasificación taxonómica de <u>Ceroplastes albolineatus</u>.....</i>  | 63     |
| <b>Tabla 4.</b> <i>Información del material y el sitio de colecta de cada una de las especies de <u>Pittocaulon</u>.....</i>   | 73     |
| <b>Tabla 5.</b> <i>Composición alcaloidea de los tallos, hojas e inflorescencias en <u>P. praecox</u> y determinación de la forma en que están presentes los APs en la planta.....</i>       | 85     |
| <b>Tabla 6.</b> <i>Composición alcaloidea de las raíces de <u>P. praecox</u>.....</i>  | 88     |
| <b>Tabla 7.</b> <i>Composición alcaloidea de los tejidos aéreos de <u>P. praecox</u> (tallos, corteza, hojas, inflorescencias y frutos).....</i>   | 92     |
| <b>Tabla 8. Experimento I.</b> <i>Composición alcaloidea de los diferentes estadios de <u>C. albolineatus</u> (huevos, ninfas de dispersión, hembras adultas) y su cubierta cerosa.....</i>  | 95     |
| <b>Tabla 9. Experimento II.</b> <i>Composición alcaloidea de los diferentes estadios de <u>C. albolineatus</u> (huevos, ninfas de dispersión, hembras adultas) y su cubierta cerosa.....</i> | 96     |
| <b>Tabla 10. Experimento III.</b> <i>Composición alcaloidea de las hembras adultas de <u>C. albolineatus</u> y su cubierta cerosa.....</i>   | 99     |
| <b>Tabla 11.</b> <i>Fraccionamiento del extracto [1+2] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de <math>CH_2Cl_2:MeOH</math>.....</i>                                    | 101    |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabla 12.</b> <i>Fraccionamiento del extracto [3+H] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.....</i>                                | <b>102</b> |
| <b>Tabla 13.</b> <i>Fraccionamiento del extracto [2659-5172] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.....</i>                          | <b>102</b> |
| <b>Tabla 14.</b> <i>Fraccionamiento del extracto [73-165] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.....</i>                             | <b>103</b> |
| <b>Tabla 15.</b> <i>Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, corteza, inflorescencias y raíces de <u>P.bombycophole</u>.....</i>  | <b>106</b> |
| <b>Tabla 16.</b> <i>Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de <u>P. hintonii</u>. Los APs fueron identificados por CG-EM.....</i>                    | <b>108</b> |
| <b>Tabla 17.</b> <i>Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de <u>P. filare</u>.....</i>  | <b>110</b> |
| <b>Tabla 18.</b> <i>Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de <u>P. velatum</u>.....</i>   | <b>112</b> |
| <b>Tabla 19.</b> <i>Fraccionamiento del extracto alcaloideo de <u>P. bombycophole</u> a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.....</i> | <b>114</b> |
| <b>Tabla 20.</b> <i>Desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H-RMN para cada uno de los ésteres de AP isoméricos aislados de <u>Pittocaulon</u>.....</i>   | <b>123</b> |
| <b>Tabla 21.</b> <i>Desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C-RMN para cada uno de los ésteres de AP isoméricos aislados de <u>Pittocaulon</u>.....</i>  | <b>124</b> |
| <b>Tabla 22.</b> <i>Perfil de APs de los diferentes estadios de vida de <u>Ceroplastes albolineatus</u> alimentándose sobre <u>Pittocaulon praecox</u>.....</i>                                 | <b>142</b> |
| <b>Tabla 23.</b> <i>Perfiles y concentración total de los APs presentes en los diferentes órganos analizados de cinco de las especies de <u>Pittocaulon</u> establecidos por CG-EM.....</i>     | <b>151</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabla 24.</b> <i>Inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS) de los extractos diclorometánico y metanólico obtenidos de tallos, raíces e inflorescencias de las diferentes especies de <u>Pittocaulon</u>.....</i> | <b>174</b> |
| <b>Tabla 25.</b> <i>Valores de <math>CI_{50}</math> para cada una de las muestras de las especies de <u>Pittocaulon</u> que fueron activas en el cernimiento.....</i>   | <b>175</b> |
| <b>Tabla 26.</b> <i>Cernimiento de la actividad inhibitoria del radical DPPH para las diferentes muestras de <u>Pittocaulon</u>.....</i>  | <b>176</b> |
| <b>Tabla 27.</b> <i>Valores de <math>CI_{50}</math> para cada una de las muestras de las especies de <u>Pittocaulon</u> que fueron activas en el cernimiento de DPPH.....</i>   | <b>177</b> |
| <b>Tabla 28.</b> <i>Extractos de <u>Pittocaulon</u> que presentaron actividad antimicrobiana y las bacterias contra las que fueron activos.....</i>   | <b>182</b> |



## ÍNDICE DE ESPECTROS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Espectro 1.</b> <i>RMN de protón del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                 | <b>187</b>    |
| <b>Espectro 2.</b> <i>Ampliación del RMN de protón del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>  | <b>187</b>    |
| <b>Espectro 3.</b> <i>RMN de Carbono 13 del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>             | <b>188</b>    |
| <b>Espectro 4.</b> <i>COSY H-H del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                      | <b>188</b>    |
| <b>Espectro 5.</b> <i>HSQC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                          | <b>189</b>    |
| <b>Espectro 6.</b> <i>Ampliación del HSQC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>           | <b>189</b>    |
| <b>Espectro 7.</b> <i>HMBC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                          | <b>190</b>    |
| <b>Espectro 8.</b> <i>Ampliación del HMBC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>           | <b>190</b>    |
| <b>Espectro 9.</b> <i>RMN de protón del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                 | <b>191</b>    |
| <b>Espectro 10.</b> <i>Ampliación del RMN de protón del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i> | <b>191</b>    |
| <b>Espectro 11.</b> <i>RMN de Carbono 13 del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>            | <b>192</b>    |
| <b>Espectro 12.</b> <i>COSY H-H del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                     | <b>192</b>    |
| <b>Espectro 13.</b> <i>HSQC del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                         | <b>193</b>    |
| <b>Espectro 14.</b> <i>HMBC del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>                         | <b>193</b>    |
| <b>Espectro 15.</b> <i>Ampliación del HMBC del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano.....</i>          | <b>194</b>    |
| <b>Espectro 16.</b> <i>RMN de protón de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>                     | <b>194</b>    |
| <b>Espectro 17.</b> <i>Ampliación del RMN de protón de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>      | <b>195</b>    |
| <b>Espectro 18.</b> <i>RMN de Carbono 13 de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>                 | <b>195</b>    |
| <b>Espectro 19.</b> <i>COSY de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>                              | <b>196</b>    |
| <b>Espectro 20.</b> <i>HSQC de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>                              | <b>196</b>    |
| <b>Espectro 21.</b> <i>HMBC de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>                              | <b>197</b>    |
| <b>Espectro 22.</b> <i>Ampliación del HMBC de la 7-angeloil-turneforcidina.....</i>               | <b>197</b>    |

## ABREVIATURAS

|  |  |
|--|--|
| $^2\text{H}$                                       | Deuterio                                       |
| Abs  | Absorbencia                                    |
| ADN  | Acido desoxirribunocleico                      |
| APs  | Alcaloides pirrolizidínicos                    |
| ARN  | Acido ribunocleico                             |
| $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ | Hidróxido de Bario octahidratado               |
| CC   | Cromatografía de columna                       |
| $\text{CD}_3\text{OD}$                             | Metanol deuterado                              |
| $\text{CDCl}_3$                                    | Cloroformo deuterado                           |
| CG   | Cromatografía de Gases                         |
| CG-EM  | Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas |
| $\text{CH}_2\text{Cl}_2$                           | Diclorometano                                  |
| $\text{CH}_3\text{CN}$                             | Acetonitrilo                                   |
| $\text{CI}_{50}$                                   | Concentración Inhibitoria 50                   |
| CO   | Monóxido de carbono                            |
| CytP450  | Sistema enzimático Citocromo P450              |
| $\delta$   | Desplazamiento químico                         |
| $\text{D}_2\text{O}$                               | Agua deuterada                                 |
| DHPs   | Dehidropirrolizidinas                          |
| DMSO   | Dimetilsulfóxido                               |
| DO   | Densidad óptica                                |
| DPPH   | Difenil picril hidracil                        |
| DTT  | Ditiotreitol                                   |
| EDTA   | Ácido etilendiamino tetra-acético              |
| eV   | Electron voltios                               |
| $\text{FeSO}_4$                                    | Sulfato ferroso                                |
| FID  | Detector de ionizador de flama                 |
| FMO  | Flavin mono oxigenasa                          |
| GSH  | Glutación                                      |
| HCl  | Ácido clorhídrico                              |
| HETCOR   | Heteronuclear Correlation                      |
| HMBC   | Heteronuclear Multiple Bond Correlation        |
| HPLC   | Cromatografía líquida de alta presión          |
| HSS  | Homospermidina Sintetasa                       |
| Hz   | Hertz  |
| $J$  | Constante de acoplamiento                      |
| KCl  | Cloruro de potasio                             |
| kDa  | Kilodaltones                                   |
| m/z  | Relación masa/carga                            |
| $\text{M}^+$                                       | Ión molecular                                  |
| MeOH   | Metanol  |
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$                  | Ditionita de sodio                             |
| $\text{NAD}^+$                                     | Nicotinamida adenin difosfato                  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| ND <sub>3</sub>     | Amoniaco deuterado                            |
| NH <sub>3</sub>     | Amoniaco                                      |
| nm                  | Nanómetros                                    |
| NOE                 | Nuclear overhauser effect                     |
| Nu <sup>-</sup>     | Nucleófilo                                    |
| PND                 | Detector fósforo-nitrógeno                    |
| ppm                 | Partes por millón                             |
| RI                  | Índice de retención                           |
| RMN <sup>1</sup> H  | Resonancia Magnética Nuclear de Protón        |
| RMN <sup>13</sup> C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13    |
| RPM                 | Revoluciones por minuto                       |
| RT                  | Tiempo de retención                           |
| SiO <sub>2</sub>    | Dióxido de Silicio                            |
| Skk                 | Senkirrina                                    |
| SN <sub>2</sub>     | Sustitución nucleofílica bimolecular          |
| SNO                 | Senecionina N-oxigenasa                       |
| TBA                 | Ácido tiobarbitúrico                          |
| TBARS               | Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico |
| TFA                 | Ácido trifluoro acético                       |
| THF                 | Tetrahidrofurano                              |
| TLC                 | Cromatografía de capa fina                    |
| UV                  | Luz ultravioleta                              |
| V                   | Voltios                                       |
| var.                | Variedad                                      |

## UNIDADES

|    |             |
|----|-------------|
| cm | centímetros |
| g  | gramos      |
| h  | hora        |
| m  | metros      |
| M  | molar       |
| µg | microgramos |
| ml | mililitro   |
| µl | microlitros |
| mm | milímetros  |
| µM | micromolar  |
| N  | normal      |

**RESUMEN**

*Pittocaulon praecox* (Asteraceae) es una especie endémica de México. Todos los tejidos analizados presentaron alcaloides pirrolizidínicos (APs). Los órganos aéreos de la planta contienen los monoésteres 1,2-saturados: 7-angeloil-dihidroxiheliotridano como alcaloide mayoritario, junto con una pequeña cantidad de su isómero el 9-angeloil. Asimismo, los monoésteres se encuentran acompañados por el AP macrocíclico derivado de otonecina, la senkirina. Las raíces contienen únicamente APs macrocíclicos (senecionina, senkirina y platifilina) como componentes mayoritarios, y no se detectó la presencia de los monoésteres. Los tallos suculentos de algunos especímenes de *P. praecox* se encuentran densamente infestados por el insecto de “escama cerosa”, *Ceroplastes albolineatus*. La cubierta cerosa y todos los estadios de vida estudiados (hembras adultas, huevos, ninfas de primer estadio (*crawlers*)) presentaron APs. Los machos no han sido reportados para esta especie. Las concentraciones de APs claramente indican que el insecto secuestra estos compuestos de su planta hospedera. Las más altas concentraciones (mg/g de peso seco) registradas fueron: huevos, 0.58; hembras adultas, 0.44; ninfas de primer estadio, 0.37 y cubierta cerosa, 0.08. La planta hospedera, así como el insecto, contienen los APs exclusivamente como bases libres.

Adicional a *P. praecox*, se estableció el perfil de APs para cinco de las seis especies que conforman el género *Pittocaulon* (subtribu Tussilagininae, tribu Senecioneae, Asteraceae). Todos los órganos analizados (raíces, flores y tallos), de las cinco especies que comprenden el género, mostraron la presencia de APs. Los más altos niveles de APs (por encima del 0.3% de peso seco) fueron encontrados en las

inflorescencias. Se determinaron tres tipos estructurales de APs: (1) los ésteres macrocíclicos de otonecina tales como senkirkina y neopetasitenina; (2) ésteres macrocíclicos de retronecina como la senecionina, únicamente encontrada en las raíces, y (3) los monoésteres de necinas 1,2-saturadas con ácido angélico. Las estructuras de las necinas estereoisoméricas 1,2-saturadas fueron establecidas por CG-EM y confirmadas por RMN. Los monoésteres aislados de *P. praecox* fueron identificados como 7-*O*-angeloil dihidroxiheliotridano y 9-*O*-angeloil dihidroxiheliotridano, identificados por primera vez como productos naturales. Asimismo, uno de los 7-*O*-monoésteres identificados en *Pittocaulon velatum* tuvo como necina el dihidroxiheliotridano. Por otro lado, los monoésteres identificados en tres de las especies de *Pittocaulon* analizadas, la necina dihidroxiheliotridano es reemplazada por la necina turneforcidina, con una configuración diferente en los carbonos C-1 y C-7.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Pittocaulon* comprende seis especies endémicas de México. Son árboles pequeños, con un tallo ramificado en forma de escoba que les confiere una extraña apariencia. Se encuentran distribuidas en un gran rango de hábitats que van desde los 300 hasta los 3000 metros de elevación, incluyendo bosques y zonas secas montañosas y rocosas. El género *Pittocaulon* junto con los géneros *Telanthophora* y *Villaseñoria*, fueron segregados del enorme género *Senecio*, de la familia Asteraceae, la cual es reconocida por sintetizar furanoeremofilanos y alcaloides pirrolizidínicos, estos últimos potencialmente tóxicos para vertebrados e invertebrados y mediadores de gran número de interacciones entre plantas e insectos.

Los tallos de *P. praecox*, una de las especies con mayor distribución del género *Pittocaulon* en México, son parasitados por el “insecto escama” *C. albolineatus*, el cual desarrolla todo su ciclo de vida en la planta. El insecto, que presenta una visible cubierta cerosa, se alimenta de la savia del árbol a través de su estilete y dependiendo del grado de infestación, la planta sufre marchitamiento y en algunos casos resulta en muerte total. Estudios fitoquímicos realizados con las raíces de *P. praecox*, permitieron identificar el alcaloide pirrolizidínico senecionina. Además fueron aislados, de diferentes tejidos de esta especie, varios sesquiterpenos del tipo furanoeremofilano. En el caso del insecto sólo se reportó una antraquinona, mientras que de la cubierta cerosa se caracterizaron un gran número de sesterterpenos (C25).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y en vista de que no existen estudios previos que establezcan la presencia de alcaloides pirrolizidínicos en las plantas que componen el género, ni en el insecto asociado a *P. praecox*, se procedió a determinar el perfil alcaloideo del insecto *C. albolineatus*, de su planta hospedera *P. praecox* y de cada una de las cuatro especies restantes que conforman el género *Pittocaulon*; exceptuando *P. calzadanum* (*P. praecox*, *P. velatum*, *P. filare*, *P. hintonii* y *P. bombycophole*). Adicionalmente, se estableció cual es el papel en el insecto *C. albolineatus* de los metabolitos pro tóxicos adquiridos de su planta hospedera a través de su ciclo de vida (huevos, ninfas de primer estadio y hembras adultas).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS (APs)

#### 2.1.1 Distribución

Dentro del reino vegetal los APs sólo se encuentran en angiospermas, muy diseminados y esporádicamente en taxones filogenéticamente sin relación. Su presencia ha sido reportada en más de 560 especies de plantas de 61 géneros pertenecientes a 13 familias. Principalmente se encuentran en las familias, Asteraceae tribus *Senecioneae* y *Eupatorieae*; familia Boraginaceae; familia Fabaceae género *Crotalaria*, y familia Orchidaceae. También se han detectado en otras familias como Apocynaceae, Celastraceae, Convolvulaceae, Ranunculaceae, Rhizophoraceae, Santalaceae y Sapotaceae (Hartmann y Witte, 1995; Hartmann y Ober, 2000).

#### 2.1.2 Estructura química

Los APs consisten de una base nécica (amino alcohol) o necina, la cual origina el sistema de anillos pirrolizidínico. Las necinas pueden ser saturadas o insaturadas en posición 1-2, además de tener hidroxilos en los C-2, C-6 o C-7, resultando así en la formación de diferentes estereoisómeros (**Figura 1**). Las bases nécicas pueden estar esterificadas con un mono o diácido llamado ácido nécico (**Figura 2**). Estos últimos pueden ser alifáticos, mono o dicarboxílicos, a menudo ramificados y/o funcionalizados, que generalmente contienen de 5 a 10 átomos de carbono. Como sustituyentes pueden tener grupos hidroxilo, metoxi, epoxi, carboxi, acetoxi u otros grupos alcoxi lo que conlleva a numerosas combinaciones de estero y diastereoisómeros (Röder, 1995).



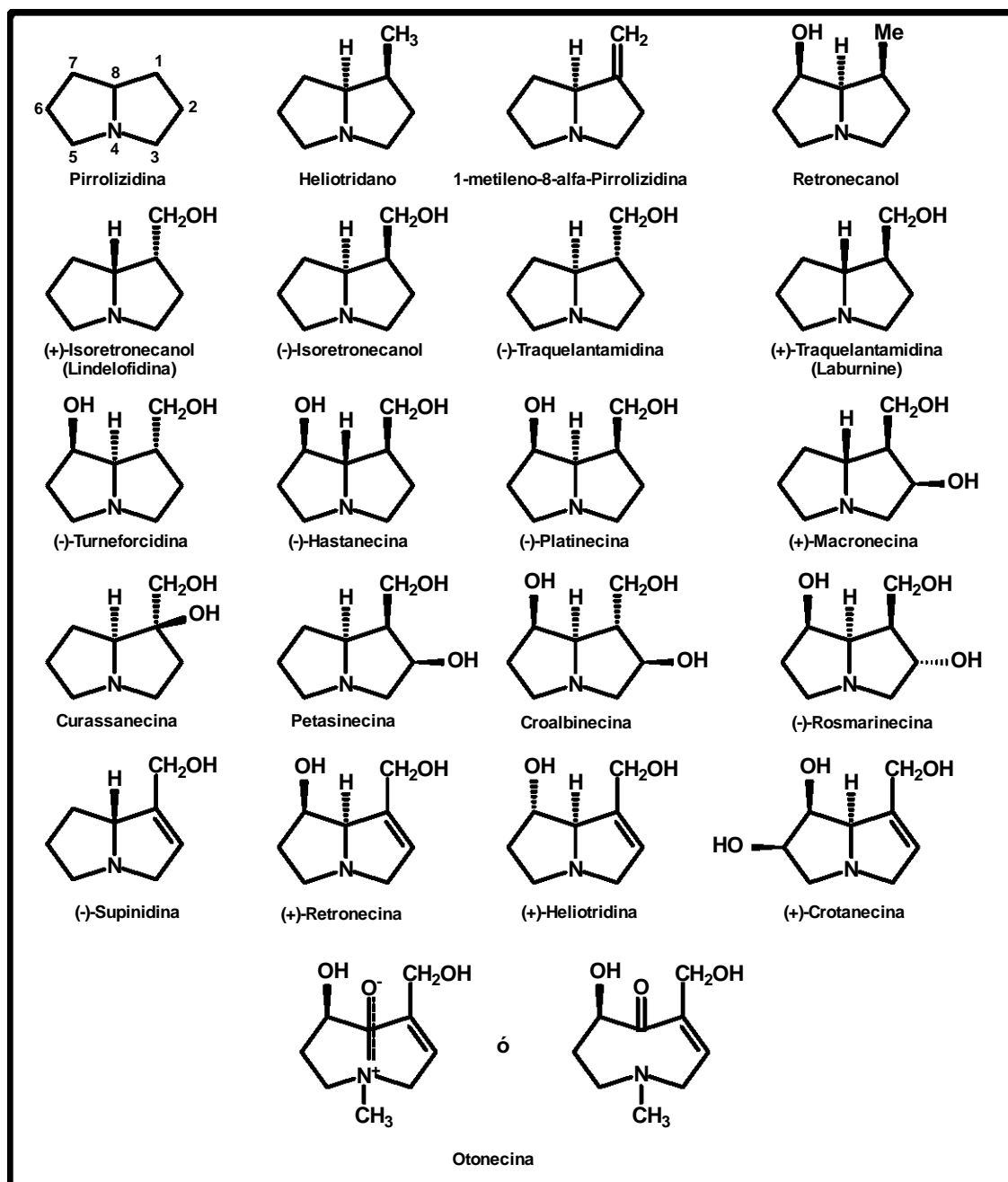
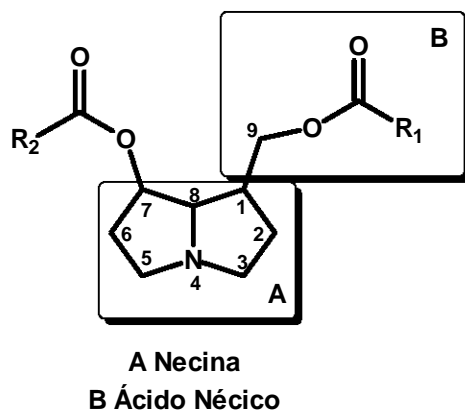


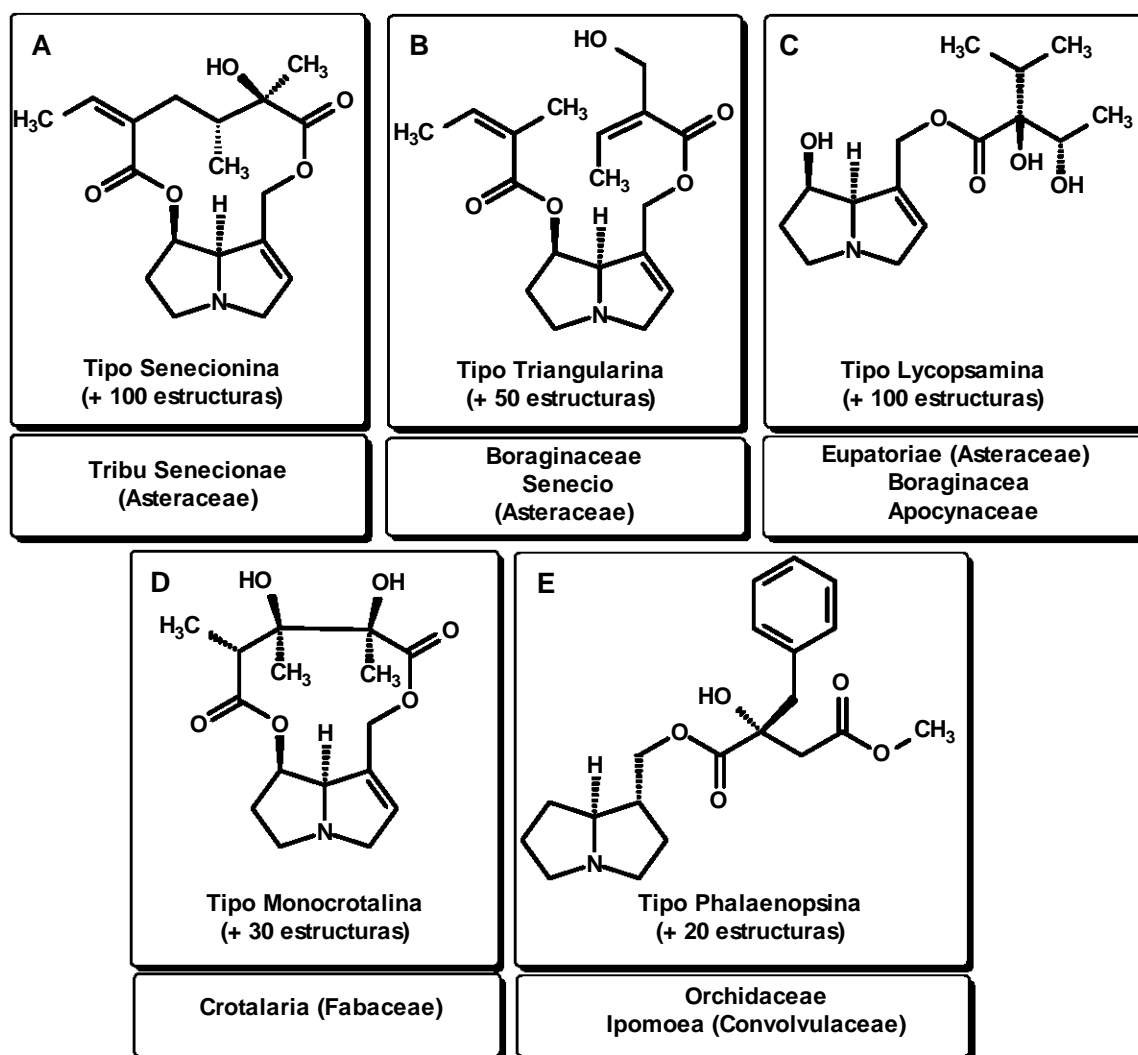
Figura 1. Bases nécicas comúnmente encontradas en los APs. (tomada de Mattocks, 1986)



**Figura 2.** Estructura general de los APs.

Se han identificado cerca de unos 660 APs, tanto como N-óxidos como bases libres, lo que ha permitido clasificarlos en cinco tipos: Senecionina, Triangularina, Monocrotalina, Lycopsamina y Phalaenopsina (**Figura 3**). Los del tipo Senecionina son diésteres macrocíclicos abundantes en las especies de la tribu *Senecioneae* (Asteraceae), todos contienen un ácido néxico ramificado C-10, derivado de dos moléculas de isoleucina (C-5) o, menos frecuente, de leucina. Los APs del tipo Triangularina son diésteres de cadena abierta que se encuentran en especies de la familia Boraginaceae y en algunas especies de *Senecio*. Los del tipo Lycopsamina, tienen como característica un ácido néxico de 7 carbonos, el ácido isopropilbutírico, y se encuentran principalmente en la familia Asteraceae subtribu *Eupatoriae*, y en las familias Boraginaceae y Apocynaceae. El otro grupo, clase monocrotalina, son diésteres macrocíclicos de 11 miembros, producidos principalmente por especies del género *Crotalaria* (Fabaceae). El último grupo es el de los APs de orquídeas (Orchidaceae) o del tipo Phalaenopsina, caracterizados por tener una base néxica saturada y a menudo estar esterificados con grupos arilo, aralquilo o con un ácido alquilnéxico. Los patrones estructurales difieren

considerablemente entre las especies de plantas (Hartmann y Witte, 1995; Hartmann, 1999; Hartmann y Ober, 2000; Fu et al., 2004).



**Figura 3.** Clasificación estructural de los APs y distribución por clase.

### 2.1.3 Biosíntesis de necinas

Con base en los estudios realizados con especies con marcadores radioactivos e isótopos y el empleo de cultivo de tejidos, se ha determinado gran parte la ruta biosintética empleada para la síntesis de las necinas de los APs, incluyendo sus

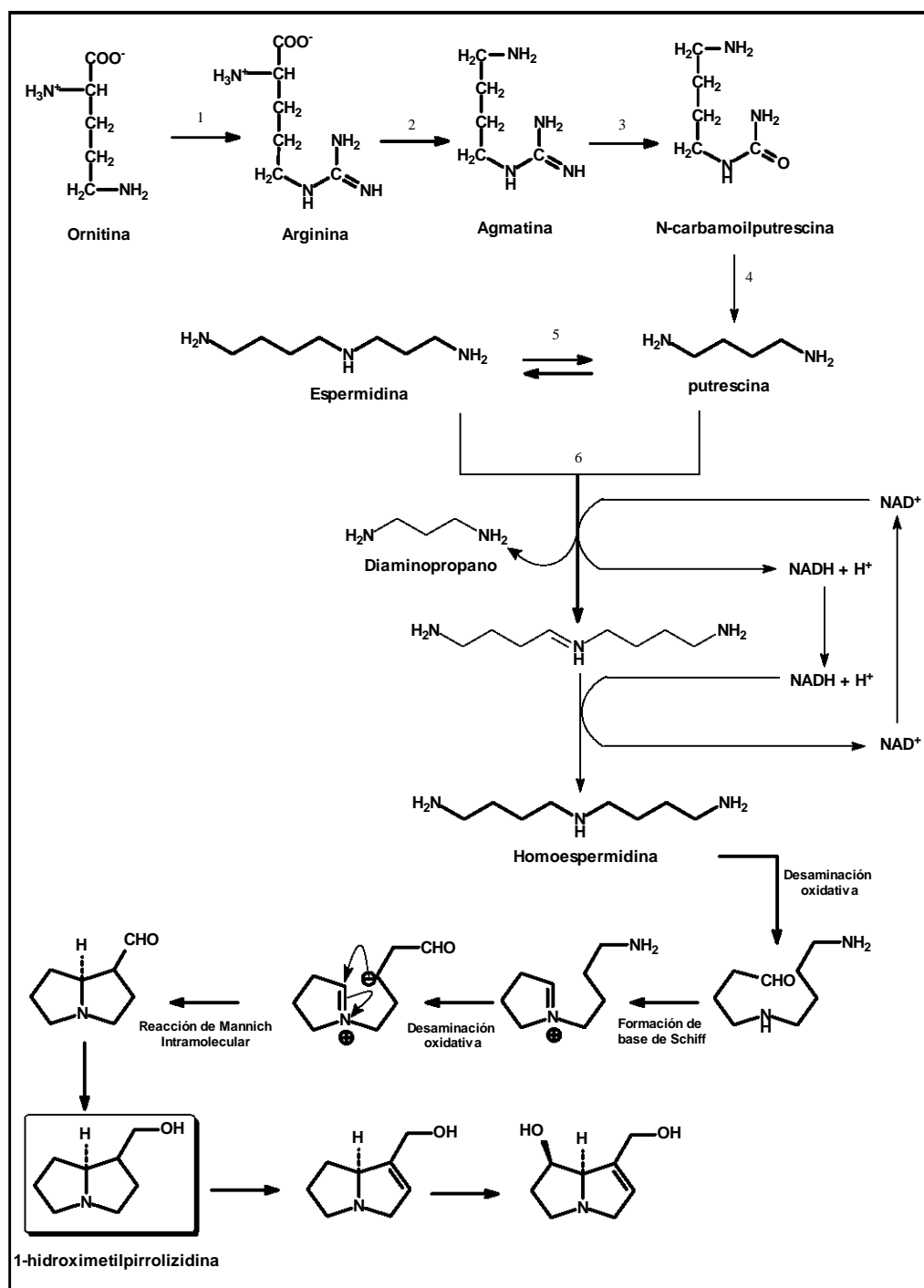
intermediarios y las enzimas implicadas. El esqueleto de carbono de la base necina se origina a partir de los aminoácidos ornitina o arginina (Robins, 1989; Hartmann y Ober, 2000). En las especies de *Senecio*, la ornitina es rápidamente convertida a arginina, por lo que ambos aminoácidos son igualmente incorporados. Estos sufren varias reacciones que llevan a la formación de putrescina, la cual es sintetizada exclusivamente a través de la vía arginina-agmatina. Las enzimas que catalizan esta ruta han sido caracterizadas de los cultivos de raíces de *Senecio* (arginina descarboxilasa, agmatina iminohidrolasa y N-carbamoylputrescina amidohidrolasa). La putrescina obtenida puede seguir varios caminos, ser convertida a espermidina vía espermidina sintetasa, ser oxidada a pirrolina y ácido aminobutírico o ser vertida a la ruta de síntesis específica de los APs (Robins, 1989; Robins 1991; Hartmann y Witte, 1995; Dewick, 2002).

Empleando putrescina y espermidina como sustratos, se produce la molécula simétrica  $C_4NC_4$ , homospermidina, primer intermediario específico de la ruta biosintética de APs, quien además controla el flujo de sustrato en esta vía. En plantas, la enzima que cataliza la formación de la homospermidina es la Homospermidina Sintetasa (HSS), que transfiere un grupo aminobutil derivado exclusivamente de espermidina a una molécula de putrescina, liberando 1,3-aminopropano. Para esta reacción se emplea  $NAD^+$  que funciona como un aceptor de hidruro en la formación oxidativa de la molécula aminobutil y como donador de hidruro en la reducción del intermediario imina (Kelly y Robins, 1988; Böttcher et al., 1993a; Böttcher et al., 1993b; Graser y Hartmann, 1997; Hartmann y Ober, 2000; Ober et al., 2000).

Las reacciones que prosiguen entre la homospermidina y la base néctica no han sido caracterizadas a nivel enzimático, lo más probable es que se forme un intermediario dialdehídico, por medio de una enzima con actividad diaminooxidasa. La formación del esqueleto bicíclico, a través del ión iminio intermediario puede dar como producto cuatro esteroisómeros de 1-hidroximetilpirrolizidina [(-)-traquelantamidina, (-)-isoretronecanol, lindelofidina ó (+)-isoretronecanol y laburninina ó (+)-traquelantamidina], todos ellos identificados como APs de fuentes naturales (**Figura 4**) (Hartmann, 1999; Hartmann y Ober, 2000).

La secuencia de reacciones por la cual se forman los diferentes ésteres de necina, fue en parte ilustrada por los estudios hechos con *Heliotropium spathulatum* y *Eupatorium cannabinum*, los cuales mostraron que primero se sintetizaba (-)-traquelantamidina, luego (-)-supinidina y por último la retronecina. Indicando que, primero ocurre la hidroxilación en el carbono C-2 de la traquelantamidina y luego se da la deshidratación por medio de una trans-eliminación involucrando la remoción del hidrógeno pro-*S* y la retención del hidrógeno pro-*R* en el carbono 2 de la supinidina. Posteriormente, ocurre la hidroxilación en posición C-7 para producir retronecina, base néctica de muchos APs tóxicos (Robins, 1989; Hartmann y Witte, 1995; Röder, 1995).

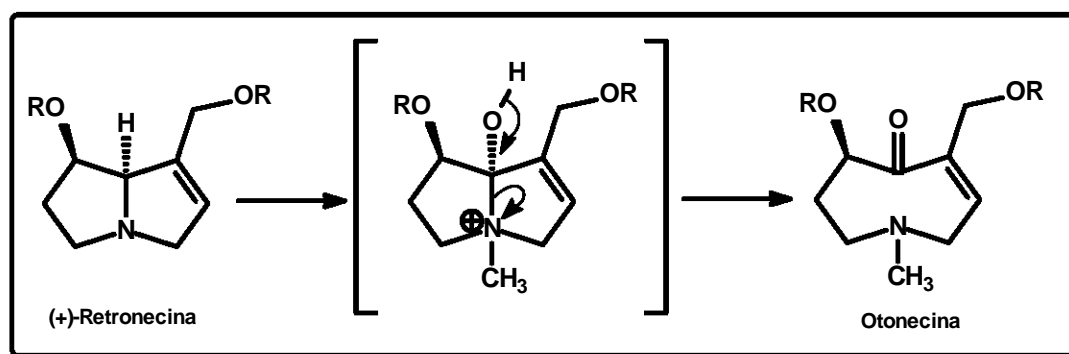
Utilizando como precursores putrescina, espermidina y homospermidina, se demostró recientemente en orquídeas, que la ruta de biosíntesis de los alcaloides del tipo Phalaenopsina es la misma que la empleada por las especies de *Senecio*, con algunas ligeras diferencias (Frölich et al., 2006).



**Figura 4.** Ruta biosintética de bases nécicas. Se ejemplifica para la retronecina. En el paso donde se forma la 1-hidroximetilpirrolizidina se pueden obtener como productos cuatro esteroisómeros diferentes. Para este caso se ilustra la (-)-traquelantamidina. Las enzimas implicadas en la formación de la necina son 1: Ornitin-d Descarboxilasa. 2: arginin-d Descarboxilasa. 3: agmatina iminohidrolasa. 4: N-carbamoilputrescina amidohidrolasa. 5: espermidina sintetasa. 6: Homoespermidina Sintetasa.

### 2.1.3.1 Bases nélicas: Otonecina

Los ésteres de retronecina, particularmente del tipo senecionina, están a menudo acompañados por ésteres del tipo otonecina. La otonecina no es un típico anillo bicíclico de cinco miembros, sino más bien un sistema aza-ciclooctan-4-ona N-metilado que puede actuar como un sistema de anillo de pirrolizidina debido a las interacciones trans-anulares. La unión entre el átomo de N y el grupo CO es ampliado a tal extensión que resulta en una estructura de resonancia (Röder, 1995). La otonecina es producida a partir de retronecina como el último paso de la vía biosintética, presumiblemente por una hidroxilación en el C-8 de retronecina, una metilación en N-4 y la posterior formación de un grupo ceto, con un rompimiento simultáneo del enlace C8-N4 (**Figura 5**). Esta secuencia está de acuerdo con los estudios hechos en cultivos de tejido de raíz de *S. vernalis* en los cuales el contenido de senecionina N-óxido disminuyó, mientras que la cantidad de senkirquina aumentó (Toppel *et al.*, 1987). A la misma conclusión se llegó con el estudio de la emilina, un AP del tipo otonecina producido por la planta *Emilia flammea* (Kelly *et al.*, 1989; Hartmann y Witte, 1995; Röder, 1995).



**Figura 5.** Ruta biosintética de bases nélicas del tipo otonecina.

#### 2.1.4 Biogénesis de ácidos néricos

La formación de los ácidos néricos no está muy bien entendida; aún cuando se ha demostrado que los esqueletos de carbono de éstos derivan de aminoácidos alifáticos de cadena ramificada tales como treonina, isoleucina, leucina y valina (**Figura 6**) (Röder, 1985; Robins, 1989).

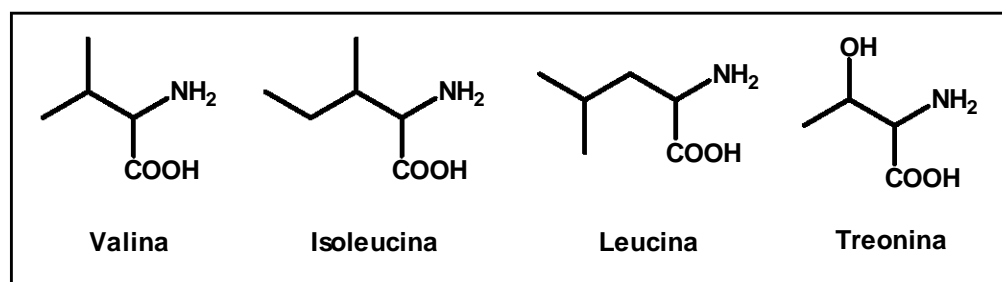
Uno de los estudios que ha demostrado de forma clara el origen biosintético del ácido seneciónico, perteneciente a los APs del tipo Senecionina, fue realizado usando cultivos de tejido de raíz de *Senecio vulgaris* y plantas de *S. pleistocephalus*. Ahí se empleó el ácido amino-butanoico marcado con  $^{13}\text{C}$  y  $^2\text{H}$ . La conclusión fue que para la biosíntesis del ácido nérico son necesarias dos unidades del precursor de la isoleucina, el ácido 2-aminobutanoico (Crout *et al.*, 1972; Stirling *et al.*, 1997).

Otro estudio concluyente fue el realizado con cultivos de tejido de la raíz de *Eupatorium clematideum* a los que se les suministró glucosa [ $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ ], y donde se demostró que la formación del ácido traquelántico se da a través del aminoácido valina con la adición de una unidad C2 proveniente de hidroxietil-TPP (acetaldehído activado) para producir así el ácido 2-oxoisovalérico, el cual, luego de una reducción, produce los ácidos néricos típicos 2,3-dihidroxisados de los APs del tipo Lycopsamina: (+)-ácido traquelántico (2'S,3'R) o ácido viridiflorico (2'S,3'S). (Weber *et al.*, 1999; Hartmann y Ober, 2000; Herbert, 2003).

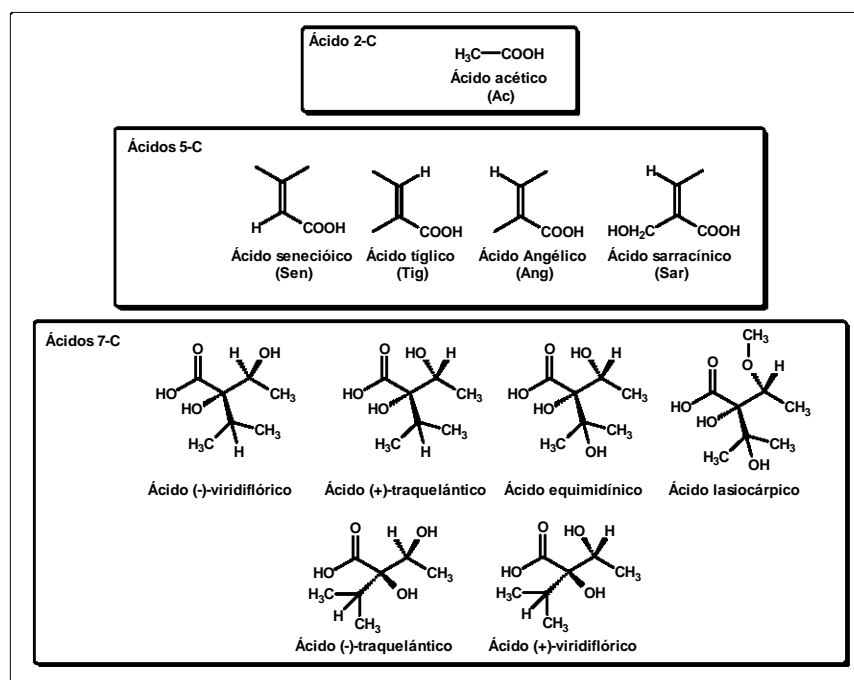


Asimismo, se han llevado a cabo algunas aproximaciones acerca del origen biosintético de otros ácidos néricos empleando marcaje radioactivo y mostrando el papel que desempeñan ciertos aminoácidos en su síntesis (Robins, 1989). Algunos ejemplos son: La incorporación de DL-[4-<sup>14</sup>C] valina en el ácido equimínico en *Cynoglossum officinale* (Crout, 1966) y de L-[U-<sup>14</sup>C] isoleucina en el ácido angélico de la heliosupina (Crout, 1967). En *Crotalaria retusa* se demostró que la L-[U-<sup>14</sup>C] isoleucina y la L-[U-<sup>14</sup>C] treonina fueron incorporadas en el ácido monocrotálico de la monocrotalina (Robins et al., 1974). En un estudio realizado en *C. globifera* los aminoácidos treonina, isoleucina, valina y leucina marcados con <sup>14</sup>C se incorporaron específicamente en el ácido tricodésmico, porción ácida de la tricodesmina (Devlin y Robins, 1984).

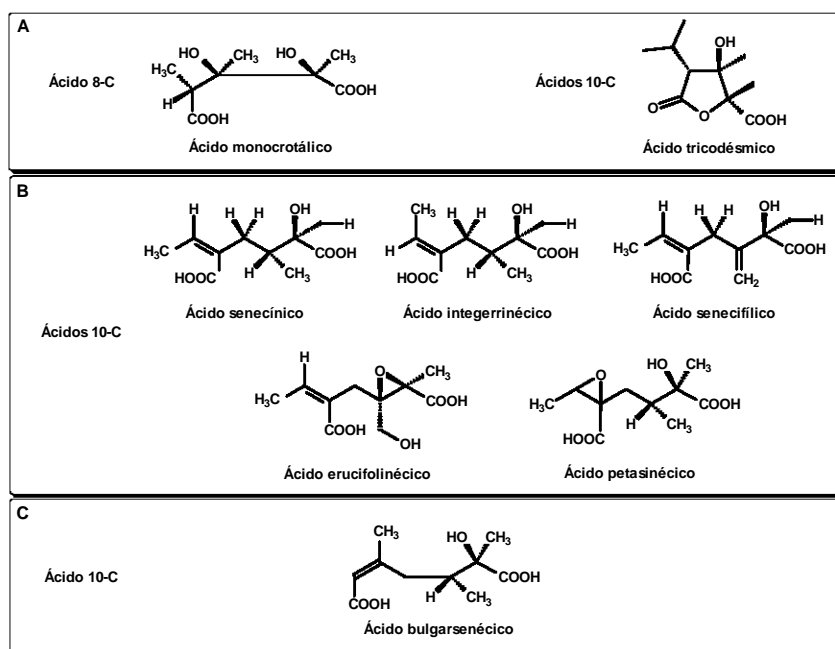
Por último, en la formación de los ácidos dicarboxílicos C-10, lo que se da es una ciclación de los diésteres de ácidos monocarboxílicos de cadena abierta (Röder, 1985). En las **figuras 7 y 8**, se ilustran algunos ácidos néricos mono y dicarboxílicos comúnmente encontrados en las estructuras de los APs.



**Figura 6.** Aminoácidos precursores biosintéticos de ácidos néricos de los APs.

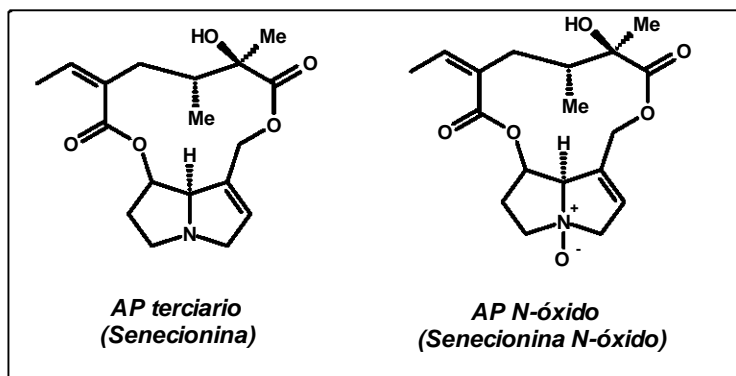


**Figura 7.** Ácidos néicos monocarboxílicos de 2, 5 y 7 carbonos más comúnmente encontrados en la estructura de los APs.



**Figura 8.** Ácidos néicos dicarboxílicos de 8 y 10 carbonos empleados para la construcción de APs macrocíclicos de **A.** 11 miembros, **B.** 12 miembros y **C.** 13 miembros.

## 2.1.5 Producción, transporte y almacenamiento.



**Figura 9.** Estructura de los APs terciarios (bases libres) y los APs N-óxidos.

El lugar de síntesis de los APs puede variar entre especies. Por ejemplo, en el género *Crotalaria* (Fabaceae), especies como *C. spectabilis* (Nowacki y Byerrum, 1962) *C. scassellatii* (Hartmann, 1994) y *C. incana* (Hartmann et al., 1989) sintetizan los APs en los tallos. De igual manera acontece en algunas especies de la familia Boraginaceae como *Heliotropium indicum* y *H. spathulatum* (Birecka y Catalfamo, 1982; Birecka et al., 1987) y de la familia Convolvulaceae como *Ipomoea hederifolia* (Jenett-Siems et al., 1998).

Caso contrario ocurre con *Symphytum officinale* (Boraginaceae) y *Phalaenopsis* sp (Orchidaceae) donde el lugar de síntesis es la raíz (Hartmann y Ober, 2000; Frölich et al., 2006) o con *Cynoglossum officinale* donde ambos, raíz y tallo, fueron capaces de producir los APs a partir de putrescina (van Dam et al., 1995). Cabe anotar que para todos los casos, los APs parecen ser sintetizados en tejidos jóvenes en desarrollo (Hartmann y Ober, 2000).

Mención aparte merece la familia Asteraceae, donde todas las especies que han sido estudiadas hasta el momento, sintetizan los APs exclusivamente en las raíces (Hartmann *et al.*, 1989; Hartmann y Ober, 2000). Esto se demostró en los estudios realizados en cultivos de tejido de raíz de *Senecio vulgaris* (Hartmann y Toppel, 1987) *S. vernalis*, *S. erucifolius* y *S. squalidus* (Toppel *et al.*, 1987). La biosíntesis de los APs en la familia Asteraceae es un proceso que está estrechamente ligado con el crecimiento de la raíz, por lo tanto cuando el crecimiento de ésta cesa, la síntesis de APs es reducida o finalizada (Sander y Hartmann, 1989; Hartmann, 1999).

Para las especies de *Senecio* que producen APs del tipo senecionina, se ha reportado a la senecionina N-óxido como el primer producto biosintético (Hartmann y Toppel, 1987). Luego, esta molécula es transportada y distribuida desde la raíz hacia toda la planta en forma de N-óxido polar (**Figura 9**), y es químicamente modificada para producir los patrones especie-específicos de APs. La translocación de los AP N-óxidos de la raíz al tallo ocurre exclusivamente vía floema (Hartmann *et al.*, 1989).

Después de ser transportados los AP como N-óxidos a los tallos, son almacenados de la misma forma en lugares preferenciales, tales como, órganos reproductivos (inflorescencias) y tejidos periféricos de tallos y hojas, representando esto un patrón de defensa contra herbívoros (Hartmann *et al.*, 1989; Hartmann, 1999). Ya a nivel celular, los AP-N-óxidos son acumulados en vacuolas, empleando para esto un transportador membranal específico (Ehmke *et al.*, 1988).

La senecionina N-óxido puede ser considerada como la estructura plantilla de la mayoría de APs macrocíclicos, especialmente del tipo senecionina. En la raíz, solo ocurren de forma limitada, pequeñas modificaciones estructurales, las cuales proceden lentamente y son separadas en tiempo y en espacio de la producción de senecionina-N-óxido (Hartmann y Toppel, 1987; Toppel et al., 1987). Por otra parte, para las especies de *Senecio*, los patrones de transformación especie-específica de los APs a partir de modificaciones hechas a la senecionina-N-óxido, ocurren principalmente en tallos, aunque también se encuentran en hojas e inflorescencias, pudiendo variar cualitativamente y cuantitativamente entre órganos. Además, la abundancia relativa de los compuestos que conforman los diferentes patrones de APs son altamente variables entre poblaciones, especies y quimiotipos (Hartmann y Dierich, 1998; Hartmann y Ober, 2000). Todas estas transformaciones representan reacciones que proceden en una posición específica y de una manera estereoselectiva. Las reacciones más comunes se pueden llevar a cabo en uno o dos pasos e incluyen: hidroxilaciones, deshidrogenaciones, epoxidaciones, *O*-acetilaciones y la formación de la base otonecina (Hartmann y Dierich, 1998). Los patrones únicos de formación, dependientes de la especie, son producidos en dos pasos consecutivos: el primero, la síntesis de la estructura “plantilla” y el segundo, la diversificación estructural. Esta última representa un equilibrio dinámico entre diferentes procesos: la tasa biosintética de la senecionina N-óxido en la raíz, la eficiencia y especificidad de las transformaciones enzimáticas, la distribución continua, la acumulación en tejidos específicos y el almacenamiento en vacuolas (Hartmann, 1999; Hartmann y Ober, 2000).

A pesar de la movilidad espacial de los APs y de la lenta distribución, estos no sufren degradación o modificaciones adicionales y no son distribuidos equitativamente dentro de la planta, sino que hay sitios de acumulación preferidos (*Hartmann, 1999; Hartmann y Ober, 2000*).

### **2.1.6 Toxicidad**

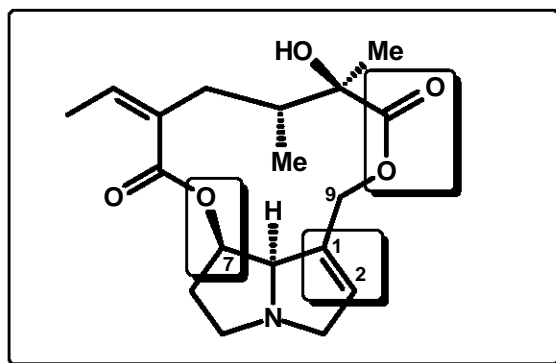
Muchas de las plantas que producen APs son responsables del envenenamiento del ganado. Aunque éste generalmente no se alimenta con plantas que contengan APs, sí se da el consumo en épocas de sequía o con reservas de alimento contaminado. Dentro de las más conocidas están las plantas de los géneros *Crotalaria*, *Heliotropium*, *Senecio* y *Symphytum* (*Hartmann, 1991; Hartmann y Witte, 1995; Seigler 1998; Prakash et al., 1999*).

En humanos, el envenenamiento por APs, ha sido atribuido al consumo accidental de plantas que contengan estos alcaloides. Por ejemplo, trigo contaminado con semillas de *Heliotropium* o *Crotalaria*, miel elaborada a partir de *Senecio jacobaeae*, consumo de leche producida por ganado que se alimenta sobre plantas con APs o consumo de té. Así, aunque estas plantas se emplean medicinalmente, el uso de éstas no es recomendable debido a los efectos tóxicos de los APs (*Prakash et al., 1999; Stewart y Steenkamp, 2001*). Los principales efectos tóxicos reportados en humanos son a nivel hepático, dando origen a la dolencia conocida como síndrome veno-oclusivo del hígado, clasificada como aguda o crónica. En casos agudos se dan ataques repentinos de dolor abdominal,

diarrea, vómitos y hepatomegalia. En casos crónicos, se presenta astenia y otros signos de hipertensión portal, fibrosis, cirrosis y lesiones vasculares. Cuando las lesiones son extensas el fallo renal puede ocasionar la muerte. Después del hígado, los principales efectos tóxicos se dan a nivel pulmonar, generando cambios en la vasculatura como trombosis en vasos, inflamación aguda y estrechamiento de los vasos, lo que conduce a oclusión. Todo esto, aunado a la fibrosis inter-alveolar, conlleva a hipertensión pulmonar y eventualmente a falla cardíaca (*Mattocks, 1986; Rizk, 1991; Stewart y Steenkamp, 2001*).

Adicionalmente, diferentes estudios sobre animales realizados *in vitro* y/o *in vivo*, le han atribuido a los APs propiedades carcinogénicas (*Svoboda y Reddy, 1972; Allen et al., 1975; Kuhara et al., 1980, Mattocks y Cabral, 1982; Wang et al., 2005*), mutagénicas (*Yamanaka et al., 1979; Frei et al., 1992; Rubiolo et al., 1992; Candrian et al., 1984; Mei et al., 2004; Mei et al., 2005*), teratogénicas (*Sivlingham y Brink; 1988; Mattocks, 1986*) y genotóxicas (*Fu et al., 2004 y las referencias incluidas allí*). Todos estos efectos serán producidos por las interacciones de los APs con biomoléculas, que incluyen unión a ADN, entrecruzamiento con ADN, entrecruzamiento Proteína-ADN, aberraciones cromosomales entre otras. Recientemente, ensayos con receptores *in vitro*, mostraron que algunos APs presentan propiedades neurotóxicas (*Schmeller et al., 1997*). A pesar de los resultados obtenidos en animales, es escasa la evidencia de que éstos compuestos sean carcinogénicos o genotóxicos en humanos (*Stewart y Steenkamp, 2001; Prakash et al., 2001*).

### 2.1.6.1 Mecanismo de toxicidad



**Figura 10.** Requerimientos estructurales para la toxicidad de los APs.

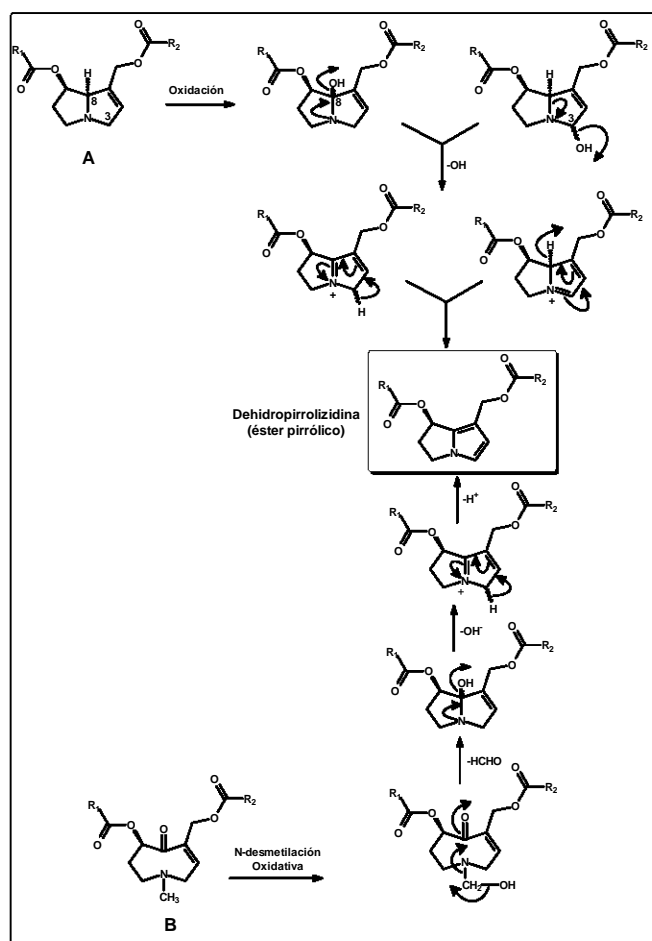
Los APs no son tóxicos *per se*, requieren ser modificados metabólicamente a través de una deshidrogenación a estructuras electrófilas altamente reactivas; con potentes propiedades alquilantes conocidas como ésteres pirrólicos o dehidropirrolizidinas (DHPs) (Röder, 1985; Hartmann y Witte, 1995; Dewick, 2002; Ivonne et al., 2005).

Cabe anotar, que no todos los APs son pro tóxicos, únicamente las bases libres (forma terciaria), aunque los N-óxidos ingeridos también pueden ser reducidos para producir metabolitos tóxicos (Hartmann y Witte, 1995). Para ser metabolizados a pirroles, necesitan cumplir con una serie de requerimientos estructurales tales como: a) poseer una base néica con un doble enlace en posición 1-2, b) que el hidroxilo alílico en C-9 esté esterificado y c) que el hidroxilo en posición C7 se encuentre libre o esterificado (**Figura 10**) (Mc Lean, 1970; Hartmann, 1999; Prakash et al., 1999; Hartmann y Ober 2000).

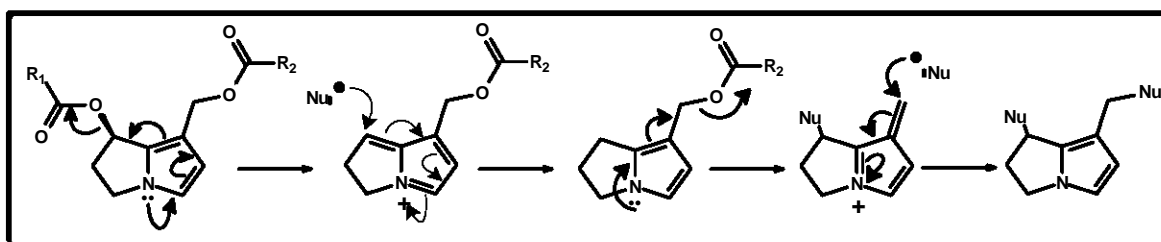


Los ésteres pirrólicos son producidos en el hígado de los mamíferos a partir de los APs pro tóxicos, empleando el sistema enzimático Citocromo P450 (CytP450), específicamente las isoformas CYP3A y CYP2B. Los ésteres pirrólicos son capaces de unirse a ciertos sitios en el hígado y a su vez formar aductos y entrecruzarse con macromoléculas como el ADN, el ARN y las proteínas, afectando su estructura y función. Esta unión puede producir mutaciones y muerte celular, conllevando a malformaciones fetales y/o carcinogénesis. Asimismo, estos aductos pueden permanecer en los tejidos y generar daño agudo o crónico en hígado o pulmones. Por lo tanto, la bioactivación de las bases libres para la formación de los pirroles es quizás el único evento responsable de los efectos tóxicos atribuidos a los APs (*Fu et al., 2004; Ivonne et al., 2005*).

El mecanismo de acción por el cual se forman los metabolitos pirrólicos, se da por una hidroxilación en las posiciones C3 o C8 de la base néctica insaturada en su forma terciaria o una demetilación oxidativa en las bases tipo otonecina. Luego se produce una deshidratación espontánea que lleva a la formación de la correspondiente DHP (**Figura 11**). Posteriormente, se genera una carga positiva localizada en posición C7 y luego en posición C9 de la base necina. En presencia de nucleófilos ( $\text{Nu}^-$ ) presentes en biomacromoléculas tales como el azufre (S) de las proteínas o el Nitrógeno (N) de los nucleótidos, los diésteres sufren una sustitución nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), simple o doble (**Figura 12**) (*Castagnoli Jr 1997; Röder; 1997; Dewick, 2002; Fu et al., 2004*).



**Figura 11.** Formación de los ésteres pirrólicos a partir de diferentes bases nélicas **A.** Retronecina (configuración *R* en la posición C7) o Heliotridina (configuración *S* en la posición C7, no ilustrada) **B.** otonecina. (Modificado de Fu et al., 2004 )



**Figura 12.** Vía metabólica de los alcaloides dehidropirrolizidínicos o ésteres pirrólicos. Nu<sup>-</sup> representa elementos nucleofílicos de macromoléculas, tales como el azufre (S) de las proteínas o el nitrógeno (N) en el ADN. La pérdida de un primer grupo saliente genera un ion iminio conjugado que actúa como electrófilo, igual ocurre cuando se da la pérdida de un segundo grupo saliente en C9. La estructura unida a dos Nu<sup>-</sup> es más tóxica.

Adicionalmente, los DHPs pueden ser metabolizados a través de varias reacciones (i) deshidrogenación para producir DHPs menos tóxicos (*Huxtable et al., 1978*), (ii) conjugación con una o dos unidades de glutatión (GSH) para formar 7-glutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina o 7,9-diglutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina, respectivamente, que luego son excretados en la bilis (*Mattocks et al., 1991; Mattocks y Jukes, 1992; Yan y Huxtable, 1994*) y (iii) liberación en la circulación produciendo daño hepático y de otros órganos (*Allen et al., 1969*). La reacción de conjugación con glutatión es catalizada por la glutatión S-transferasa y es considerada como la principal vía de desintoxicación de las DHPs (*White, 1976; Yan y Huxtable 1995a; Yan y Huxtable, 1995b; Lin et al., 1998, Lin et al., 2000*).

Además del alcaloide en particular y de la naturaleza de la exposición, la toxicidad de los diferentes APs depende de la fracción alcaloidea que es convertida a pirrol, la tasa de conversión y la reactividad química del pirrol (*Mattocks, 1968; Peterson y Jago, 1984; Stewart y Steenkamp, 2001*), así como de la relación de esta cinética de formación con las vías de desintoxicación (*Fu et al., 2004*).

### **2.1.7 Metabolismo**

#### **a) Metabolismo de los APs Pro-tóxicos.**

Generalmente en vertebrados, los APs insaturados son metabolizados a través de tres vías: 1) hidrólisis de los ésteres ubicados en las posiciones C-7 y C-9 de las bases nélicas, 2) la N-oxidación de las bases nélicas terciarias a su correspondiente N-óxido,

los cuales son relativamente no reactivos y fácilmente excretados en la orina por su solubilidad en agua y 3) la ya nombrada oxidación y posterior deshidratación para formar las DHPs tóxicas (ésteres pirrólicos) (*Castagnoli Jr et al., 1997; Fu et al., 2004*). Caso especial es el de los APs del tipo otonecina, que son metabolizados por dos vías, la primera es a través de la hidrólisis de los ésteres para producir la respectiva base y ácidos que componen el AP, la segunda ruta es la ya mencionada N-demetilación oxidativa de la base néctica, seguida del cierre del anillo y por último, una deshidratación (*Fu et al., 2004*).

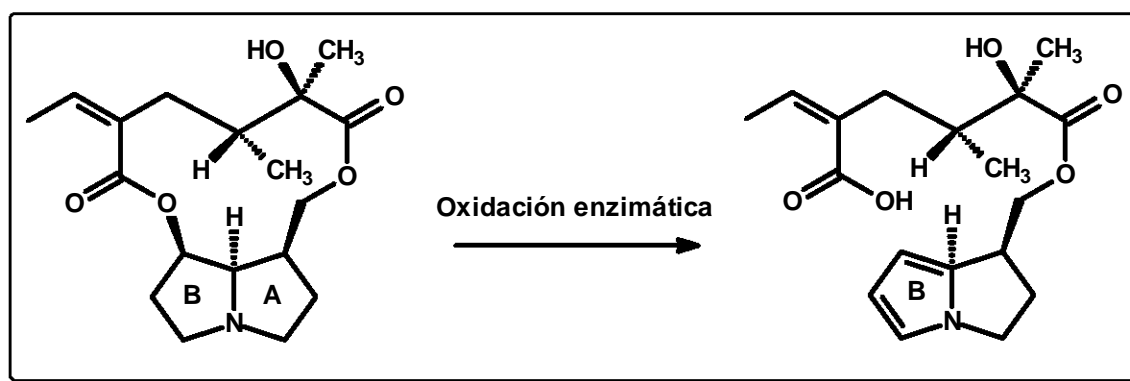
La hidrólisis en los APs insaturados y la N-oxidación, exceptuando ésta para los del tipo otonecina, son consideradas como las vías de desintoxicación de los APs por excelencia. Para la hidrólisis de los ésteres se emplean las enzimas denominadas carboxilestearasas del hígado, que pueden ser microsomales o citosólicas. Para la formación de los N-óxidos son varias las enzimas que se encuentran comprometidas, estas pueden ser Flavin-monooxigenasas (FMO) y las enzimas del sistema Citocromo P450, principalmente la isoforma CYP3A (*Fu et al., 2004*).

También se ha demostrado una marcada diferencia en susceptibilidad a los efectos tóxicos de los APs entre distintas especies animales, tal es el caso de corderos, cabras, cobayos, hamsters, conejos y codornices, que son altamente resistentes, a diferencia de ratas, aves de corral y ganado vacuno, porcino y equino, que presentan alta susceptibilidad. Estas diferencias son atribuidas a las variaciones que se presentan en el balance de la eficiencia que tienen las enzimas que metabolizan el AP a la hora de formar el pirrol tóxico y las vías de desintoxicación para producir metabolitos menos tóxicos o

no tóxicos. Por lo tanto las especies que tienen una alta tasa de formación de ésteres pirrólicos, son las especies susceptibles (*Prakash et al., 1999; Ivonne et al., 2005*).

Un claro ejemplo de esto lo dan los cobayos, que al poseer una Flavín monooxigenasa microsomal multisustrato que cataliza efectivamente la conversión del AP ingerido en su respectivo N-óxido, hace que la tasa de formación del N-óxido sea mucho mayor que la de formación del pirrol, explicando así la alta resistencia de esta especie al envenenamiento por APs (*Miranda et al., 1991; Hartmann, 1999*). Asimismo ocurre en el caso de los corderos, donde las tasas de producción de pirroles son bajas (*Fu et al., 2004*). Además se encontraron altos niveles de actividad de la enzima microsomal epóxido hidrolasa hepática, la cual cataliza la hidrólisis de los APs y fue sugerida como la responsable de la resistencia de los corderos a los efectos tóxicos de los APs (*Swick et al., 1983*).

**b) Metabolismo de los APs no tóxicos (1, 2-saturados).**



**Figura 13.** Metabolismo de los APs 1,2-saturados. En el anillo B se forma el pirrol, pero debido a que el átomo de Nitrógeno no está conjugado, esta estructura es mucho más estable y no es susceptible a reacciones con nucleófilos.

Los APs saturados y sus bases nélicas no son tóxicos, ya que no cumplen con uno de los requisitos estructurales clave, como es la insaturación en posición 1,2. Los APs saturados sufren una ruptura hidrolítica en C-7 con la posterior formación de un pirrol en el anillo B de la base nélica (**Figura 13**). A diferencia de los pirroles tóxicos formados en el anillo A, los B son más estables y no susceptibles a reacciones con nucleófilos (Röder, 1995).

### 2.1.8 Química ecológica

Una de las características más importantes de los APs es el papel que desempeñan en las relaciones planta-insecto. Respecto a la capacidad de atraer insectos especializados, los APs son únicos entre la gran cantidad de alcaloides que han sido aislados y caracterizados. Ya se mencionaron los efectos tóxicos de los APs y su mecanismo de toxicidad, por lo tanto es posible pensar que los insectos que emplean en su metabolismo las enzimas CytP450 microsomales, deben ser afectados por los APs tal y como ocurre en vertebrados (Hartmann 1995; Hartmann 1999; Hartmann y Ober, 2000; Hartmann, 2004). Entonces cabría preguntar, ¿Por qué los insectos de diferentes taxones no relacionados son capaces de resistir y secuestrar APs?

La razón de la producción de APs en plantas parece ser el uso de éstos como agentes protectores contra herbívoros generalistas, debido a que estos últimos no se alimentan de plantas que producen dichos alcaloides. Si lo hicieran reducirían los N-óxidos en su intestino produciendo bases libres lipofílicas y pro tóxicas (Hartmann 1999).

A diferencia de los generalistas, un número de especies de diferentes taxa han adquirido adaptaciones, no sólo que superan la barrera de defensa de las plantas que son protegidas por APs, sino también que los secuestran y funcionan en su propio beneficio. Esto se da basándose en la característica de que los APs son exclusivamente sintetizados, distribuidos y almacenados como N-óxidos. Así, los insectos herbívoros adaptados almacenan los APs exclusivamente como N-óxidos. Por lo tanto, se considera a la N-oxidación de las bases libres como el principal mecanismo de desintoxicación de APs en insectos al convertir las bases libres potencialmente tóxicas en derivados que no pueden ser transformados en la toxina alquilante (*Hartmann, 1995; Hartmann, 1999; Hartmann y Ober, 2000; Hartmann, 2004*).

Un gran número de insectos pertenecientes a diferentes órdenes tales como lepidópteros, coleópteros, ortópteros, homópteros y hemípteros son conocidos por secuestrar APs de plantas. Algunas de estas especies son especialistas ya que restringen su dieta a ciertas plantas, pero otras son polífagas y se alimentan de varias plantas que producen APs. Estos insectos pueden almacenar los APs al consumirlos en su dieta para luego utilizarlos como sustancias protectoras o emplearlos en la producción de hormonas sexuales (*Boppré, 1986; Hartmann y Witte, 1995*). A continuación se dan algunos ejemplos del destino que le imparten distintas especies de diferentes órdenes a estos alcaloides:

- ***Orden Lepidoptera***

Es el orden en donde mayor número de interacciones planta-insecto que involucran APs han sido reportadas. A lo largo de tres décadas, se ha acumulado un gran

volumen de evidencia (Von Nickisch-Rosenegk y Wink, 1993; Hartmann y Witte, 1995; Nishida, 1995; Trigo et al., 1996; Nishida, 2002). Especies pertenecientes a la familia Danainae, como es el caso de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) (Edgar et al., 1976; Kelley et al., 1987) y especies de las familias Arctiidae, Ctenuchidae e Ithomiinae secuestran APs, no sólo como mecanismo de defensa química, sino también como precursores de feromonas, determinantes del crecimiento y claves en la selección sexual. Todas las mariposas y polillas que se especializan en secuestrar APs son aposemáticas y no-palatables (Boppré, 1986).

Uno de los ejemplos más contundentes y representativos del papel que juegan los APs en las relaciones planta-insecto lo da la polilla americana *Utetheisa ornatrix* (Arctiidae) (Eisner y Meinwald, 1995). Las larvas de *U. ornatrix* secuestran APs cuando se alimentan de plantas del género *Crotalaria* (Fabaceae) y los conservan a través de los diferentes estadios hasta llegar al estado adulto, brindándoles así protección contra depredadores (Eisner y Eisner, 1991). Ya en el estado adulto, a través de la copulación, la hembra recibe del macho un aporte de APs, que al juntarlos con los que ella adquirió en su etapa larval, los transmite a los huevos (Dussourd et al., 1991). Esta transferencia provee tanto a la madre (Gonzalez et al., 1999), como a los huevos, de una eficiente protección contra insectos depredadores tales como coccinélidos (Dussourd et al., 1988), hormigas (Hare y Eisner, 1993), la larva *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera, Chrysopidae) (Dussourd et al., 1991; Eisner et al., 2000) y la avispa parasitoide *Trichogramma ostriniae* (Bezzarides et al., 2004).



Los machos de *Utetheisa* utilizan el anillo de necina obtenido de la planta y sintetizan la hormona hidroxidanaidal (*Culvenor y Edgar, 1972; Conner et al., 1981*). Esta feromona, emitida por el órgano llamado coremata, es la que rige el comportamiento de apareamiento, informando a la hembra el contenido de APs del macho. Así la hembra sabe la cantidad de químicos de protección que puede ganar durante la cópula para transmitirlos a su progenie (*Conner et al., 1990; González et al., 1999; Iyengar y Eisner, 1999*).

A diferencia de los Arctiidos donde son las larvas las que secuestran los APs, en las familias de mariposas Ithomiinae y Danainae son los adultos. Estos ingieren los APs a través del consumo de néctar o mojan la parte de la planta a consumir (partes muertas o marchitas) con el fluido de su proboscis, para luego ingerir los APs extraídos (*Boppré, 1984; Boppré, 1986*).

Todas las especies de lepidópteros que secuestran APs están bien protegidas contra depredadores. Varios estudios han demostrado que huevos, larvas y adultos de mariposas que basan su dieta en plantas que contengan APs, son rechazados o evitados por arañas (*Masters, 1990; Trigo et al., 1993; Orr et al., 1996; Trigo et al., 1996b; Conner et al., 2000; Silva y Trigo, 2002*).

Algunas otras especies que han sido estudiadas y en donde se han observado patrones similares de secuestro y empleo de los APs son: *Cretonotos transiens* (Arctiidae) (*Boppré y Schneider, 1985; Wink y Schneider, 1988; Wink et al., 1988; Egelhaaf et al., 1990; Hartmann et al., 1990; Von Nickisch-Rosenegk et al., 1990; Schulz et al., 1993*), *Tyria jacobaeae* (Arctiidae) (*Aplin et al., 1968; Rothschild et al., 1979;*

*Edgar et al., 1980; Ehmke et al., 1990; Von Nickisch-Rosenegk y Wink, 1993; Lindigkeit et al., 1997), Danaus gilippus y D. chrysippus (Danainae) (Edgar y Culvenor, 1974; Boppré, 1986; Dussourd et al., 1989;), Grammia geneura (Hartmann et al., 2004b; Hartmann et al., 2005a) y Estigmene acrea (Hartmann et al., 2004a; Hartmann et al., 2005b), entre otras (Trigo y Brown Jr. 1990, Trigo et al., 1993; Freitas et al., 1996; Trigo et al., 1996a; Trigo et al., 1996b; Weller et al., 1999; Bruckmann et al., 2000; Hristov y Conner, 2005).*

- **Orden Coleoptera**

Con relación a los APs, son el segundo orden más estudiado, después de los lepidópteros. En especial los escarabajos del género *Oreina* (Chrysomelidae), las especies *O. speciosissima*, *O. frigida*, *O. elongata* y *O. intricata* secuestran APs como N-óxidos de sus plantas hospederas (*Adenostyles alliariae*, *A. alpina* y *A. leucophylla*, *Senecio nemorensis* y *S. fuchsii*) que liberan como compuestos de defensa a través de sus glándulas exocrinas. Además, es conocido que estos insectos especialistas sintetizan cardenólidos a partir de colesterol como mecanismo de defensa (*Pasteels, 1993; Dobler y Rowell-Rahier 1994a; Dobler y Rowell-Rahier 1994b; Pasteels et al., 1996*). Un caso particular lo representan los adultos de *O. cacaliae*, que no tienen la capacidad de sintetizar cardenólidos, pero si secuestran, como N-óxidos, senecifilina y senecionina de su planta hospedera *Adenostyles alliariae* (Asteraceae) (*Pasteels et al., 1988; Rowell-Rahier et al., 1991; Ehmke et al., 1999; Hartmann T, 1999*). Los APs pueden ser almacenados de forma selectiva en el cuerpo (hemolinfa) o en las glándulas exocrinas de defensa, siendo la transferencia a estas últimas altamente específica ya que solo se

encuentran ésteres macrocíclicos de retronecina del tipo Senecionina (*Hartmann et al., 1997; Hartmann y Ober, 2000*).

*Platyphora* es otro de los géneros del orden Coleoptera que ha sido ampliamente estudiado. De éste, nueve especies han sido reportadas como secuestradoras de APs. Estos insectos se alimentan de miembros de la familia Asteraceae tribu *Eupatorieae*, Apocynaceae o Boraginaceae, que contienen APs del tipo Lycopsamina. Al igual que en las especies de *Oreina*, estos transfieren los APs a sus secreciones exocrinas, pero en vez de cardenólidos todas las especies secretan saponinas triterpénicas pentacíclicas. Otra diferencia importante con el género *Oreina* donde los APs son secuestrados como N-óxidos, es que los insectos del género *Platyphora* pueden ingerir los APs como base libre o N-óxido, pero los almacenan exclusivamente como base libre (terciarios). Además, no los acumulan en la hemolinfa, sino que los transfieren rápidamente a las glándulas secretoras. Dentro de los APs comúnmente secuestrados están la intermedina, lycopsamina y sus  $O_3$ -acetil o propionil ésteres, así como  $O_7$ - y  $O_9$ -hidroxi-isovaleril retronecin-ésteres (*Pasteels et al., 2001, Pasteels y Hartmann, 2004*). También se ha demostrado que varias especies, como *P. boucardi*, *P. eucosma* y *P. bella* tienen la capacidad de modificar estructuralmente los APs obtenidos de sus plantas hospederas *Prestonia portobellensis* (Apocynaceae), *Koanophyllon panamense* (Asteraceae, tribu *Eupatorieae*) y *Tournefortia cuspidate* (Boraginaceae), respectivamente. Algunas reacciones que estas especies catalizan son: (i) epimerización de los APs con configuración (7*S*) del tipo Lycopsamina adquiridos de la planta, cuyo mecanismo ya fue resuelto (*Hartmann et al., 2003b*) (ii) La esterificación de la base néctica obtenida de la planta con ácidos nécticos sintetizados por el insecto, produciendo APs específicos del

insecto, (iii) epimerización en 3' y (iv) transformación de APs triesterificados en monoésteres del tipo Lycopsamina, que luego son acumulados en las secreciones de defensa (Hartmann *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2003b; Pasteels *et al.*, 2003a; Pasteels *et al.*, 2003b).

Otros Coleópteros también han sido estudiados. Tal es el caso de diferentes especies del género *Longitarsus*, capaces de secuestrar APs de diferentes familias de plantas (Asteraceae y Boraginaceae) (Haberer y Dobler, 1999; Dobler *et al.*, 2000) ó el escarabajo *Chauliognathus fallax*, que secuestra los APs de las inflorescencias de su planta hospedera, *Senecio brasiliensis* (Klitzke y Trigo, 2000).

- **Orden Orthoptera**

Los adultos del saltamonte *Melanoplus sanguinipes* secuestran los APs que consumen al alimentarse sobre *Senecio vulgaris*. Los alcaloides identificados corresponden al mismo patrón de la planta, e incluye los esteroisómeros *Z* y *E*-senecionina (30%) e integerrimina (5 %), así como senecifilina (50%), espartoidina (13 %), y trazas de senecivernina (2%). En el análisis de las heces, los APs fueron encontrados como N-óxidos, indicando que no hubo reducción de los alcaloides en el sistema digestivo del insecto. Así, este insecto puede resistir los APs, además de poseer un efectivo sistema de excreción (Ehmke *et al.*, 1989).

Otro ejemplo del orden Orthoptera lo dan los saltamontes aposemáticos del género *Zonocerus*. Tal es el caso del saltamontes africano *Z. variegatus* (L.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae), el cual muestra gran atracción por lo APs y se alimenta impunemente

sobre *Chromolaena odorata*, planta que contiene los APs como N-óxidos (rinderina, intermedina, 3'-O-acetil ester de rinderina, supinina y los 7 y 9 ésteres de angeloil retonecina). Los huevos y todos los estadios de ambos géneros del insecto *Z. variegatus* contienen APs, con algunas variaciones del patrón químico que presenta la planta. En el insecto se encuentran ausentes los 7 y 9 ésteres y el 3'-O-acetil éster. Los mayoritarios, igual que en las inflorescencias de la planta son intermedina y rinderina. Pero la mayor diferencia se da con lycopsamina y equinatina, APs presentes en el insecto más no en la planta. Estos últimos son los esteroisómeros de intermedina y rinderina respectivamente con configuración (S) en posición 3'. Se dedujo que el cambio de la configuración de (R) a (S) lo realiza el insecto en su tracto digestivo, asimismo que este puede modificar la configuración de la base néctica en posición C-7, pasando de 7(S)-heliotridina a 7(R)-retronecina (Bernays et al., 1977; Biller et al., 1994).

Por último, para las ninfas y adultos del saltamontes *Zonocerus elegans* (Thunb.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae), se demostró la capacidad de detección de APs y la atracción por diferentes especies productoras de éstos pertenecientes a los géneros *Senecio* (Asteraceae), *Heliotropium* (Boraginaceae), y *Crotalaria* (Fabaceae) (Boppré et al., 1984).

- **Orden Homoptera**

El áfido, *Aphis jacobaeae* Schrank (Aphididae) es un especialista que se alimenta únicamente sobre especies de *Senecio* (*S. jacobaea*, *S. inaequidens* y *S. silvaticus*). El análisis del insecto y su secreción, mostró que los patrones de APs fueron los mismos que

los de sus plantas hospederas, exceptuando la acetilerucifolina en *S. jacobaea* y los APs del tipo otonecina en *S. inaequidens* (Witte et al., 1990; Vrieling et al., 1991).

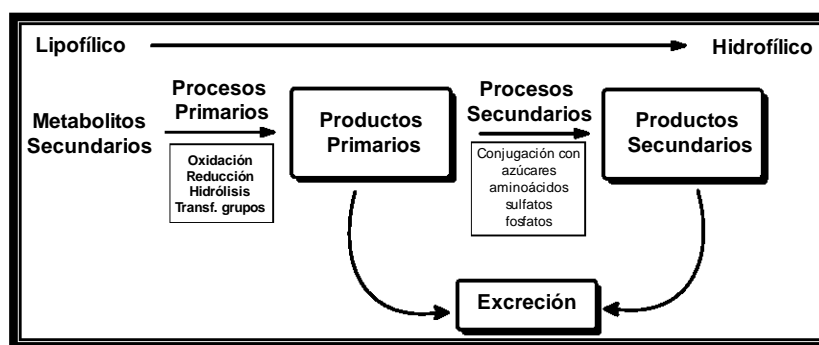
Adicional a la presencia de los áfidos, las diferentes especies de *Senecio* se encuentran infestadas por el enemigo natural de éstos, el coleóptero *Coccinella septempunctata* L., Coccinellidae. El estudio demuestra que el coleóptero también secuestra los APs, obtenidos a través de su presa, ilustrando así el flujo inter específico y el papel que juegan los APs en interacciones tri tróficas (Benn et al., 1979; Witte et al., 1990). Es importante anotar que tanto los áfidos, como los coccinélidos, almacenan los APs como bases libres o terciarias, a diferencia de su planta hospedera en donde están presentes exclusivamente como N-óxidos (Witte et al., 1990).

- **Orden Hemiptera**

Hasta el momento son pocos los insectos del orden Hemiptera reportados como secuestradores de APs (McLain y Shure, 1985; Klitzke y Trigo, 2000). Los adultos y ninfas del hemíptero de coloración aposemática, *Largus rufipennis*, al alimentarse sobre los tallos de *Senecio brasiliensis* (Asteraceae), secuestran los APs producidos por la planta, entre ellos senecionina e integerrimina. Quizás almacenan los APs para protección, tal como se demostró en ensayos preliminares, donde *L. rufipennis* fue rechazado por depredadores como *Nephila clavipes* y *Cyanocorax caeruleus* (Corvidae) (Klitzke y Trigo, 2000).

### 2.1.9 Mecanismos de secuestro y desintoxicación de APs por insectos.

En las interacciones planta-insecto se libra una batalla en todo momento, las plantas defendiéndose para no ser comidas y los insectos para comer impunemente. Las plantas han generado una gran cantidad de metabolitos secundarios que contrarrestan el ataque de los insectos. De la misma forma, los insectos evitan aquellos, desplegando gran cantidad de mecanismos que están en constante evolución, siendo los sistemas de desintoxicación enzimática el factor más importante en la tolerancia fisiológica de los tóxicos producidos por las plantas (Brattsten, 1979; Brattsten, 1992). La degradación-modificación metabólica se puede dividir en procesos primarios y secundarios. El producto de los procesos primarios es a veces lo suficientemente polar para ser excretado directamente o puede ser convertido a productos conjugados más fácilmente excretables. Los productos resultantes son más solubles en agua (hidrofílicos) que el compuesto de donde derivan (Brattsten, 1979; Brattsten, 1992) (Figura 14).



**Figura 14.** *Procesos de desintoxicación.*

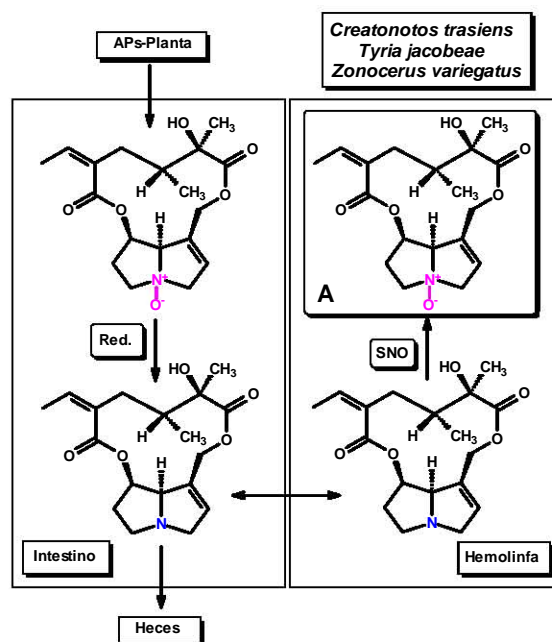
Como ya se ha anotado, los APs existen en dos formas intercambiables, la polar, como sal, no tóxica, conocida como N-óxido y la lipofílica, como base libre (terciaria), potencialmente tóxica. Cuando los organismos, más específicamente los insectos, son

capaces de mantener los APs en su estado de N-óxido, están “metabólicamente” seguros. Sin embargo cuando los N-óxidos son reducidos, se produce la pro toxina que dará origen al metabolito alquilante, causante de la toxicidad. Esta característica clave de los APs, de poder existir en dos formas intercambiables (base libre vs N-óxido), es la que permite a los insectos secuestrar y utilizar los APs sin sufrir daño alguno (Véase **Figura 9**). Además de servirles como mecanismo de defensa, ya que un depredador que tenga el sistema microsomal CytP450 y ataque a un herbívoro que secuestra APs como N-óxidos, reducirá estos en el intestino y los absorberá como APs terciarios pro tóxicos. A continuación se presenta una descripción de las estrategias bioquímicas empleadas por los insectos para el consumo, secuestro y almacenamiento de los APs.

Las larvas de la familia Arctiidae, *Tyria jacobaeae* y *Cretonotos trasiens*, y el saltamontes aposemático *Zonocerus variegatus*, pueden tomar los APs terciarios con la misma eficiencia que los respectivos N-óxidos, pero la desintoxicación y el almacenamiento de los APs lo hacen exclusivamente por N-oxidación. El mecanismo consiste en tomar el alcaloide como N-óxido y reducirlo en el intestino, luego el AP en su forma terciaria-lipofílica es absorbido por difusión pasiva en la hemolinfa, lugar donde sufre de nuevo una N-oxigenación. Mediante diferentes ensayos se determinó, en la hemolinfa de varios Arctiidos (*Tyria jacobaeae*, *Callimorpha dominulla*, *Cretonotos trasiens*, *Arctia caja*, *A. intercallaris*, *Amerila phaedra* e *Idea leuconoe*), la presencia de una enzima tipo Flavin monooxigenasa dependiente de NADPH, responsable de la N-oxidación (**Figura 15**). Esta enzima, denominada Senecionina N-oxigenasa (SNO), es no microsomal y altamente específica, ya que sólo N-oxida APs con las características estructurales necesarias para que un AP sea pro tóxico (*Lindigkeit et al., 1997*). En el



2002, Naumann y colaboradores, purificaron la SNO de *T. jacobaeae* y caracterizaron la secuencia aminoacídica, para después expresar la proteína recombinante en su forma activa en *E.coli* (Naumann et al., 2002).



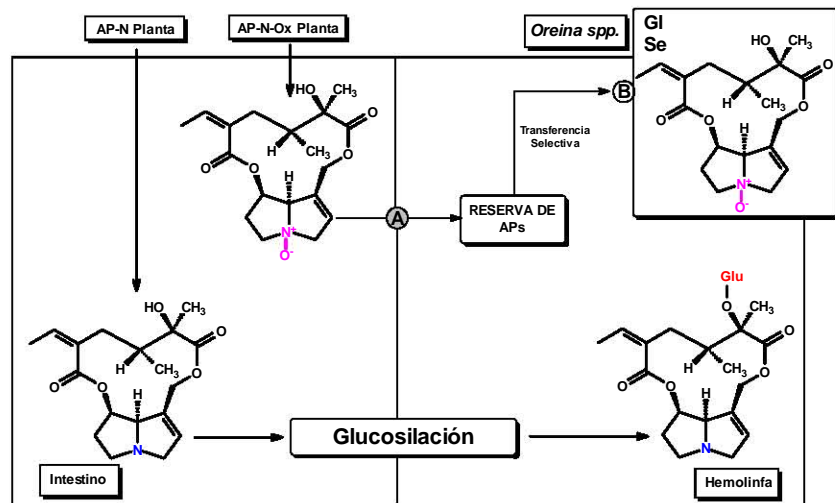
**Figura 15.** Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por *C. trasiens*, *T. jacobaeae* y *Z. variegatus*. Los APs ingeridos como N-óxido son reducidos en el intestino (Red.) y permean la membrana para cruzar a la hemolinfa, donde son nuevamente N-oxidados utilizando la enzima Senecionina-N-oxigenasa (SNO) (Lindigkeit et al., 1997; Hartmann et al., 1999).

*Estigmene acrea* y *Grammia geneura* son dos insectos polívoros pertenecientes a la familia Arctiidae. Con respecto a los mecanismos de secuestro y procesamiento de los APs, éstos tienen varias características en común con las especies ya descritas: (i) son “farmacófagos” (Boppré, 1984), ya que utilizan la planta como una fuente de alcaloides más que como una fuente nutricional; (ii) los APs secuestrados son almacenados como N-óxidos no tóxicos y transmitidos a lo largo de su ciclo de vida; (iii) pueden utilizar APs de casi cualquier tipo estructural, excepto los del tipo otonecina, que no pueden ser desintoxicados por N-oxidación, (iv) la N-oxidación de los APS terciarios (pro tóxicos)

es catalizada por una enzima específica que garantiza la tolerancia y mantenimiento de los APs, pero para este caso parece ser de amplio espectro a diferencia de la de *Tyria* que prefiere los del tipo Senecionina, (v) a partir de las bases nécticas de los APs obtenidos de la planta sintetizan los APs propios de cada insecto. *G. geneura* re-esterifica las necinas para producir creatonotinas y callimorfinas, de las cuales sólo las primeras están presentes en *E. acrea* (véase **Figura 18**) (Hartmann et al., 2004a; Hartmann et al., 2004b; Hartmann et al., 2005a; Hartmann et al., 2005b). Cabe anotar que las creatonotinas han sido aisladas de *C. transiens* (Hartmann et al., 1990; Schulz et al., 1993) y *T. jacobaeae* (Ehmke et al., 1990). Asimismo, las callimorfinas han sido descritas en *Tyria jacobaeae* (Aplin et al., 1968; Edgar et al., 1980; Ehmke et al., 1990) *Callimorpha dominula* (Edgar et al., 1980), *Gnophaela latipennis* (L'Empereur et al., 1989), *Hyalurga syma* (Trigo et al., 1993) y *Creatonotos transiens* (Wink et al., 1988; Hartmann et al., 1990), (vi) *E. acrea* sintetiza la feromona de cortejo hidroxidanaidal a partir de los APs obtenidos de la planta (Hartmann et al., 2005b).

Los crisomélidos del género *Oreina*, almacenan los APs en sus cuerpos y glándulas exocrinas exclusivamente como N-óxidos, pero a diferencia de los Arctiidos y *Z. variegatus* carecen de la capacidad de reducirlos en el intestino y de N-oxidar los APs terciarios (Ehmke et al., 1991). Las larvas y los adultos de *O. cacaliae* absorben los APs en forma de N-óxidos. Esta toma no es específica y no discrimina entre diferentes estructuras de APs de plantas. Como N-óxidos son mantenidos en el intestino, para ser luego transferidos a la hemolinfa, empleando, quizás, un transportador de membrana específico que permita absorber los N-óxidos. Posteriormente, los N-óxidos de APs son acumulados en la hemolinfa y tejidos adyacentes, para servir como APs de reserva, que

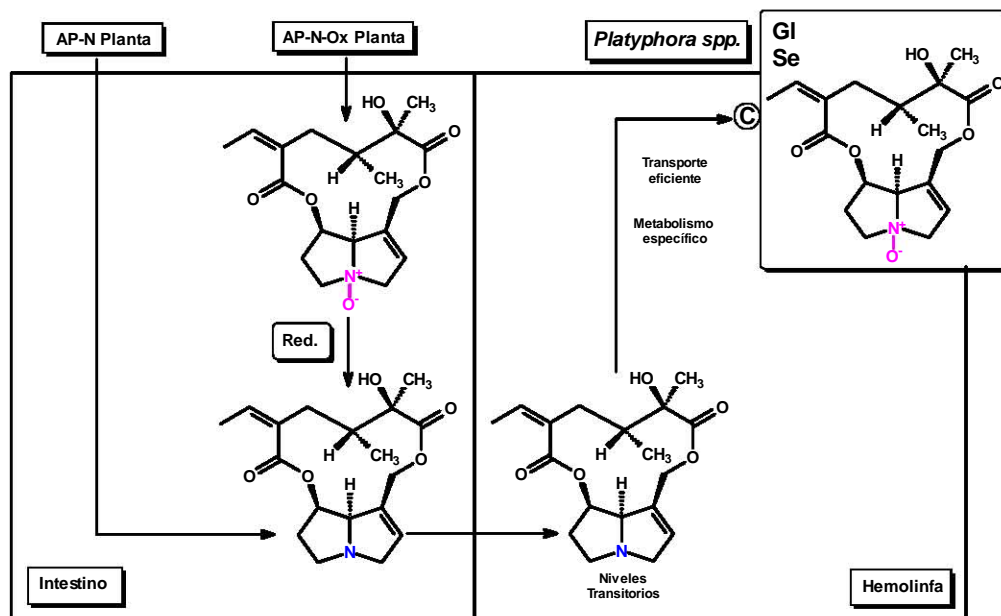
se emplearán al momento de volver a llenar las glándulas exocrinas. Se presume que la transferencia de los N-óxidos, de la hemolinfa a las glándulas de defensa, se da a través de un proceso mediado por un transportador altamente específico, ya que sólo ciertos N-óxidos de AP son transferidos de la reserva a las glándulas y secreciones. Cabe anotar que debido a que las larvas carecen de glándulas, los APs se almacenan en la hemolinfa y tejidos adyacentes. Cuando se da el caso de absorción de APs terciarios, estos se desintoxican por glucosilación, pero el lugar exacto donde esto ocurre no ha sido determinado (**Figura 16**) (Hartmann *et al.*, 1999; Pasteels y Hartmann, 2004).



**Figura 16.** Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por *O. cacialae*. Los APs ingeridos como N-óxido, no sufren reducción y son transferidos a la hemolinfa usando un transportador específico **A**. En la hemolinfa se da la reserva de APs. Luego mediante un transportador **B** los APs como N-óxidos se concentran en las glándulas (**GI**) y en las secreciones (**Se**). Los APs terciarios ingeridos son glucosilados (Pasteels y Hartmann, 2004).

Las especies de *Platyphora* han desarrollado mecanismos de absorción y acumulación de APs, completamente diferentes a la de los escarabajos del genero *Oreina*.

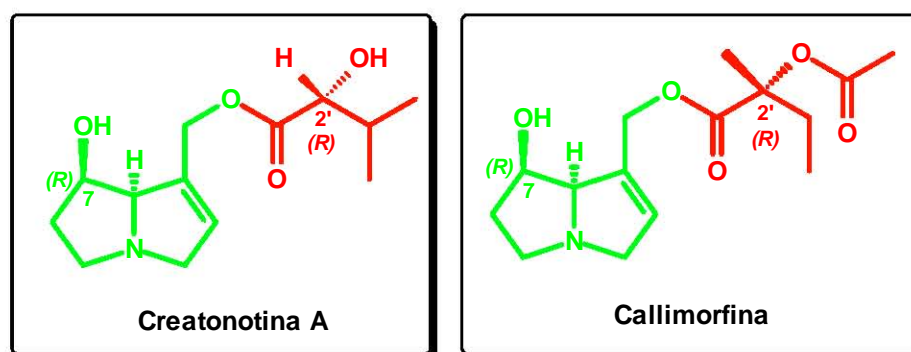
El insecto puede ingerir los APs ya sea en su forma terciaria o como N-óxidos. El AP como base libre se absorbe a través de la hemolinfa, pero si es ofrecido como N-óxido, sufre primero una reducción en el intestino que produce la base libre, que será transportada a la hemolinfa. Luego el AP terciario es removido de la hemolinfa y transferido directa y eficientemente a las glándulas exocrinas, para su acumulación en las secreciones. Esta transferencia, mediada quizás por un transportador, permite que *P. boucardi* no almacene APs en la hemolinfa ni en el cuerpo, quizás para prevenir una acumulación que sea nociva para el insecto (**Figura 17**) (Hartmann et al., 2001; Pasteels y Hartmann., 2004).



**Figura 17.** Mecanismo de ingestión, metabolismo, y almacenamiento de los APs empleado por *P. boucardi*. Los APs ingeridos como N-óxido, sufren reducción. Los APs terciarios ingeridos son absorbidos pasivamente a la hemolinfa, para luego ser bombeados y concentrados en las glándulas (Gl) y secreciones (Se), usando un transportador específico © (Pasteels y Hartmann, 2004).

Un tercer mecanismo ha sido reportado para varias especies de *Longitarsus* (Coleoptera: Chrysomelidae). Estos escarabajos que consumen plantas productoras de

APs, de las familias Asteraceae y Boraginaceae, ingieren los alcaloides, ya sea como bases libres o como N-óxidos (*Haberes y Dobler, 1999; Dobler et al., 2000*). Cuando los APs son ingeridos como terciarios, el insecto los N-oxida eficientemente a través de una enzima específica de APs, similar a la N-oxigenasa encontrada en Arctiidos. En *Longitarsus* spp., dicha enzima parece estar ubicada en la hemolinfa o en algún tejido asociado, pero no en el intestino. Lo que no está claro en este mecanismo, es la forma en que los APs N-óxidos cruzan la membrana del intestino, quizás por medio de un transportador. Por otra parte, la acumulación y el almacenamiento de los APs se da como bases libres y N-óxidos, siendo predominantes los N-óxidos. El almacenamiento de los APs como N-óxidos ocurre en la hemolinfa, a diferencia de los APs terciarios que se encuentran en las glándulas secretoras y otros compartimentos, alejados de la enzima N-oxigenasa. Esto permite suponer que la enzima solamente tiene un acceso transitorio a los APs terciarios (*Naberhaus et al., 2003; Naberhaus et al., 2004*).



**Figura 18.** Estructura de algunos APs sintetizados por insectos a partir de APs obtenidos de plantas. La parte en verde es el fragmento proveniente de la planta. La parte en rojo es el fragmento que el insecto adiciona (esterificación).

Como se ha ilustrado, los insectos especializados de diferentes taxones que secuestran APs de plantas, han adquirido una gran variedad de mecanismos y rasgos específicos con respecto al comportamiento, estructura morfológica y bioquímica, que les permite lograr un almacenamiento seguro y prevenir la acumulación de concentraciones nocivas de APs, además de poder emplear los compuestos para su propia defensa. Siendo de vital importancia para los insectos la característica dual que presentan los APs. Pero todos los estudios con APs han sido llevados a cabo únicamente con individuos especialistas, dejando a un lado los depredadores de éstos. Sólo un estudio hace referencia de cómo el depredador de las larvas del escarabajo *O. cacaliae* supera las defensas de su presa. Este ejemplo es dado por *Mitopus morio* (Arachnida, Opioliones, Phalangidae), el cual no es propiamente un insecto secuestrador de APs, pero si desintoxica de forma eficiente los APs de defensa producidos por su presa. Si éstos son ingeridos como N-óxido, son rápidamente eliminados en las heces sin sufrir ninguna modificación, en caso tal de ser ingeridos como terciarios, son primero N-oxidados, posiblemente en el intestino a través de una N-oxigenasa, para luego ser eliminados (*Hartmann et al., 2003a*).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Género *Pittocaulon* (subtribu *Tussilagininae*, tribu *Senecioneae*, *Asteraceae*)

La Familia Asteraceae, llamada alternativamente Compositae, es probablemente la familia más grande de las angiospermas incluyendo alrededor de 22,750 especies, agrupadas en aproximadamente 1,500 géneros (*Bremer, 2005*). Muchas de las especies de la familia Asteraceae son herbáceas o arbustivas, y pocas veces arbóreas. La familia es reconocida por su distribución mundial y por las flores que se encuentran en la cabezuela o receptáculo. Las cabezuelas pueden llevar un solo tipo de flor (liguladas o de disco) o ambas. Las liguladas se encuentran en la periferia y las del disco en el centro (*Smitsen, 2002*).

Dentro de la familia Asteraceae, los numerosos géneros son divididos en 13 tribus, de las cuales, la Tribu *Senecioneae*, a la cual pertenece el género *Senecio*, es una de las más grandes en las angiospermas. Estas plantas se encuentran en una variedad de habitats que van desde el ártico hasta los bosques tropicales. Hasta hace poco contenía cerca de 1,500 especies o 1/7 de todas las Compuestas (*Rzedowski y Rzedowski, 2005*).

Quizás debido a la variedad y gran número de especies que componen el género, muchos botánicos lo han subdividido en secciones o segregado en géneros más pequeños que reflejen más apropiadamente las relaciones filogenéticas de estas plantas (*Clark, 1996*). En 1973, H. Robinson y R. D. Bretell segregaron *Senecio Sect. Terminales Greenm.* de *Senecio* y de allí obtuvieron un nuevo género, denominado *Pittocaulon*. Este género fue separado de los otros géneros por sus tallos delgados y la presencia de ductos

de resina en el córtex (*Robinson y Brettell, 1973; Clark, 1996*). Recientemente, el género *Pittocaulon* ha sido confirmado por técnicas de filogenética molecular (*Bain and Golden, 2000*).

El género *Pittocaulon* difiere del *Senecio*, macroscópicamente en su hábito de hojas-tallos, y microscópicamente, por el tamaño uniforme de las células del collar de la antera y las líneas estigmáticas fusionadas del estilo. El nombre del nuevo género fue tomado de los tallos resinosos que lo hacen distintivo. Las especies de *Pittocaulon* tienen la característica de tener tallos erectos, elásticos, suculentos y resinosos, sin hojas en determinadas temporadas, ya que son caducifolias y no están presentes durante la antesis. Además, las inflorescencias salen de los tallos sin hojas y son de tipo corimbiforme. Estas plantas se diseminan principalmente a través de la germinación de semillas (*Clark, 1996*).

*Pittocaulon* comprende seis especies y dos variedades: *P. calzadanum* B. L. Turner.; *P. bombycophole* (Bull.) Rob. & Brett.; *P. filare* (Mc Vaugh) Rob. & Brett; *P. hintonii* Rob. & Brett var. *hintonii*, *P. hinttoni* Rob & Brett. var. *cerrograndensis*; *P. praecox* (Cav) Rob. & Brett; *P. velatum* (Greenm.) Rob & Brett. var. *velatum* y *P. velatum* (Greenm.) Rob & Brett var. *tzimolensis* (*Robinson y Brettell, 1973; Barkley, 1990; Turner, 1995; Clark, 1996; Clark, 2000; Olson, 2005*).

Todas las especies de *Pittocaulon* son endémicas de México y se encuentran en un rango de hábitats que va desde los 100 a los 5800 metros de elevación en áreas empinadas y rocosas, creciendo en bosques secos, tropicales o de maleza. *P. bombycophole*, *P. filare*, *P. hintonii* son de distribución reducida encontrándose en



pequeñas porciones de tierra de la Sierra Madre del sur de México. *P. bombycophole* en Michoacán y Guerrero, *P. filare* en Colima y Jalisco y *P. hintonii* en Michoacán y Jalisco. *P. praecox* y *P. velatum* son los que presentan mayor distribución. Todas las especies se encuentran restringidas a México, exceptuando *P. velatum* que se encuentra en algunas localidades de Guatemala (Clark, 1996; Olson, 2005). *P. calzadanum* solo se ha reportado en Oaxaca (Turner, 1995).

En la **Tabla 1** se da la descripción botánica del género y de cada una de las especies que lo conforman de acuerdo con la descripción realizada por Robinson y Brettell, en 1973 y Clark en 1996 y que hacen parte de este trabajo:

### 3.1.1 Descripción Botánica.

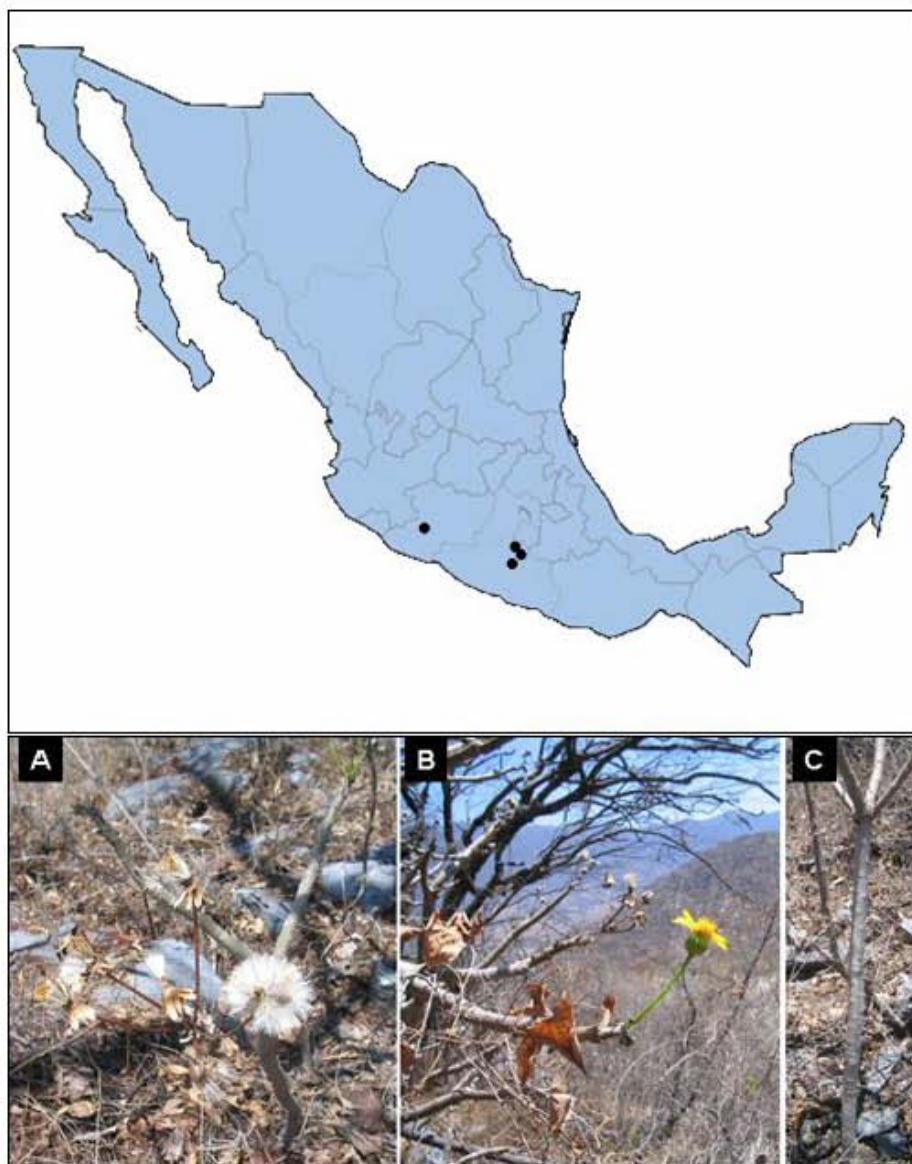
**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Pittocaulon praecox*.

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>División</b> | Magnoliophyta   |
| <b>Clase</b>    | Magnoliopsida   |
| <b>Subclase</b> | Asteridae   |
| <b>Orden</b>    | Asterales   |
| <b>Familia</b>  | Asteraceae (Compositae)                                   |
| <b>Tribu</b>    | Senecioneae   |
| <b>Subtribu</b> | Tussilagininae  |
| <b>Género</b>   | Pittocaulon   |
| <b>Especie</b>  | <i>Pittocaulon praecox</i> (Cav.) DC. var. <i>praecox</i> |

**Género *Pittocaulon* Rob & Brett. (*Robinson y Brettell, 1973*).**

Arbustos erectos o árboles pequeños con pocas hojas debajo de la inflorescencia. Los tallos son cilíndricos, quebradizos, resinosos, con dos series de canales resina corticales, elásticos, suculentos, huecos y tabicados, glabros o con pubescencia justo debajo de la inflorescencia en algunas especies o en otras encontrándose en las axilas de las hojas y en la base de la inflorescencia. Tallos marcados con cicatrices en forma de luna o de herradura. La corteza es de color gris claro. Las hojas son alternadas, simples, aglomeradas en el extremo de las ramas, caducifolias, presentes después de la antesis, y pecioladas. Las láminas van de circulares a ovadas con lóbulos triangulares prominentes o ligeramente dentados con dientes poco profundos. Láminas prominentemente palmadas y venadas. La inflorescencia terminal va de subumbelada a cimas corimbiformes o compuestos de cimas, pedúnculos multi-ramificados con brácteas lineales-subulados dispersos. Cabezuelas radiadas que van de pocas a muchas. Involucro turbo-campanulado a cilíndrico. El receptáculo es plano a ligeramente convexo, desnudo o superficialmente alveolado de sólido a fistuloso. Las brácteas del involucro de 5-20, lineales-lanceoladas. Las brácteas del cálculo son pocas, no evidentes, de lineal-lanceoladas a lineales, las brácteas internas presentan márgenes membranosas. Las flores liguladas de 3-14, son amarillas, con tubo cilíndrico y un ápice ligular con tres dientes pequeños. Las flores del disco de 6-73+, la corola gradualmente expansiva, amarilla, con 5 lóbulos coronares. La base de la antera sagitada. Los aquenios son cilíndricos y glabros (*Robinson y Brettell, 1973; Clark, 1996*).

- a) *Pittocaulon bombycophole* (Bullock) Rob. & Brett., *Phytologia* 26: 452. 1973  
*Senecio bombycopholis* Bullock, Hook. *Ic. Pl.* 34: t. 3343. 1937.

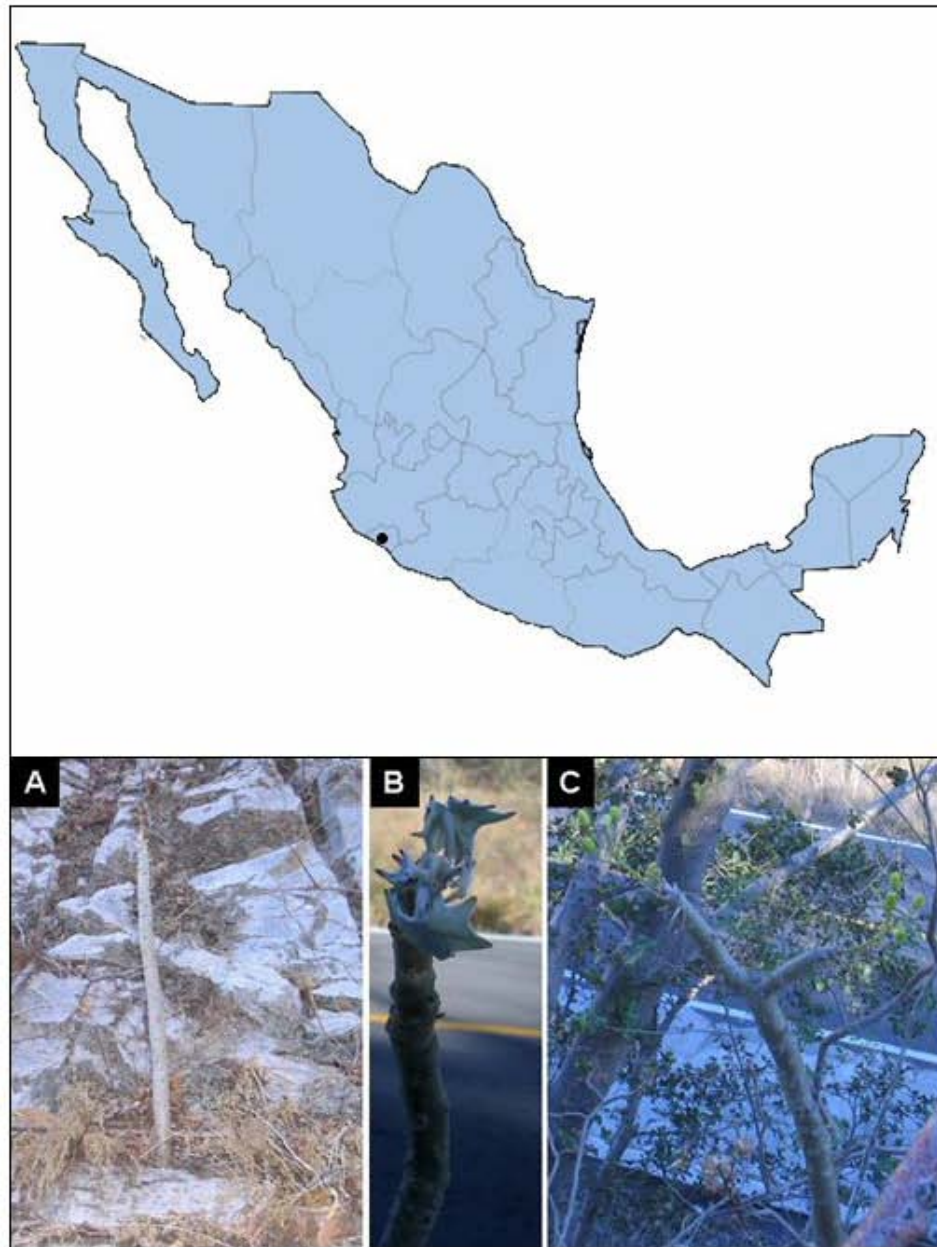


**Figura 19.** Distribución de *Pittocaulon bombycophole* en México. Las imágenes ilustran diferentes partes de *P. bombycophole*. **A.** Tallo con frutos. **B.** Inflorescencia. **C.** Tallo.

*P. bombycophole* se encuentra distribuido en regiones secas y lugares rocosos en zonas de maleza, a una elevación entre 700 y 1150 m en las cimas del norte de la Sierra madre del sur en Michoacán y Guerrero, y en los cañones secos cerca de Iguala, Guerrero y cerca de Temascaltepec, México. Su tiempo de floración va desde febrero a julio (**Figura 19**).

*P. bombycophole* son arbustos o árboles pequeños, de 1 a 3 metros de alto, con tallos de 2.0 cm de diámetro, glabros. Los pecíolos de las hojas miden de 4.4 a 19.9 cm, tomentosos llegando a ser aracnoides, con un mechón de pelillos en las axilas de las hojas, láminas de 5 a 10.5 cm de ancho y 4.7-19.9 cm de largo, redondas a ampliamente redondas, irregularmente palmiti-lobulada con 5-9 lóbulos triangulares poco profundos, lóbulo apical 3.5 cm, margen entero o con pocos denticulos callosos, agudas en el ápice, base profundamente cordada, superficie adaxial aracnoidea llegando a ser glabra, superficie abaxial lanada-tomentosa llegando a ser glabro-aracnoidea, venación principal palmada con 3-5 venas principales, venas reticulares no prominentes. Inflorescencia sub-umbelada a cimas corimbiformes, 8.5-17 cm de la base, pedúnculos ramificados, mechón de pelillos a la base de la inflorescencia, pocas brácteas, 5-11 mm, glabras o tomentosas. Pocas cabezuelas (3-15), 19-22 mm de alto, 14-20 mm de diámetro, receptáculo sólido. Pocas brácteas del cálculo. Flores liguladas 7+, de 12.0-20.0 mm de longitud, linear-elíptica a elíptica, venas sin ramificar. Flores del disco, numerosas (73+), corola gradualmente expansiva, tubo 2.0-4.3mm de largo, lóbulos 5, 1.0-1.6 mm de largo. Apéndices de la antera 0.02-0.10 mm largo, área estigmática del estilo, entera. Aquenios 4.0-8.5 mm de largo de color café pálido (*Clark, 1996*).

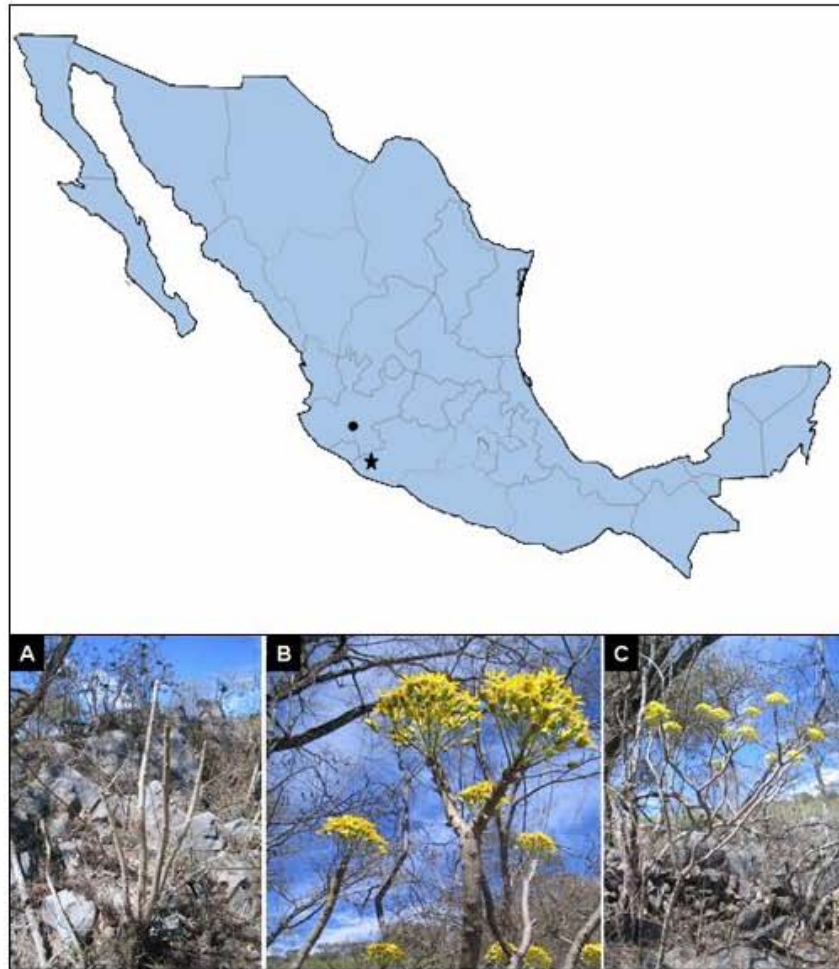
- b) *Pittocaulon filare* (Mc Vaugh), Rob & Brett., *Phytologia* 26: 452. 1973.  
*Senecio filaris* Mc Vaugh, *Contr. Unive. Michigan Herb.* 9: 470. 1972.



**Figura 20.** Distribución de *Pittocaulon filare* en México. Las imágenes ilustran diferentes partes de *P. filare*. A. Tallos. B. Hojas juvenes. C. Tallo con inflorescencias.

*Pittocaulon filare* florece en el período comprendido entre diciembre y febrero. Se encuentra en zonas de acantilados, pendientes rocosas y barrancos de yeso y pizarra en bosques caducifolios a una elevación de 300 a 500 m en las pendientes de las montañas del Pacífico en Colima y Jalisco (**Figura 20**).

*P. filare* se encuentra como arbustos o árboles pequeños, de 1 a 2 metros de alto. Los tallos, esencialmente glabros, miden 1.5 cm de diámetro. Los pecíolos de las hojas con tomento blanco en las axilas de las hojas, láminas de 8 de largo a 12 cm de ancho, ampliamente ovadas a orbiculares, palmati-lobulada con 5 lóbulos triangulares, lóbulo apical 3,5 cm de alto, margen entero, ápice agudo a acuminado, base redondeada a cordada, superficie adaxial glabra, superficie abaxial ligeramente tomentosa llegando a ser glabra, venación principal palmada. Inflorescencia sub umbelada algunas veces corimbiformes, 9-12 cm de largo y 12 cm de ancho, con 3 pedúnculos desde la base, infrecuentemente ramificados, escasos y elongados, los últimos pedicelos miden de 2.6 a 9.5 mm de largo, tomento blanco en las axilas, pocas brácteas, 2-6 mm de longitud, glabras o tomentosas. Pocas cabezuelas (5-12), turbinadas a campanuladas, 14-20 mm de largo, 10-13 mm de diámetro. Brácteas del involucreo 13-14, 10.5 mm de largo y 1.5 mm de ancho, glabras. Pocas brácteas del cálculo. Las flores liguladas de 13 a 14, miden 14 mm de longitud, lineal-oblongo lanceoladas, venas sin ramificar. Las flores del disco son numerosas (31+), corola gradualmente expansiva, tubo 2.3 mm de largo, lóbulos 1.0-1.3 mm de largo. Apéndices de la antera 0.11 mm largo, área estigmática del estilo, entera. Aquenios 4.5 mm de largo, de color café pálido (*Clark, 1996*).

c) *Pittocaulon hintonii* Rob & Brett., *Phytologia* 26: 452. 1973

**Figura 21.** Distribución de *Pittocaulon hintonii* en México. El punto indica la variedad *cerrograndensis* y la estrella la variedad *hintonii*. Las imágenes ilustran diferentes partes de *P. hintonii* var *hintonii*. A. Tallos. B. Inflorescencias. C. Tallo con inflorescencias.

Arbustos o árboles pequeños, 1-3 metros de alto. Tallos esencialmente glabros. Pecíolos de las hojas tomentosos en las axilas, láminas de 7,2 cm de largo a 9,3 cm de ancho aproximadamente, circulares, palmada-lobulada con lóbulos triangulares superficiales, de margen entero pero cada lóbulo punteado con dentículos de callosa, agudo en el ápice, base cordada, superficie adaxial aracnoide, superficie abaxial aracnoide, venación principal palmada. Inflorescencia corimbiforme, con un eje central

prominente de 9-16 cm de largo y 6-12 cm de ancho, pedúnculos de 4.0-8.0 cm desde la base, muchos ramificados, los últimos pedicelos 1.8-5.8 cm de largo, tomento blanco en las axilas, pocas brácteas, 4-7 mm de longitud, glabras o tomentosas. Pocas cabezuelas (9+), turbinada a campanulada, 10-12 mm de largo y 10-13 mm de diámetro. Receptáculo sólido. Brácteas del involucre 13-14, 8.0-10 mm de largo y 1.5-2.0 mm de ancho, glabras. Brácteas del cálculo pocas, 2-4 mm de longitud. Flores liguladas 7-14, de 14.0-15.0 mm de longitud, lineal-elípticas a elípticas, venas sin ramificar. Las flores del disco son numerosas (31+), corola gradualmente expansiva, tubo 2.5 mm de largo, lóbulos 1.0 mm de largo. Apéndices de la antera 0.02 mm largo, área estigmática del estilo, entera. Aquenios 3.5 mm de largo, de color café palido (Clark, 1996).

***Pittocaulon hintonii*** Rob & Brett., Phytologia 26: 452. 1973., **var. *hintonii***.

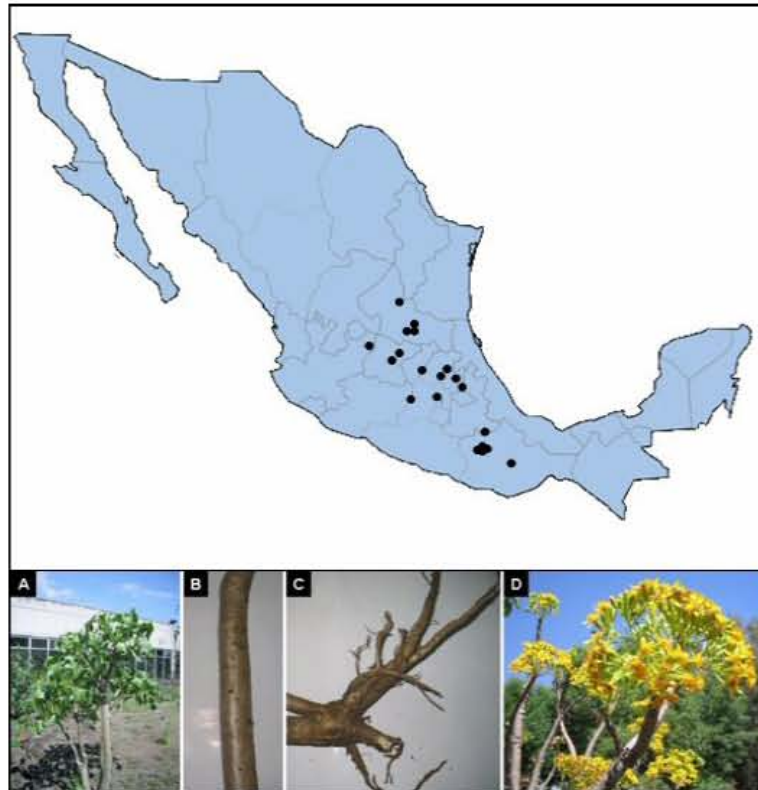
La variedad *hintonii* se distribuye en afloramientos rocosos en la Sierra de Naranjillo, Michoacán, México, a una elevación de 1400 m (**Figura 21**). Al igual que la variedad *cerrograndensis* florece en marzo. Son arbustos o árboles pequeños hasta de 3.0 metros de alto. No hay datos de las hojas. Últimos pedicelos de la Inflorescencia 1.8-4.8 cm de alto. Cabezuela 10-12 mm de largo y 13 mm de ancho. Brácteas del involucre 8.0 mm de largo y 1.5-2.0 mm de ancho. Flores liguladas 7-9, 14.0-15.0 mm de longitud. Las flores del disco (32 aprox), 8-9 mm de longitud total, lóbulos de 1.0 mm de largo. Aquenios 3.5 mm de largo. La clave para diferenciar la variedad *hintonii* de la *cerrograndensis* está dada por las flores ligulares. En *P. hintonii* var. *cerrograndensis* son 14 y en *P. hintonii* var. *hintonii* son de 7 a 9 (Clark, 1996).



d) *Pittocaulon praecox* (Cav.) Rob & Brett., *Phytologia* 26: 452. 1973

*Senecio praecox* (Cav.) DC., *Prod.* 6:431. 1838.

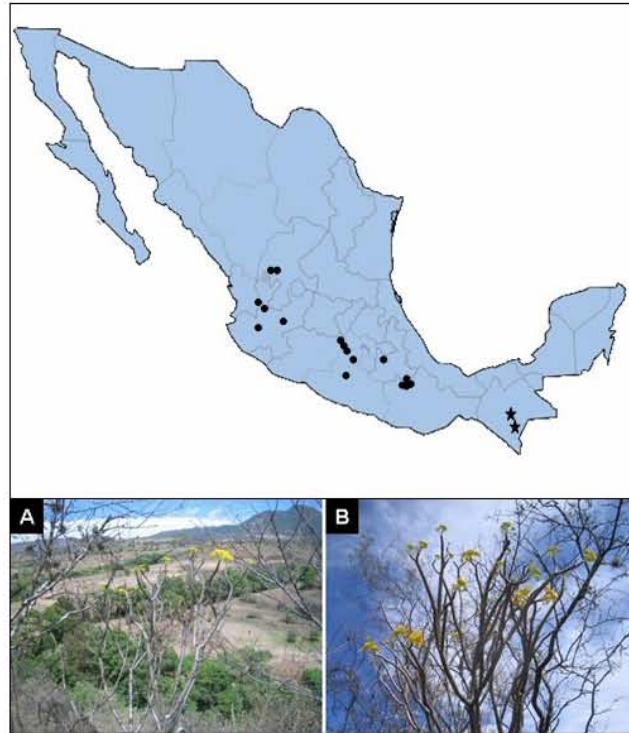
*Cineraria praecox* Cav.  *Ic. Pl.* 3: 23, 7. 244. 1794.



**Figura 22.** Distribución de *Pittocaulon praecox* en México. Las imágenes ilustran diferentes partes de *P. praecox*. **A.** Planta con hojas. **B.** Tallos. **C.** Raíz. **D.** Inflorescencias.

Conocido comúnmente como “palo loco”, “candelero”, “palo bofo”, “tesapacle”, “tezacpatli” y “tezcacpatli” (Rzedowski y Rzedowski, 2005), fue descrito por primera vez en 1794 por Cavanille como *Cineraria praecox* de una especie que se encontraba cultivada en el jardín botánico de Madrid. En 1838 DeCandolle transfirió *C. praecox* a *Senecio* (Clark, 1996).

Arbustos o árboles pequeños, de 1 a 4 metros de alto. Tallos glabros de 12 cm de diámetro, las cicatrices miden de 3 a 8 mm de ancho, lunadas. Las hojas están presentes después de florecer o algunas veces emergen antes de la antesis. Los pecíolos de las hojas miden de 6.0-11.5 cm de longitud, presentan pubescencia en mechones dispersos en las axilas, láminas de 5.0-10.0 cm de ancho y de 4.7-9.3 cm de largo, ovadas a sub orbiculares, 7-9 lóbulos con lóbulos apicales prominentes y lóbulos basales proyectados hacia atrás, margen entero o con pocos denticulos de callosa, agudos en el ápice, base cordada, superficie adaxial glabra, superficie abaxial glabra, venación principal prominentemente palmada. Inflorescencia umbeliforme, con un fuerte eje central, 5.5-9.0 cm de largo y 7.5-20.0 cm de ancho, muchos de los pedúnculos están ramificados, pocas brácteas, tubuladas y glabras. Numerosas cabezuelas, atestada, 16.5-22.0 mm de largo, 6.6-8.3 mm de diámetro. Receptáculo fistuloso a sólido. Brácteas del involucre (7)8, 8.0-10.5 mm de largo y 2.0-3.5 mm de ancho. Brácteas del cálculo 0-1, 2-4 mm de longitud. Las flores liguladas son 4-5, 7.5-15.0 mm de largo, lineal-elíptica a elíptica a linear lanceolada, venas sin ramificar. Flores del disco, numerosas (12-20), corola gradualmente expansiva, tubo 5.0-7.6 mm de largo, lóbulos 1.6-3.0 mm de largo. Apéndices de la antera 0.04-0.012 mm largo. Área estigmática del estilo, entera. Los aquenios miden 3.0-5.5 mm de largo, presentan un color café pálido. Florece de octubre a junio. Se distribuye en suelos poco profundos, en áreas rocosas y especialmente en flujos de lava a una elevación de 1567-3250 m en los estados Mexicanos de Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas (**Figura 22**) (*Clark, 1996*).

e) *Pittocaulon velatum* Rob & Brett., *Phytologia* 26: 453. 1973.

**Figura 23.** Distribución de *Pittocaulon velatum* en México. El punto indica la variedad *velatum* y la estrella la variedad *tzimolenzis*. Las imágenes **A** y **B** ilustran dos individuos de *P. velatum* var. *velatum* con inflorescencias.

Arbustos o árboles pequeños, miden hasta 5 metros de alto. Tallos de 9 cm de diámetro. Los tallos superiores son glabros o con un fino tomento de color café. Las cicatrices miden 3-8 mm de ancho, multilacunar, lunada, dentada. Las hojas emergen después de la antesis. Los pecíolos miden 4.4-10.4 cm de largo, glabros a flocosos-pubescentes, laminas de 5.0-10.5 cm de ancho y 4.5-11.3 cm de largo, ovadas a ampliamente ovadas a orbiculares, con lóbulos triangulares prominentes 2-3 cm de longitud o vagamente dentados, margen con lóbulos punteados con denticulos de callosa, ápice acuminado, base cordada, superficie adaxial tomentosa llegando a ser glabra, superficie abaxial, tomentosa llegando a ser aracnoide a glabra, venación principal

vagamente palmada. Inflorescencia umbeliforme, con un eje central fuerte, 4.5-9.0 cm de largo y 5.5-16.5 cm de ancho, pedúnculos ramificados, pocas brácteas, 1.5 mm de longitud, linear-subulada glabra. Cabezuela numerosamente atestada, 13.0-19.0 mm de largo, 3.0-6.0 mm de diámetro. Receptáculo fistuloso a sólido. Brácteas de involucre (5-8), 6.3-10.6 (14) mm de largo y 1.3-3.0 mm de ancho. Brácteas del cálculo 0-5. Flores liguladas 3-5, 7.3-11.6 (15.0) mm de longitud, linear-elíptica a linear lanceolada, venas sin ramificar. Flores del disco, numerosas 6-9, corola gradualmente expansiva, tubo 3.0-6.0 mm de largo, lóbulos 0.5-2.3 mm de largo. Apéndices de la antera 0.01-0.11 mm largo, área estigmática del estilo, entera. Aquenios 2.3-5.0 mm de largo, café oscuro (Clark, 1996).

***P. velatum* (Greenm) Rob & Brett. var. *velatum***

***Senecio velatus* Greenm., Ann. Missouri Bot Gard. 1:280, t. 13. 1914.**

***Senecio morelensis* Miranda, Anal. Inst. Biol. (Mex). 12: 603. 1941.**

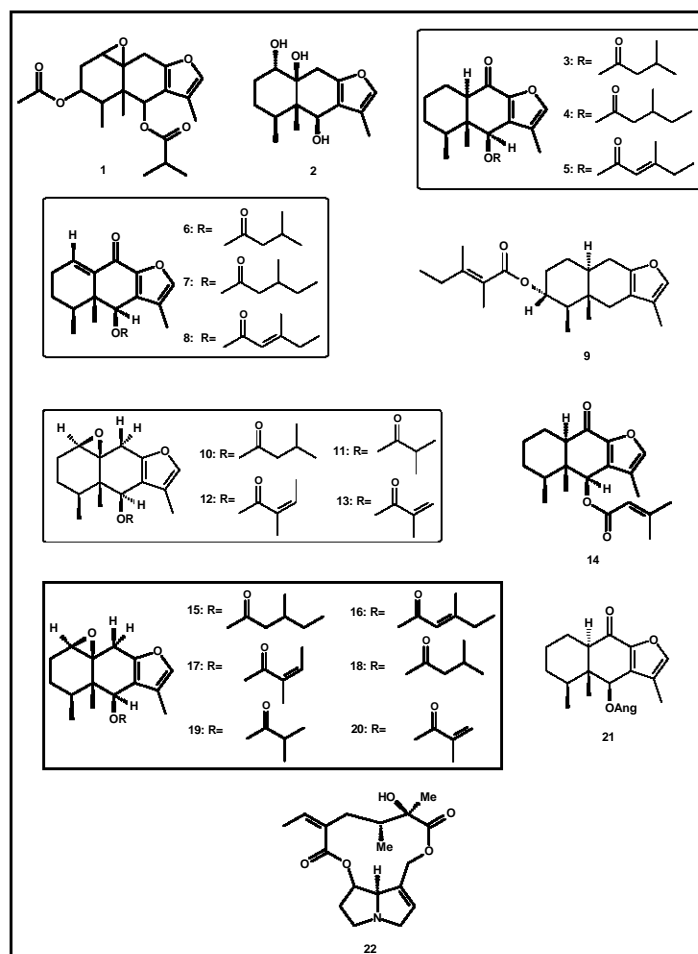
***Senecio praecox* var. *morelensis* (Miranda) Mc Vaugh, Contr. Univ. Michigan Herb. 9: 475. 1972.**

*P. velatum* var. *velatum* se encuentra en los estados de Jalisco, Guerrero, México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Zacatecas (**Figura 23**). Asimismo tiene distribución limitada en Guatemala. Florece de octubre a junio, y se distribuye en zonas semi-desérticas de México, monte bajo abierto a 900-2100 m de elevación.

Arbustos o árboles pequeños, hasta 5.0 metros de alto. Tallos de 9.0 cm de diámetro. Tallos superiores tomentosos finos y café suave. Cicatrices 3-8 mm de ancho. Pecíolos de las hojas 4.4-10.4 cm de longitud, glabros a flocosos pubescentes. Láminas de 5.0-10.5 cm de ancho y 4.8-11.3 cm de largo, ampliamente ovado a circular con prominentes lóbulos triangulares de 2 a 3 cm de longitud, los lóbulos algunas veces

punteados por dentículos de callosa. Superficie adaxial tomentosa llegando a ser glabra o glabra y abaxial tomentosa llegando a ser aracnoide a glabra. Inflorescencia 6.0-9.0 cm alto y 8.5-16.5 cm de ancho. Cabezuela 13.0-19.0 mm de alto y 3.5-6.0 mm de diámetro. Receptáculo fistuloso a sólido. Brácteas del involucre 5-8, 7.0-10.6 (14.0) mm de largo y 1.3-3.0 mm de ancho. Flores liguladas 3-5, 7.3-11.6 (15.0) mm longitud. Flores del disco 6-9, tubo 3.0-6.0 mm de longitud, lóbulos de 0.5-2.3 mm de largo. Aquenios 2.3-5.0 mm de largo (Clark, 1996).

### 3.1.2 Estudios químicos realizados en el Género *Pittocaulon*.



**Figura 24.** Metabolitos secundarios aislados de *Pittocaulon praecox*.

Los estudios químicos realizados sobre el género *Pittocaulon* se reducen únicamente a los trabajos reportados para la especie *Pittocaulon praecox*, previamente conocido como *Senecio praecox*. El análisis fitoquímico ha sido encaminado principalmente al estudio de sesquiterpenos, especialmente del tipo furanoeremofilano. El primer reporte fue hecho por Ortega y colaboradores, al aislar del extracto metanólico de las flores un producto cristalino al cual denominaron precoxilina A (**Figura 24.1**) (Ortega et al., 1975). Además, de la raíz se aisló un furanoeremofilano, denominado euriopsol, obtenido previamente de la resina de especies de *Euriopsis* (**Figura 24.2**) (Eagle et al., 1969; Ortega et al., 1975). En 1976, Bohlman y Zdero identificaron una veintena de furanoeremofilanos, de los cuales nueve fueron reportados por primera vez (Bohlman y Zdero, 1976). De los tallos obtuvieron una mezcla compleja de furanoeremofilanos e identificaron tres con las siguientes características: un grupo oxo en posición 9, el protón de la posición 10 con orientación  $\alpha$  y el OH en posición 6 con orientación  $\beta$ . Por medio de una hidrólisis alcalina se estableció que el hidroxilo en la posición 6 podía estar esterificado con uno de los siguientes ácidos: el ácido Isovalérico (**Figura 24.3**), el ácido 3-metil valérico (**Figura 24.4**) ó el ácido 3-metil-2-*trans*-pentenoico (**Figura 24.5**). Para esta misma mezcla fueron detectados furanoeremofilanos esterificados en posición 6 con los mismos ácidos, pero con una insaturación en posición 1,10 (**Figura 24.6-24.8**). También fue identificado un furanoeremofilano que no presenta el grupo 9-oxo y el OH en 6 $\beta$ , pero esterificado en posición 3 $\alpha$  con el ácido 3-metil-2-*trans*-pentenoico (**Figura 24.9**) (Bohlman y Zdero, 1976). De la fracción apolar de las raíces se estableció la presencia de una mezcla de cuatro 1,10-Epoxi-furanoeremofilanos, esterificados en posición 6 $\beta$  con diferentes ácidos (**Figura 24.10-24.13**). Asimismo, se

determinó la presencia de un 9-Oxo-10- $\alpha$ H-furanoeremofilano sustituido con el ácido 3-metil-2-butenoico en posición 6 $\alpha$  (**Figura 24.14**). De la fracción polar se obtuvo una mezcla de seis 1,10-Epoxi-9-Oxo-6 $\alpha$ -OH furanoeremofilanos, esterificados en posición 6 con diferentes ácidos (**Figura 24.15-24.20**) (Bohlman y Zdero, 1976). Por último, del extracto metanólico de los tallos se obtuvo el 6 $\beta$ -angeloiloxifuranoeremofil-10 $\beta$ H-9-ona (**Figura 24.21**) (Jiménez-Estrada et al., 1999). Sólo un estudio reportó la presencia de un alcaloide pirrolizidínico, fue el realizado por Ortega y colaboradores donde se aisló la senecionina de las raíces de *P. praecox* (**Figura 24.22**) (Ortega et al., 1975).

### 3.2 *Ceroplastes albolineatus* Cockerell (*Coccidae: Homoptera*)

#### 3.2.1 Orden Homoptera, Familia Coccidae.

Perteneciente al orden Homoptera, la familia Coccidae o de las “escamas suaves” (*Soft scales*), es la tercera familia mas grande dentro de la superfamilia Coccoidea (21 familias, 6000 especies), después de Diaspididae y Pseudococcidae, con aproximadamente 1100 especies y cerca de 160 géneros (Ben-Dov y Hodgson, 1997a; Arnett, 2000). Estos insectos, también conocidos como cóccidos, están distribuidos en todas las regiones zoogeográficas, predominantemente en trópicos y subtrópicos (Ben-Dov, 1993). Muchas especies son plagas de plantas vasculares económicamente importantes, tales como árboles ornamentales y frutales. Cuando los cóccidos alcanzan grandes poblaciones, pueden matar a su planta hospedera, debido al volumen total de savia removida y al daño ocasionado en los tejidos vegetales por las partes bucales del insecto, representando un agotamiento de los recursos disponibles y a los efectos tóxicos producidos quizás, por la inyección de toxinas de la saliva. Asimismo, todas las especies

de Coccidae producen una secreción dulce (*honeydew*), sustancia apta para el crecimiento de hongos. Todos estos factores conllevan a la pérdida de nitrógeno y de la capacidad fotosintética, al afectar el intercambio de gases y las tasas de asimilación por bloqueo de los estomas. La secreción dulce también sirve para establecer una relación mutualística benéfica con hormigas, proporcionándoles alimento y éstas a su vez le brindan al insecto beneficios sanitarios y protección contra los enemigos naturales (*Hodgson, 1994; Ben-Dov y Hodgson, 1997a*).

Para los cóccidos se han registrado dos modos de reproducción, la sexual y la partenogenética. En el ciclo de vida general, las hembras tienen dos o tres estados ninfales, dependiendo de la especie, y el adulto. El macho, si lo hay, tiene dos estados ninfales, más pupa y prepupa, antes de emerger como adulto alado.

Las hembras son todas chupadoras de savia, sin alas, sedentarias, con la cabeza, el tórax y el abdomen fusionados y con partes bucales en forma de estilete, de cuerpo ovalado, redondeado, a menudo convexo, generalmente 2-6 mm de largo (*Hodgson, 1994*). Las hembras son hemimetábolos y secretan continuamente cera generando una cubierta voluminosa. El peso de la cubierta difiere entre especie, edad y sexo. Después de la última muda y antes de la ovoposición, las hembras adultas de muchas especies aumentan el tamaño, la forma y el volumen, cambian el color del cuerpo el dorso comienza a ser convexo, lo que se correlaciona con el desarrollo de los ovarios, la acumulación de los huevos y también la formación de la cámara de cría. Cuando la ovoposición se ha completado, el abdomen se encoge y la cavidad entera se llena de



#### 4. JUSTIFICACIÓN.

De acuerdo a las observaciones de campo realizadas, existe una relación biótica entre la planta *Pittocaulon praecox* (Asteraceae; tribu Senecioneae) y el insecto del orden Homóptera, *Ceroplastes albolineatus* (Coccidae). Debido a la escasa información acerca de la presencia de APs en los diferentes miembros del género *Pittocaulon* y de la interacción que se suscita entre *Ceroplastes albolineatus* y su planta hospedera *Pittocaulon praecox*, resulta relevante conocer la relación mediada químicamente que se da entre estos individuos, a través de la determinación de los APs que produce la planta y el empleo que el insecto le da a dichos compuestos. Además establecer el perfil químico, en cinco de las seis especies que componen el género *Pittocaulon* (*P. velatum*, *p. filare*, *P. hintonii* y *P. bombycophole*) nos permitirá responder otra serie de preguntas concernientes a la concentración de APs en los diferentes tejidos analizados.

El enfoque especial que se le brinda en este trabajo a los APs, se debe a la importancia que tienen estos como mediadores de un gran número de interacciones bióticas entre plantas e insectos de diferentes órdenes (*Hartmann y Ober, 2000*). Además de ser reconocidos agentes tóxicos para vertebrados e invertebrados (*Hartmann, 1999*).

Lo que permite esperar que la planta hospedera y las especies restantes que componen el género *Pittocaulon* produzcan APs; son los antecedentes que se tienen, ya que es ampliamente reconocido que las plantas de la tribu *Senecioneae* presentan APs (*Hartmann y Witte, 1995*). Además, hay un estudio que reporta la purificación de la senecionina en las raíces de *P. praecox* (*Ortega et al., 1975*).

Por otra parte, el insecto *Ceroplastes albolineatus* realiza el ciclo de vida completo (hembra adulta, huevos, estadios ninfales) sobre su planta hospedera, *Pittocaulon praecox*. Este insecto, en su primer estadio ninfal, inserta su estilete para alimentarse de los nutrientes que se transportan en la planta a través del floema, estando así en contacto íntimo con la vía de distribución de los APs en la tribu Senecioneae (Hartmann et al., 1989). El interrogante que surge aquí es: ¿Cual es el destino que le imparte (metabolismo, secuestro o excreción) el insecto a los APs que esta ingiriendo durante su etapa de alimentación?. Aún más, si asumimos que los APs son tóxicos para individuos generalistas y que estos evitan plantas que contienen APs (Hartmann, 1999), ¿Porqué *C. albolineatus* se establece sobre los tallos de la planta sin sufrir ningún trastorno?. Como precedente tenemos que insectos de diferentes órdenes han desarrollado mecanismos que les permiten evadir los compuestos tóxicos, para este caso los APs, que producen las plantas (Hartmann y Ober, 2000). Un ejemplo de esto lo da el áfido *Aphis jacobaeae* Schrank (Aphididae) que se alimenta sobre *Senecio jacobaeae*. Esta relación presenta múltiples similitudes con la relación planta-insecto *P. praecox*-*C. albolineatus*: El insecto pertenece al orden homoptera, se alimenta succionando los nutrientes a través del floema secuestrando los APs presentes en su planta hospedera (Witte et al., 1990), por lo que podemos esperar que *C. albolineatus* secuestre los APs de *P. praecox*.

Por último, ya sea que el insecto secuestre o no los APs, es necesario pensar en un mecanismo de desintoxicación para estos compuestos, ya sea empleando una FMO como la SNO aislada de otros insectos secuestradores de APs (Lindigkeit et al., 1997) o involucrando enzimas del tipo Citocromo P450 (Fu et al., 2004).

huevos. El cuerpo esclerotizado entonces forma un campo protector para los huevos y las ninfas del primer estadio (*Ben-Dov y Hodgson, 1997a*).

Los huevos, que son cubiertos uniformemente con filamentos de cera para prevenirlos de la desecación y de que se peguen entre sí, son producidos en gran número variando de unas cuantas docenas a miles, todo dependiendo del tamaño de la hembra. El promedio de fecundidad es afectado por la temperatura, la densidad de los insectos, el tamaño de las hembras adultas, las especies y las condiciones edáficas de la planta hospedera.

Después de la eclosión de los huevos, las ninfas del primer estadio o de dispersión (*crawlers*) se quedan inmóviles por un corto período de tiempo debajo del cuerpo de la hembra o en el ovisaco. Luego al salir, son responsables de la dispersión pasiva y activa que permite la selección de un lugar apropiado para alimentarse en la planta hospedera. Una vez establecido el lugar, la ninfa inserta su estilete en el tejido de la planta y comienza a alimentarse del floema. Las ninfas de este estadio carecen de cubierta cerosa y por lo tanto son más susceptibles a factores ambientales, siendo así el estadio en el que se presenta mayor mortalidad.

Al crecer la ninfa, para de alimentarse y sufre su primera y segunda muda. En este proceso se observa un cambio inicial en el color del cuerpo y se comienza a secretar la cubierta cerosa. A partir del segundo estadio ninfal y hasta alcanzar la adultez, se desarrollan dentro de esta cubierta. Por lo general estos insectos pasan el ciclo de vida completo como hembras adultas o machos, en el lugar donde se establecen las ninfas del primer estadio (*Ben-Dov y Hodgson, 1997a*).

La gran familia *Coccidae* se divide a su vez en 10 subfamilias, una de ellas es la subfamilia *Ceroplastinae* Atkinson, la cual contiene siete géneros siendo el más representativo el género *Ceroplastes* Gray, 1828 (Hodgson, 1994). Recientemente un estudio basado en un análisis cladístico, considera que las “escamas cerosas” deben ser clasificadas en un solo género, *Ceroplastes* (Qin y Gullan, 1995).

### **3.2.2 Género *Ceroplastes* Gray.**

El género *Ceroplastes* Gray es caracterizado por la capa de cera que cubre el cuerpo de la hembra adulta. Conocidos como “escamas cerosas”, son abundantes en zonas tropicales y subtropicales, pero son conocidos en todas las regiones zoogeográficas. Hay alrededor de 150 especies, subespecies y variedades de *Ceroplastes* (Ben-Dov, Yair, 1993). Para la región neotropical, la cual incluye Centro y Suramérica, se han reportado 73 especies (Ben-Dov y Hodgson, 1997a). Para México se han descrito 14 especies (Millar, 1996).

En el género se encuentran cuatro estadios en la hembra y cinco en el macho, pero es sabido que el macho es sumamente raro. Muchas especies tienen una generación por año aunque se han encontrado con 1 ½ y 2 por año, lo que puede indicar que en las áreas calientes algunas especies puedan tener más de una por año. En la primavera cada hembra descarga de cientos a miles de huevos debajo de su cuerpo. A medida que se depositan los huevos, la superficie ventral de la hembra llega a ser más y más cóncava formando una cámara de cría. En los últimos días de la primavera o temprano en el verano, salen las ninfas de dispersión y 2 o 3 días después dejan la cámara de cría y buscan un lugar para establecerse. En algunas especies las ninfas de dispersión se

establecen en los tallos del hospedero y permanecen en ese sitio todo el tiempo que dura su ciclo de vida, sin embargo otras especies se establecen en las hojas como larvas y luego pasan a los tallos en el tercer estadio. El método de reproducción es principalmente por partenogénesis (Gimpel, 1974).

Dentro de los enemigos naturales del género *Ceroplastes* se han identificado hongos, depredadores como coccinélidos (Coleoptera), y parasitoides pertenecientes a la superfamilia Chalcidoidea (familias Encyrtidae, Aphelinidae, Eulophidae, Pteromalidae y Eupelmidae) (Ben-Dov y Hodgson, 1997b). Las especies del género *Ceroplastes* se alimentan de plantas y pueden ocasionar daños en especies importantes. Al succionar pueden causar pérdida del vigor de la planta, pobre crecimiento, muerte progresiva de ramas, caída prematura de hojas y muerte. En la **Tabla 2** se enlistan algunas de las especies de *Ceroplastes* y los cultivos que atacan (Ben-Dov y Hodgson, 1997b).

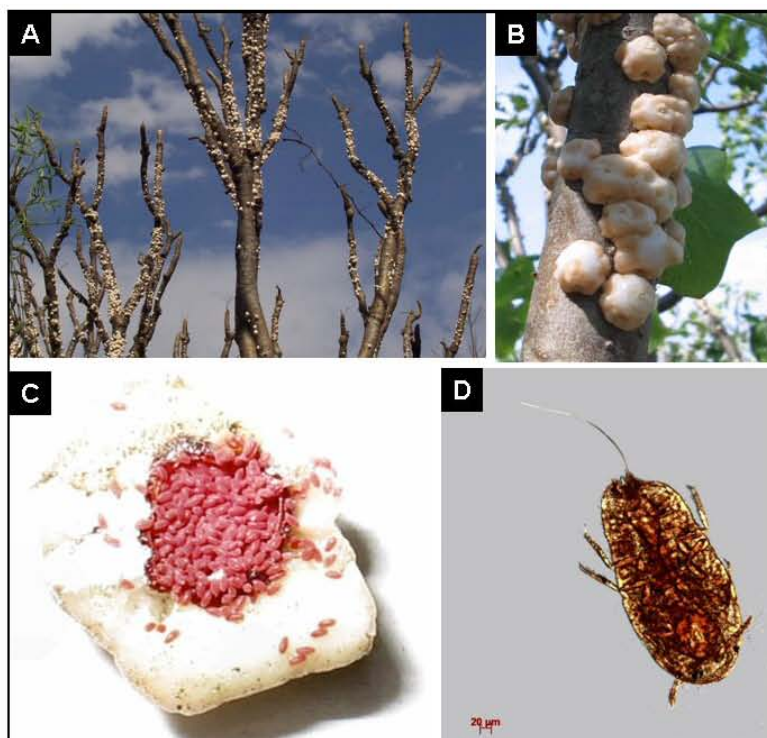
**Tabla 2.** Algunas especies del género *Ceroplastes* y algunos de los cultivos de importancia económica u ornamental que atacan.

| Espece                             | Cultivos atacados   |
|------------------------------------|---|
| <i>C. actiniformis</i> Green       | Mango ( <i>Mangifera indica</i> ), Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> ), Annona spp., Caña de azucar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.), Coco ( <i>Cocos nucifera</i> )   |
| <i>C. ceriferus</i> (Fabricius)    | Ornamentales ( <i>Euonymus, Ilex</i> ), Aguacate ( <i>Persea americana</i> y <i>P. gratissima</i> ), Guayaba, Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> ), Manzana ( <i>Malus domesticus</i> ), Ciruelo ( <i>Prunus</i> spp.), Te ( <i>Camellia sinensis</i> ) |
| <i>C. cirripediformis</i> Comstock | Ornamentales ( <i>Chrysantemum, Citrus, Gardenia e Ilex</i> ), Aguacate, Guayaba, Zapote ( <i>Dyospiros</i> spp.), Annona spp., Litchi, Granadilla ( <i>Pasiflora</i> spp.)   |
| <i>C. destructor</i> Newstead      | Ornamentales ( <i>Citrus, Croton, Ficus, Hibiscus, Gardenia</i> ), Café ( <i>Coffea arabica</i> ), Aguacate, Guayaba, Manzana, Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ), Te   |
| <i>C. floridensis</i> Comstock     | Ornamentales ( <i>Laurus, Nerium, Psidium, Ficus, Ilex</i> ), Aguacate, Mango, Annona spp, Litchi , Mamey ( <i>Mammea americana</i> ), Manzana, Pera ( <i>Pyrus communis</i> ), Cacao, Te   |
| <i>C. rubens</i> (Maskell)         | Ornamentales ( <i>Coccoloba, Hibiscus, Plumeria</i> ), Te, Aguacate, Mango, Zapote, Annona, Litchi, Manzana, Ciruelo, Café, Coco  |

### 3.2.3 Ceroplastes albolineatus Cockerell., *Entomological News*. 157-158. 1894

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de Ceroplastes albolineatus.

|                     |   |
|---------------------|---|
| <b>Reino</b>        | Animalia                                  |
| <b>Phylum</b>       | Artropoda                                 |
| <b>Clase</b>        | Insecta                                   |
| <b>Orden</b>        | Homoptera                                 |
| <b>Sub orden</b>    | Sternorrhyncha                            |
| <b>Superfamilia</b> | Coccoidea                                 |
| <b>Familia</b>      | Coccidae                                  |
| <b>Género</b>       | Ceroplastes                               |
| <b>Especie</b>      | <i>Ceroplastes albolineatus</i> Cockerell |



**Figura 25.** Diferentes estadios del insecto Ceroplastes albolineatus. **A.** Hembras adultas infestando los tallos de Pittocaulon praecox. **B.** Acercamiento de la hembras adultas alimentándose sobre P. praecox. **C.** Hembra adulta con huevos. **D.** Ninfa de dispersión de primer estadio (Crawler).

El insecto *Ceroplastes albolineatus* fue descrito por primera vez en Jamaica en el año de 1894, por Cockerell (*Cockerell, 1894*). De manera general, estos insectos pertenecientes al Orden Homoptera, familia *Coccidae*, género *Ceroplastes*, están distribuidos en México, Jamaica y Brasil (**Tabla 3**) (*Ben-Dov, 1993*). En México, se encuentran comúnmente en los tallos de su principal planta hospedera *Pittocaulon praecox* (Asteraceae), aunque también se han reportado en *Schinus molle* (Anacardiaceae), *Ligustrum* sp. (Oleaceae) y *Nerium oelander* (Apocynaceae).

**a) *Ciclo biológico del insecto Ceroplastes albolineatus.***

Este insecto desarrolla todo su ciclo biológico sobre el tallo de *P. praecox* alimentándose de los jugos celulares del vegetal y presentando dos generaciones al año. Una de ellas se inicia en el mes de junio y la otra en diciembre (*Narada y Lechuga, 1971*). Se presume que la forma de reproducción es por partenogénesis ya que sólo se encuentran hembras y no machos, caso muy frecuente en los cóccidos. Se ha podido observar que las hembras alcanzan su madurez en los meses de mayo y noviembre. A medida que la madre va depositando sus huevecillos, estos van quedando unidos por ambos extremos dando un aspecto moniliforme, después se independizan hasta quedar completamente separados. Conforme la hembra va ovopositando, los huevos van llenando la cavidad denominada cámara de cría, que se forma al momento en que la hembra repliega su cuerpo hacia la región ventral. Una vez que la hembra ha terminado de ovipositar, muere, quedando solamente la cutícula gruesa, donde alberga los huevecillos. Se ha visto que la postura media de huevecillos es aproximadamente de 1000 unidades. Entre los 21-25 días, tiempo al que emergen las larvas, éstas salen de la

cubierta protectora e inician su recorrido por el tallo y ramas hasta encontrar una región que les resulte adecuada para el desarrollo de todo su ciclo biológico (Narada y Lechuga, 1971).

**b) Descripción de los estadios de desarrollo de C. albolineatus (Narada y Lechuga, 1971).**

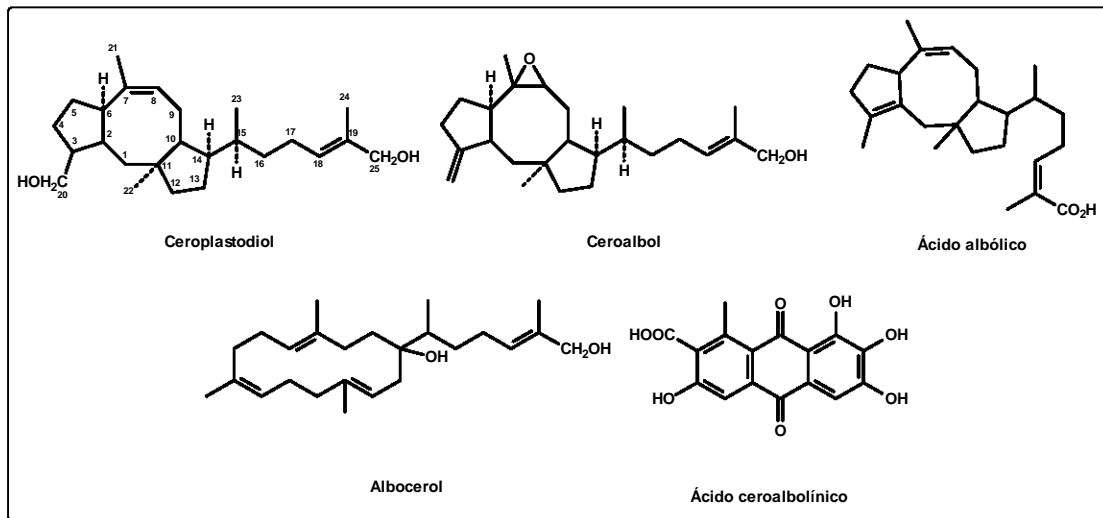
- **Huevo.-** Tiene una coloración rojiza; es de forma ovada, con superficie lisa y brillante. Mide 430 micras de longitud por 280 micras de ancho (**Figura 25C**).
- **Ninfas de Dispersión, 1er estadio (“Crawlers”).-** En esta etapa del desarrollo las ninfas no presentan cera, la coloración del cuerpo es rojo sangre. Su forma es ovada. El estilete bucal es cuatro veces más largo que la longitud total del cuerpo. Forma y tamaño de las patas proporcionadas a la talla del insecto. Todos estos elementos provistos de pelos (**Figura 25D**).
- **2do. Estadio Ninfal.-** En este estadio el cuerpo está cubierto de cera de tipo laminar. En la región dorsal se observa la línea media desnuda y un penacho de cera a cada lado. La cubierta del cuerpo es liso de contorno casi circular.
- **3er. Estadio ninfal.-** En esta etapa de desarrollo, los individuos presentan dos tipos de cera: una laminar y otra compacta y más acuosa; la primera sigue siendo blanca, mientras que la otra es rosa marfil.
- **Hembra adulta.-** De contorno redondeado o elíptico. Altamente convexa, ligeramente esférica, recubierta de grandes cantidades de cera de color rosa amarillento. Todas ellas presentan una hendidura en la región central; ello



nos indica el sitio donde se secreta la cera. Se observan varios tubérculos los cuales presentan gran cantidad de glándulas productoras de cera. Las patas normales y fuertes (**Figuras 25A y 25B**).

**c) Estudios químicos previamente realizados sobre *C. albolineatus*.**

La cera que funge como cubierta protectora está compuesta principalmente por sesterterpenos (compuestos de 25 átomos de carbono) (**Figura 26**) (*Rios y Colunga, 1965; Rios y Perez, 1969; Rios y Gomez, 1969; Rios et al., 1974; Quijano et al., 1975; Veloz et al.; 1975; Calderon et al., 1978a; Calderon et al., 1978b; Quijano et al., 1979a; Quijano et al., 1979b; Quijano et al., 1981*). Además se caracterizaron los ácidos grasos presentes en la cera del insecto (*Calderon y Rios, 1968*). Del insecto como tal, únicamente se determinó la presencia de un compuesto tipo antraquinona llamado ácido ceroalbolínico, que es el que le da la coloración rojiza característica a todos los estadios (**Figura 26**) (*Rios, 1966; Gadgil et al., 1968*).



**Figura 26.** Algunos metabolitos secundarios aislados de *Ceroplastes albolineatus*

## 5. HIPÓTESIS

1. Las especies de la tribu *Senecioneae* producen alcaloides pirrolizidínicos por lo tanto se espera que las especies que conforman el género *Pittocaulon* sintetizen este tipo de sustancias.

2. El insecto *Ceroplastes albolineatus* cumple todo su ciclo de vida sobre *Pittocaulon praecox*, por lo tanto se espera que este sea capaz de secuestrar los alcaloides pirrolizidínicos obtenidos de su planta hospedera.

3. Si el insecto *Ceroplastes albolineatus* secuestra los alcaloides pirrolizidínicos producidos por la planta *Pittocaulon praecox*, se espera que posea un mecanismo de desintoxicación enzimático (FMO, CytP450) para evitar los efectos nocivos de estos.

4. La teoría de la defensa óptima predice que a las partes de la planta que sean de un alto valor para la adecuación de ésta, les serán asignadas mayor cantidad de compuestos defensa, por lo tanto se espera que en las especies de *Pittocaulon*, las flores tengan la mayor concentración de alcaloides pirrolizidínicos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Generales

- Determinar la presencia de APs en cinco de las seis especies que constituyen el género *Pittocaulon*.
- Determinar si el insecto *Ceroplastes albolineatus* secuestra los APs de su planta hospedera, *Pittocaulon praecox*.

### 6.2 Específicos

- Determinar la presencia de APs en las raíces y órganos aéreos (tallos e inflorescencias) de *Pittocaulon bombycophole*, *P. filare*, *P. velatum* y *P. hintonii* por CG.
- Determinar la presencia de APs en las raíces y órganos aéreos (tallos, hojas, frutos e inflorescencias) de *P. praecox* por cromatografía de gases (CG).
- Identificar los APs presentes en cada una de las especies que componen el género *Pittocaulon* por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).
- Determinar la presencia de APs en las hembras adultas, huevos y ninfas del primer estadio de *Ceroplastes albolineatus* alimentándose sobre *P. praecox*.
- Identificar los APs presentes en cada una de las muestras analizadas de *Ceroplastes albolineatus* por CG-EM.

- Comparar el perfil de los APs producidos por *P. praecox* con los APs identificados en el insecto *Ceroplastes albolineatus*.
- Purificar los APs mayoritarios presentes con estructura desconocida mediante técnicas cromatográficas rutinarias como cromatografía de columna (CC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
- Caracterizar los APs mayoritarios con estructura desconocida mediante su análisis espectroscópico por resonancia magnética nuclear (RMN).
- Determinar la actividad antioxidante (DPPH y TBARS) y antimicrobiana [hongos y bacterias gram (+) y gram (-)] de los extractos de las diferentes especies de *Pittocaulon*.
- Determinar la presencia del sistema enzimático citocromo P450 (CytP450) en el insecto *Ceroplastes albolineatus*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Recolección del Material vegetal

***Pittocaulon praecox***: Las raíces, flores y tallos de *Pittocaulon praecox* (Cav.) Rob. & Brett. fueron colectados dentro del campus principal (Ciudad Universitaria) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (2277 m), D.F, durante la primavera (marzo del 2004 y 2005). Las hojas fueron colectadas en el otoño del 2004 y 2005 (octubre) y los frutos en mayo del 2004 y 2005, después de la floración. Los tallos infestados fueron colectados en mayo del 2006. La identificación botánica fue realizada por el Doctor Mark Olson, del Instituto de Biología de la UNAM. El material vegetal recolectado fue secado a temperatura ambiente, molido y almacenado hasta la extracción de los alcaloides.

***Pittocaulon velatum*, *P. filare*, *P. hintonii*, *P. bombycophole***: *P. velatum*, *P. filare*, *P. hintonii* fueron colectadas del 10 al 13 de marzo del 2005. *P. velatum* se recolectó en el estado de Michoacán, en una pendiente rocosa ubicada a un lado de la carretera libre que lleva de Zitácuaro a Ciudad Hidalgo (2235 m). *P. filare* se recolectó en el estado de Colima, en una cuesta empinada de piedra caliza, ubicada 5 Km al sur de la intersección de los Asmoles en la carretera libre que conduce de Colima a Manzanillo (464 m). Las muestras de *P. hintonii* fueron recolectadas en una superficie rocosa plana, en el Rancho la Parota, Municipio de Coalcomán, en el estado de Michoacán (1230 m). La colecta de *P. bombycophole* se realizó el 24 de marzo del 2005, en el estado de Guerrero en una ladera rocosa ubicada en la carretera que conduce de Buenavista a Coaxacalán (1728 m). De las cuatro especies de *Pittocaulon* se recolectaron tallos, raíces

y flores. De *P. filare* no se recolectaron flores, debido a que durante la época de colecta ya había pasado el tiempo de floración. Las hojas no fueron recolectadas porque en el tiempo que están presentes las inflorescencias no hay hojas. Las muestras vegetales fueron depositadas en el Herbario Nacional MEXU, del Instituto de Biología de la UNAM. Los números de voucher para cada una de las especies son: *P. velatum* (910), *P. filare* (897), *P. hintonii* (878), *P. praecox* (1020) y *P. bombycophole* (1008). A continuación se ilustran en la **Tabla 4** las especies estudiadas y los lugares de recolección:

**Tabla 4.** Información del material y el sitio de colecta de cada una de las especies de *Pittocaulon*.

| <i>ESPECIE</i>                                      | <i>ESTADO</i> | <i>ELEVACIÓN</i> | <i>UBICACIÓN</i>          | <i>MATERIAL</i>       |
|---|---------------|------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>Pittocaulon velatum</i><br>var. <i>velatum</i>   | Michoacán     | 2235 m           | Ciudad Hidalgo- Zitácuaro | Flores y tallos       |
| <i>Pittocaulon hintonii</i><br>var. <i>hintonii</i> | Michoacán     | 1230 m           | Coalcomán-Costa           | Flores, tallos y raíz |
| <i>Pittocaulon filare</i>                           | Colima        | 464 m            | Manzanillo-Colima         | Flores, tallos y raíz |
| <i>Pittocaulon bombycophole</i>                     | Guerrero      | 1728 m           | Buenavista-Coaxacacán     | Flores, tallos y raíz |

### 7.2 *Recolección del insecto Ceroplastes albolineatus*

Las hembras del insecto *Ceroplastes albolineatus* Cockerell fueron recolectadas de los tallos infestados de *P. praecox* durante tres años sucesivos [mayo-julio del 2004, del 2005 y mayo del 2006] en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (2277 m), México D.F.

Las tres colectas fueron designadas como experimentos I, II y III, respectivamente. Las hembras adultas, que consisten de un cuerpo rojizo (insecto *per se*) y una cubierta cerosa, fueron cuidadosamente removidas de los tallos de *P. praecox* con una espátula

evitando cualquier tipo de contaminación con algún tejido de la planta. Posteriormente, la cubierta cerosa fue separada del insecto. Ambos, la cubierta cerosa y el insecto fueron procesados como se explica a continuación: Experimento I. La cubierta cerosa fue disuelta en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y el insecto fue macerado en un mortero y extraído con metanol (MeOH). Los huevos y las ninfas de dispersión del primer estadio (*crawlers*) fueron extraídos directamente con MeOH. Después de evaporar el solvente, el residuo fue preservado hasta el análisis de los alcaloides. La diferencia entre huevos 1 y huevos 2 corresponde a los tiempos en que fueron colectados, finales de mayo y julio respectivamente. Para los experimentos II y III, todas las muestras del insecto (hembras adultas, cubierta cerosa, huevos y ninfas de dispersión) fueron secadas a temperatura ambiente y sometidas a extracción empleando un montaje Soxhlet, primero se extrajo con bencina de petróleo durante 2 horas, posteriormente se extrajo con MeOH por 5 h. Luego el solvente fue evaporado y el residuo fue preservado para el análisis de APs.

Los huevos fueron colectados directamente de la cámara de cría de las hembras adultas durante el mes de julio de los años 2004 y 2005 para los experimentos I y II, respectivamente, ya que en esa época del año, la hembra muerta tiene la cámara de cría completamente llena de huevos (Véase **Figura 25C**). Los huevos recolectados fueron simplemente vertidos en una caja de Petri. Una parte de los huevos fue secada a temperatura ambiente y almacenada hasta el análisis de los APs. La otra parte fue colocada a temperatura ambiente sobre un papel filtro dentro en una caja de petri durante 21-25 días hasta que las ninfas de dispersión emergieran. Estas fueron secadas y almacenadas para el análisis.

### **7.3 Tratamiento de las muestras.**

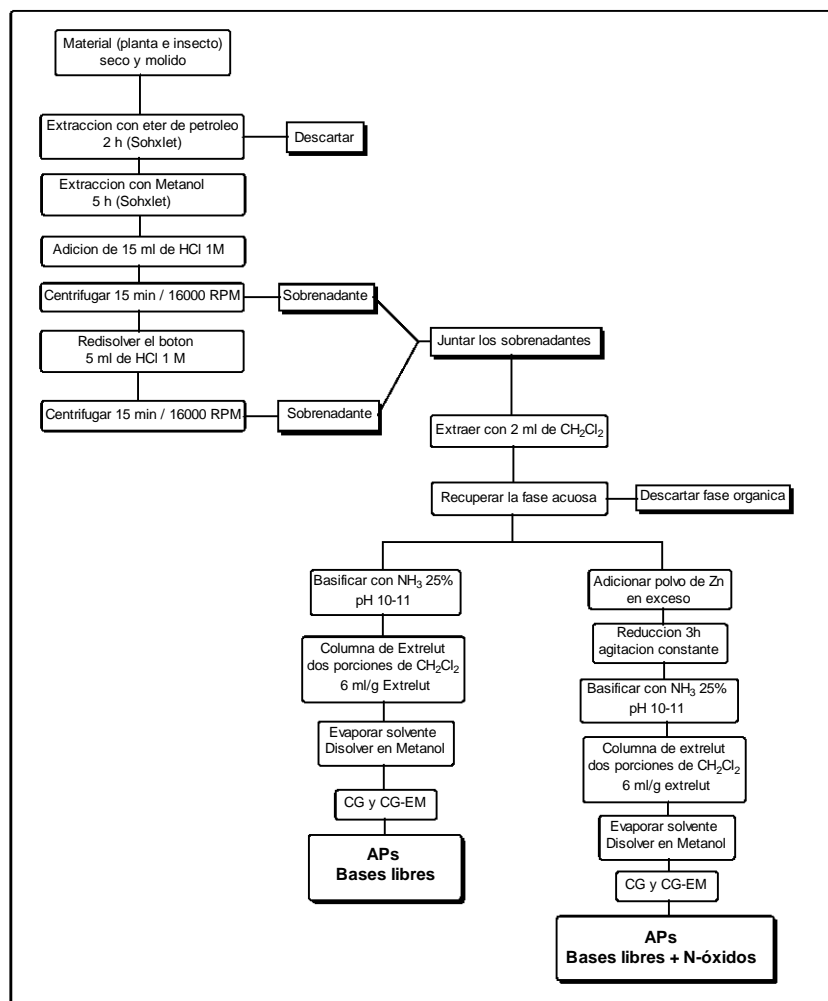
#### **7.3.1 Procedimiento para la obtención de los extractos alcaloideos de las especies de Pittocaulon y el insecto Ceroplastes albolineatus.**

a) **Material vegetal:** Los órganos secos de la planta (hojas, tallos, flores, frutos y raíces) fueron molidos y pesados. El material fue extraído en un montaje Soxhlet siguiendo el mismo procedimiento descrito para el insecto en los experimentos II y III. Luego el residuo se extrajo con 0.5-2.0 ml de HCl 1 M y se centrifugó. El botón formado fue disuelto en un pequeño volumen de HCl para una segunda extracción. Posteriormente, los sobrenadantes se juntaron y fueron extraídos con 2 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase acuosa fue recuperada y la mitad de la solución se llevó a pH básico (9.0) con amoníaco al 25%, para luego ser pasado por una columna de Extrelut® (Merck) (1.4 ml de solución/g de Extrelut) eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml/g Extrelut). Esta fracción contiene solo los APs presentes como bases libres. El solvente fue evaporado y el residuo fue disuelto en 10 o 100 µl de MeOH para luego realizar el análisis de los APs por CG, CG-EM y su separación por HPLC. La otra mitad del sobrenadante ácido fue mezclada con un exceso de polvo de zinc y se agitó magnéticamente durante 3 h a temperatura ambiente, para lograr una reducción completa de los APs presentes como N-óxidos. Luego la muestra se basificó y se continuó el procedimiento como ya fue descrito. Esta fracción contiene los APs totales (bases libres y N-óxidos) (**Figura 27**). Por último se lleva la muestra a sequedad y se pesa.

b) **Insecto:** Las muestras preservadas de *Ceroplastes albolineatus* (hembras adultas, huevos, ninfas de dispersión, cubierta cerosa) y los residuos obtenidos de la



extracción con Soxhlet, fueron disueltos en 0.2-2 ml de HCl 1 M, macerados en un mortero y extraídos dos veces para ser tratados posteriormente como se describió para el material vegetal.



**Figura 27.** Procedimiento empleado para la extracción de APs.

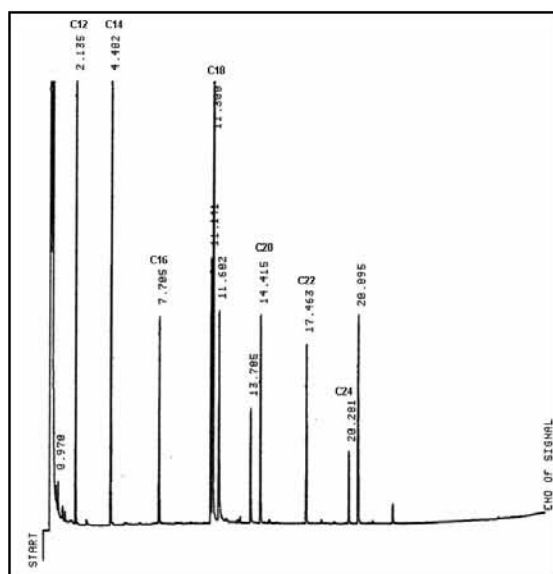
### 7.3.2 Determinación de la presencia de los APs en los extractos

Los extractos alcaloideos obtenidos fueron sometidos a análisis cualitativo y cuantitativo de acuerdo con la metodología empleada por Witte y colaboradores (Witte *et al.*, 1993).



- **Cromatografía de Gases. Determinación del índice de retención (RI).**

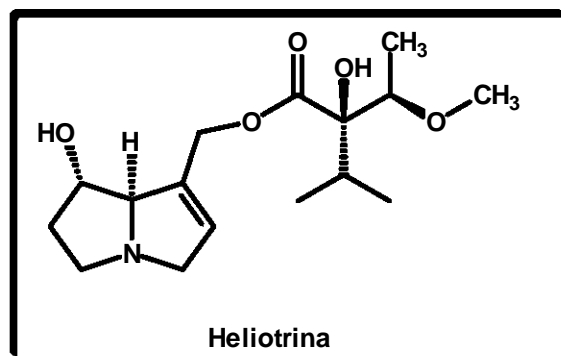
Después de haber establecido cuales son los picos de interés se calcula el Índice de Retención (RI) para cada uno de estos, usando la co-inyección de un patrón de hidrocarburos (alcanos C12-C24 o C21-C40) (**Figura 29**). Luego se calculó el valor de RI empleando el índice de Kovats (*Kovats, 1958*).



**Figura 29.** Perfil cromatográfico de APs para determinar el RI usando un patrón de alcanos (C12-C24)

- **Cromatografía de Gases. Análisis cuantitativo.**

Para el análisis cuantitativo se empleó el detector FID y como estándar interno heliotrina a una concentración de 1 mg/ml, en algunos casos se empleó una concentración de 0.1 mg/ml (**Figura 30**). La heliotrina fue donada por el Dr. Thomas Hartmann del IPB de Braunschweig, Alemania.



**Figura 30.** Estructura de la heliotrina empleada como estándar en la cuantificación de los APs.

### 7.3.3 Identificación de los APs presentes en los extractos analizados.

- *cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas (CG-EM).*

Después del análisis preliminar de los extractos por CG se procede a determinar por CG-EM cuales son los APs presentes en la muestra. La identificación se basa en la información conjunta aportada por el índice de Kovats (valores de RI), los iones moleculares ( $[M]^+$ ) y los patrones de fragmentación del espectro de masas específico de cada compuesto, comparados a su vez con compuestos de referencia de la base de datos de APs establecida por Witte y colaboradores en el Institut für Pharmazeutische Biologie, Technische Universität de Braunschweig, Alemania (Witte *et al.*, 1993), lo que permitió establecer la estructura de los APs sin ningún tipo de ambigüedad.

Para obtener los datos de CG-EM se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890A equipado con una columna analítica de 30m x 0.32 mm (ZB1 ó DB5, Phenomenex, dependiendo de la polaridad de los compuestos), la cual estaba acoplada directamente a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (TSQ 700, Finigan). Las condiciones fueron: temperatura del inyector y línea de transferencia 250°C, temperatura de la fuente de iones 150°C, el programa de temperatura usado fue 100°C (3 min)-310°C (6°C/min). El volumen de inyección fue de 1 µl. El flujo del gas transportador (Helio) fue 1.6 ml/min. Los espectros de masas fueron registrados a 70 eV.

#### ***7.3.4 Purificación de los APs mayoritarios.***

Los extractos alcaloideos fueron sometidos a fraccionamiento por CC, empleando como fase estacionaria, gel de sílice 60 G Merck y como fase móvil un sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, con un aumento progresivo de polaridad (95:5-50:50). El seguimiento se hizo por cromatografía de capa fina (TLC) usando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 G con indicador de fluorescencia UV254 Macherey-Nagel de 20 x 20 y 0.25 mm de espesor y como fase móvil un sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> (82:15:3) , y a través del CG empleando el detector FID. Para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz ultravioleta (UV) (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm). Para detectar la presencia de alcaloides se usó la solución aspersante del reactivo de Dragendorff (Merck) como revelador específico.

- ***Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)***

Se utilizó una columna RP-18 (25 cm x 0.4 cm i.d, Nucleosil; Macherey and Nagel) con una elución isocrática de una mezcla de solventes acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) 75%:ácido tri-fluoroacético (CF<sub>3</sub>COOH) 25% pH 2. La longitud de onda fue de 210 nm. El flujo dependiendo de la muestra fue 9.0 ml o 7.5 ml/min.

### ***7.3.5 Determinación de la estructura de los APs purificados.***

La elucidación estructural se realizó por técnicas espectroscópicas rutinarias: resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C uni y bidimensionales (HETCOR y HMBC, NOE) empleando un espectrómetro Bruker AVANCE II-600 y operando a frecuencias de 600.1 MHz para <sup>1</sup>H y 150.9 MHz para <sup>13</sup>C. El solvente utilizado fue CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D (0.65 ml) + 2 gotas de ND<sub>3</sub> (Solución al 25% en D<sub>2</sub>O, Aldrich), y los desplazamientos químicos fueron referenciados empleando TMS ( $\delta_H = 0.00$ ) para <sup>1</sup>H y la señal del solvente CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D ( $\delta_C = 49.0$ ) para <sup>13</sup>C.

### ***7.3.6 Determinación de la presencia del sistema enzimático Citocromo P450 (CytP450).***

#### ***a) Recolección del insecto.***

Las hembras adultas se recolectaron en mayo del 2005 en la ciudad universitaria de la UNAM. Estos fueron almacenados a -70°C.

***b) Obtención de la fracción celular S-9.***

Para la obtención de la fracción celular S-9 se utilizaron hembras adultas almacenadas a -70°C. A éstas se les removió la cubierta cerosa, se lavaron cinco veces con una solución estéril de cloruro de potasio (KCl) 0.15 M y se transfirieron a un homogenizador. Posteriormente se filtró con una gasa y se centrifugó durante 10 min a 9000 g. El sobrenadante, que es la fracción S-9, fue recuperado y almacenado en tubos estériles a - 80 °C. Todo el procedimiento fue llevado a cabo a una temperatura de 4°C (*Garner et al., 1972; Maron y Ames, 1983*).

***c) Obtención de los microsomas de C. albolineatus.***

Para obtener los microsomas se descongeló la fracción S-9, se centrifugó a 100,000 g durante 60 min a 4 °C con aceleración y desaceleración lenta. De allí se recuperó el botón y se adicionó un volumen igual al inicial de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 7.4), 0.25 M de sacarosa a 4 °C. Luego se resuspendió y se volvió a centrifugar a 100,000 g durante 60 min a 4 °C. De nuevo se recuperó el botón, pero ahora se le adicionó amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 7.4), 1.0 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% (v/v) de glicerol a 4 °C y se resuspendió. Los microsomas obtenidos fueron congelados en alícuotas de 10 a 500 µl en hielo seco y almacenados a -80 °C (*Hayes, 2001; Graham y Higgins, 2002*).

**d) Determinación del contenido proteico de *C. albolineatus*: Método de Bradford.**

Se preparó una solución stock de albúmina de 1 mg/ml, de ésta se obtuvieron las diferentes concentraciones de 4, 8, 12, 16, 20  $\mu\text{g/ml}$ . De cada una se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  y se le adicionó 1 ml del reactivo de Bradford. El blanco consta de 20  $\mu\text{l}$  de buffer fosfatos y 1 ml de Bradford. De la muestra problema se tomaron 10  $\mu\text{l}$  y se le adicionaron 490  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos, luego de esta solución se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se le agregó 1 ml de Bradford. Después de 5 minutos se leyó la absorbencia (Abs) a 595 nm. Se graficó una curva estándar de Abs<sub>595</sub> vs Concentración de albúmina. El valor de absorbencia obtenido para la muestra de *C. albolineatus* se interpoló en la curva para obtener la concentración de proteína presente (*Bradford, 1976*).

**e) Determinación del contenido de CytP450 microsomales.**

Para establecer la presencia del sistema enzimático CytP450 se disolvieron los microsomas con amortiguador de fosfatos (pH 7.4), manteniendo una concentración final entre 0.05 a 5  $\mu\text{M}$  de CytP450 (2 mg de proteína/ml para microsomas). Luego de mezclar la solución, se dividió en dos celdas de 1 ml cada una, se corrió la línea basal entre 400 y 500 nm en un espectrofotómetro de doble haz luminoso y se registraron las lecturas a 420, 450 y 490 nm. Posteriormente la celda problema fue saturada con 30 a 40 burbujas de monóxido de carbono (CO), una burbuja por segundo y después de esto se le agregó un poco de ditionita de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) a cada celda, antes de hacer la lectura en el espectrofotómetro en un rango de longitud de onda que va desde 400 a 500 nm, hasta alcanzar el pico máximo. Como control positivo se utilizaron microsomas de hígado de rata (*Omura y Sato, 1964; Hayes, 2001*).



***f) Determinación de la presencia de CytP450 microsomaes por electroforesis en gel de poliacrilamida con marcador de peso molecular.***

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% a 200 V durante 60 min. Se utilizaron alícuotas de 5 µg de proteína microsomal como muestra. Además, se empleó como marcador de peso molecular estándares de enzima de CytP450 con un rango de 50 a 60 kDa y como control positivo los microsomas de rata obtenidos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Determinación de la forma en que están presentes los APs en *P. praecox* (N óxidos o terciarios).

El análisis preliminar para determinar la forma en que se encuentran los APs en *P. praecox* se realizó con las muestras de tallos (25.4 g), hojas (32.4 g) e inflorescencias (21.6 g) recolectadas durante 2004. A éstas se les hizo una extracción con solventes de polaridad ascendente, comenzando con hexano, diclorometano, acetato de etilo y terminando con metanol, siendo este último el extracto analizado. Se emplearon las siguientes cantidades de extracto: de tallos 8.0 g, de hojas 7.5 g y de flores 8.0 g. La determinación de la forma en que se encuentran los APs en *P. praecox* se realizó acorde al procedimiento descrito en la parte experimental. En la **Tabla 5** se muestran estos resultados.

**Tabla 5.** Composición alcaloidea de los tallos, hojas e inflorescencias en *P. praecox*. Determinación de la forma en que están presentes los APs. (**RED**= reducción con Zn) (**UNRED**=sin reducir). Los APs totales (N-óxidos y terciarios) son detectables por CG-EM después de la reducción de los N-óxidos.

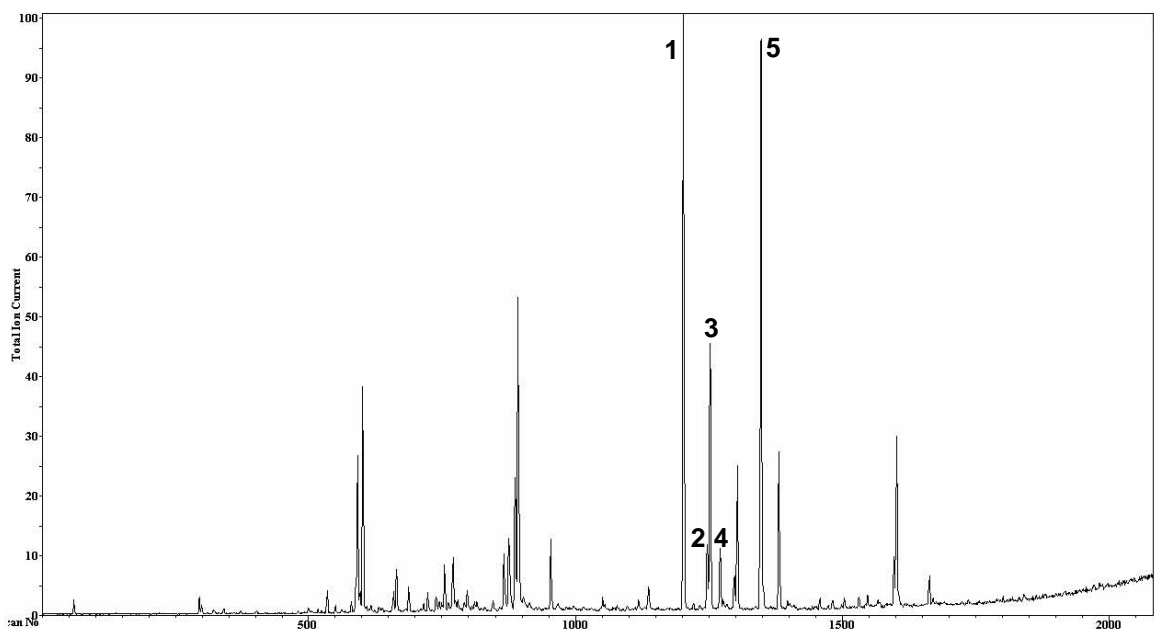
| Alcaloides                      | m/z [M <sup>+</sup> ] | RI   | % de Abundancia relativa |             |            |            |                 |            |
|---------------------------------|-----------------------|------|--------------------------|-------------|------------|------------|-----------------|------------|
|                                 |                       |      | Tallos                   |             | Hojas      |            | Inflorescencias |            |
|                                 |                       |      | RED                      | UNRED       | RED        | UNRED      | RED             | UNRED      |
| <i>7-éster-d</i>                | 239                   | 1810 | 65                       | 63          | 88         | 78         | 61              | 76         |
| <i>9-éster-d</i>                | 239                   | 1837 | 26                       | 18          | 9          | 3          | 19              | 8          |
| <i>9-éster (isómero)</i>        | 239                   | 1854 | 1                        | 11          | 6          | 8          | 3               | 10         |
| <i>Senkirkina</i>               | 365                   | 2458 | 3                        | 3           | tr         | tr         | 12              | 6          |
| <i>Neosenkirkina</i>            | 365                   | 2534 | --                       | --          | --         | --         | tr              | tr         |
| <b>mg de APs/g de peso seco</b> |                       |      | <b>1,2</b>               | <b>1,38</b> | <b>0,7</b> | <b>0,7</b> | <b>4,4</b>      | <b>4,1</b> |

## **8.2 Análisis de los APs presentes en Pittocaulon praecox por CG-EM.**

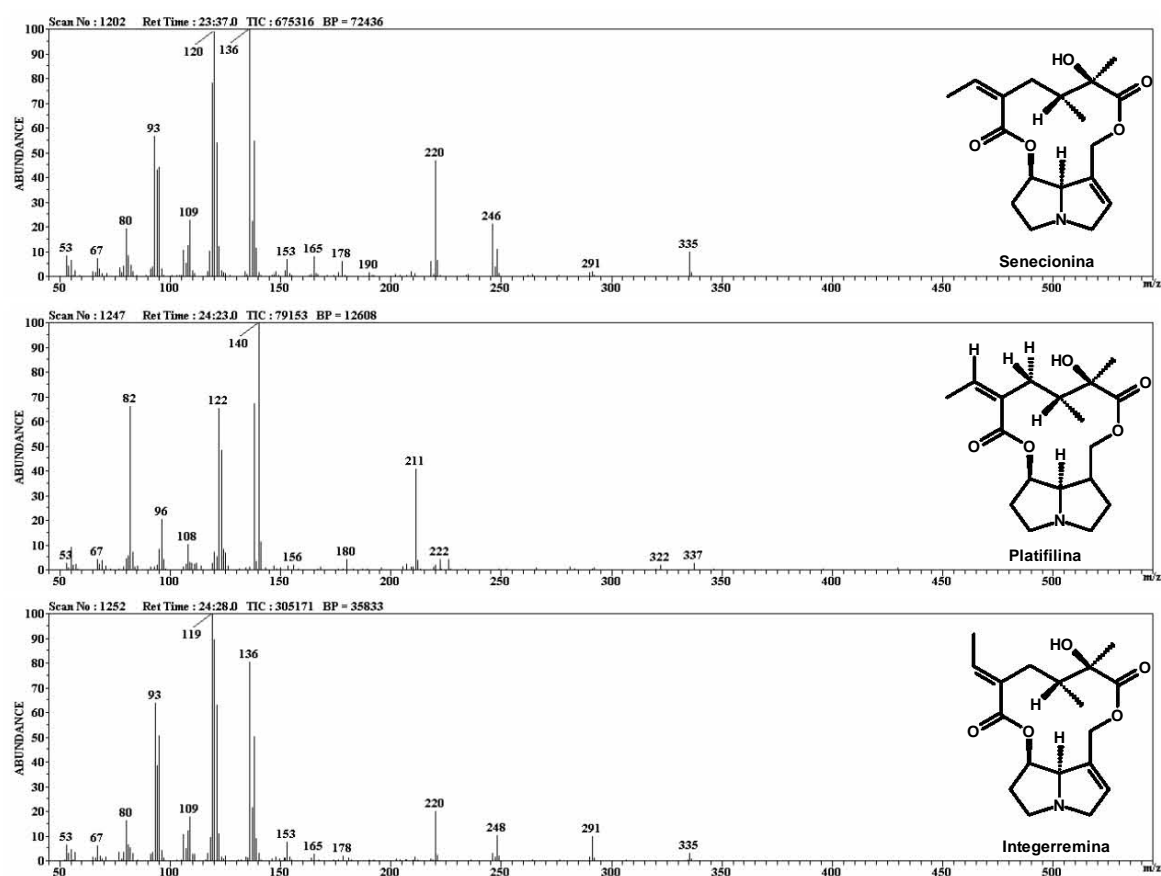
Debido quizás a que algunos de los APs se estaban perdiendo durante el empleo de solventes no polares, se modificó el proceso de extracción utilizado en el análisis preliminar. El nuevo análisis de los APs para *P. praecox* se realizó con material seco de muestras recolectadas en el 2005. El procedimiento de extracción empleado fue el ilustrado en la parte experimental (Véase **Figura 27**).

### ***Raíz***

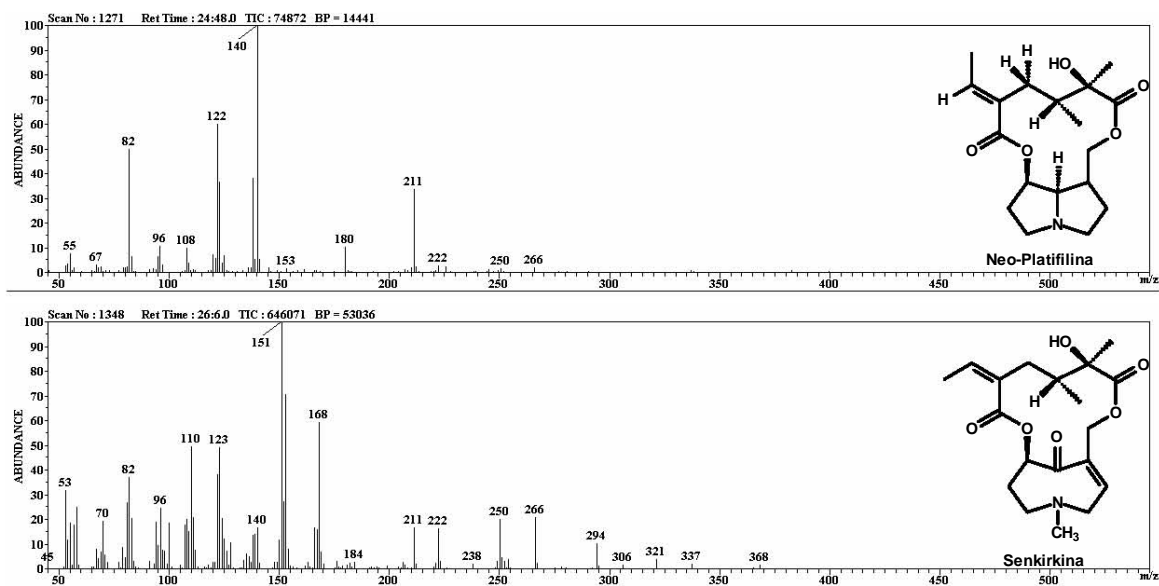
De los 19.59 gramos de material, se obtuvieron 31.4 mg de extracto alcaloideo. El análisis de éste por CG-EM mostró la presencia de seis APs, identificados como: senecionina, platifilina, integerrimina, neo-platifilina y senkirina. La identificación se realizó empleando los índices de retención, el ion molecular y la posterior comparación con sustancias de referencia ubicadas en la base de datos del Instituto de Química de la Universidad Tecnológica Carolo-Wilhelmina en Braunschweig, Alemania. A continuación se presenta el cromatograma (**Figura 31**) y el espectro de masas (**Figura 32**) y las estructuras de los APs identificados (**Figura 33**). En la **Tabla 6** se ilustra la abundancia relativa de cada uno de los APs identificados en las raíces de *P. praecox*.



**Figura 31.** Cromatograma de gases de las raíces de *P. praecox*. 1) Senecionina. 2) Platifilina. 3) Integerremina. 4) Neo-platifilina. 5) Senkirkina.



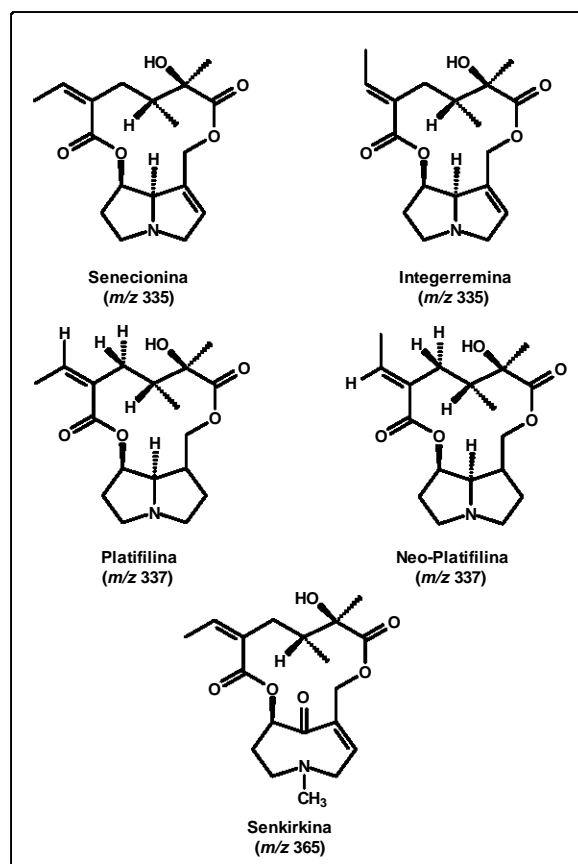
Continua



**Figura 32.** Espectro de masas de cada uno de los APs presentes en las raíces de *P. praecox*. 1) Senecionina. 2) Platifilina. 3) Integerrimina. 4) Neo-platifilina. 5) Senkirkina.

**Tabla 6.** Composición alcaloidea de las raíces de *P. praecox*. Los APs fueron identificados por CG-EM.

| Alcaloide                       | % de Abundancia Relativa |      |        |
|---------------------------------|--------------------------|------|--------|
|                                 | <i>m/z</i> [ $M^+$ ]     | RI   | Raíces |
| <i>Senecionina</i>              | 335                      | 2282 | 40     |
| <i>Platifilina</i>              | 337                      | 2335 | 4      |
| <i>Integerrimina</i>            | 335                      | 2342 | 16     |
| <i>Neo-platifilina</i>          | 337                      | 2363 | 4      |
| <i>Senkirkina</i>               | 365                      | 2458 | 36     |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                          |      | 0.462  |



**Figura 33.** Estructura de los APs identificados en las raíces de *P. praecox*.

#### **Tejidos aéreos de *P. praecox* analizados**

#### **Tallos sin corteza (parte interna) y tejidos periféricos (Corteza), Inflorescencias, Hojas y Frutos.**

Como material de partida de los tallos, la corteza, las flores, las hojas y los frutos, se tomaron 12.2, 13.1, 27.3, 65.6 y 1.0 gramos y se obtuvieron 20.8, 51.9, 125.7, 222, 2.0 mg de extracto alcaloideo, respectivamente. El análisis de los tallos y la corteza por CG-EM mostró la presencia de dos APs. Uno de ellos, con un  $[M^+]$  de 239 y un RI de 1810 que presentó los patrones de fragmentación característicos de un AP con base néctica insaturada sustituido en *O*-7 con un ácido néctico [*m/z* (rel. int.): 239 (1,  $[M]^+$ ), 221 (2), 156 (41), 139 (80), 138 (27), 108 (14), 106 (11), 96 (8), 95 (14), 82 (100), 68 (5), 55 (28),

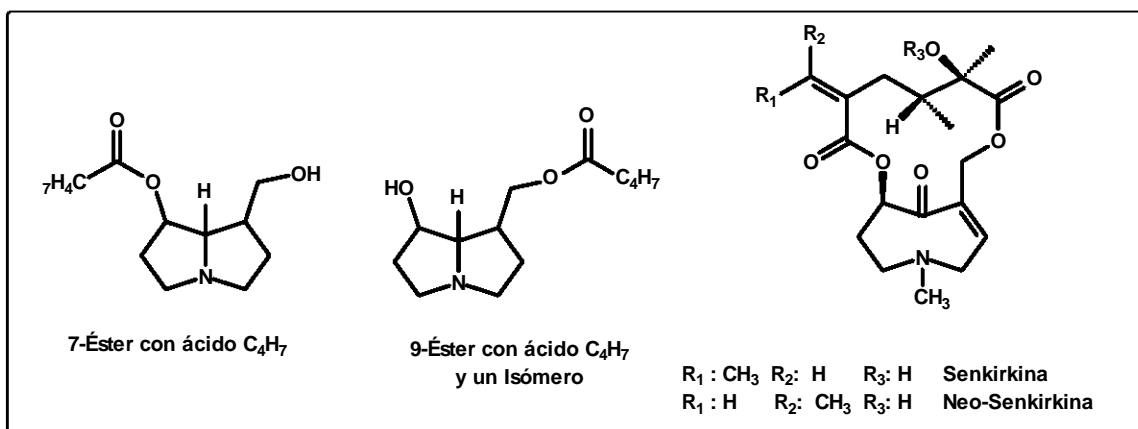
53 (7)]. El pico base a  $m/z$  82 es característico de los APs saturados, mientras que los fragmentos mayoritarios como  $m/z$  139 (correspondiente a la pérdida del ácido néxico  $C_5H_8O_2$ , que puede ser alguno de los isómeros angélico, tíglico o seneciónico) y  $m/z$  156 (fragmentación de la base néxica) son característicos de las necinas  $O_7$ -saturadas (Rizk, 1991; Witte et al., 1993). Este compuesto fue denominado **7 éster-d**. El otro compuesto identificado fue la senkirina (**Figura 34**).

En las hojas, inflorescencias y frutos, se da la presencia concomitante de el 7-éster-d ya mencionado y de un compuesto con igual ion molecular ( $[M^+]$  de 239), pero un valor de RI diferente, 1837. Las señales presentadas en su espectro de masas permiten pensar en un AP con una base néxica insaturada y sustituido con un ácido néxico en C-9 [ $m/z$  (rel. int.): 239 (10,  $[M]^+$ ), 221 (17), 195 (3), 140 (11), 122 (13), 119 (6), 106 (4), 96 (41), 95 (100), 82 (90), 67 (3), 55 (23)]. Esto debido al pico base a  $m/z$  82 y los picos prominentes a 95 (indicativo de esterificación en C-9, 100%) y 96 (41%) (Rizk, 1991; Witte et al., 1993). Este otro compuesto fue llamado **9-éster-d** (**Figura 34**).

En las hojas, adicional al 7 y 9 éster-d, se evidenció la presencia de un AP, al cual se llamó AP-X, con un  $m/z$   $[M^+]$  de 381 y un RI de 2542. Este compuesto, posiblemente un AP derivado de la base néxica otonecina, mostró la señal característica de los derivados de otonecina a  $m/z$  168 y un patrón de fraccionamiento similar al que éstos presentan [ $m/z$  (rel. int.): 381 ( $[M]^+$ ), 182 (28), 168 (27), 153 (100), 110 (15), 100 (32), 83 (45), 58 (36)]. La estructura no pudo ser establecida por comparación con la base de datos.

En las inflorescencias se detectaron trazas del isómero *E* de la senkirkina, denominado neo-senkirkina (**Figura 34**). Por último, en los frutos se detectó la presencia de un isómero estructural del 9-éster-d, sustituido quizás con un ácido néxico diferente.

Debido a que el cromatograma de frutos de *P. praecox* fué el que mayor número de APs presentó en común con los perfiles de tallos, corteza, inflorescencias y hojas, se seleccionó para ilustrarlo (**Figura 35**). Para el caso de los espectros de masas, se ilustrarán únicamente los de los compuestos que no se identificaron en la raíz (**Figura 36 y 37**), al igual que los APs que no pudieron ser cotejados con la base de datos. La **Tabla 7** ilustra las cantidades relativas de los APs detectados para cada una de las muestras.

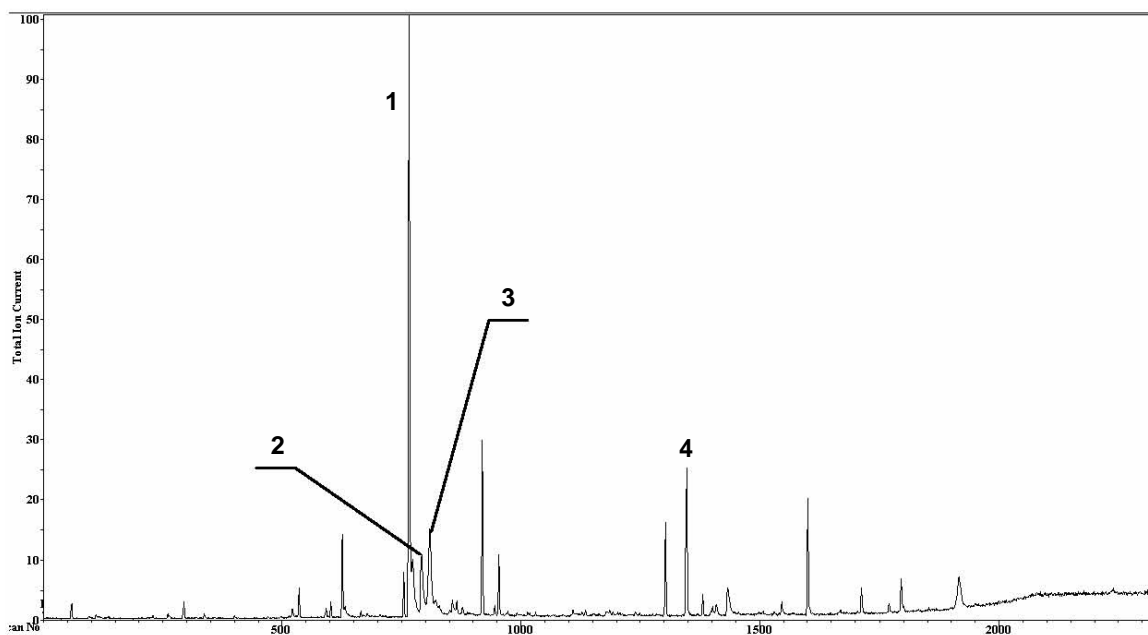


**Figura 34.** Estructura de los APs identificados en las partes aéreas de *P. praecox*.

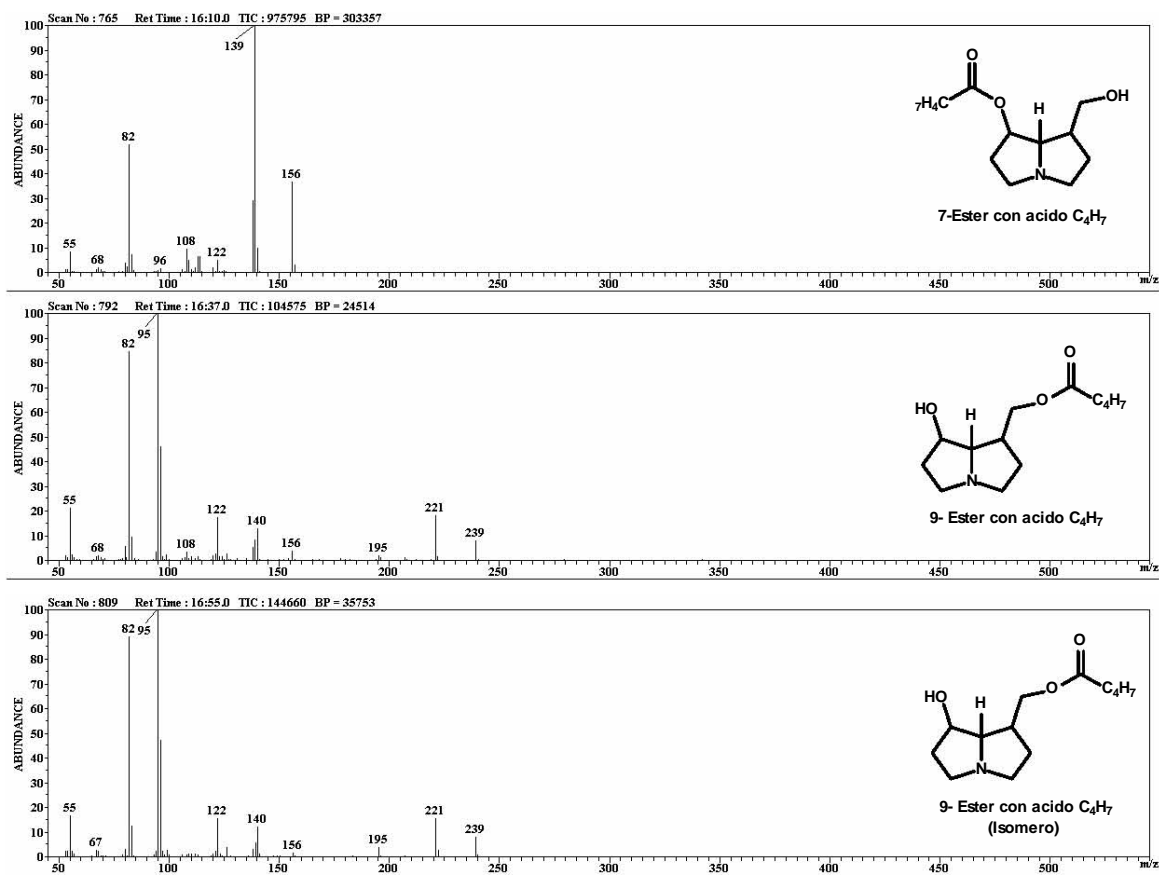


**Tabla 7.** Composición alcaloidea de los tejidos aéreos de *P. praecox* (tallos, corteza, hojas, inflorescencias y frutos). Los APs fueron identificados por CG-EM.

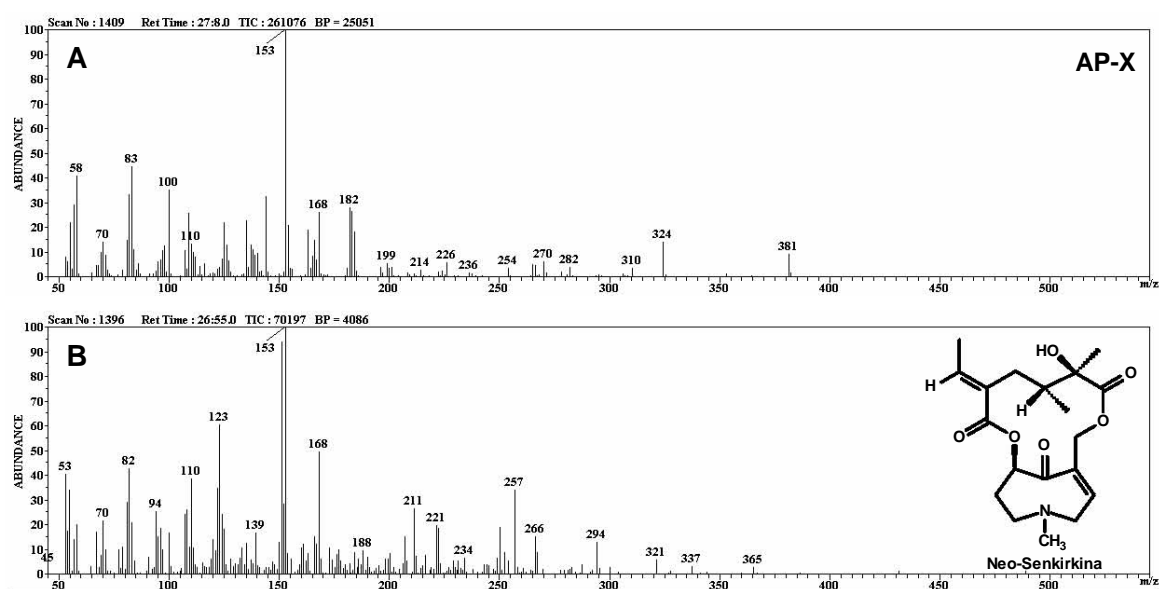
| Alcaloides                      | $m/z$ [ $M^+$ ] | RI   | % de Abundancia Relativa |              |                 |              |              |
|---------------------------------|-----------------|------|--------------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|
|                                 |                 |      | Tallos                   | Corteza      | Inflorescencias | Hojas        | Frutos       |
| <i>7-éster-d</i>                | 239             | 1810 | 68                       | 33           | 66              | 78           | 60           |
| <i>9-éster-d</i>                | 239             | 1837 | --                       | --           | 11              | 2            | 14           |
| <i>9-éster-d (isómero)</i>      | 239             | 1854 | --                       | --           | --              | --           | 11           |
| <i>Senkirkina</i>               | 365             | 2458 | 32                       | 66           | 14              | --           | 7            |
| <i>Neosenkirkina</i>            | 365             | 2534 | --                       | --           | tr              | --           | --           |
| <i>AP-X</i>                     | 381             | 2542 | --                       | --           | --              | 12           | --           |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                 |      | <i>0.119</i>             | <i>0.128</i> | <i>0.968</i>    | <i>1.420</i> | <i>0.374</i> |



**Figura 35.** Cromatograma de los frutos de *P. praecox*. 1) *7-éster-d*. 2) *9-éster-d*. 3) Isómero del *9-éster-d*. 4) *Senkirkina*.



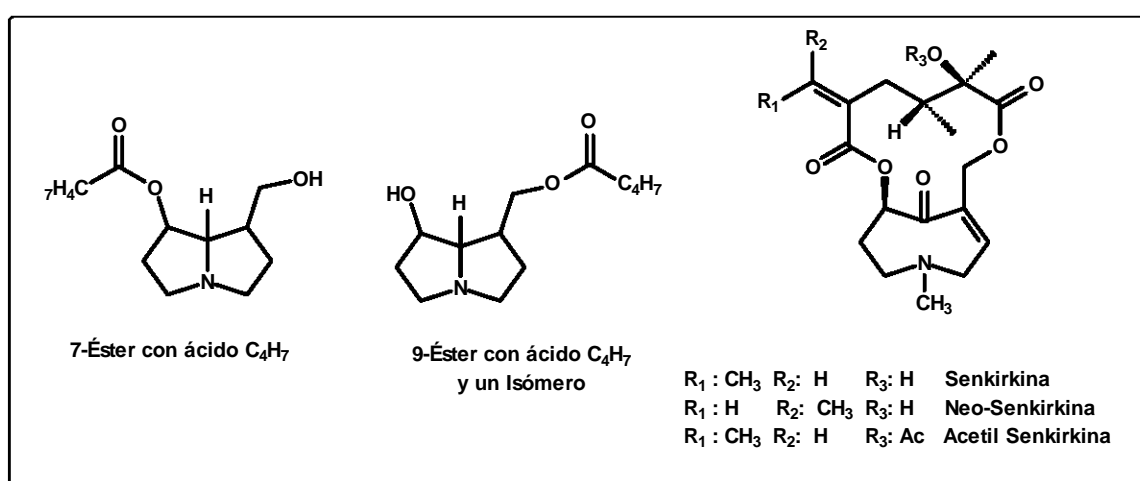
**Figura 36.** Espectro de masas de cada uno de los APs identificados en los frutos de *P. praecox*.



**Figura 37. A.** Espectro de masas del alcaloide denominado AP-X detectado en las hojas de *P. praecox*. **B.** Espectro de masas del alcaloide Neo-senkirkina detectado en las flores de *P. praecox*.

### 8.3 Análisis de los APs presentes en el insecto *Ceroplastes albolineatus* por CG-EM.

Para determinar la presencia de los APs en *C. albolineatus* se recolectaron las muestras durante tres años consecutivos. La determinación de los APs en *C. albolineatus* se realizó acorde al procedimiento descrito en la parte experimental. A continuación se muestran los resultados de cada uno de los experimentos. En la **Figura 38** se ilustran los APs identificados en *Ceroplastes albolineatus*.



**Figura 38.** Estructura de los APs identificados a través de los diferentes estadios del ciclo de vida de *C. albolineatus*.

#### Experimento I.

Las muestras de hembras adultas (7g), cubierta cerosa (6g), ninfas de dispersión (1g) y huevos (1g), fueron recolectadas durante el 2004. Los resultados son reportados en la **Tabla 8**. En la cubierta cerosa y en las hembras adultas se estableció la presencia de cinco APs, todos ellos presentes en las muestras analizadas de su planta hospedera, *P. praecox*. Los APs fueron el **7-éster-d** ( $m/z$  239, RI 1810), el **9-éster-d** ( $m/z$  239, RI 1837) y su isómero ( $m/z$  239, RI 1854), y la senkirquina y su isómero-*E*, la neo-senkirquina.

En las ninfas de dispersión se dió la presencia exclusiva de la senkirquina y en menor proporción su isómero estructural. También para los huevos la presencia de senkirquina fue mayoritaria y se apreció como segundo compuesto mayoritario el **7-éster-d**.

**Tabla 8. Experimento I.** Composición alcaloidea de los diferentes estadios de *C. albolineatus* (huevos, ninfas de dispersión, hembras adultas) y su cubierta cerosa. Las muestras fueron recolectadas de su planta hospedera *P. praecox* en 2004. Los APs fueron identificados por CG-EM.

| Alcaloides                      | m/z [M <sup>+</sup> ] | RI   | % de Abundancia Relativa |                 |                      |            |            |
|---------------------------------|-----------------------|------|--------------------------|-----------------|----------------------|------------|------------|
|                                 |                       |      | Hembra adulta            | Cubierta cerosa | Ninfas de dispersión | Huevos 1   | Huevos 2   |
| <i>7-éster-d</i>                | 239                   | 1810 | 36                       | 29              | --                   | 16         | 29         |
| <i>9-éster-d</i>                | 239                   | 1837 | 10                       | 5               | --                   | --         | 4          |
| <i>9-éster (isómero)</i>        | 239                   | 1854 | 5                        | 2               | --                   | --         | --         |
| <i>Senkirquina</i>              | 365                   | 2458 | 41                       | 53              | 97                   | 84         | 57         |
| <i>Neosenkirquina</i>           | 365                   | 2534 | 2                        | 3               | 3                    | --         | 3          |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                       |      | <i>0,4</i>               | <i>0,05</i>     | <i>0,4</i>           | <i>0,1</i> | <i>0,6</i> |

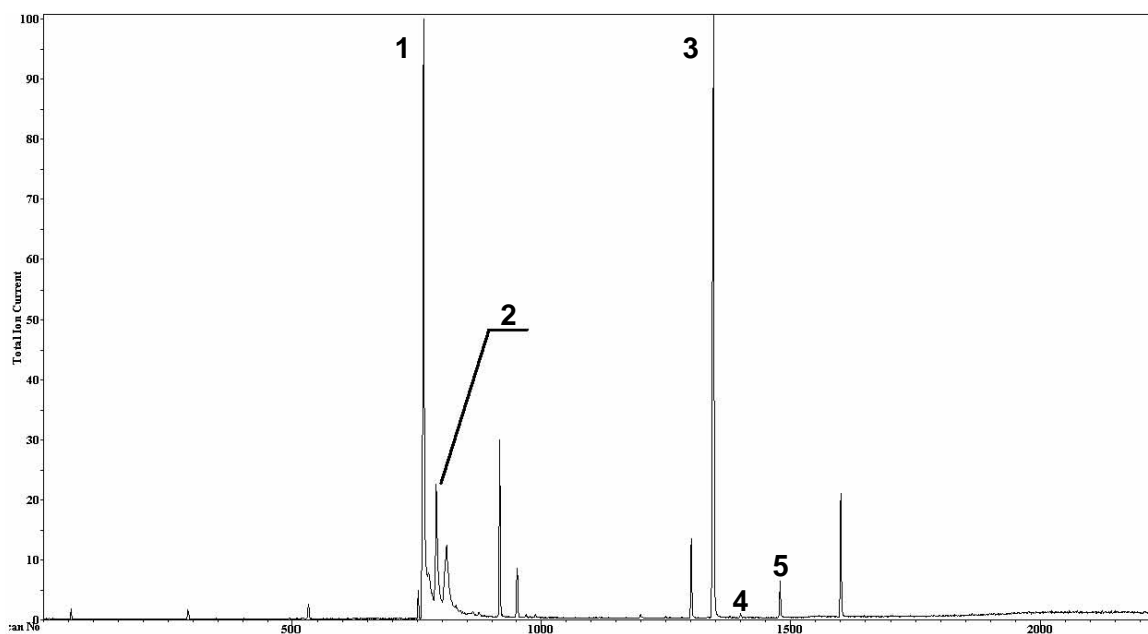
## Experimento II.

Las muestras de hembras adultas (18 g), cubierta cerosa (18 g), ninfas de dispersión (0,1g) y huevos (5,9 g), fueron recolectadas durante 2005. En este experimento la hembra adulta es la que presenta mayor número y concentración de alcaloides. La acetil-senkirquina (m/z 407, RI 2638) fue el único de los cinco alcaloides

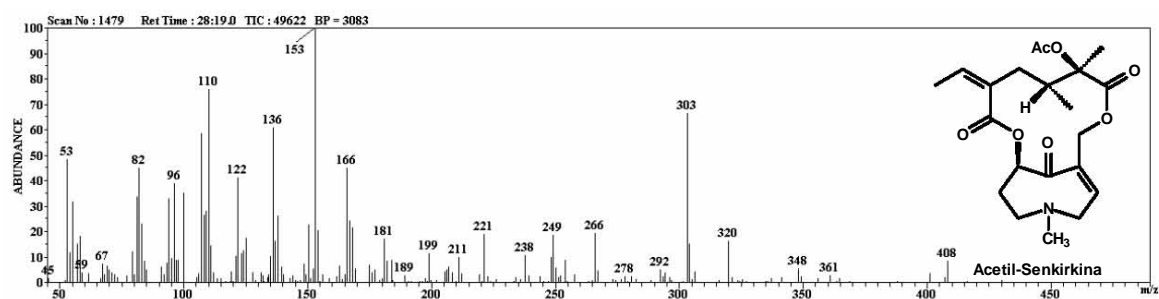
identificados en el experimento II (7-éster-d, 9-éster-d, senkirkina, neo-senkirkina) que no fue identificado en el experimento I (**Figura 40**). De igual manera, como en el experimento anterior, la cubierta cerosa permite apreciar la presencia de APs pero a muy baja concentración. Es de resaltar, que para este experimento, las ninfas de dispersión y los huevos contienen única y exclusivamente senkirkina (**Figura 41**). Los resultados se muestran en la **Tabla 9** y en la **Figura 39**.

**Tabla 9. Experimento II.** Composición alcaloidea de los diferentes estadios de *C. albolineatus* (huevos, ninfas de dispersión, hembras adultas) y su cubierta cerosa. Las muestras fueron recolectadas de su planta hospedera *P. praecox* en 2005. Los APs fueron identificados por CG-EM.

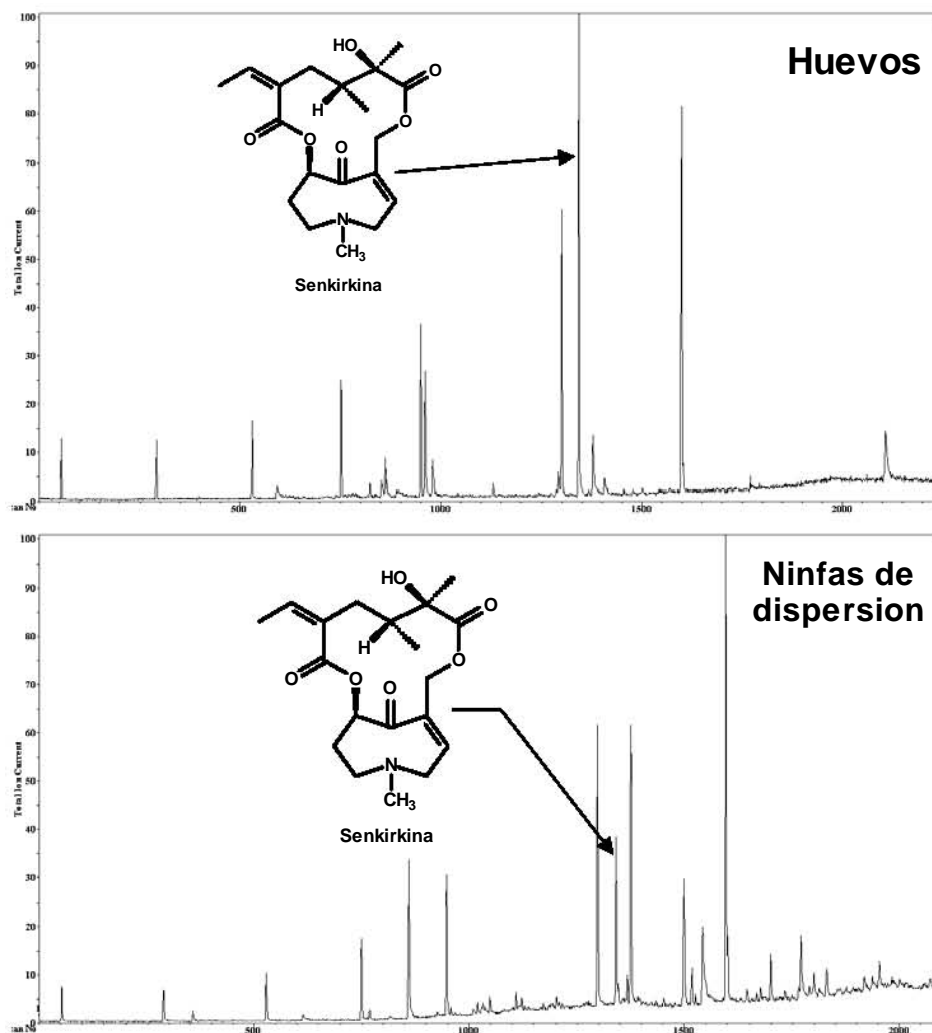
| Alcaloides                      | m/z [M <sup>+</sup> ] | RI   | % de Abundancia Relativa |                 |                      |        |
|---------------------------------|-----------------------|------|--------------------------|-----------------|----------------------|--------|
|                                 |                       |      | Hembra adulta            | Cubierta cerosa | Ninfas de dispersión | Huevos |
| <i>7-éster-d</i>                | 239                   | 1810 | 63                       | 15              | --                   | --     |
| <i>9-éster-d</i>                | 239                   | 1837 | 18                       | 14              | --                   | --     |
| <i>Senkirkina</i>               | 365                   | 2458 | 64                       | 70              | 100                  | 100    |
| <i>Neo-senkirkina</i>           | 365                   | 2534 | tr                       | --              | --                   | --     |
| <i>Acetil-senkirkina</i>        | 407                   | 2641 | 7                        | --              | --                   | --     |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                       |      | 0.125                    | 0.003           | 0.007                | 0.037  |



**Figura 39.** Cromatograma de las hembras adultas de *C. albolineatus*. 1) 7-éster-d. 2) 9-éster-d. 3) Senkirquina. 4) Neo-senkirquina. 5) Acetil-senkirquina.



**Figura 40.** Espectro de masas de la acetil-senkirquina detectado en las hembras adultas de *C. albolineatus*.



**Figura 41.** Cromatograma de los huevos y las ninfas de dispersión de *C. albolineatus* donde se identificó la senkirkina como AP exclusivo.

### Experimento III.

Las muestras de hembras adultas (1.0 g) y la cubierta cerosa (1.0 g), fueron recolectadas durante 2006. Los datos obtenidos se compararon con el perfil de APs de el tallo de *P. praecox* (1.0 g) de donde el insecto fue recolectado. En este experimento se aprecia que los metabolitos presentes en el insecto (hembra adulta) y en la cubierta cerosa, corresponden a los mismos APs identificados en los tallos de la planta hospedera. En este experimento (III), se identificaron tres APs tanto en el tallo de la planta como en

las hembras adultas, el 7-éster-d, el 9-éster-d y la senkikina. De nuevo la concentración de los APs en la cubierta cerosa fue la menor, además de establecerse en ésta la presencia de la senecionina. En la **Tabla 10** se reportan los resultados.

**Tabla 10. Experimento III.** *Composición alcaloidea de las hembras adultas de C. albolineatus y su cubierta cerosa. Las muestras fueron comparadas con los tallos de su planta hospedera P. praecox, recolectada en 2006. Los APs fueron identificados por CG-EM.*

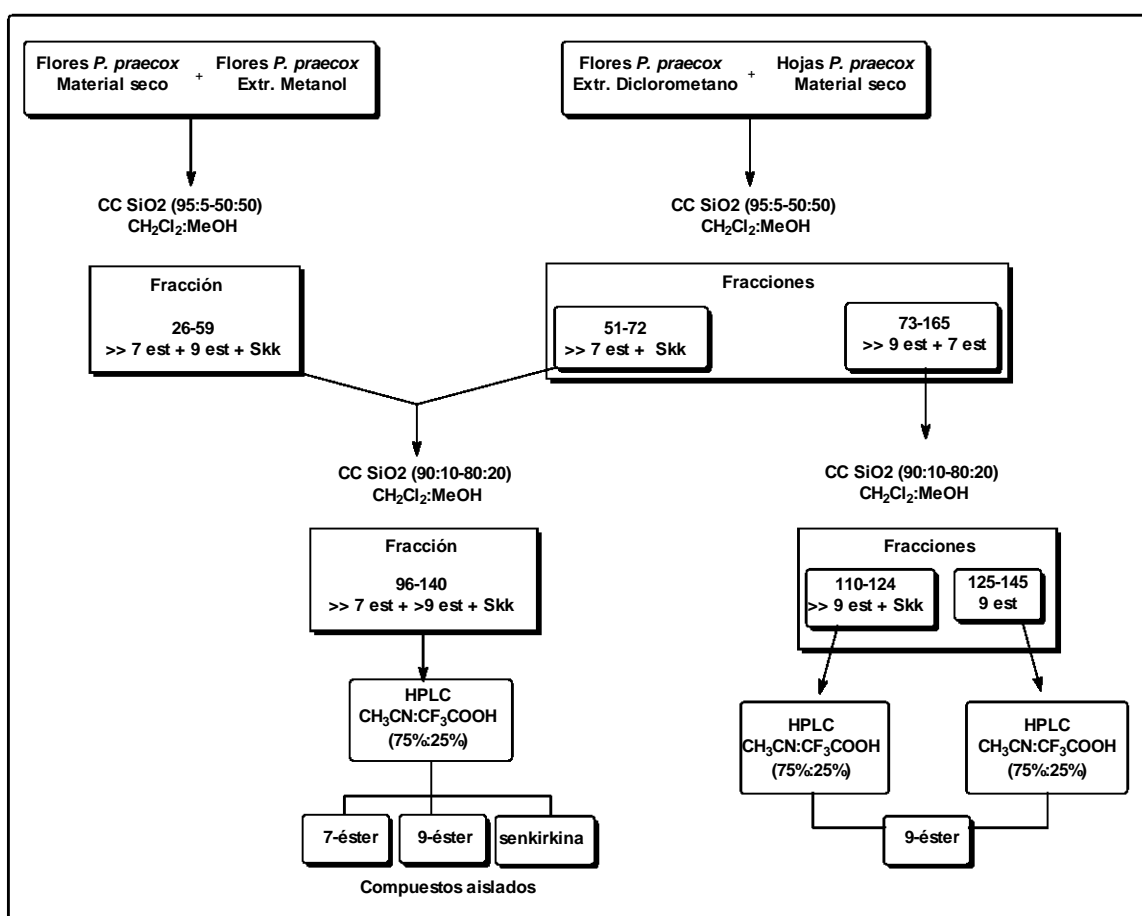
| <i>Alcaloides</i>               | <i>m/z [M<sup>+</sup>]</i> | <b>RI</b> | <b>% de Abundancia Relativa</b> |                      |                        |
|---------------------------------|----------------------------|-----------|---------------------------------|----------------------|------------------------|
|                                 |                            |           | <b>Tallo infestado</b>          | <b>Hembra adulta</b> | <b>Cubierta cerosa</b> |
| <i>7-éster-d</i>                | 239                        | 1810      | 59                              | 47                   | 43                     |
| <i>9-éster-d</i>                | 239                        | 1837      | 35                              | 41                   | 31                     |
| <i>Senecionina</i>              | 335                        | 2272      | --                              | --                   | 11                     |
| <i>Senkirkina</i>               | 365                        | 2458      | 6                               | 12                   | 16                     |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                            |           | 0.450                           | 0.150                | 0.080                  |

#### 8.4 Purificación de los 7 y 9 ésteres-d presentes en P. praecox.

Para el aislamiento de los compuestos mayoritarios de *P. praecox*, el 7 y 9 éster-d se utilizaron extractos de flores y hojas. Los extractos obtenidos fueron procesados acorde al procedimiento ya descrito para la extracción de los APs (reducción con Zn). Como punto de partida, se emplearon 130 gramos de extracto metanólico de hojas y se obtuvieron 222.7 mg de extracto alcaloideo. De las flores secas se obtuvieron tres extractos, el primero con material fresco (Sohxlet), el segundo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el tercero en



MeOH; los pesos iniciales fueron 36.21 g, 24.53 g y 104.36 g. El peso de los extractos alcaloides para cada uno fue de 125.7 mg, 300.4 mg y 637.4 mg, respectivamente. Debido a que un análisis previo de CG mostró que las flores normales tenían una composición cualitativa y cuantitativamente similar a las del extracto en metanol, se procedió a juntar estas dos y se le denominó “extracto final” [1+2]. Asimismo, como los compuestos mayoritarios del extracto alcaloideo de hojas y de flores en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se encontraban en una proporción similar, se decidió juntarlos y denominarlos [3+H]. El proceso completo de purificación se ilustra en la **Figura 42**.



**Figura 42.** Procedimiento de purificación de 7 y 9 éster-d presentes en *P. praecox*.

**Procedimiento de fraccionamiento del extracto [1+2]**

El extracto se fraccionó por columna cromatográfica, empleando el sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ , y aumentando la polaridad progresivamente. Se adicionaron 200 ml de cada sistema de elución y se recogieron 126 fracciones de 10 ml cada una. El seguimiento de la columna se realizó por CG y en algunos casos por TLC empleando como sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$  82:15:3 y revelando con el reactivo de Dragendorff.

**Tabla 11.** Fraccionamiento del extracto [1+2] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ .

| Sistema de elución                   | Proporción | Fracciones | Fracciones reunidas | Observación                          |
|--------------------------------------|------------|------------|---------------------|--------------------------------------|
| $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ | 95:5       | 1-10       | 1-25                | Descartada                           |
|                                      | 90:10      | 11-24      | 26-59               | >> 7-éster-d + 9-éster-d + Senkirina |
|                                      | 85:15      | 25-38      | 60-100              | Descartada                           |
|                                      | 80:20      | 39-51      |                     |                                      |
|                                      | 75:25      | 52-63      |                     |                                      |
|                                      | 70:30      | 64-75      |                     |                                      |
|                                      | 65:35      | 76-88      |                     |                                      |
|                                      | 60:40      | 89-99      |                     |                                      |
|                                      | 55:35      | 100-115    |                     |                                      |
|                                      | 50:50      | 116-126    |                     |                                      |

**Procedimiento de fraccionamiento del extracto [3+H]**

Este extracto se fraccionó por CC, utilizando las mismas condiciones ya descritas para el extracto [1+2]. Se adicionaron 200 ml de cada sistema de elución y se recogieron 164 fracciones de 10 ml cada una.

**Tabla 12.** Fraccionamiento del extracto [3+H] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de  $CH_2Cl_2:MeOH$ .

| Sistema de elución | Proporción | Fracciones | Fracciones reunidas | Observación                 |
|--------------------|------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| $CH_2Cl_2:MeOH$    | 95:5       | 1-9        | 1-50                | Descartada                  |
|                    | 90:10*     | 10-41      | 51-72               | >> 7-éster-d + Senkirkina** |
|                    | 85:15      | 42-57      | 73-165              | >> 9 éster-d + 7-éster-d    |
|                    | 80:20      | 58-72      |                     |                             |
|                    | 75:25      | 73-88      |                     |                             |
|                    | 70:30      | 89-104     |                     |                             |
|                    | 65:35      | 105-118    |                     |                             |
|                    | 60:40      | 119-133    |                     |                             |
|                    | 55:35      | 134-149    |                     |                             |
|                    | 50:50      | 150-164    |                     |                             |

\*Se emplearon 400 ml

\*\* >> Hace referencia a la cantidad de compuesto

**Fraciones reunidas de las CC de [1+2] y [3+H] y purificación del extracto [2659-5172]**

La fracción 26-59 del extracto [1+2] se reunió con la fracción 51-72 de la columna cromatográfica del extracto [3+H], ambas conteniendo como compuesto mayoritario el 7-éster-d. La muestra [2659-5172], con un peso de 215.6 mg se purificó por CC empleando como fase móvil el sistema  $CH_2Cl_2:MeOH$ . Se recogieron 235 fracciones de 2 ml por frasco cada una.

**Tabla 13.** Fraccionamiento del extracto [2659-5172] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de  $CH_2Cl_2: MeOH$ .

| Sistema de elución | Proporción | Volumen (ml) | Fracciones | Fracciones reunidas | Observación                             |
|--------------------|------------|--------------|------------|---------------------|---|
| $CH_2Cl_2:MeOH$    | 90:10      | 200          | 1-104      | 1-95                | Descartada                              |
|                    | 85:15      | 200          | 105-198    | 96-139              | >>7-éster-d + >9-éster-d +Skk           |
|                    | 80:20      | 100          | 199-235    | 140-150<br>151-235  | 7-éster-d + 9-éster-d + >>Skk<br>Mezcla |

### *Purificación de la fracción [73-165] proveniente del extracto [3+H]*

La fracción [73-165] con un peso de 147.8 mg, proveniente de [3+H] y conteniendo como compuesto mayoritario el 9-éster-d fue purificada usando columna cromatográfica y empleando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Se recolectaron 235 fracciones de 2 ml cada una.

**Tabla 14.** *Fraccionamiento del extracto [73-165] a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH.*

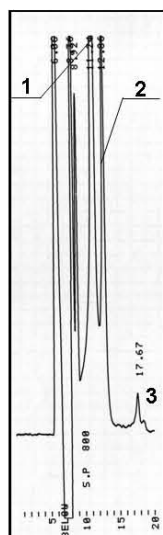
| Sistema de elución                    | Proporción | Volumen (ml) | Fracciones | Fracciones reunidas              | Observación   |
|---------------------------------------|------------|--------------|------------|----------------------------------|---|
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH | 90:10*     | 100          | 1-45       | 1-75                             | Descartada  |
|                                       | 85:15      | 300          | 46-198     | 76-94                            | 7-éster -d+ 9-éster-d                                     |
|                                       | 80:20      | 100          | 199-235    | 95-109                           | 9-éster-d + Senkirkina                                    |
|                                       |            |              |            | <b>110-124</b><br><b>125-145</b> | <b>&gt;&gt;9-éster-d + Senkirkina</b><br><b>9-éster-d</b> |

### *Purificación del 7-éster-d y del 9-éster-d por HPLC*

Para la separación de los compuestos se empleó un sistema de elución isocrático de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) 25% pH-2: ácido trifluoro acético (CF<sub>3</sub>COOH) 75% a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm y un flujo de 9 ml/minuto.

### *Purificación del 7-éster-d por HPLC*

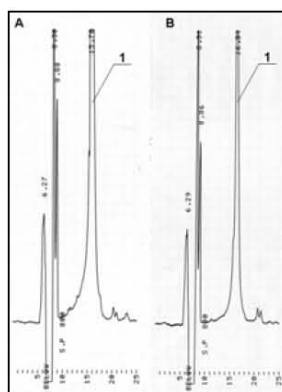
Con las condiciones previamente mencionadas, el 7-éster-d fue purificado de la fracción [96-140], proveniente de la fracción [2659-5172]. En el cromatograma se observa una buena separación donde el 7-éster-d presenta un tiempo de retención (RT) de 11.24, el 9-éster-d de 12.86 y la senkirkina de 17.67 (**Figura 43**). De aquí se obtuvieron 15.5 mg del 7-éster-d, 4.0 mg del 9-éster-d y 1.6 mg de senkirkina.



**Figura 43.** Purificación por HPLC semipreparativo. Cromatograma de la fracción [96-140] que permitió la purificación del 7-éster-d (1), 9-éster-d (2) y la senkirina (3).

#### **Purificación del 9-éster-d por HPLC**

El 9-éster-d fue purificado por HPLC semipreparativo de las fracciones [110-124] y [125-145], provenientes del fraccionamiento de [73-165]. En los cromatogramas se observa un pico con un tiempo de retención (RT) de 15.70 y 16.04, respectivamente, ambos correspondientes al 9-éster-d en cada una de las muestras (**Figura 44**). En total se obtuvieron 18.2 mg del compuesto en mención.



**Figura 44.** Purificación por HPLC semipreparativo. Cromatograma de las fracciones [110-124] (A) y [125-145] (B), que permitió la purificación del 9-éster-d (1).

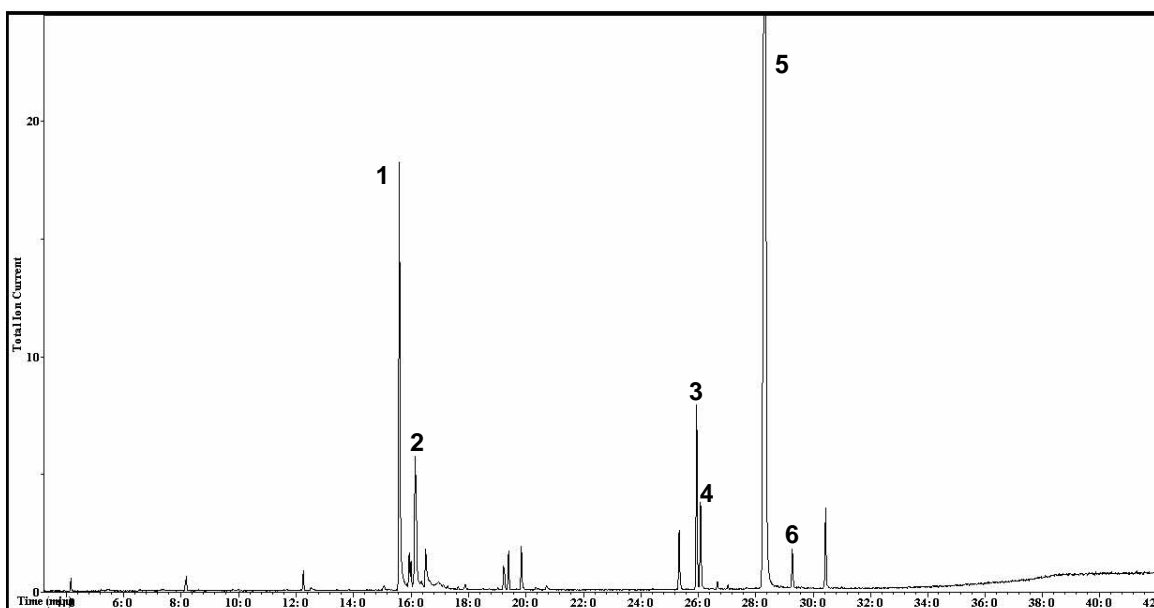
### 8.5 Perfil de APs presentes en las diferentes especies de *Pittocaulon* analizadas.

#### *P. bombycophole*

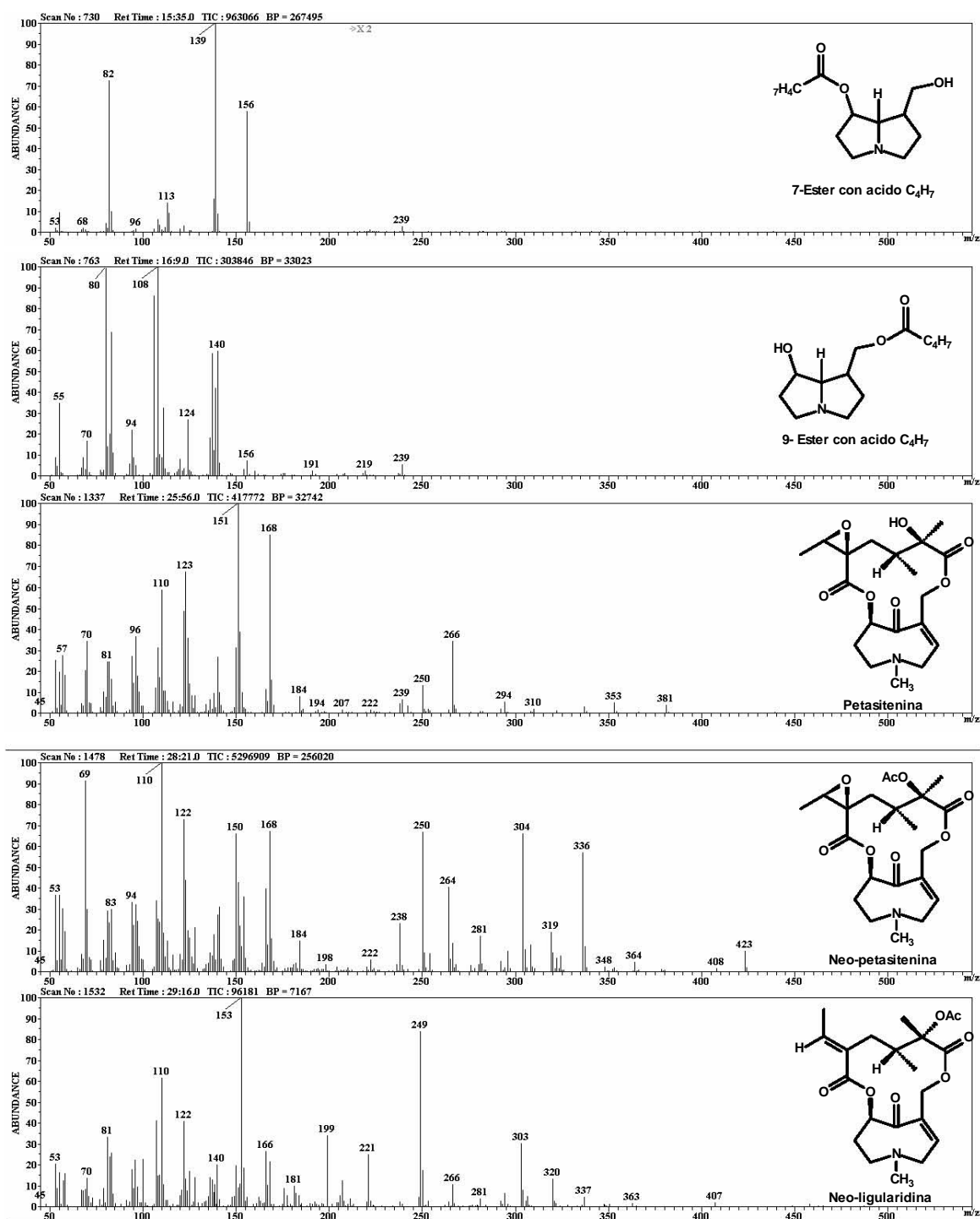
Todos los órganos analizados (tallos (23.2 g), corteza (1 g), raíces (20.7 g) e inflorescencias (9.0 g)) de *P. bombycophole* contenían APs. En total, fueron seis los alcaloides identificados. Las inflorescencias fueron los órganos de *P. bombycophole* que mostraron mayor concentración de APs. En las cuatro muestras se pudo apreciar la presencia de dos APs con características de bases nécicas 1,2-saturadas esterificadas en posición 7 [ $m/z$  (rel. int.): 239 (4, [M]<sup>+</sup>), 156 (60), 139 (100), 138 (17), 114 (3), 113 (20), 108 (7), 82 (60), 68 (2), 55 (9), 53 (2)] y 9 [ $m/z$  (rel. int.): 239 (4, [M]<sup>+</sup>), 239 (10), 221 (23), 156 (8), 139 (23), 122 (16.5), 95 (100), 82 (92), 55 (22)], denominados **7-éster-t** y **9-éster-t**, ambos con un [M<sup>+</sup>] de 239 y un RI de 1780 y 1806, respectivamente. A pesar de que ambos compuestos presentan un [M<sup>+</sup>] de 239, igual al ya descrito para los ésteres detectados en las muestras de *P. praecox*, sus RI (1780 y 1806 para *P. bombycophole* vs 1810 y 1837 para *P. praecox*) son diferentes, lo que indica que estamos ante la presencia de un isómero estructural. Asimismo en todas las muestras se identificó la neopetasitenina. Los otros APs identificados fueron: senkirkina, petasitenina y neoligularidina. Los resultados del análisis de los APs se observan en la **Tabla 15**. También se muestra el cromatograma de las inflorescencias de *P. bombycophole* (**Figura 45**) y el espectro de masas de los APs que no han sido mostrados previamente (**Figura 46**).

**Tabla 15.** Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, corteza, inflorescencias y raíces de *P.bombycophole*. Los APs fueron identificados por CG-EM.

| Alcaloides                      | m/z<br>[M+] | RI   | % Abundancia Relativa |                 |        |         |
|---------------------------------|-------------|------|-----------------------|-----------------|--------|---------|
|                                 |             |      | Tallos                | Inflorescencias | Raíces | Corteza |
| <i>7-éster-t</i>                | 239         | 1780 | 76                    | 16              | 38     | 80      |
| <i>9-éster-t</i>                | 239         | 1806 | 8                     | 6               | 6      | 4       |
| <i>Senkirkina</i>               | 365         | 2458 | tr                    | 6               | 8      | --      |
| <i>Petasitenina</i>             | 381         | 2447 | tr                    | --              | --     | --      |
| <i>Neo-ligularidina</i>         | 407         | 2709 | --                    | 1               | tr     | --      |
| <i>Neo-petasitenina</i>         | 423         | 2632 | 16                    | 70              | 48     | 16      |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |             |      | 2,41                  | 3,04            | 0,52   | 1,60    |



**Figura 45.** Cromatograma de las inflorescencias de *P.bombycophole*. 1) *7-éster-t*. 2) *9-éster-t*. 3) *Petasitenina*. 4) *Senkirkina*. 5) *Neo-petasitenina*. 6) *Neo-ligularidina*.



**Figura 46.** Espectro de masas del 1) 7-éster-*t* (RI:1708 ). 2) 9-éster-*t* (RI:1806). 3) Petasitenina. 4) Neopetasitenina. 5) Neo-ligularidina, detectados en las inflorescencias de *P. bombycophole*.

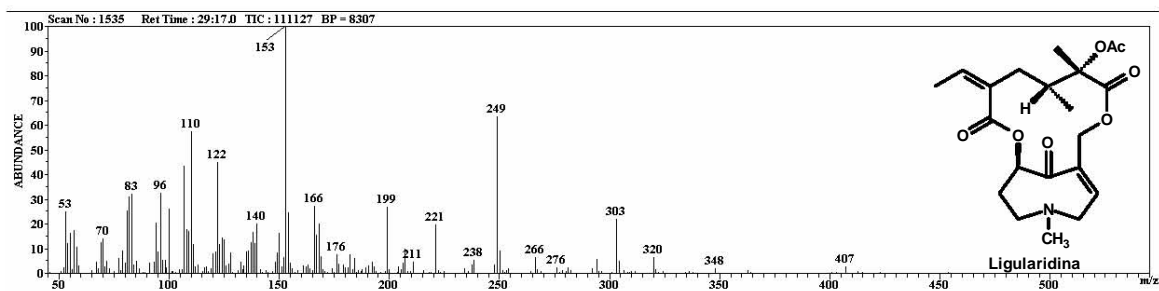


*P. hintonii*

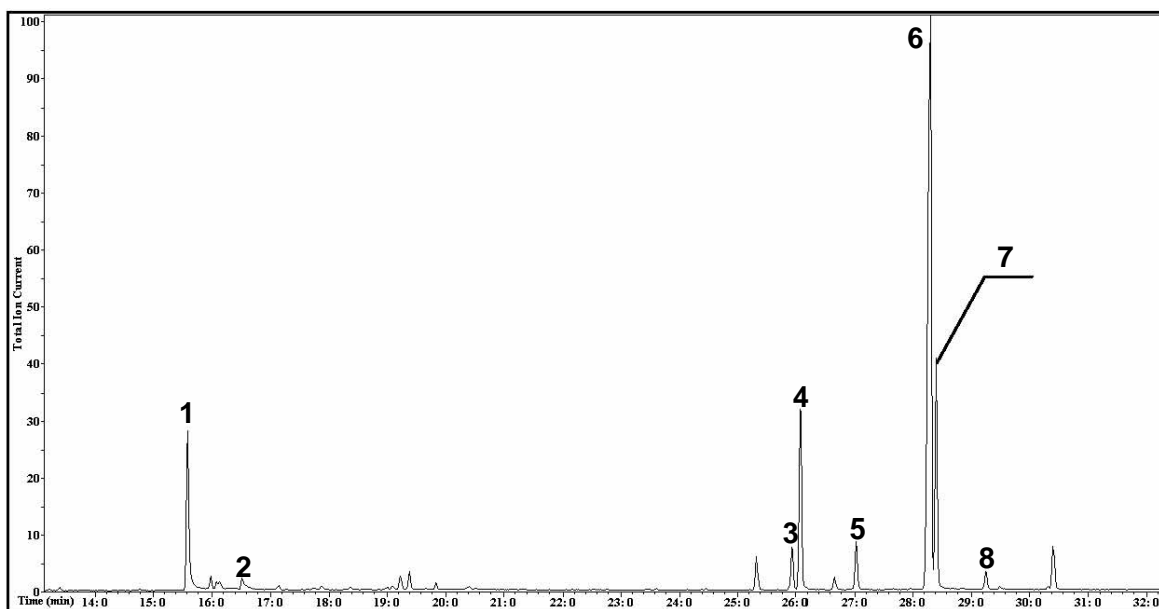
Las muestras de tallos (21,1g), inflorescencias (5,1 g) y raíces (20,2 g) de *P. hintonii* contenían APs. Además de senkirkina, acetyl senkirkina y neo-petasitenina, las tres muestras presentaron los compuestos 7-éster-t y 9-éster-t ya enunciados para *P. bombycophole*. En las raíces se identificó una pequeña cantidad de ligularidina (**Figura 47**). Las raíces y las flores contenían adicionalmente neo-senkirkina y petasitenina (**Figura 48**). Los compuestos mayoritarios presentes en todas las muestras analizadas fueron el 7-éster-t y la neo-petasitenina. Las inflorescencias mostraron la mayor concentración de APs y las raíces la menor (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de *P. hintonii*. Los APs fueron identificados por CG-EM.

| Alcaloides                      | m/z<br>[M+] | RI   | % de Abundancia Relativa |                 |        |
|---------------------------------|-------------|------|--------------------------|-----------------|--------|
|                                 |             |      | Tallos                   | Inflorescencias | Raíces |
| <i>7-éster-t</i>                | 239         | 1780 | 71                       | 39              | 19     |
| <i>9-éster-t</i>                | 239         | 1806 | 3                        | 2               | 1      |
| <i>Senkirkina</i>               | 365         | 2458 | 1                        | 1               | 12     |
| <i>Neo-senkirkina</i>           | 365         | 2534 | --                       | 1               | 3      |
| <i>Petasitenina</i>             | 381         | 2447 | --                       | 3               | 3      |
| <i>Acetyl senkirkina</i>        | 407         | 2641 | 4                        | 2               | 12     |
| <i>Ligularidina</i>             | 407         | 2708 | tr                       | tr              | 1      |
| <i>Neo-petasitenina</i>         | 423         | 2632 | 20                       | 50              | 49     |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |             |      | 1.12                     | 2.89            | 0.99   |



**Figura 47.** Espectro de masas de la ligularidina (RI: 2708) detectada en las raíces de *P. hintonii*.



**Figura 48.** Cromatograma de las raíces de *P. hintonii*. 1) 7-éster-t. 2) 9-éster-t. 3) Petasitenina. 4) Senkirkina. 5) Neo-senkirkina. 6) Neo-petasitenina. 7) Acetilsenkirkina. 8) Ligularidina.

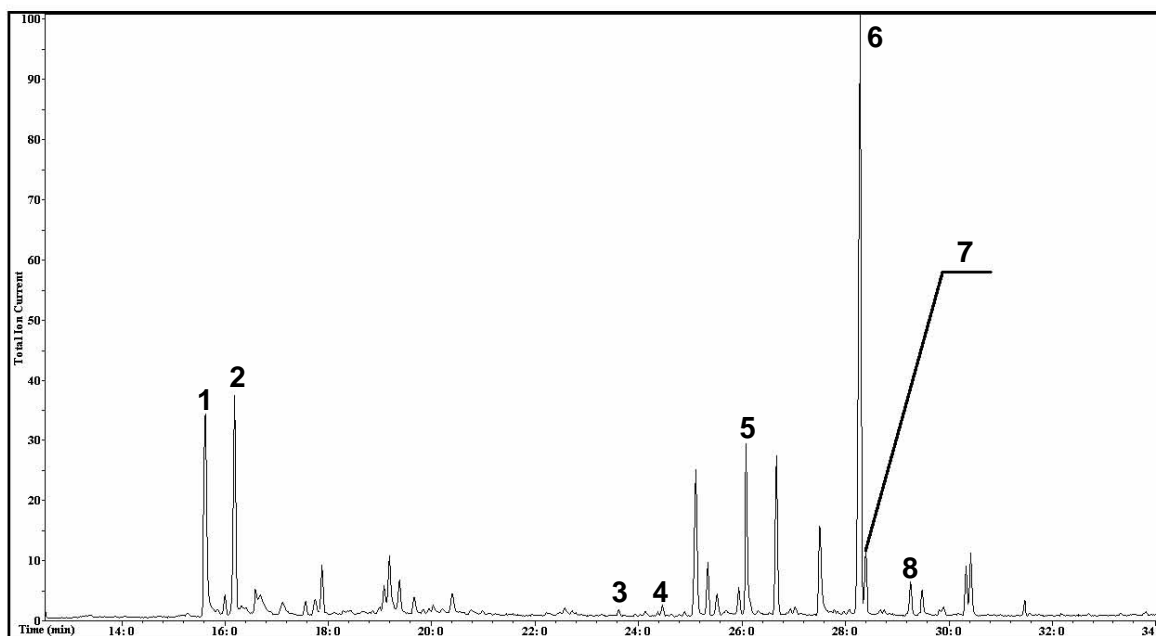
### *P. filare*

Las muestras estudiadas de *P. filare*, tallos (17.8 g) y raíces (18.8 g), presentaban APs. Se identificaron como compuestos mayoritarios la neo-petasitenina y el 7-éster-t, en raíces y tallos, respectivamente. En las raíces se identificaron un mayor número de

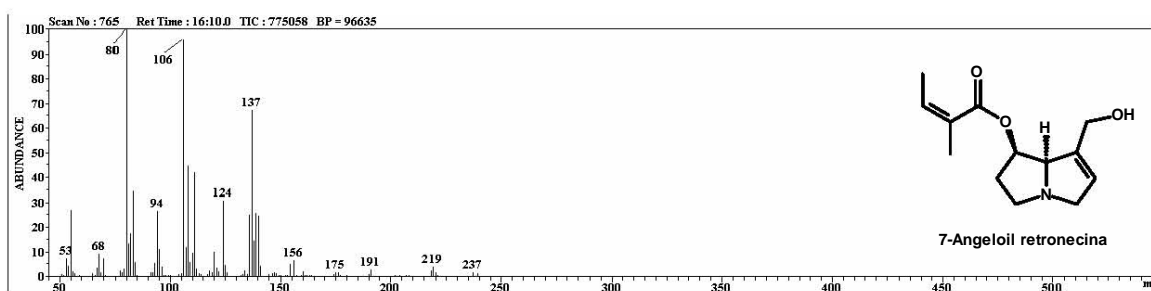
compuestos, entre ellos senecionina, su isómero integerrimina, senkirkina, su derivado acetilado y la neo-ligularidina. En ambas muestras se identificó un compuesto con una abundancia relativa de 43% en tallos y 16% en raíces; con un RI de 1809 y un  $m/z$   $[M^+]$  de 237, correspondiente al 7-éster angeloil retronecina (**Figura 49** y **Tabla 17**). Este AP tiene como necina a la retronecina, la cual presenta una insaturación en posición 1,2. El patrón de fragmentación distingue de manera inequívoca un éster de base néctica saturada de uno con necina insaturada, ya que los ésteres  $O_7$  1,2-insaturados poseen fragmentos característicos a  $m/z$  80, 94, 136, 137, tal y como se aprecia en la **Figura 50**.

**Tabla 17.** Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de *P. filare*. Los APs fueron identificados por CG-EM.

| Alcaloides                      | $m/z$<br>[M+] | RI   | % de Abundancia Relativa |        |
|---------------------------------|---------------|------|--------------------------|--------|
|                                 |               |      | Tallos                   | Raíces |
| <i>7-angeloil retronecina</i>   | 239           | 1809 | 43                       | 16     |
| <i>7-éster-t</i>                | 239           | 1780 | 57                       | 23     |
| <i>Senecionina</i>              | 335           | 2284 | --                       | tr     |
| <i>Integerrimina</i>            | 335           | 2342 | --                       | tr     |
| <i>Senkirkina</i>               | 365           | 2458 | --                       | 10     |
| <i>Acetilsenkirkina</i>         | 407           | 2641 | --                       | tr     |
| <i>Neo-ligularidina</i>         | 407           | 2709 | --                       | tr     |
| <i>Neo-petasitenina</i>         | 423           | 2632 | tr                       | 52     |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |               |      | 0.15                     | 0.25   |



**Figura 49.** Cromatograma de las inflorescencias de *P. filare*. 1) 7-éster-t. 2) 7-angeloil retronecina. 3) Senecionina. 4) Integerrimina. 5) Senkirquina 6) Neo-petasitenina. 7) Acetilsenkirquina. 8) Neo-ligularidina.



**Figura 50.** Espectro de masas de la 7-angeloil retronecina (RI: 1809) detectada en las raíces de *P. filare*.

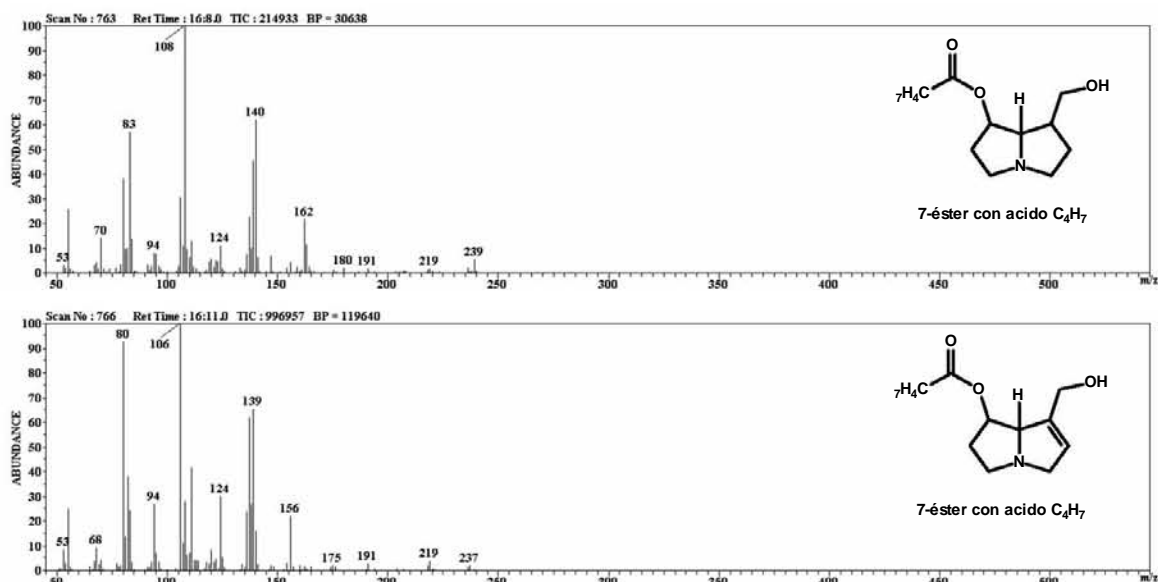
### *P. velatum*

Las muestras analizadas de tallos (20.5 g), raíces (19.7 g) e inflorescencias (3.91 g) de *P. velatum*, mostraron la presencia de APs. En las raíces, la senecionina fue el compuesto mayoritario, en las inflorescencias fue la mezcla de los  $O_7$ -ésteres (**Figura 51**). Las raíces fueron el tejido analizado donde se identificaron un mayor número de APs, entre ellos la senecionina y su isómero la integerrimina, además de trazas de senkirquina y neo-petasitenina (**Figura 52**). Asimismo se identificaron dos  $O_7$ -ésteres

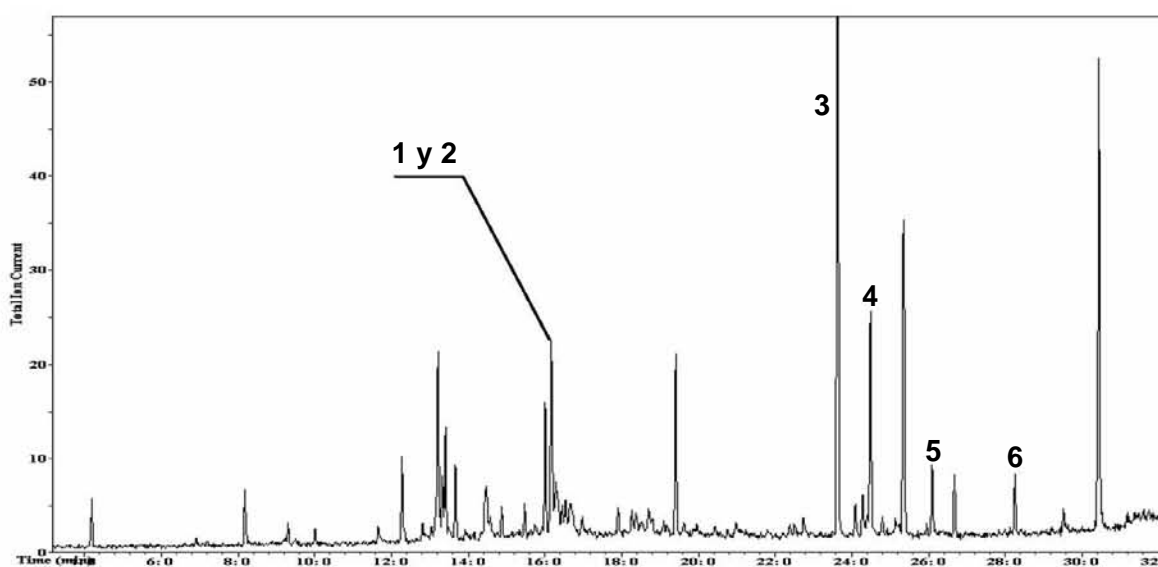
presentes como una mezcla y que no pudieron ser separados, uno de ellos con un  $M^+$  de 237 y el otro con un  $M^+$  de 239, ambos con un RI de 1810 y con patrones de fragmentación correspondientes a una base néica 1,2-insaturada y 1,2-saturada, respectivamente. La mayor concentración de APs se dio en las inflorescencias con un valor de 0.32 mg/g de peso seco. En los tallos solo se detectaron trazas del monoéster  $O_7$  con un  $[M^+]$  de 237 (**Tabla 18**).

**Tabla 18.** Alcaloides pirrolizidínicos identificados en los tallos, inflorescencias y raíces de *P. velatum*. Los APs fueron identificados por CG-EM.<sup>a</sup> La suma de ambos compuestos produjo un % de abundancia relativa de 25.<sup>b</sup> Valores obtenidos después de la hidrólisis y cuantificación de las respectivas necinas.

| Alcaloides                      | m/z<br>[M <sup>+</sup> ] | RI   | % Abundancia relativa |                 |                 |
|---------------------------------|--------------------------|------|-----------------------|-----------------|-----------------|
|                                 |                          |      | Tallos                | Raíces          | Inflorescencias |
| <i>Mezcla de 7-ésteres</i>      | 237                      | 1810 | tr                    | 25 <sup>a</sup> | 31 <sup>b</sup> |
| <i>Mezcla de 7-ésteres</i>      | 239                      | 1810 | --                    |                 | 65 <sup>b</sup> |
| <i>Senecionina</i>              | 335                      | 2284 | --                    | 59              | --              |
| <i>Integerrimina</i>            | 335                      | 2342 | --                    | 16              | --              |
| <i>Senkirkina</i>               | 365                      | 2458 | --                    | tr              | --              |
| <i>Neo-petasitenina</i>         | 423                      | 2632 | --                    | tr              | --              |
| <i>mg de APs/g de peso seco</i> |                          |      | n.d.                  | 0.16            | 0.32            |



**Figura 51.** Espectro de masas de cada uno de los dos  $O_7$ -ésteres (RI: 1810) presentes como una mezcla en las raíces e inflorescencias de *P. velatum*.



**Figura 52.** Cromatograma de la raíz de *P. velatum*. 1) y 2) Mezcla de  $O_7$ -ésteres. 3) Senecionina. 4) Integerrimina. 5) Senkirkina. 6) Neopetasitenina.

### 8.6 Purificación del 7-éster-t

Para el aislamiento del compuesto mayoritario presente en *P. hintonii* y *P. bombycophole*, el 7-éster-t se utilizaron los extractos alcaloideos de tallos (63 mg), flores (198 mg) y raíces (156 mg). Los extractos obtenidos fueron procesados de acuerdo al procedimiento ya descrito para la extracción de los APs (reducción con Zn). El extracto

alcaloideo total empleado en la purificación pesó 417 mg. A éste se le realizó un fraccionamiento por medio de una columna cromatográfica y se recolectaron 215 fracciones de 10 ml cada una, que se observan en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Fraccionamiento del extracto alcaloideo de *P. bombycophole* a través de CC empleando como sistema de elución una mezcla de  $CH_2Cl_2$ : MeOH.

| Sistema de elución | Proporción | Fracciones | Fracciones reunidas | Observación                                  |
|--------------------|------------|------------|---------------------|--|
| $CH_2Cl_2$ :MeOH   | 95:5       | 1-8        | 1-34                | Descartada                                   |
|                    | 90:10      | 9-25       | 36-75               | 7-éster-t + Neo-petasitenina                 |
|                    | 85:15      | 26-42      | 76-95               | 7-éster-t + Neo-petasitenina                 |
|                    | 80:20      | 43-88      | 96-125              | <b>7-éster-t + 9-éster-t</b>                 |
|                    | 75:25      | 89-113     | 126-150             | <b>7-éster-t (97,6%) + 9-éster-t (2,4%)</b>  |
|                    | 70:30      | 114-129    | 151-200             | <b>7-éster-t (mayoritario 79%, isómeros)</b> |
|                    | 65:35      | 130-144    | 200-215             | Descartada                                   |
|                    | 60:40      | 145-158    |                     |  |
|                    | 55:35      | 159-172    |                     |  |
|                    | 50:50      | 173-199    |                     |  |
| 45:55              | 200-215    |            |                     |  |

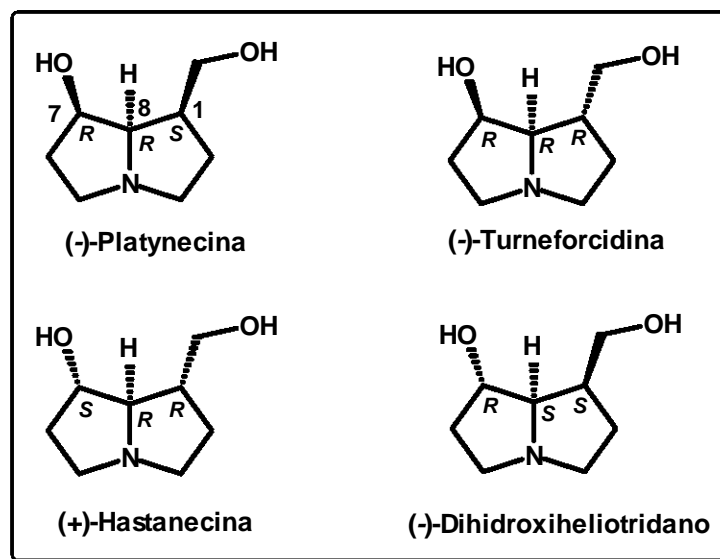
Después de fraccionar la columna y reunir las fracciones se obtuvieron 34 mg del 7-éster-t en la fracción 126-150. En esta fracción, el 7-éster-t fue el compuesto mayoritario (97.6%), acompañado de un 2.4% posiblemente de un isómero. Esta muestra fue la que se empleó posteriormente para el análisis de RMN. Las fracciones comprendidas entre 151 y 200 fueron unidas, aquí el compuesto mayoritario también fue el 7-éster-t (79%), pero acompañado de algunas impurezas (21%). La muestra (151-200) fue utilizada para la identificación de la base néctica por CG-EM. Para establecer cuál era la necina que hacía parte del éster, se procedió a hidrolizar la muestra (25.7 mg) con 34 mg de hidróxido de bario octahidratado ( $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ ) en 1 ml de agua a 40°C. El procedimiento completo se describe en la siguiente sección para la hidrólisis de la

heliotrina. Posteriormente, la muestra hidrolizada fue acetilada (piridina/anhídrido acético; 1:1) y analizada por CG-EM. Al hacer la comparación con las sustancias de referencia presentes en la base de datos se estableció que la necina que hace parte del 7-éster-t es la turneforcidina.

### **8.7 Base néctica de los APs presentes en las diferentes especies de *Pittocaulon* y en *Ceroplastes albolineatus*.**

Ya se mencionó que los APs constan de una base néctica y los ácidos nécticos. En el caso de los APs esterificados en posición 7 y 9 (d y t), encontrados en todas las especies de *Pittocaulon* y *C. albolineatus*, se identificó una base néctica saturada. Pero en *P. praecox* y en el insecto, los ésteres tienen índices de retención diferentes (1810 y 1837) al compararse con los índices de retención de los compuestos presentes en las otras tres especies (1710 y 1806), lo que hace suponer que estamos ante dos pares de compuestos isoméricos diferentes entre sí. El problema surge al momento de determinar cual es la necina presente en estos ésteres, debido a que se han reportado cuatro bases nécticas saturadas, todas ellas isoméricas y con igual peso molecular ( $[M^+]$  239). Dos de ellas provienen de isoretronecanol ((-)-platynecina y (-)-dihidroxiheliotridano) y las dos restantes de traquelantamidina ((-)-turneforcidina y (-)-hastanecina) (**Figura 53**). Para poder identificar cuál es la base néctica de los ésteres se obtuvieron los compuestos de referencia como se indica a continuación y se estableció un método por CG-EM que permitió separar e identificar cada una de las bases nécticas saturadas mediante su RI, su ion molecular y su patrón de fragmentación característicos.



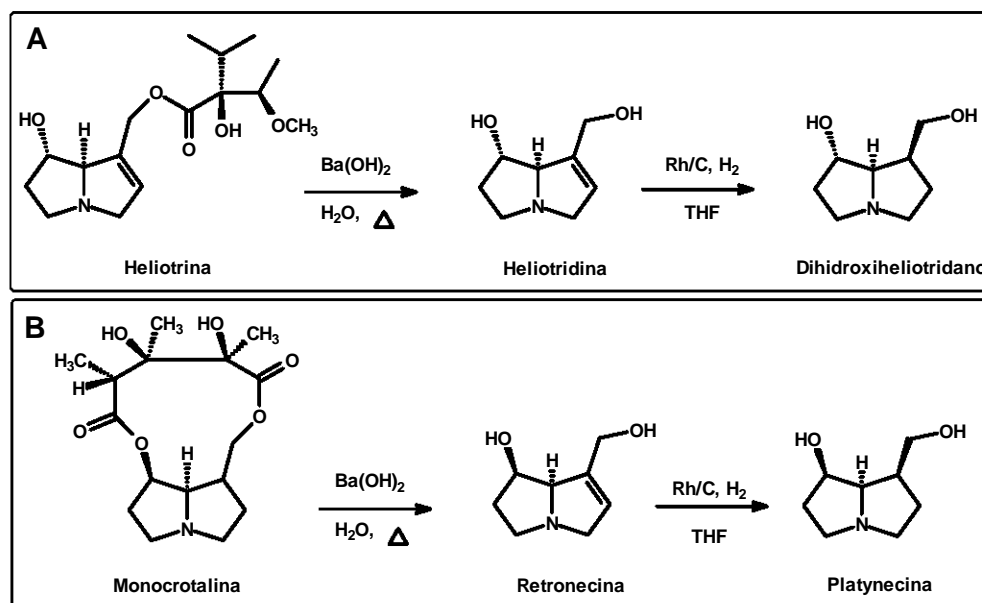


**Figura 53.** Bases nécicas saturadas

Para la obtención de la necina saturada (-)-dihidroxiheliotridano, se utilizó como sustancia de partida un AP que tuviera en su estructura la base nécica en mención. Al cumplir la heliotrina con este requisito, se sometió a hidrólisis en una solución saturada de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  por 2h para producir la correspondiente base 1,2-saturada, la heliotridina. La solución saturada fue llevada a temperatura ambiente y se le adicionó hielo seco, el exceso de hidróxido de bario y las sales formadas fueron descartadas por centrifugación. Luego la muestra fue llevada a sequedad y extraída con ácido trifluoroacético (TFA):éter. Para eliminar el ácido se pasó a través de una columna básica de óxido de aluminio  $\text{pH}=9.5$  y se lavó con MeOH. La muestra fue recristalizada en acetona (**Figura 54A**). La pureza fue determinada mediante el análisis de CG y CG-EM, después de obtener los derivados con MSTFA. Los cromatogramas mostraron dos picos con un espectro de masas idéntico. El compuesto mayoritario (92%, basado en el área del pico) fue el derivado de platynecina, el otro compuesto (8%) fue su diastereoisómero la (-)-turneforcidina.

El producto (retronecina) fue sometido a una reacción de hidrogenación estereoselectiva, empleando, con pequeñas modificaciones, la metodología descrita por Donohoe (*Donohoe et al., 2002*) y Denmark (*Denmark et al., 1997*). Una solución de 23 mg de heliotridina fue disuelta en 4 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro con 1 mg de rodio en carbón activado (5%) (Fluka). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en la oscuridad y con agitación constante bajo presión atmosférica de H<sub>2</sub> durante 16 h. El catalizador fue removido por centrifugación (1 min) y el solvente evaporado bajo una corriente de N<sub>2</sub>. El residuo fue disuelto en 2 ml de MeOH, filtrado y el solvente removido. Por último, el residuo aceitoso (20 mg) fue cristalizado en acetona a -18 °C. La pureza fue determinada de la misma forma que la platynecina. El compuesto mayoritario (93%) fue el derivado (-)-dihidroxiheliotridano, el otro compuesto (7%) fue la (+)-hastanecina.

La preparación de la (-)-platynecina se llevó a cabo usando la misma metodología descrita para producir el (-)-dihidroxiheliotridano. En este caso, se empleó como producto de partida la monocrotalina, que al ser hidrolizada produjo la retronecina. Esta última fue sometida a una reacción de hidrogenación estereoselectiva que permitió obtener la respectiva base saturada (**Figura 54B**).



**Figura 54.** Obtención de las bases necinas saturadas (A) dihidroxiheliotridano y (B) platynecina a partir de heliotrina y monocrotalina respectivamente.

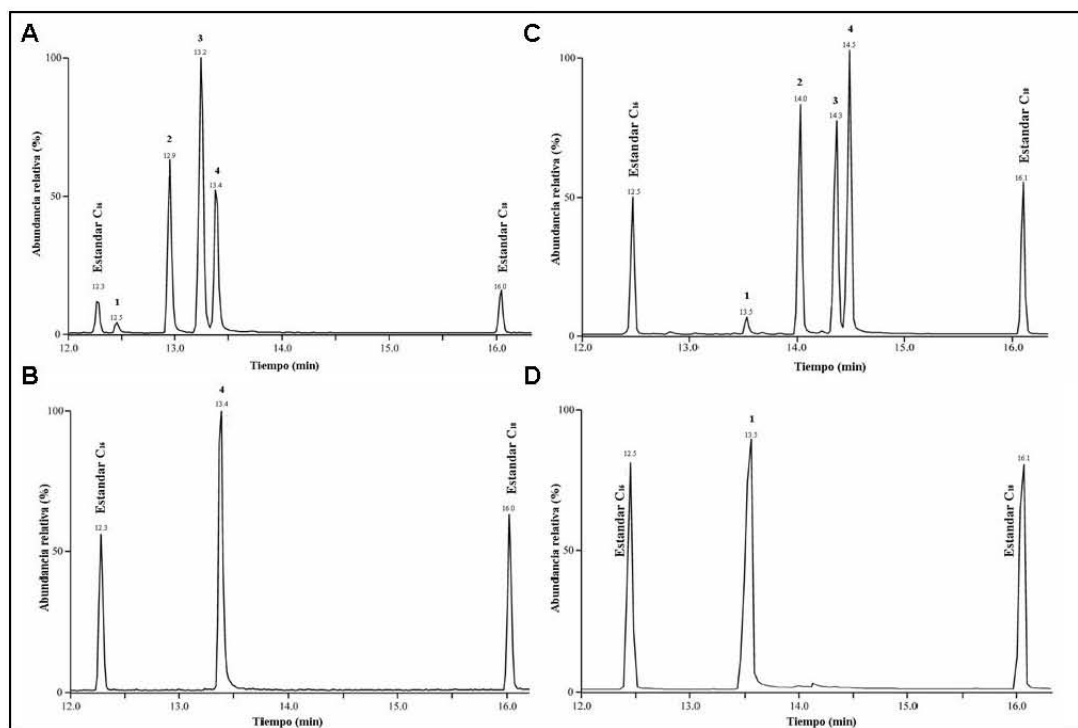
La (-)-turneforcidina fue obtenida a través de la hidrólisis de la 7-éster-turneforcidina, aislada e identificada previamente de *P. bombycophole* y *P. hintonii* (Sección 7.6). La hidrólisis fue realizada siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente para el dihidroxiheliotridano. Por último, la (+)-hastanecina fue una donación del Dr. S. E. Denmark de la Universidad de Illinois.

Para el análisis por CG-EM, se prepararon los derivados acetilados de las necinas saturadas, usando una mezcla de piridina/anhídrido acético (1:1) a 75 °C durante 2 h y luego directamente analizadas. Así se logró un sistema que permitió diferenciar claramente, sin traslapamiento, ni ningún tipo de ambigüedad, las cuatro necinas. Las diferentes bases nélicas tienen los RI que a continuación se describen: 7,9-Di-O-acetil-turneforcidina RI(ZB1) 1609, RI(DB5) 1659; CG-IE-EM,  $m/z$  (rel. int.): 241. 7,9-Di-O-acetil-platynecina RI(ZB1) 1636, RI(DB5) 1687; 241 (2, [M]<sup>+</sup>). 7,9-Di-O-acetil-hastanecina RI(ZB1) 1652, RI(DB5) 1704; 241 (2, [M]<sup>+</sup>). 7,9-Di-O-acetil-

dihidroxiheliotridano RI(ZB1) 1659, RI(DB5) 1712; CG-IE-EM,  $m/z$  (rel. int.): 241 (1,[M]<sup>+</sup>).

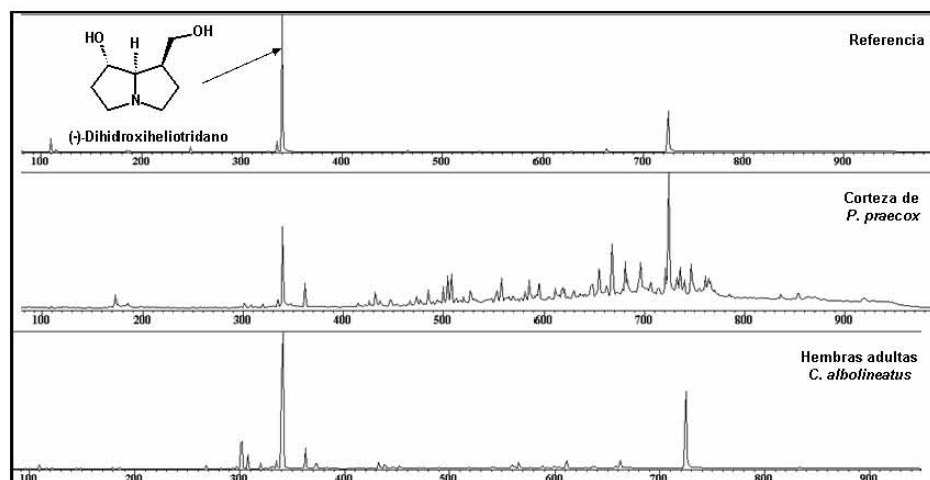
Para la identificación de las bases nélicas de los ésteres de *P. praecox*, *C. albolineatus* y las cuatro especies de *Pittocaulon*, se utilizaron las muestras puras del 7-éster-d y 9-éster-d obtenidos de *P. praecox* y el 7-éster-t de *P. bombycophole*-*P. hintonii*. Además, se identificó en el extracto hidrolizado de corteza de *P. praecox* y de las hembras adultas del insecto.

Las muestras puras esterificadas y los extractos de corteza y hembras adultas, fueron sometidas a hidrólisis con Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, para liberar la base nélica de los ácidos nélicos. En las muestras puras antes de la hidrólisis, el 7-éster-d y el 9-éster-d de *P. praecox* se observan en el CG como una señal a 1810 y 1837, respectivamente y después de la hidrólisis se aprecia una sola señal a 1462. Para el 7-éster-t de *P. bombycophole* + *P. hintonii* las señales salen a 1780 y 1420, antes y después de la hidrólisis respectivamente. Posteriormente, las muestras hidrolizadas fueron acetiladas y directamente analizadas por CG-EM en el equipo. Este análisis permitió comparar las muestras con los compuestos de referencia y determinar que la base nélica saturada presente en el 7-éster-d y en el 9-éster-d de *P. praecox* corresponde al (-)-dihidroxiheliotridano, siendo esta la primera vez que se reporta a esta nélica como producto natural. Para el 7-éster-t purificado de *P. bombycophole*+*P. hintonii* es la (-)-turneforcidina, como se ilustra en la **Figura 55**.



**Figura 55.** Separación por CG de los derivados di-O-acetil de las cuatro necinas estereoisoméricas 1,2-saturadas. **A y C:** Separación de las mezclas de estándares; **B:** necina obtenida por hidrólisis del 7-angeloildihydroxiheliotridano de *P. praecox*; **D:** necina obtenida por hidrólisis de la 7-angeloilturneforcidina de *P. bombycophole*. **A y B:** separación en columna ZB2; **C y D:** separación en columna ZB5. **1)** turneforcidina. **2)** platynecina. **3)** hastanecina. **4)** dihidroxiheliotridano.

En las muestras de extracto alcaloide de corteza de *P. praecox* y las hembras adultas del insecto, los ésteres 7-d y 9-d aparecen con un RI de 1810 y 1837, respectivamente. Después de la hidrólisis se observó solo un pico con un RI de 1462 menor, correspondiente a la base néica libre. En la **Figura 56** se ilustra el análisis por CG-EM de las muestras acetiladas y la comparación con la base de referencia. La estructura que se identificó como la base néica para los alcaloides de *P. praecox* y del insecto fue dihidroxiheliotridano con un RI de 1712 y un ion molecular de 241.

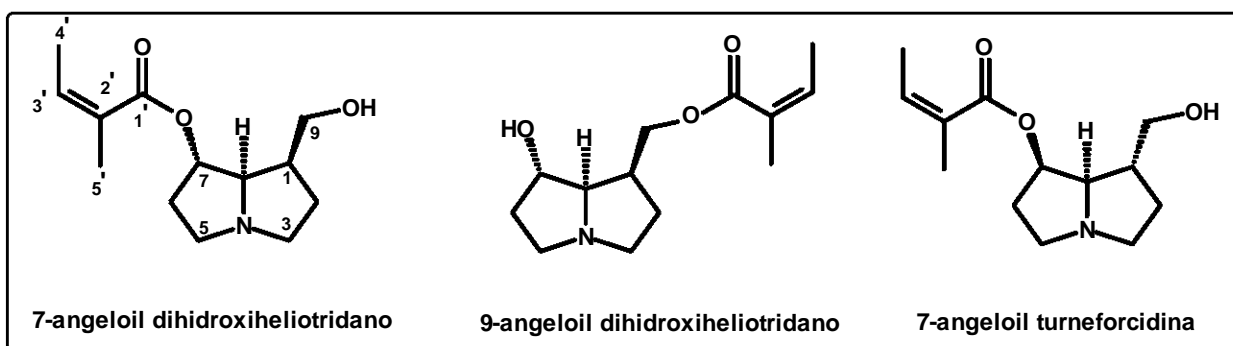


**Figura 56.** Identificación de la necina dihidroxiheliotridano presente en los extractos hidrolizados de corteza de *P. praecox* y hembras adultas de *C. albolineatus*.

### 8.8 Bases nélicas de la mezcla de *O*<sub>7</sub>-esteres presentes en las raíces e inflorescencias de *P. velatum*.

Al no ser posible la separación por CG de la mezcla de *O*<sub>7</sub>-esteres presentes en *P. velatum*, ésta fue sometida a una hidrólisis siguiendo la metodología descrita previamente, para así saber cual eran las bases nélicas que componen los APs. Al hacer el análisis por CG-EM de los derivados acetilados de cada una de las necinas no esterificadas se identificaron dos bases nélicas: la 1,2-saturada dihidroxiheliotridano ya identificada en *P. praecox* y la heliotridina 1,2-insaturada [7,9-Di-O-acetil-heliotridina RI(ZB1) 1652, RI(DB5) 1705; GC-IE-EM, *m/z* (rel. int.): 239 (9,[M]<sup>+</sup>), 197 (24), 180 (25), 179 (23), 168 (3), 153 (11), 136 (35), 120 (21), 119 (49), 118 (6), 106 (13), 101 (13), 94 (38), 93 (100), 80 (21), 67 (6), 53 (10)]. Después de la identificación se realizó la cuantificación de las necinas y se obtuvo un 65 % de abundancia relativa para el dihidroxiheliotridano y un 31% para la heliotridina.

**8.9 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los ésteres 7-d, 9-d aislados de *Pittocaulon praecox* y 7-t aislado de *Pittocaulon bombycophole*+*Pittocaulon hintonii*.**



**Figura 57.** Estructura de los monoésteres aislados e identificados en el género *Pittocaulon*.

Para confirmar los datos obtenidos por el análisis de CG-EM acerca de las necinas que formaban parte de los APs y establecer el ácido néxico de los monoésteres, se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Vease **Sección de espectros p. 173**) de los APs aislados de *P. praecox* 7 y 9 éster de dihidroxiheliotridano, y el 7 éster de turneforcidina aislado de *P. bombycophole*-*P. hintonii* (**Figura 57**). En las **Tablas 20 y 21** se registran los desplazamientos químicos de cada uno de los compuestos puros. Los espectros de cada sustancia fueron analizados en MeOH deuterado ( $\text{CD}_3\text{COD}$ ) más dos gotas de amoníaco deuterado ( $\text{ND}_3$ ) en un equipo de RMN de 600 MHz.

**Tabla 20.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  RMN para cada uno de los ésteres isoméricos y sus constantes de acoplamiento.

| H-                                    | 7-O-angeloil-<br>turneforcidina | 7-O-angeloil-<br>dihidroxiheliotridano | 9-O-angeloil-<br>dihidroxiheliotridano |
|---------------------------------------|---------------------------------|--|--|
| 1 $\alpha$                            | -                               | 2.49 (m)                               | 2.59 (m)                               |
| 1 $\beta$                             | 2.32 (m)                        | -                                      | -                                      |
| 2 $\alpha$                            | 1.75 (m)                        | 1.88 (m)                               | 1.86 (m)                               |
| 2 $\beta$                             | ca 2.12 (m)                     | 1.64 (m)                               | 1.62 (m)                               |
| 3 $\alpha$                            | 3.12 (m)                        | 2.98 (m)                               | 2.90 (m)                               |
| 3 $\beta$                             | 2.61 (m)                        | 2.72 (m)                               | 2.68 (m)                               |
| 5 $\alpha$                            | 3.15 (m)                        | 3.17 (m)                               | 3.19 (m)                               |
| 5 $\beta$                             | 2.70 (m)                        | 2.83 (m)                               | 2.61 (m)                               |
| 6 $\alpha$                            | ca 2.18 (m)                     | 1.84 (m)                               | 1.75 (m)                               |
| 6 $\beta$                             | ca 2.12 (m)                     | 2.20 (m)                               | 2.07 (m)                               |
| 7 $\alpha$                            | 5.28 (m)                        | -                                      | -                                      |
| 7 $\beta$                             | -                               | 5.26 (dt)                              | 4.11 (c)                               |
| 8 $\alpha$                            | 3.41 (dd)                       | 3.50 (c)                               | 3.25 (t)                               |
| 9a                                    | 3.54 (dd)                       | 3.78 (dd)                              | 4.45 (dd)                              |
| 9b                                    | 3.52 (dd)                       | 3.63 (dd)                              | 4.22 (dd)                              |
| 3'                                    | 6.18 (cc)                       | 6.15 (cc)                              | 6.14 (cc)                              |
| 4'                                    | 1.99 (dc)                       | 1.96 (dc)                              | 1.97 (dc)                              |
| 5'                                    | 1.91 (q)                        | 1.87 (q)                               | 1.89 (q)                               |
| <i>J (constantes de acoplamiento)</i> |                                 |  |  |
| 1,2 $\alpha$                          | 9.1                             | 6.8                                    | 6.5                                    |
| 1,2 $\beta$                           | 6.6                             | 9.4                                    | 10.7                                   |
| 1,8                                   | 6.9                             | 8.2                                    | 7.8                                    |
| 1,9a                                  | 6.8                             | 6.3                                    | 6.3                                    |
| 1,9b                                  | 6.8                             | 7.3                                    | 8.1                                    |
| 2 $\alpha$ ,2 $\beta$                 | -12.5                           | -12.5                                  | -12.4                                  |
| 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$                | 6.7                             | 6.4                                    | 5.9                                    |
| 2 $\alpha$ ,3 $\beta$                 | 10.2                            | 4.4                                    | 2.9                                    |
| 2 $\beta$ ,3 $\alpha$                 | 3.1                             | 8.6                                    | 10.0                                   |
| 2 $\beta$ ,3 $\beta$                  | 6.0                             | 7.5                                    | 7.5                                    |
| 3 $\alpha$ ,3 $\beta$                 | -9.7                            | -11.1                                  | -11.4                                  |
| 5 $\alpha$ ,5 $\beta$                 | -10.1                           | -11.3                                  | -10.5                                  |
| 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$                | 7.6                             | 7.3                                    | 7.1                                    |
| 5 $\alpha$ ,6 $\beta$                 | 2.8                             | 6.6                                    | 3.9                                    |
| 5 $\beta$ ,6 $\alpha$                 | 10.8                            | 5.9                                    | 9.6                                    |
| 5 $\beta$ ,6 $\beta$                  | 6.3                             | 7.0                                    | 6.2                                    |
| 6 $\alpha$ ,6 $\beta$                 | n.d                             | -13.8                                  | -12.3                                  |
| 6 $\alpha$ ,7                         | 4.5*                            | 4.5                                    | 7.8                                    |
| 6 $\beta$ ,7                          | 1.9*                            | 6.5                                    | 6.4                                    |
| 7,8                                   | 4.6                             | 4.4                                    | 6.9                                    |
| 9a,9b                                 | -10.7                           | -10.9                                  | -11.2                                  |
| 3',4'                                 | 7.3                             | 7.3                                    | 7.3                                    |
| 3',5'                                 | 1.5                             | 1.5                                    | 1.5                                    |
| 4',5'                                 | 1.6                             | 1.6                                    | 1.6                                    |

\*Estos valores pueden ser intercambiables. Entre paréntesis están las multiplicidades: m: multiplete, q: quintuplete, c: cuarteto, t: triplete, d: doblete.



**Tabla 21.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  RMN para cada uno de los ésteres isoméricos.

| C- | 7-O-angeloil-<br>turneforcidina | 7-O-angeloil-<br>dihidroxiheliotridano | 9-O-angeloil-<br>dihidroxiheliotridano |
|----|---------------------------------|--|--|
| 1  | 41.7                            | 44.9                                   | 41.9                                   |
| 2  | 32.4                            | 29.6                                   | 28.9                                   |
| 3  | 56.1                            | 54.8                                   | 54.9                                   |
| 5  | 53.0                            | 54.0                                   | 54.0                                   |
| 6  | 35.8                            | 33.5                                   | 36.1                                   |
| 7  | 75.5                            | 75.7                                   | 72.3                                   |
| 8  | 71.9                            | 72.7                                   | 72.8                                   |
| 9  | 65.2                            | 62.8                                   | 65.1                                   |
| 1' | 168.5                           | 169.3                                  | 169.6                                  |
| 2' | 128.8                           | 128.9                                  | 129.0                                  |
| 3' | 140.2                           | 139.5                                  | 139.3                                  |
| 4' | 16.1                            | 16.1                                   | 16.1                                   |
| 5' | 20.9                            | 20.7                                   | 20.8                                   |

- **Identificación de los monoésteres de necinas 1,2-saturadas por RMN**

Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN fueron analizados para obtener información de los cambios químicos de  $^1\text{H}$  y de las constantes de acoplamiento H, H. Esto fue exitoso para los protones de todos los compuestos excepto para los protones H-2 $\beta$ , H-6 $\alpha$  y H-6 $\beta$  del 7-éster-t el cual presentó un fuerte traslapamiento de las señales de protón en la región que comprende de  $\delta = 2.12\text{--}2.18$  ppm; como consecuencia, la  $J(6\alpha,6\beta)$  no está definida y los valores de  $J(6\alpha,7)$  y  $J(6\beta,7)$  son intercambiables para este compuesto (**Espectro 16**). Para asegurar en que posición (O-7 y O-9) se encontraban esterificadas las necinas, se emplearon los espectros de H,C-HMBC donde se pudo apreciar la interacción de la señal de  $^{13}\text{C}$  correspondiente al carbonilo con el cambio químico de los protones H-7 y H-9, respectivamente (**Espectros 8, 15 y 22**). Para todas las necinas estudiadas, se encontró que los desplazamientos químicos tanto para el  $^1\text{H}$  como para el  $^{13}\text{C}$ , en particular

aquellos que se encuentran en posiciones  $\alpha$  con respecto al nitrógeno (posiciones 3, 5 y 8), no fueron reproducibles después de almacenar las soluciones en  $\text{CDCl}_3$  o en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) como solvente. Las alteraciones en los desplazamientos químicos variaban desde 2 ppm, en el caso de  $^{13}\text{C}$  hasta valores por encima de 0.7 ppm en el caso de  $^1\text{H}$ , por lo que las comparaciones entre espectros se hacían insignificantes. Tal comportamiento es atribuido a una fácil protonación del átomo de nitrógeno de la necina. Para superar este obstáculo los espectros de RMN se obtuvieron al disolver las sustancias en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y adicionándole al solvente unas gotas de amoniaco deuterado ( $\text{ND}_3$  25 % en agua deuterada [ $\text{D}_2\text{O}$ ], Aldrich) para garantizar que las necinas presentes en solución estén como bases libres. Así, todos los espectros fueron registrados bajo tales condiciones. Por lo tanto se pudieron adquirir los datos de  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, de los tres monoésteres.

Los dos monoésteres, 7-dihidroxiheliotridano (7-d) y 9-dihidroxiheliotridano (9-d), aislados de *P. praecox* y la 7-turneforcidina (7-t) aislada de *P.bombycophole+P.hintonii* fueron identificados como angelatos, lo que se evidenció por sus desplazamientos de RMN en  $^1\text{H}$  (**Tabla 20**) y  $^{13}\text{C}$  NMR (**Tabla 21**). En el espectro de  $^1\text{H}$ , se aprecia un singulete que integra para tres protones a 1.87 (7-d) (**Espectro 1**), 1.89 (9-d) (**Espectro 9**) y 1.91 (7-t) ppm (**Espectro 16**), un doblete que integra para tres protones a 1.96 (7-d), 1.97 (9-d) y 1.99 ppm (7-t) ( $J = 7.3$  Hz), y un protón olefínico que aparece como un multiplete a  $\delta$  6.15 (7-d), 6.14 y (9-d) y 6.18 ppm (7-t). Todas estas señales son características de los ésteres del ácido angélico. Además, la señal olefínica indica claramente que la molécula que esterifica es el ácido angélico,

descartando a los otros dos ácidos isoméricos, el tíglico y el seneciónico, ya que para estos, la señal del protón olefínico aparece a campo más bajo ( $\delta$  6.95) y más alto ( $\delta$  5.44), respectivamente (*Joseph-Nathan et al., 1984; Eshbakova et al., 2006*).

La correlación en el espectro de HMBC entre el átomo de carbono del grupo carboxilo del angeloil y el protón H9 demuestra que 9-d es un derivado sustituido con un grupo angeloil en posición 9 (**Espectro 14 y 15**). Esto se confirma por los desplazamientos de los protones H9 ( $\delta_{\text{H}} = 4.45$  y  $4.22$  ppm) cuyas señales son fácilmente identificables por su constante de acoplamiento geminal de 11.2 Hz y sus acoplamientos vecinales con H-1 de 6.3 y 8.1 Hz, respectivamente. Esta molécula, el 9-angeloil dihidroxiheliotridano, es la primera vez que se describe como producto natural (Véase **Figura 57**).

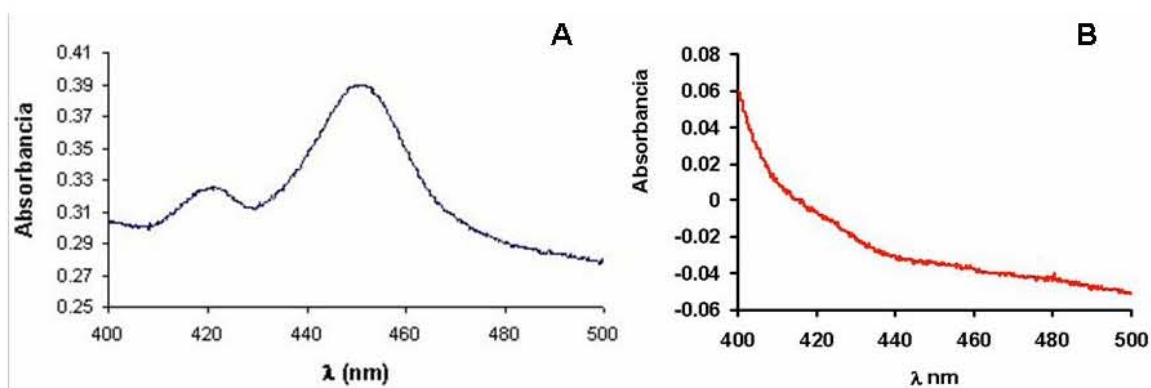
Un razonamiento similar puede ser empleado para elucidar la estructura del 7-*O*-angeloil-dihidroxiheliotridano. El espectro de HMBC (**Espectro 7 y 8**) exhibe una correlación entre el carbonilo del angeloil y H-7 ( $\delta_{\text{H}} = 5.26$  ppm). El compuesto 7-d muestra una excelente concordancia con los valores de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR de este compuesto reportado en la literatura, previamente aislado de *Senecio integrifolius* var. *fauiri* (*Roeder y Liu, 1991*) y al que le habían atribuido la estructura de la 7-*O*-angeloil-turneforcidina.

El monoéster 7-t aislado de *P. bombycophole*+*P. hintonii* corresponde a la 7-*O*-angeloilturndeforcidina. Las propiedades químicas y espectroscópicas son diferentes de las del compuesto descrito como 7-*O*-angeloil-turneforcidina por Roeder y Liu (*Roeder and Liu, 1991*). De nuevo, la esterificación del hidroxilo ubicado en la posición C7 se

obtuvo de las correlaciones que mostró el HMBC entre el carbono del grupo carboxilo con un desplazamiento de  $\delta$  168.5 con el H-7 ( $\delta_H = 5.28$  ppm, **Tablas 16 y 17**).

#### **8.10 Determinación de la presencia del sistema enzimático Cyt P450 en los microsomas de C. albolineatus.**

Se partió de una muestra de hembras congeladas a  $-70^\circ\text{C}$ . Luego de quitarles la cubierta cerosa (15.4 gramos) fueron depositadas en una solución estéril de KCl 0.15 M. Posteriormente se procesaron, acorde a los protocolos descritos en la parte experimental para obtener la fracción celular S9 y los microsomas donde estaría contenido el sistema CytP450. El contenido proteico de los microsomas se determinó por el método de Bradford, obteniéndose aproximadamente 2.85 mg de proteína microsomal/ml. Para establecer el contenido de CytP450 microsomal en los microsomas se realizó un burbujeo con monóxido de carbono a la muestra problema y posteriormente se le adicionó ditionita de sodio. Luego, se hizo una lectura diferencial en el espectrofotómetro con un barrido de 400 a 500 nm, donde se estableció la absorción de la proteína en su estado oxidado no asociada con CO y luego el pico de absorción máximo del complejo proteína reducida-CO. En el control positivo (microsomas de rata) se observaron dos máximos característicos a 420 y 450 nm indicadores de la presencia de la proteína inactiva y la proteína activa, respectivamente (**Figura 58A**). Para la muestra de microsomas obtenidos de *C. albolineatus* se siguió el mismo procedimiento, pero en este caso no se observaron los picos de absorción característicos de CytP450 observados en el control (**Figura 58B**).

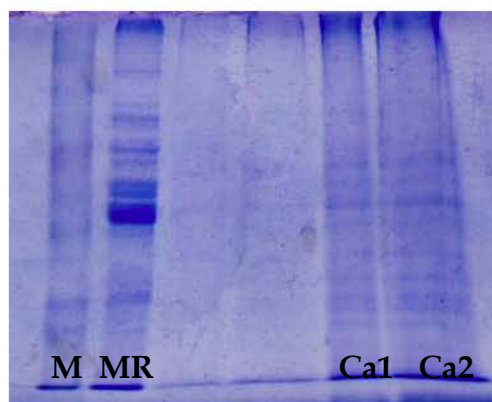


**Figura 58.** Determinación de la presencia del sistema enzimático Citocromo P450 en **A.** microsomas de rata y en **B.** microsomas de *C. albolineatus*.

Los resultados negativos llevaron a proponer una metodología alternativa. Tomando como base la posible interferencia en la lectura espectrofotométrica del colorante del tipo antraquinona ( $C_{16}H_{10}O_8$ ) presente en el insecto (Rios, 1969), se realizó una purificación del extracto proteico empleando una columna de Sephadex-G10 (Amersham) como fase estacionaria y eluyendo con buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). La columna se eluyó en un cuarto frío a  $-4^{\circ}C$  y se recogieron diez fracciones de 8 ml cada una. Antes de comenzar la separación, la muestra fue centrifugada y el precipitado se conservó a  $-80^{\circ}C$ . El sobrenadante fue la muestra sembrada en la columna. Las fracciones recolectadas fueron concentradas por medio de ultracentrifugación a 32500 RPM/1h/ $4^{\circ}C$ . Luego de concentradas se apreció que en la fracción dos, se formó el botón proteico que posteriormente fue disuelto en buffer para resuspender (amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4 con glicerol) y conservado a  $-80^{\circ}C$ .

La determinación por el método de Bradford de la cantidad de proteína aislada arrojó un valor de 0.879 mg/ml. Posterior a esto se realizó la determinación de los citocromos totales por la técnica de monóxido de carbono (CO). Se utilizaron tres muestras, la primera que era la fracción microsomal antes de pasarla por la columna, la segunda el precipitado que se formó después de centrifugar la fracción microsomal y por último, el botón que se formó en la fracción dos después de pasar la muestra por la columna. Para las tres el resultado de citocromos totales fue negativo ya que no se aprecian las bandas características del CytP450 (hombro a 450 nm), como sí ocurrió con el control positivo (microsomas de rata).

Otra forma de determinar la presencia de CytP450 es realizando una electroforesis en gel de poliacrilamida usando como referencia un marcador de peso molecular. Las muestras usadas fueron el control positivo (microsomas de rata), los microsomas de *C. albolineatus* y el marcador de peso molecular. En la **Figura 59** se observa el gel. En la región que comprende el rango de peso molecular de 50 Kda a 60 Kda, se aprecian en los controles las bandas características de las proteínas pertenecientes al sistema CytP450. En las muestras, aunque en mucha menor concentración también se observan en esta zona las bandas características.



**Figura 59.** *Gel de poliacrilamida al 10%. M es el marcador de peso molecular, MR es la muestra de los microsomas obtenidos de rata y Ca1 y Ca2 son dos muestras de microsomas obtenidos de C. albolineatus.*

## 9. DISCUSIÓN

### • *Alcaloides pirrolizidínicos en Pittocaulon praecox.*

Todos los tejidos analizados de *P. praecox* (*Asteraceae*) mostraron la presencia de alcaloides pirrolizidínicos (**Véase Tabla 22**). Previamente se había reportado la presencia de senecionina, en las raíces de *P. praecox* (*Ortega et al., 1975*). Las partes aéreas (hojas, tallos, frutos e inflorescencias) presentaron como principal alcaloide una base néctica 1,2-saturada y esterificada en C7 que fue identificada como el monoéster 7-angeloil-dihidroxiheliotridano, cuya estructura y configuración absoluta se establecieron después de emplear los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y bidimensionales y el análisis de CG-EM, además de ser comparado con un compuesto de referencia obtenido sintéticamente. El monoéster  $O_7$  se encontraba al mismo tiempo acompañado de una pequeña proporción de su isómero estructural, el 9-angeloil-dihidroxiheliotridano. A su vez ambos compuestos se encontraban acompañados de ésteres de APs macrocíclicos que tenían como base néctica la otonecina, siendo el compuesto mayoritario la senkirkina. Las raíces, a diferencia de las partes aéreas, no contenían monoésteres; pero sí ésteres de APs macrocíclicos como constituyentes mayoritarios, tales como la senecionina, la senkirkina y la platifilina, con bajas cantidades de sus respectivos isómeros geométricos 20E: integerrimina, neo-senkirkina y neo-platifilina.

Los diésteres macrocíclicos que fueron identificados contienen los mismo ácidos nécticos, pero pueden ser distinguidos por las necinas que los conforman, así el par platifilina/neoplatifilina contiene la platynecina, una necina 1,2-saturada, el par



senecionina/integerrimina posee la base néctica retronecina con una insaturación en posición 1,2 y por último, el par senkirkina/neo-senkirkina contiene la base néctica del tipo otonecina 1,2-insaturada.

Las diferencias que existen entre los diferentes órganos de la planta no sólo se dan en la concentración total de los APs, sino también en los perfiles cualitativos. Los monoésteres de AP que se encuentran ausentes en las raíces, dominan en las partes aéreas. Todos los seis APs macrocíclicos están presentes en las raíces con senecionina y senkirkina como las estructuras mayoritarias, sin embargo en las partes aéreas, particularmente en los tallos, la senkirkina es casi exclusivamente el único metabolito macrocíclico presente. En las hojas, la senkirkina parece ser reemplazada por un AP desconocido que no pudo ser identificado, pero que acorde a su patrón de fragmentación de MS posee las señales características de un AP con base néctica otonecina.

En cuanto a la concentración, las inflorescencias y las hojas mostraron los niveles más altos de APs con cerca de 1 y 1.4 mg/g de peso seco, seguidos por las raíces (0.4 mg/g) y los frutos (0.6 mg/g). En cambio, la concentración de APs en los tallos y en los tejidos periféricos, sólo superaron los 0.1 mg/g.

- ***Características especiales del perfil de APs de Pittocaulon praecox.***

Los cuatro géneros mexicanos *Barkleyanthus*, *Psacalium*, *Pittocaulon* y *Robinsonecio* forman un grupo monofilético dentro de la subtribu *Tussilaginatae* de la

tribu *Senecioneae* (Asteraceae) (Bain y Goleen, 2000). Ninguno de ellos ha sido previamente analizado para determinar la presencia de APs. Los perfiles de APs establecidos para *Pittocaulon praecox* incluyen estructuras relacionadas con APs del tipo senecionina. Los APs macrocíclicos comparten los mismos ácidos nécicos C<sub>10</sub>, compuestos de dos unidades C<sub>5</sub> unidas por medio de un enlace C-C (Stirling et al., 1997). Los dos monoésteres contienen una de estas unidades C<sub>5</sub>, la molécula de angeloil unida por esterificación ya sea en la posición C-7 o C-9 hidroxilada. En todas las especies de *Senecio* estudiadas la senecionina N-óxido es el primer producto de biosíntesis, el cual es exclusivamente sintetizado en las raíces y luego distribuido a toda la planta (Hartmann et al., 1989). La senecionina N-óxido es la estructura de partida, para la diversificación de los APs en las diferentes especies, lo cual genera los perfiles de APs específicos que caracterizan las diferentes especies de *Senecio* (Hartmann y Dierich, 1998; Pelsler et al., 2005). Además, dicha diversificación estructural puede ocurrir en todos los órganos de la planta (Hartmann y Dierich, 1998). La dominancia de la senecionina en las raíces de *P. praecox* y su ausencia en sus partes aéreas indican el papel que esta estructura, sintetizada en las raíces, desempeña en su rol como estructura esqueleto-precursora. La conversión directa de la senecionina en senkirquina, el AP macrocíclico mayoritario presente en los tallos de *P. praecox*, ha sido demostrada en varias especies de *Senecio* (Toppel et al., 1987; Kelly et al., 1989). La platifilina, una necina 1,2-saturada y que sólo fue detectada en las raíces, puede ser un derivado de la biosíntesis de senecionina formado como producto secundario en, o algo menos probable, sintetizado por hidrogenación de la senecionina.

La senecionina, la senkirkina y la platifilina están acompañadas de trazas de sus isómeros geométricos *20E*, integerrimina, neosenkirkina y neoplatifilina (**Figura 60**). Ya que la isomerización *Z/E* nunca ha sido observada, es muy probable que estas sustancias representen productos biosintéticos secundarios. Los dos angeloil-monoésteres de la base néctica 1,2-saturada dihidroxiheliotridano requieren especial atención, ya que esta necina, a diferencia de los APs macrocíclicos, posee una configuración (*S*) en el C-7. Quizás su origen biosintético como producto secundario en la formación de los APs macrocíclicos es poco factible, ya que los 7/9 angeloil-dihidroxiheliotridanos estaban ausentes en las raíces, pero presentes en la mayoría de las partes aéreas analizadas, lo que permitiría pensar en una formación independiente que ocurra en los tallos. Aunque no ha sido previamente descrito para la familia Asteraceae, la formación independiente de los APs en diferentes órganos es bien conocida; tal es el caso en las familias Orchidaceae (Frölich *et al.*, 2006) y Boraginaceae (van Dam *et al.* 1995; Frölich *et al.*, 2007).

Otro aspecto interesante que es necesario reseñar es el hecho de que los APs de las partes aéreas de *P. praecox* están presentes como bases libres, mientras que en las otras especies de Asteraceae se encuentran generalmente como *N*-óxidos (Hartmann y Ober, 2000). Esto se estableció al comparar los porcentajes de abundancia relativa de los APs presentes en una muestra sometida a reducción con zinc (APs totales: terciarios + *N*-óxidos) y otra que no fue reducida (APs terciarios). Al hacer el análisis no se apreciaron diferencias significativas entre los valores de abundancia (**Tabla 22**), indicando así que la reducción con zinc no afecta a los APs presentes en *P. praecox*, por lo tanto éstos se encuentran en su forma terciaria o de base libre, descartando así la presencia de los APs

como N-óxidos en las partes aéreas de la planta. Constituyen la excepción, los derivados de la otonecina, como senkirina y neo-senkirina, que debido a la presencia de un grupo metilo en el nitrógeno del núcleo de pirrolizidina no pueden formar los N-óxidos. No se puede concluir que los APs están presentes en toda la planta en su forma de bases libres ya que faltó determinar los AP como N-óxidos en las raíces, lo cual no se realizó debido a que los extractos alcaloides de éstas solo fueron analizados después de la reducción. Los APs como N-óxidos han sido ampliamente estudiados y principalmente se les ha atribuido el estar involucrados en la formación de derivados de retronecina y de bases nélicas 1,2-insaturadas relacionadas, que, con la excepción de la senecionina/integerrimina en las raíces de *P. praecox*, están ausentes. Los APs 1,2-saturados, que se encuentran estructuralmente relacionados con los derivados del dihidroxiheliotridano de *P. praecox*, son alcaloides característicos encontrados en orquídeas (Frölich et al., 2006) y en especies de *Ipomoea* (Convolvulaceae) (Jenett-Siems et al. 1998; Jenett-Siems et al. 2005). En ambas familias ellos se encuentran exclusivamente como bases libres (*Ipomoea*) o en forma de mezclas con sus respectivos N-óxidos.

- ***Alcaloides Pirrolizidínicos presentes en los diferentes estadios de Ceroplastes albolineatus.***

Los tallos suculentos de *P. praecox* se encuentran infestados por el insecto escama *Ceroplastes albolineatus* (Homoptera: Coccidae), fácilmente apreciable por su notable cubierta cerosa. Las concentraciones de APs medidas indican claramente que el insecto secuestra los APs de su planta hospedera. Estudios químicos previos habían aislado e identificado gran cantidad de sesterterpenos (C25) presentes en la cubierta del

insecto y una antraquinona en el insecto *per se*. Por lo tanto esta es la primera vez que se identifican los APs en el insecto. Además de ser la primera vez que se reporta una “escama” que secuestra APs.

El análisis de CG-EM de *C. albolineatus* mostró que todos los estadios de vida del insecto desarrollados sobre *P. praecox* (hembras adultas, huevos, ninfas de primer estadio), así como su cubierta cerosa contenían APs. Los resultados de los tres experimentos denominados como I, II y III, resultantes de tres diferentes tiempos de colecta, véase **Tabla 22**, indican que, aunque se encuentran diferencias cuantitativas apreciables entre los tres experimentos, las concentraciones de APs asociadas con los insectos siempre son sustanciales y demasiado altas para asumir que los valores son resultado de una contaminación accidental. Las concentraciones de APs encontradas en las hembras maduras vivas se encuentran en igual proporción que aquellas encontradas en los tallos, que es el tejido del que éstas se alimentan. En el experimento I las concentraciones son aún mayores mientras que en el experimento III donde ellas fueron analizadas por comparación directa del tallo infestado, son menores. Las concentraciones más altas de APs (mg/g de peso seco) fueron registradas en los huevos (0.58); las hembras adultas (0.44); las ninfas de primer estadio (0.37) y la cubierta cerosa (0.08). Asimismo, las ninfas de primer estadio, que salen al eclosionar los huevos, contienen cantidades apreciables de APs 0.37 mg/g de peso seco en el exp. I y 0.037 mg/g de peso seco en el exp. II. Las concentraciones más bajas de APs (0.003 a 0.05 mg/g de peso seco) fueron encontradas en la cubierta cerosa. Generalmente el perfil de APs en el insecto refleja el patrón de la planta. En los experimentos I y II la senkirina fue el compuesto mayoritario encontrado en todos los análisis de APs. No hay algún indicativo

que sugiera que el insecto lleva a cabo alguna modificación estructural a los metabolitos producidos por la planta.

- ***Características especiales del secuestro de APs por parte de Ceroplastes albolineatus.***

Como en otros insectos escamas, las hembras de *C. albolineatus* se establecen en los tallos de su planta hospedera, que para nuestro caso es *Pittocaulon praecox*, y permanecen allí a lo largo de su ciclo de vida. Las hembras se alimentan exclusivamente de la savia, rica en azúcares, que es transportada por el floema de su planta hospedera. Una gran proporción de los carbohidratos ingeridos son convertidos en lípidos grasos que son excretados a través de las glándulas localizadas en la epidermis. Ya que la cantidad de aminoácidos presentes en el floema es baja, la formación de la cera ayuda a ajustar el balance entre estos dos nutrientes mayoritarios (Arreguín y Guerra, 1978). Adicionalmente, la cubierta cerosa protege al insecto inmóvil, al crear una barrera mecánica contra depredadores, parasitoides y el ambiente (Takabayashi y Takahashi, 1993).

Los APs que se encontraron asociados con el insecto, son ingeridos a través del estilete que éste inserta en los tallos para succionar la savia conducida por el floema o de los tejidos periféricos de la planta donde el insecto se establece y donde los APs son acumulados. Lo anterior es consistente y ha sido bien documentado, ya que en las especies de *Senecio* los APs son transportados a través de la vía del floema (Hartmann et al., 1989; Hartmann y Dierich, 1998). Los APs encontrados en los diferentes estadios de vida de *C. albolineatus* reflejan el perfil de los APs de la planta indicando que todos los

APs acumulados en las partes aéreas de la planta son evidentemente movilizados a través del floema. Esto es corroborado por los estudios realizados con *Aphis jacobaeae*, el único insecto que se alimenta del floema y que ha sido reportado como secuestrador de APs de diferentes especies de *Senecio*. Para *A. jacobaeae*, los perfiles de APs del insecto reflejan los perfiles especie-específicos de la planta *Senecio jacobaeae* (Witte et al., 1990).

Considerando un papel protector de los APs secuestrados en *C. albolineatus*, el estado más vulnerable de todos los estadios de su ciclo de vida son las ninfas del primer estadio. Los huevos son bien protegidos bajo la cutícula dura de la hembra (cámara de cría) y la cubierta cerosa. Sin embargo, después de la eclosión, las ninfas de primer estadio dejan la cavidad protectora y buscan un lugar apropiado para establecerse. Durante este estadio los APs podrían ser una eficiente protección química contra depredadores y posibles parasitoides. Más interesante aún, es que las ninfas de primer estadio reciben de los huevos únicamente el AP tóxico 1,2-insaturado del tipo otonecina, la senkirquina (Fu et al., 2004), pero no los alcaloides no-tóxicos 1,2-saturados. Esta discriminación no da cabida a ambigüedades, ya que los huevos colectados de la cámara de cría de la hembra fueron analizados directamente y comparados con el contenido alcaloideo de las ninfas de dispersión que salieron del mismo lote de huevos almacenados en una caja de Petri y que no tuvieron ningún contacto con tejidos de la planta o de otro material del insecto. En el caso de las polillas de la familia *Arctiidae*, donde los huevos son el estadio del ciclo de vida más vulnerable al ataque por depredadores, los machos y las hembras proveen a los huevos con una carga de APs, lo que les proporciona una

eficiente protección química contra los diferentes depredadores y parasitoides (*Eisner et al., 2002*)

- **Mecanismo de desintoxicación: CytP450 vs Flavin Mono Oxigenasa.**

Ambos insectos succionadores (*A. jacobaeae* y *C. albolineatus*), secuestran los APs adquiridos de la planta como bases libres. Obviamente las dos especies del orden Homoptera son capaces de resistir a los APs pro-tóxicos, *A. jacobaeae* del tipo senecionina y *C. albolineatus* derivados de otonecina tales como la senkirquina. Todas las otras especies de insectos que secuestran APs que no son succionadores y que han sido estudiados en detalle, mantienen los APs adquiridos de la planta como N-óxidos no tóxicos (lepidópteros y escarabajos del género *Oreina*) o en caso tal de enfrentarse con las bases libres, los insectos previenen la acumulación de concentraciones nocivas en la hemolinfa o en tejidos del cuerpo, por la eficiente transferencia a las glándulas de defensa exocrinas como en los escarabajos del género *Platyphora* (*Hartmann, 1999; Hartmann, 2004*).

Es extraño encontrar reportes que indiquen el secuestro del alcaloide pro tóxico senkirquina en insectos (*Dobler et al., 2000*). La razón de esto es que la sustancia en mención no se puede N-oxidar (*Lindigkeit et al., 1997; Fu et al., 2004; Hartmann et al., 2005a*). Por lo tanto, pensar en la N-oxidación como mecanismo de desintoxicación a través de una enzima flavín mono oxigenasa como la SNO caracterizada en *Tyria jacobaeae*, (*Naumann et al., 2002*), no procedería en *C. albolineatus* ya que este



homoptero puede secuestrar la senkirina en estado adulto y transmitirla impunemente a través de los diferentes estadios de su ciclo de vida.

Los resultados negativos obtenidos en las pruebas realizadas para determinar la presencia del sistema enzimático CytP450 pueden ser atribuidos a la influencia de varios factores durante el proceso de purificación, tales como la inestabilidad relativa de los microsomas, la presencia de sustancias que promuevan un efecto inhibitorio, la interferencia de otro tipo de proteínas (enzimas hidrolíticas) o la cantidad total de proteína aislada (Scott, 1996). A pesar de éstos resultados negativos, pensar en la ausencia total del sistema CytP450 es poco factible, ya que esta superfamilia ha sido descrita en la gran mayoría de seres vivos, incluyendo desde bacterias hasta mamíferos. En especies parásitas como *C. albolineatus*, sin embargo, que se nutren de los componentes y metabolitos del hospedero el perfil de actividad de las enzimas que componen esta superfamilia podría estar grandemente alterado, como lo sugiere el resultado de la electroforesis realizada con los microsomas aislados de las hembras adultas, en el que la concentración de proteínas que corresponderían a CytP450 se ve muy baja en comparación con los microsomas hepáticos de rata. De hecho en otras formas parasitarias estudiadas (Berger y Fairland, 1993; Saeed et al., 2002) se han identificado sólo isoformas específicas y en niveles muy variables. De tal forma que *C. albolineatus* podría estar protegido contra la bioactivación de los APs pro tóxicos del tipo de otonecina mediada por enzimas del sistema CytP450, que produce ésteres pirrólicos reactivos citotóxicos y genotóxicos para vertebrados (Fu et al., 2004) e insectos (Frey et al. 1997; Narberhaus et al. 2005), mediante una eficiente compartimentalización que prevenga el contacto con enzimas bioactivadoras (CytP450) conjuntamente con bajos

niveles de este sistema de desintoxicación. Esto último se ha reportado para otras especies como cobayos, ovejas y hamsters que pueden alimentarse sobre plantas con este tipo de compuestos (APs) o sobrellevar directamente los APs sin sufrir ningún tipo de intoxicación (*Hartmann y Ober, 2000; Hartmann y Witte, 1995*).

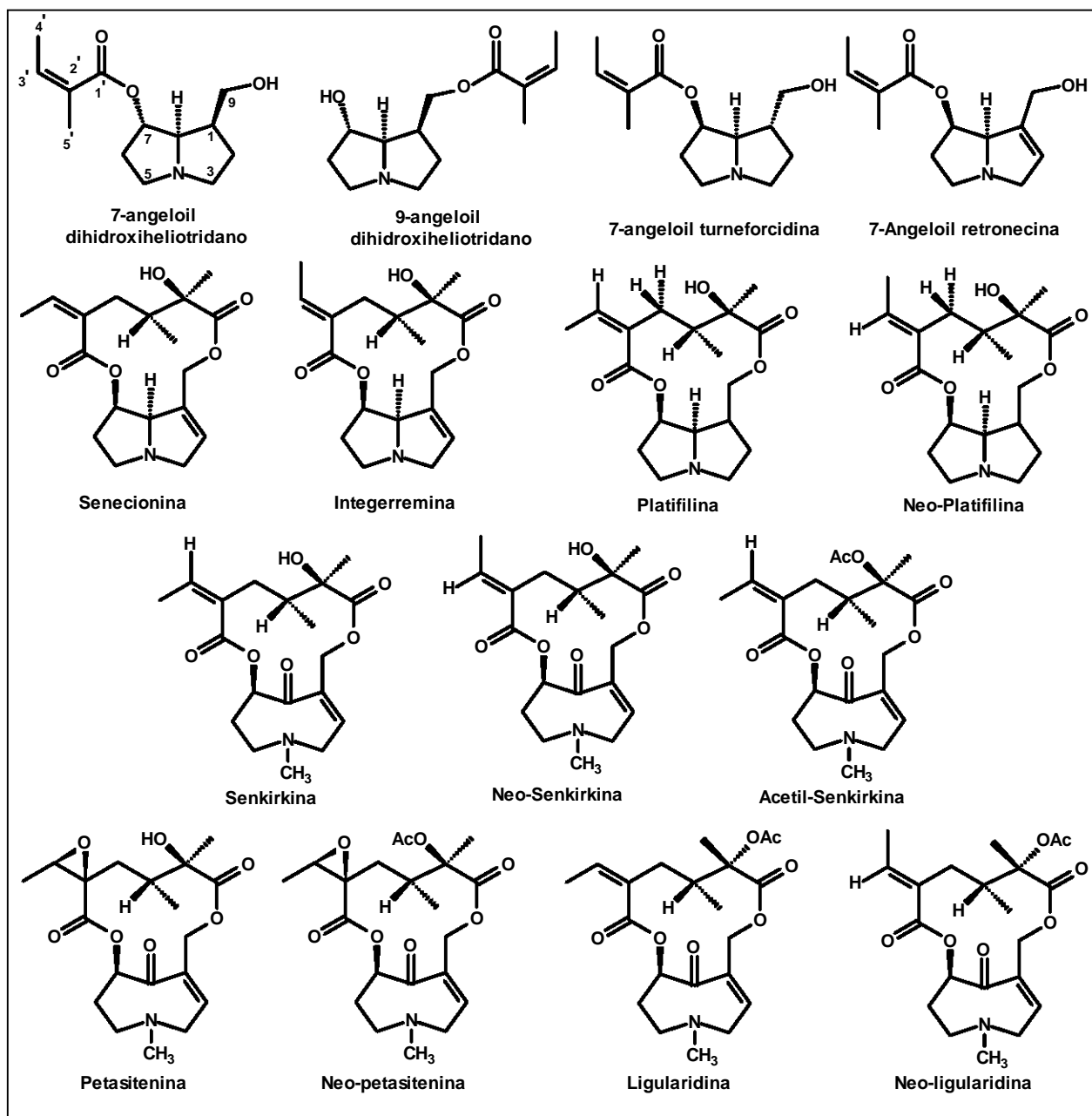
Con respecto a los APs 1,2-saturados presentes en *C. albolineatus*, tales como el O<sub>7</sub> y el O<sub>9</sub> ésteres de angeloil-dihidroxiheliotridano, su metabolismo debe ser microsomal. Estos APs no son pro tóxicos, debido a que no pueden ser bioactivados enzimáticamente al carecer del doble enlace en posición 1-2, una de las características estructurales necesarias para que un AP sea pro tóxico (*Fu et al., 2004; Mattocks, 1986*). Hasta ahora, la función biológica de estos APs es poco entendida; solo hay un reporte que indica una actividad disuasora e insecticida de estos compuestos contra herbívoros (*Reina et al., 1997*).

**Tabla 22.** Perfil de APs de los diferentes estadios de vida de *Ceroplastes albolineatus* alimentándose sobre *Pittocaulon praecox*.

| Alcaloides<br>pirrolizidínicos                  | m/z<br>[M <sup>+</sup> ] | RI   | Porcentaje de abundancia relativa<br>(miligramos) |                     |                    |              |                        |               |                                 |                |                 |                          |              |                    |               |
|---|--------------------------|------|---|---------------------|--------------------|--------------|------------------------|---------------|---------------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|--------------|--------------------|---------------|
|   |                          |      | Experimento I                                     |                     |                    |              | Experimento II         |               |                                 |                | Experimento III |                          |              |                    |               |
|   |                          |      | Hem. <sup>1</sup>                                 | C Cer. <sup>2</sup> | Hu. 1 <sup>3</sup> | Hu. 2        | Ninf 1er. <sup>4</sup> | Hem.          | C Cer.<br>(x10 <sup>-4</sup> )* | Hu.            | Ninf 1er.       | Tallos inf. <sup>5</sup> | Hem.         | CCer. <sup>6</sup> |               |
| 7-<br>Angeloildihidroxiheiotridano              | 239                      | 1810 | 36<br>(0.16)                                      | 29<br>(0.014)       | 16<br>(0.018)      | 29<br>(0.17) | -                      | -             | 15<br>(0.02)                    | 12<br>(3.6)*   | -               | -                        | 59<br>(0.27) | 47<br>(0.07)       | 43<br>(0.034) |
| 9-<br>Angeloildihidroxiheiotridano              | 239                      | 1837 | 10<br>(0.04)                                      | 5<br>(0.002)        | -                  | 4<br>(0.023) | -                      | 14<br>(0.018) | 18<br>(5.4)*                    | -              | -               | -                        | 35<br>(0.16) | 41<br>(0.06)       | 31<br>(0.025) |
| 9-<br>Angeloildihidroxiheiotridano<br>(isómero) | 239                      | 1854 | 5<br>(0.02)                                       | 2<br>(0.001)        | -                  | -            | -                      | -             | -                               | -              | -               | -                        | -            | -                  | -             |
| Senkirkina                                      | 365                      | 2461 | 41<br>(0.18)                                      | 53<br>(0.03)        | 84<br>(0.092)      | 57<br>(0.33) | 97<br>(0.36)           | 64<br>(0.083) | 70<br>(2.1)*                    | 100<br>(0.007) | 100             | 100<br>(0.04)            | 6<br>(0.03)  | 12<br>(0.018)      | 16<br>(0.013) |
| Neosenkirkina                                   | 365                      | 2531 | 2<br>(0.008)                                      | 3<br>(0.002)        | -                  | 3<br>(0.017) | 3<br>(0.01)            | -             | -                               | -              | -               | -                        | -            | -                  | -             |
| mg APs totales / g de peso seco:                |                          |      | 0.44  | 0.05                | 0.11               | 0.58         | 0.37                   | 0.13          | 0.003                           | 0.007          | 0.04            | 0.45                     | 0.15         | 0.08               |               |

- 1 Hem. : Hembras adultas
- 2 CCer. : Cubierta Cerosa
- 3 Hu. : Huevos
- 4 Ninf. 1er.: Ninfas del primer estadio.
- 5 Tallos inf. : Tallos infestados con *C. albolineatus*.
- 6 Adicional al perfil de APs se obtuvo un 11% de senecionina.

- *Perfiles de APs de las especies de Pittocaulon analizadas.*



**Figura 60.** Estructura de los diferentes APs identificados en las especies del género Pittocaulon analizadas.

Cinco de las seis especies mexicanas de *Pittocaulon* fueron analizadas por CG-EM para determinar si contenían APs. Los resultados son ilustrados en la **Tabla 23**. El género mostró una gran diversidad de APs de los cuáles se identificaron un total de 17. Para todas las especies analizadas, tres tipos estructurales fueron los dominantes: (1) los monoésteres  $O^7$  y  $O^9$  de bases nécicas 1,2-saturadas, (2) los ésteres macrocíclicos de retronecina, y (3) los diésteres macrocíclicos conteniendo la base nécica otonecina 1,2-insaturada (**Figura 60**). En dos de las especies estudiadas, *P. filare* y *P. velatum*, los monoésteres 1,2-saturados se encuentran acompañados de monoésteres de la base nécica 1,2-insaturada, retronecina o heliotridina, respectivamente. Los diésteres macrocíclicos de retronecina como la senecionina y su isómero *E*, la integerrimina, que además son análogos estructurales de los diésteres de otonecina como senkirquina y neosenkirquina, fueron detectados en las raíces de tres de las especies analizadas. En *P. praecox*, además de la senecionina y la integerrimina se identificaron los diésteres 1,2-saturados, platifilina y neoplatifilina. Los APs fueron detectados en todos los órganos de todas las plantas en estudio, observándose diferencias cualitativas y cuantitativas sustanciales entre los diferentes órganos. Para todas las especies, las inflorescencias mostraron los niveles más altos de concentración de APs, alcanzando niveles hasta de 0.3% (basado en peso seco) en *P. bombycophole*. Este fenómeno es bien conocido para otras especies de *Senecio* donde fueron las flores las que mostraron los niveles más altos de APs (*Hartmann y Zimmer, 1986*).

A pesar de que la senecionina y la senkirquina son frecuentemente encontradas en taxones distantes dentro de la tribu *Senecioneae*, las ligularidinas y petasiteninas sólo han sido reportadas en taxones de la subtribu *Tussilaginineae*, tales como las especies

asiáticas y europeas de *Petasites* y *Homogyne* y de las especies asiáticas *Farfugium* y *Ligularia* (Hartmann y Witte, 1995). Esto, desde el punto de vista quimiosistemático, confirma que el género *Pittocaulon* es un miembro de la subtribu Tussilaginarieae (Bain y Golden, 2000).

La co ocurrencia de los diésteres macrocíclicos de otonecina y los de retronecina no es una sorpresa, ya que los derivados de otonecina se derivan biogénicamente de los derivados de retronecina tal como se ha demostrado en la conversión de senecionina en senkirkina (Toppel et al., 1987; Kelly et al., 1989). La presencia de la senecionina sólo en las raíces parece razonable ya que en todas las especies de *Senecio* que han sido estudiadas, las raíces aparecen como el lugar de síntesis exclusivo de la senecionina, que es la estructura macrocíclica que sirve como esqueleto para la producción de los otros APs (Hartmann et al., 1989; Hartmann y Ober, 2000). En todas las especies estudiadas, todos los derivados macrocíclicos de retronecina y otonecina que son especie-específicos son formados por modificaciones periféricas del esqueleto de la senecionina (Hartmann y Dierich, 1998; Pelsler et al., 2005) lo cual es también probable para el caso de todos los APs macrocíclicos presentes en el género *Pittocaulon*.

Sin embargo, una característica particular de *Pittocaulon* es la presencia concomitante, más o menos cuantitativamente balanceada, de diésteres macrocíclicos de APs con monoésteres. En *Senecioneae* los monoésteres de AP o los diésteres de cadena abierta son raramente encontrados junto con los APs macrocíclicos. Los ésteres de la necina (-)-dihidroxiheliotridano encontrados en *P. praecox* y *P. velatum* como el único estereoisómero de 1-hidroximetil-7-hidroxipirrolizidina detectable, son reemplazados por

ésteres de la necina (-)-turneforcidina en las otras tres especies. La asignación inequívoca de los cuatro posibles esteroisómeros y sus correspondientes ésteres se estableció empleando un método por CG-EM que permitiera la separación y el asignamiento sin ningún tipo de ambigüedad de los cuatro estereoisómeros. Además, la estructura fue confirmada por RMN y por comparación con sustancias de referencia. La presencia del dihidroxiheliotridano como constituyente de plantas es nueva, ya que sólo se había reportado como un producto sintético (*Robertson et al., 1996*). La turneforcidina ya ha sido descrita frecuentemente como la base néctica de varios APs monoésteres y diésteres de cadena abierta, así como de APs macrocíclicos tales como los del tipo monocrotalina (*Mattocks, 1986; Rizk, 1991; Hartmann y Witte, 1995*). Una tercera necina estereoisomérica, es la platynecina, encontrada comúnmente en los APs macrocíclicos 1,2-saturados como son platifilina y neoplatifilina que fueron identificados en las raíces de *P. praecox*.

Una relación biosintética entre los APs macrocíclicos y la turneforcidina parece razonable ya que ambos tienen una configuración (*R*) en el C-7. Esto aplica para tres de las especies de *Pittocaulon*, pero no para *P. praecox* y *P. velatum*. En estas dos especies los APs macrocíclicos con configuración-7*R* se encuentran junto con los monoésteres de dihidroxiheliotridano con configuración-7*S*. En *P. velatum* el monoéster saturado con configuración 7*S* se encuentra acompañado por su análogo 1,2 insaturado de 7-angeloilheliotridina. Parece poco probable que los monoésteres de dihidroxiheliotridano representen un intermediario o productos secundarios en la biosíntesis de senecionina, a menos que uno asuma una epimerización adicional en el C-7.

- *APs y la defensa vegetal.*

En cada una de las partes analizadas de las especies del género *Pittocaulon* se encontraron APs. A éstos compuestos nitrogenados se les atribuye que fueron desarrollados por las plantas como defensas químicas bajo la presión de selección ejercida por los herbívoros debido a su sabor “amargo”, que les permite ser recordados como potentes disuasores de la alimentación (*Boppré 1986, Brown y Trigo, 1995*) y sus reconocidas propiedades tóxicas contra diferentes individuos (*Mattocks, 1986; Brown y Trigo, 1995; Macel et al., 2005*). Uno de los argumentos que soportan este papel defensivo es que muchos herbívoros generalistas no se alimentan de plantas que producen APs (*Van Dam et al., 1995; Hartmann, 1999*). Adicionalmente los individuos especialistas además de haber desarrollado mecanismos que les permiten no ser afectados por los compuestos producidos por la planta, emplean los APs como protectores contra depredadores (*Hartmann, 1999; Ober, 2003*).

Las plantas requieren de una amplia diversidad metabólica, cualitativa y cuantitativa, para contrarrestar la gran cantidad de enemigos que las atacan. Además es ampliamente aceptado que a mayor diversidad metabólica, mejor protección para la planta y que las mezclas de MS son mas efectivas que los compuestos individuales (*Espinosa-García, 2001*). En el género *Pittocaulon*, se da la presencia concomitante de tres clases de APs: (1) los ésteres macrocíclicos del tipo otonecina; (2) los ésteres macrocíclicos de retronecina, solo en raíces y (3) los monoésteres de necinas 1,2-saturadas. Los primeros y los segundos son tóxicos para mamíferos e invertebrados. Los monoésteres saturados no presentan tal toxicidad, ya que carecen de un requisito



estructural como es la insaturación en posición 1,2 (Hartmann, 1999). Adicionalmente son muy pocos los estudios de actividad realizados con estos compuestos (Reina et al., 1997). Lo anterior no quiere decir que estos compuestos no sean útiles para la planta desde el punto de vista defensivo, aunque por sí solos puede que no sean tóxicos, al estar presentes en una mezcla, quizás ejerzan un efecto sinérgico (Coley y Kursar, 2001). La actividad tóxica a la cual aquí se hace referencia va dirigida casi que exclusivamente contra mamíferos e insectos herbívoros. Son pocos los reportes de APs con actividad antimicrobiana, quizás por la falta de estudios que la comprueben o en realidad, debido a su mecanismo de acción (Fu et al., 2004), a la poca actividad inhibitoria que tengan los APs. Entonces cabe preguntar, ¿Cómo se defiende la planta ante el ataque de microorganismos? La respuesta, en parte, podría estar dada por otra u otras clases de MS presentes. Para el género *Pittocaulon* solo se han reportado sesquiterpenos del tipo furanoeremofilano, pero son necesarios más estudios que permitan identificar otros tipos de MS, como terpenos y compuestos fenólicos, reconocidos por su actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano y fúngico.

Las cantidades relativas tan variables de los APs encontrados en los órganos analizados de *Pittocaulon* son completamente normales y ha sido reportada para diferentes especies que producen APs. Dichas diferencias en la concentración de los APs se da a todos los niveles: entre tejidos de un individuo a través del tiempo, entre los órganos de un individuo, entre individuos, poblaciones, especies, géneros y familias, (Borstel et al., 1989; Witte et al., 1992; Vrieling et al., 1993; Biller et al., 1994; Van Dam et al., 1995; Hartmann, 1999). La presencia de APs es extremadamente variable, lo que le facilita a la planta poder encarar las demandas de un ambiente que varia

continuamente (Ober, 2003). Además se debe tener en cuenta que dicha variabilidad está regida genética y ambientalmente (Vrieling 1993; Brown y Trigo, 1995; Schoonhoven et al., 2005).

La acumulación de alcaloides en los tejidos analizados de *Pittocaulon* cumple con un patrón que está de acuerdo con las predicciones de la teoría de la defensa óptima formulada por Feeny (Feeny, 1976) y Rhoades & Cates (Rhoades y Cates, 1976) que enuncia en una de sus sub-hipótesis: “Dentro de un organismo las defensas serán destinadas en proporción al riesgo que tenga la parte de la planta y el valor de esta parte en su adecuación, y serán inversamente proporcionales al costo de la defensa” (Mc key, 1974; Stamp, 2003).

La prioridad de asignación está determinada por la historia de vida de la planta y los cambios que ocurren con el desarrollo de la misma (Espinosa-García, 2001). Las especies de *Pittocaulon* generalmente florecen y fructifican todos los años durante la primavera, ya para la época de lluvias cuando las inflorescencias caen, se da la producción de las hojas que va hasta comienzos del invierno (Clark, 1996). De acuerdo con esto se esperaría que durante la reproducción, las flores y las semillas de *Pittocaulon* tengan una mayor concentración de MS que las otras partes de la planta. Este patrón se puede apreciar en la **Tabla 23** en donde los valores obtenidos para las inflorescencias de cuatro de las especies analizadas (de *P. filare* no se recolectaron), fueron los que mayor concentración de APs por gramo de peso seco presentaron (0.97 mg en *P. praecox*, 3.04 mg en *P. bombycophole*, 2.89 mg en *P. hintonii* y 0.32 mg en *P. velatum*) al compararlos con los otros dos tejidos analizados (tallos y raíces). Esto permite a la planta proveer con

compuestos de defensa a una estructura reproductiva altamente significativa que si se viera afectada podría tener un impacto más grande en la adecuación de la planta que el daño a otros órganos. Para *P. praecox*, adicional a los tallos, raíces e inflorescencias, también se analizaron las hojas. El patrón que se esperaría de esta planta anual es que antes de la reproducción, las hojas estuviesen mejor protegidas que durante la etapa reproductiva. Efectivamente esto es lo que acontece, la concentración de APs en las hojas de *P. praecox* por gramos de peso seco (1.42 mg/g) y es aún mayor que el de las inflorescencias.

**Tabla 23.** Perfiles y concentración total de los APs presentes en los diferentes órganos analizados de cinco de las especies de *Pittocaulon* establecidos por CG-EM.

| Alcaloides pirrolizidínicos      | m/z<br>[M] <sup>+</sup> | RI<br>(ZBI) | Alcaloides pirrolizidínicos (Abundancia relativa, %)<br>(miligramos) |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
|----------------------------------|-------------------------|-------------|--|----------------|----------------|------------------------|------|------|-------------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|---------------|-------------------|--------------|--------------|-------------|--|--|--|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                  |                         |             | <i>P. praecox</i>  |                |                | <i>P. bombycophole</i> |      |      | <i>P. filiare</i> |              |              | <i>P. hitomii</i> |              |               | <i>P. velatum</i> |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
|                                  |                         |             | T <sup>a</sup>   | I <sup>a</sup> | H <sup>a</sup> | R <sup>a</sup>         | T    | I    | R                 | T            | R            | T                 | I            | R             | T                 | I            | R            |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| 7-Angeloitretonecina             | 237                     | 1809        |  |                |                |                        |      |      |                   | 43<br>(0.07) | 16<br>(0.04) |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| 7-Angeloilhelioridano            | 237                     | 1810        |  |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           | 31 <sup>b</sup><br>(0.1)    | (25) <sup>c</sup><br>(0.04) |
| 7-Angeloiturnesfordina           | 239                     | 1780        |  |                |                |                        |      |      |                   | 76<br>(1.83) | 16<br>(0.49) | 38<br>(0.2)       | 57<br>(0.09) | 23<br>(0.06)  | 71<br>(0.8)       | 39<br>(1.13) | 19<br>(0.19) |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| 9-Angeloiturnesfordina           | 239                     | 1806        |  |                |                |                        |      |      |                   | 8<br>(0.19)  | 6<br>(0.18)  | 6<br>(0.03)       |              |               | 3<br>(0.03)       | 2<br>(0.06)  | 1<br>(0.01)  |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| 7-Angeloilhidroxihelioridano     | 239                     | 1810        | 33<br>(0.043)  | 66<br>(0.64)   | 78<br>(1.1)    | tr                     |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  | 65 <sup>b</sup><br>(0.21) | (25) <sup>c</sup><br>(0.04) |                             |
| 9-Angeloilhidroxihelioridano     | 239                     | 1837        |  | 11<br>(0.11)   | 2<br>(0.03)    |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Senecionina                      | 335                     | 2284        |  |                |                | 40<br>(0.18)           |      |      |                   |              |              |                   |              | tr            |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             | 59<br>(0.09)                |
| Integerrimina                    | 335                     | 2342        |  |                |                | 16<br>(0.07)           |      |      |                   |              |              |                   |              | tr            |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             | 16<br>(0.03)                |
| Platifilina                      | 337                     | 2335        |  |                |                | 4<br>(0.018)           |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Neoplaitifilina                  | 337                     | 2363        |  |                |                | 4<br>(0.018)           |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Senkirkina                       | 365                     | 2459        | 66<br>(0.086)  | 14<br>(0.14)   |                | 36<br>(0.17)           |      |      |                   | tr           | 6<br>(0.18)  | 8<br>(0.04)       |              | 10<br>(0.025) | 1<br>(0.01)       | 1<br>(0.03)  | 12<br>(0.12) |             |  |  |  |                           |                             | tr                          |
| Neosenkirkina                    | 365                     | 2534        |  |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   | 1<br>(0.03)  | 3<br>(0.03)  | 3<br>(0.09) |  |  |  |                           |                             |                             |
| Petasitenina                     | 381                     | 2447        |  |                |                |                        |      |      |                   | tr           |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| PA-X <sup>d</sup>                | 381                     | 2542        |  |                | 12<br>(0.17)   |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Acetilsenkirkina                 | 407                     | 2632        |  |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              | tr            | 4<br>(0.04)       | 2<br>(0.06)  | 12<br>(0.12) |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Ligularidina <sup>e</sup>        | 407                     | 2708        |  |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               | tr                | tr           | 1<br>(0.01)  |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Neoligularidina <sup>e</sup>     | 407                     | 2709        |  |                |                |                        |      |      |                   |              |              |                   |              |               |                   |              |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |
| Acetilpetasitenina               | 423                     | 2632        |  |                |                |                        |      |      |                   | 16<br>(0.38) | 70<br>(2.1)  | 48<br>(0.25)      | tr           | 52<br>(0.13)  | 20<br>(0.22)      | 50<br>(1.44) | 49<br>(0.48) |             |  |  |  |                           |                             | tr                          |
| mg APs totales / g de peso seco: |                         |             | 0.13   | 0.97           | 1.42           | 0.46                   | 2.41 | 0.52 | 3.04              | 0.16         | 0.25         | 1.12              | 2.89         | 0.99          | 0.32              | 0.16         |              |             |  |  |  |                           |                             |                             |

<sup>a</sup> T: Tallos; I: Inflorescencias; H: Hojas; R: Raíces. <sup>b</sup> Estos fueron determinados después de la hidrólisis y cuantificación de las respectivas neocinas. <sup>c</sup> Los angeloiésteres: dihidroxihelioridano y de retronecina, no se pudieron separar. La suma de ambos compuestos produjo un 25% de abundancia relativa. <sup>d</sup> AP desconocido. <sup>e</sup> La secuencia de elución de los dos isómeros EZZ no es segura.

## 10. CONCLUSIONES

- Todas los tejidos analizados de *P. praecox* (tallos, corteza, hojas, inflorescencias, raíces) contenían APs.
- En los tejidos aéreos de *P. praecox*, los APs se encuentran en su forma terciaria o de bases libres.
- Se reporta por primera vez la presencia de APs en cinco de las seis especies que conforman el género *Pittocaulon*. En todas las partes analizadas (raíz, tallos e inflorescencias) se identificaron APs de tres tipos: monoésteres de necina 1,2-saturadas no tóxicas, ésteres macrocíclicos de retronecina y diésteres macrocíclicos del tipo otonecina, potencialmente tóxicos.
- En las raíces de *P. praecox*, *P. velatum* y *P. filare* se estableció la presencia de la senecionina y su isómero *E*, la integerrimina.
- Para tres de las especies de *Pittocaulon* estudiadas (*P. bombycophole*, *P. filare*, *P. hintonii* y *P. velatum*) los monoésteres tenían como base nécica la turneforcidina. Para *P. praecox* y *P. velatum* la necina fue identificada como dihidroxiheliotridano, siendo esta la primera vez que se reporta esta necina como producto natural. Los monoésteres  $O_7$  y  $O_9$  se encontraban esterificados por el ácido angélico.

- Los monoésteres 7-*O*-angeloildihidroxiheliotridano y 9-*O*-angeloil dihidroxiheliotridano se reportan por primera vez como productos naturales.
- Las hembras adultas del insecto *Ceroplastes albolineatus* secuestran APs de su planta hospedera sin modificarlos. Los APs secuestrados son de dos tipos estructurales: los pro-tóxicos (diésteres de otonecina 1,2-insaturados) y los no-tóxicos (7 y 9 monoésteres, teniendo como necina el dihidroxiheliotridano).
- Los resultados indican que la hembra provee a los huevos de una carga de alcaloides, y éstos a su vez transmiten a las ninfas de dispersión del primer estadio, únicamente el AP tóxico (senkirkina).
- El insecto *Ceroplastes albolineatus* es el primer insecto escama reportado que secuestra alcaloides pirrolizidínicos y posee la habilidad de secuestrar la senkirkina. El mecanismo por el cual lo hace no está determinado.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**Allen JR, Carstens LA, Katagiri GJ.** Hepatic veins of monkeys with veno-occlusive disease: sequential ultrastructural changes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 279–289. 1969.

**Allen Y, Hsu I, Cartens L.** Dehydroretronecine- induced rhabdomyosarcomas in rats. *Cancer Research* 35: 997–1002. 1975.

**Aplin R T, Benn M H, Rothschild M.** Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature* 219: 747-748. 1968.

**Arnett R H.** American insects: a handbook of the insects of America north of Mexico. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press L L C. p 287. 2000.

**Arreguín B, Guerra G.** Insect metabolism. I. Isolation of glucose phosphate isomerase. *Revista Latinoamericana de Química* 9: 17-22. 1978.

**Bain J F, Golden J L.** A phylogeny of *Packera* (Senecioneae, Asteraceae) based on internal transcribed spacer region sequence data and a broad sampling of outgroups. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 16: 331-338. 2000.

**Barkley T M.** New Taxa In *Senecio* From México. *Phytologia* 69: 138-149. 1990.

**Ben-Dov Y.** A systematic catalogue of the soft scale insects of the world (Homoptera: Coccoidea: Coccidae) : with data on geographical distribution, host plants, biology, and economics importance. Edited by Yair Ben-Dov Gainesville, Florida: Sandhill Crane, xxviii, pp 536. 1993.

**Ben-Dov Y, Hodgson C J.** Soft scale insects: their biology, natural enemies, and control. Vol 7A. Edited by Yair Ben-Dov, Chris J. Hodgson. Amsterdam : Elsevier, 1997a.

**Ben-Dov Y, Hodgson C J.** Soft scale insects: their biology, natural enemies, and control. Vol 7B. Edited by Yair Ben-Dov, Chris J. Hodgson. Amsterdam : Elsevier, 1997b.

**Benn M, DeGrave J, Gnanasunderam C, Hutchins R.** Host-plant pyrrolizidine alkaloids in *Nyctemera annulata* Boisduval: Their persistence through the life-cycle and transfer to a parasite. *Experientia* 35: 731-732. 1979.

**Bernays E A, Edgar J A, Rothschild M.** Pyrrolizidine alkaloids sequestered and stored by the aposematic grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Journal of Zoology (London)* 182: 85-87. 1977.

**Berger B J, Fairlamb A H.** Cytochrome P450 in trypanosomatids. *Biochemical Pharmacology* 46: 149-157. 1993.

**Bezzerides A, Yong T-H, Bezzerides J, Hussein J, Ladar J, Eisner M and Eisner T.** Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinia*). *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 101: 9029–9032. 2004.

**Biller A, Boppré M, Witte L, Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoecological aspects. *Phytochemistry* 35: 615-619. 1994.

**Birecka H, Catalfamo J L.** Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of *Heliotropium spathulathum*. *Phytochemistry* 21: 2645-2651. 1982.

**Birecka H, Birecki M, Frohlich M W.** Evidence for arginine as endogenous precursor of necines in *Heliotropium*. *Plant Physiology* 84: 42-46. 1987.

**Bohlman F, Zdero C.** Neue Furanoterpenophile aus mexikanischen *Senecio*-Arten. *Chemische Berichte* 109: 819-825. 1976.

**Bohm B A, Stuessy T F.** Flavonoids of the sunflower family (*Asteraceae*). Springer Verlag. Wien New York, Austria. 2001.

**Bors W, Saran M, Eltsner E F.** Modern Methods Plant Analysis, New Series; Academic Press: New York, Vol.13: 77. 1992.

**Boppré M.** Redefining "pharmacophagy". *Journal of Chemical Ecology* 10: 1151-1154. 1984.

**Boppré M, Seibt U, Wickler W.** Pharmacophagy in grasshoppers? *Zonocerus* attracted to and ingesting pure pyrrolizidine alkaloids. *Entomologia experimentalis et applicata* 35: 115-117. 1984.

**Boppré M, Schneider D.** Pyrrolizidine alkaloids quantitatively regulate both scent organ morphogenesis and pheromone biosynthesis in male *Cretonotos* moths. *Journal of Comparative Physiology* 157A: 569-577. 1985.

**Boppré M.** Insect pharmacophagously utilizing defensive plant chemical (Pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften* 73: 17-26. 1986.

**Borstel K V, Witte L, Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry* 28: 1635-1638. 1989.

**Böttcher F, Adolph R-T, Hartmann T.** Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 32: 679-689. 1993a.

**Böttcher F, Ober D, Hartmann T.** Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *Canadian Journal of Chemistry* 72: 80-85. 1993b.

**Bradford M M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.

**Brattsten L B.** Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. In: *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites*. Edited by Gerald A. Rosenthal, Daniel H. Janzen. Academic Press, Inc. USA. p 200-262. 1979.

**Brattsten L B.** Metabolic defenses against plant allelochemicals. In: *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Volumen II: Ecological and Evolutionary Processes. Second Edition*. Edited by Gerald A. Rosenthal, May R. Berenbaum. Academic Press, Inc. USA. 176-232. 1992.

**Bremer B.** Asterids. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0003685]. pp 1-6. 2005.

**Brückmann M, Trigo J R, Foglio M A, Hartmann T.** Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology* 10: 25-32. 2000.

**Brown Jr. K S, Trigo J R.** The ecological activity of alkaloids. En: *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. Vol 47. Edited by: G. A. Cordell. Academic Press. USA. pp 227-354. 1995.

**Calderon J S, Quijano L, Rios T.** Ceralbic acids I and II: two new sesterterpenic acids isolated from insect's wax. *Chemistry & Industry* 15: 584-585. 1978a.



**Calderon J S, Quijano L, Rios T.** Ceralbol, a new sesterterpenic alcohol isolated from insect wax. *Experientia* 34: 421-422. 1978b.

**Calderon J S, Rios T.** Identification of fatty acids in the wax of *Ceroplastes albolineatus*. *Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México* 20: 91-94. 1968.

**Candrian U, Lüthy J, Graf U, Schlatter CH.** Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in drosophila and their transfer into rat milk. *Food Chemistry and Toxicology*. 22: 223-225. 1984.

**Castagnoli Jr N, Rimoldi J M, Bloomquist J, Castagnoli K P.** Potential metabolic bioactivation pathways involving cyclic tertiary amines and azaarenes. *Chemical Research and Toxicology* 10: 924-940. 1997.

**Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruney T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck A J.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 213-220. 2002.

**Clark B L.** A study of variation in *Senecio* sect. *Terminales* Greenm. (Compositae: Senecioneae). Ph.D dissertation, Kansas State University, Manhattan, Kansas, U.S.A. 1996.

**Clark B L.** A new variety and four new combinations in *Pittocaulon* and *Telanthophora* (Asteraceae: Senecioneae) from México. *SIDA* 19 : 235-236. 2000.

**Cockerell T D A.** A new wax-scale found in Jamaica. *Entomological News*. 157-158. 1894.

**Coley P D, Kursar T A.** Herbivoría, defensas vegetales y enemigos en bosques tropicales. En: Anaya, A.L., F.J. Espinosa-García y R. Cruz-Ortega (Eds.) *Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. pp. 401-424. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdés. México, D.F. 2001.

**Conner W E, Eisner T, Meer R K v. D, Guerrero A, Meinwald J.** Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatix*): Role of a pheromone derived from dietary alkaloids. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 9:227-235. 1981.

**Conner W E, Roach B, Benedict E, Meinwald J, Eisner T.** Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth, *Utetheisa ornatix*. *Journal of Chemical Ecology* 16: 543-552. 1990.

**Conner W E, Boada R, Schroeder F C, González A, Meinwald J, Eisner T.** Chemical defense: Bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 97: 14406-14411. 2000.

**Crout, D H G.** Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of echimidinic acid. *Journal of Chemical Society (C)* 1968-1972. 1966.

**Crout, D H G.** Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of the angelate component of heliosupine. *Journal of Chemical Society (C)* 1233-1234. 1967.

**Crout D H G, Davies N M, Smith E H, Whitehouse D.** Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of senecic acid. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 671-680. 1972.

**Culvenor C C J, Edgar J A.** Dihydropyrrolizine secretions associated with coremata of *Utetheisa* moths (Family Arctiidae). *Experientia* 38: 627-628. 1972.

**Denmark S E, Parker Jr. D L, Dixon J A.** Tandem [4+2]/[3+2] Cycloadditions of nitroalkenes. 12. Synthesis of (-)-platynecine. *Journal of Organic Chemistry* 62: 435-436. 1997.

**Devlin J A, Robins D J.** Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of trichodesmic acid. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 1329-1332. 1984.

**Dewick P M.** Medicinal Natural products. A biosynthetic approach. Second Edition. John Wiley & Sons. LTD. England. 2002.

**Dobler S, Rowell-Rahier M.** Production of cardenolides versus sequestration of pyrrolizidine alkaloids in larvae of *oreina* species (Coleoptera, chrysomelidae). *Journal of Chemical Ecology* 20: 555-568. 1994a.

**Dobler S, Rowell-Rahier M.** Response of a leaf beetle to two food plants, only one of which provides a sequestrable defensive chemical. *Oecologia* 97: 271-277. 1994b.

**Dobler S, Haberer W, Witte L, Hartmann T.** Selective sequestration of pyrrolizidine alkaloids from diverse host plants by *Longitarsus* flea beetles. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1281-1298. 2000.

**Donohoe T J, Guillermin J-B, Walter D S.** Preparation of (-)-nemorensic acid and approaches to nemorensine using the partial reduction of electron deficient furans. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 1369-1375. 2002.

**Dussourd D E, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J, Eisner T.** Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 85: 5992-5996. 1988.

**Dussourd E, Harvis C A, Meinwald J, Eisner T.** Paternal allocation of sequestered plant pyrrolizidine alkaloid to eggs in the danaine butterfly, *Danaus gilippus*. *Experientia* 45: 896-898. 1989.

**Dussourd D E, Harvis C, Eisner T, Meinwald J.** Pheromone advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 88: 9224-9227. 1991.

**Eagle G A, Rivett D E A, Williams D H, Wilson R G.** The structure of euryopsol, a furanoeremophilane from *Euryops* species. *Tetrahedron* 25: 5227-5233. 1969.

**Edgar J A, Cockrum P A, Frahn J L.** Pyrrolizidine Alkaloids in *Danaus plexippus* L. and *Danaus chrysippus* L. *Experientia* 32: 1535-1537. 1976.

**Edgar J A, Culvenor C C J.** Pyrrolizidine ester alkaloid in Danaid butterflies. *Nature* 248: 614-616. 1974.

**Edgar J A, Culvenor C C J, Cockrum P A, Smith L W, Rothschild M.** Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth "metabolite". *Tetrahedron Letters* 21: 1383-1384. 1980.

**Egelhaaf A, Cölln K, Schmitz B, Buck M, Wink M, Schneider D.** Organ specific storage of dietary pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Cretonotos transiens*. *Zeitschrift für Naturforschung* 45c:115-120. 1990.

**Ehmke A, Von Borstel K, Hartmann T.** Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta* 176: 83-90. 1988.

**Ehmke A, Prosch P, Witte L, Hartmann T, Isman M B.** Fate of ingested pyrrolizidine alkaloid N-oxide in the Grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Naturwissenschaften* 76: 27- 29. 1989.

**Ehmke A, Witte L, Biller A, Hartmann T.** Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the Arctiid moth *Tyria jacobaeae* L. *Zeitschrift für Naturforschung* 45c:1185-1192. 1990.

**Ehmke A, Rowell-Rahier M, Pasteels J M, Hartmann T.** Sequestration of ingested [<sup>14</sup>C]senecionine N-oxide in the exocrine defensive secretions of chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology* 17: 2367-2379. 1991.

**Ehmke A, Rowell-Rahier M, Pasteels J M, Theuring C, Hartmann T.** Sequestration, maintenance, and tissue distribution of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in larvae of two *Oreina* species. *Journal of Chemical Ecology* 25: 2385-2395. 1999.

**Eisner T, Meinwald J.** The chemistry of sexual selection. *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 92:50-55. 1995.

**Eisner T, Eisner M.** Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid containing moth, *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. *Psyche* 98:111-118. 1991.

**Eisner T, Rossini C, Gonzalez A, Iyengar V K, Siegler M V S, Smedley S R.** Paternal investment in egg defence. *En: M Hilker, T Meiners, eds, Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition.* Oxford, Blackwell Publishing. pp 91-116. 2002.

**Eisner T, Eisner M, Rossini C, Iyengar VK, Roach BL, Benedikt E, Meinwald J.** Chemical defense against predation in an insect egg. *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 97:1634-1639. 2000.

**Eshbakova A, Saidkhodzhaev A I, Baser K H C, Duman H, Vdovin A D, Abdullaev N D.** Furocoumarins from *Prangos ferulacea* k. *Chemistry of Natural Compounds* 42: 102-103. 2006

**Espinosa-García F J.** La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. *En: Anaya, A.L., F.J. Espinosa-García y R. Cruz-Ortega (Eds.) Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación.* Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdés. México, D.F. pp. 231-249. 2001.

**Feeny P.** Plant apparency and chemical defense. *In: Recent Advances in Phytochemistry, Volume 10.* Edited by J W Wallace and R L Mansell. New York: Plenum Press. USA. pp 1-40. 1976.

**Frei H, Lüthy J, Brauchli J, Zweifel U, Würigler F E, Schlatter C.** Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemical Biological Interactions* 83: 1-22. 1992.

**Freitas A V L, Trigo J R, Brown Jr. K S, Witte L, Hartmann T, Barata L E S.** Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology* 7: 61-67. 1996.

**Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Gruen S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley R B, Briggs S P, Simcox K, Gierl A.** Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-699. 1997.

**Frölich C, Hartmann T, Ober D.** Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry* 67 :1493-1502. 2006.

**Frölich C, Ober D, Hartmann T.** Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry* 68: 1026-1037. 2007.

**Fu P P, Xia Q, Lin G, Chou M W.** Pyrrolizidine alkaloids—Genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug metabolism reviews* 36: 1–55. 2004.

**Gadgil D D, Rama R A A, Venkataraman K.** Ceroalbolinic acid. *Tetrahedron Letters* 18: 2229-2230. 1968.

**Garduño-Ramírez M L, Trejo A, Navarro V, Bye R, Linares E, Delgado G.** New Modified Eremophilanes from the Roots of *Psacalium radulifolium*. *Journal of Natural Products* 64: 432-435. 2001.

**Garner R C, Miller E C, Miller J A.** Liver microsomal metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivate toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Research* 32: 2058-2066. 1972.

**Gimpel W F A.** Systematic revision of the max scales genus *Ceroplastes*, in the United States – Homoptera: Coccoidea, Coccidae. Edited by: William F. Gimpel, Douglass R. Miller, John A. Davidson, College park, Maryland : University of Maryland, agricultural experiment station. p 85. 1974.

**Gonzalez A, Rossini C, Eisner M, Eisner T.** Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 96: 5570–5574. 1999.

**Graham J M, Higgins J A.** Biomembrane protocols I: isolation and analysis. Vol.19. Humana Press. USA. 2002.

**Graser G, Hartmann T.** Biosynthetic incorporation of the aminobutyl group of spermidine into pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 45: 1591-1595. 1997.

**Haberer W, Dobler S.** Quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids sequestered from diverse host plants in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chemoecology* 9:169–175. 1999.

**Hare J F, Eisner T.** Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. *Oecologia* 96: 9-18. 1993.

**Hartmann T, Zimmer M.** Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Journal of Plant Physiology* 122: 67-80. 1986.

**Hartmann T, Toppel G.** Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 26: 1639-1643. 1987.

**Hartmann T, Ehmke A, Eilert U, Von Borstel K, Theuring C.** Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L.. *Planta* 177: 98-107. 1989.

**Hartmann T, Biller A, Witte L, Ernst L, Boppré M.** Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 549-554. 1990.

**Hartmann T.** Alkaloids. *In: Rosenthal GA & MR Berenbaum (eds). Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. Second edition. Volume I. Academic press, London, United Kingdom. 79-121. 1991.*

**Hartmann T.** Biochemistry of the formation of pyrrolizidine alkaloids in root cultures. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 26. Medicinal and aromatic plants. Springer, Berlin Heidelberg New York. 339-355. 1994.

**Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloids between plants and insects: a new chapter of an old story. *Chemoecology* 3/4: 139-146. 1995.

**Hartmann T, Witte L.** Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids. *In: Alkaloids: Chemical & Biological perspectives Volume 9.* Edited by S. William Pelletier. Elsevier Science Pergamon Press Great Britain. 155-233. 1995.

**Hartmann T, Witte L, Ehmke A, Theuring C, Rowell-Hier M, Pasteels J M.** Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. *Phytochemistry* 45: 489-497. 1997.

**Hartmann T, Dierich B.** Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence?. *Planta* 206: 443-451. 1998.

**Hartmann T.** Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207: 483-495. 1999.

**Hartmann T, Theuring C, Schmidt J, Tahier M, Pasteels J M.** Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of insect Physiology* 45: 1085-1095. 1999.

**Hartmann T, Dietrich O.** Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Topics in Current Chemistry* 209: 207-243. 2000.

**Hartmann T, Theuring T, Witte L, Pasteels J M.** Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1041-1056. 2001.

**Hartmann T, Haggström H, Theuring T, Lindigkeit R, Rowell-Rahier M.** Detoxification of pyrrolizidine alkaloids by the harvestman *Mitopus morio* (Phalangidae) a predator of alkaloid defended leaf beetles. *Chemoecology* 13:123-127. 2003a.

**Hartmann T, Theuring C, Witte L, Schulz S, Pasteels J M.** Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 515-523. 2003b.

**Hartmann T.** Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* 219: 1-4. 2004.

**Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays E A.** Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Chemoecology* 14:207-216. 2004a.

**Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer M S, Bernays E A.** Acquired and partially *de novo* synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. *Journal of Chemical Ecology* 30: 229-254. 2004b.

**Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays E A, Singer M S.** Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1083-1099. 2005a.

**Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer M S, Bernays E A.** Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 391-411. 2005b.

**Hayes W A.** Analysis and characterization of enzymes and nucleic acids. *En: Principles and Methods of Toxicology*. 4<sup>th</sup> edition. Cap 35. Taylor & Francis. Boston Massachusetts, USA. pp 1625-1688. 2001.

**Herbert R B.** The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports* 20: 494–508. 2003.

**Hodgson C J.** The scale insect family coccidae : an identification manual to genera. Cambridge : CAB International. **1994**.

**Hol W H G, Van Veen J A.** Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobae* affect fungal growth. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1763-1772. 2002.

**Hristov N, Conner W E.** Effectiveness of tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae) chemical defenses against an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). *Chemoecology* 15:105–113. 2005.

**Huxtable R J, Ciaramitaro D, Eisenstein D.** The effect of a pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, on the biochemical functions of the pulmonary endothelium. *Molecular Pharmacology* 14: 1189–203. 1978.

**Ivonne M, Rietjens C M, Martena M J, Boersma M G, Spiegelberg W, Alink G M.** Molecular mechanisms of toxicity of important foodborne phytotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research* 49: 131–158. 2005.

**Iyengar V K, Eisner T.** Female choice increases offspring fitness in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 96: 15013–15016. 1999.

**Jain S C, Sharma R.** Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropum ellipticum*. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin* 35: 3487-3489. 1987.

**Jenett-Siems K, Schimming T, Kaloga M, Eich E, Siems K, Gupta M P, Witte L, Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. *Phytochemistry* 47: 1551-1560. 1998.

**Jenett-Siems K, Ott S C, Schimming T, Siems K, Muller F, Hilker M, Witte L, Hartmann T, Austin D F, Eich E.** Ipangulines and minalobines, chemotaxonomic markers of the infrageneric *Ipomoea* taxon subgenus Quamoclit, section Mina. *Phytochemistry* 66: 223-231. 2005.

**Jiménez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Cerqueda E, Saad I.** Fotoadiciones de etanol a 6 $\beta$ -angeloiloxifuranoeremofil-10 $\beta$ H, 9-ona y sus derivados. *Revista de la sociedad Química de México* 43: 106-109. 1999.

**Joseph-Nathan P, Wesener J R, Günther H.** A two-dimensional NMR study of angelic and tiglic acid. *Organic Magnetic Resonance* 22: 190-191. 1984.

**Kelley R B, Seiber J N, Jones A D, Segall D J, Brower L P.** Pyrrolizidine alkaloids in overwintering monarch butterflies (*Danaus plexippus*) from Mexico. *Experientia* 43: 943-946. 1987.

**Kelly H A, Kunec E K, Rodgers M, Robins D J.** Biosynthesis of the seco-pyrrolizidine base otonecine. *Journal of Chemical Research (S)* 358-359. 1989.

**Kelly H A, Robins D J.** Evidence for an immonium ion intermediate in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 329-330. 1988.

**Klitzke C F, Trigo J R.** New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects. Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 313-318. 2000.

**Kovats, E.** Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1 : Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41: 1915-1932. 1958.

**Kuhara K, Takanashi H, Hirono I, Furuya T, Asada Y.** Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia dentate*. *Cancer letters* 10: 117-122. 1980.

**L'Empereur K M, Li Y, Stermitz F R.** Pyrrolizidine alkaloids from *Hackelia californica* and *Gnophaela latipennis*, and *H. californica*-hosted arctiid moth. *Journal of Natural Products* 54: 360-366. 1989.

**Lin, G, Cui Y Y, Hawes E M.** Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine. Firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition* 26:181-184. 1998.

**Lin, G, Cui Y Y, Hawes E M.** Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, an hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metabolism and Disposition* 28:1475-1483. 2000.

**Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel H M, Boppré M, Hartmann T.** The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* 245: 626-636. 1997.

**Macel M, Bruinsma M, Dijkstra S M, Ooijendijk T, Niemeyer H M, Klinkhamer P G L.** Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1493-1508. 2005.

**Maron D M, Ames B N.** Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215. 1983.

**Masters A R.** Pyrrolizidine alkaloids in artificial nectar protect adult ithomiine butterflies from spider predator. *Biotropica* 22: 298-304. 1990.

**Mattocks A R.** Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature* 217:723-728. 1968.

**Mattocks A R, Cabral J R P.** Carcinogenicity of some pyrrolic pyrrolizidine alkaloid metabolites and analogues. *Cancer letters* 17: 61-66. 1982.

**Mattocks, A R.** Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press, London. 1986.

**Mattocks A, Crosswell S, Jukes R.** Identity of a biliary metabolite formed from monocrotaline in isolated, perfused rat liver. *Toxicol* 29: 409-415. 1991.

**Mattocks A, Jukes R.** Detection of sulphur-conjugated pyrrolic metabolites in blood and fresh or fixed liver tissue from rats given a variety of toxic pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters* 63: 47-55. 1992.

**McLean E.** The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharmacological Reviews* 22: 429-83. 1970.

**McLain D K, Shure D J.** Host plant toxins and unpalatability of *Neacoryphus bicrucis* (Hemiptera: Lygaeidae). *Ecological Entomology* 10:291-298. 1985.

**McKey D.** Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* 108: 305-320. 1974.

**Mei N, Heflich R H, Chou M W, Chen T.** Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cII gene of transgenic big blue rats. *Chemical Research and Toxicology* 17: 814-818. 2004.

**Mei N, Guo L, Fu P P, Heflich R H, Chen T.** Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer* 92: 873 – 875. 2005.

**Millar D R.** Checklist of the Scale insects (Coccoidea: Homoptera) of Mexico. *Proceedings of the Entomological Society Washington* 98: 68-86. 1996.

**Miranda C L, Chung W, Reed R E, Zhao X, Henderson M C, Wang J -L, Williams D E, Buhler D R.** Flavin-containing monooxygenase: a major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 178: 546-552. 1991.

**Narada R, Lechuga V.** Estudio ecológico de los insectos de *Senecio praecox* D. C. En el Pedregal de San Angel. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias UNAM. México DF, México. 1971.

**Narberhaus I, Theuring C, Hartmann T, Dobler S.** Uptake and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) adapted and non-adapted to alkaloid-containing host plants. *Journal of Comparative Physiology B* 173: 483-491. 2003.

**Narberhaus I, Theuring C, Thomas Hartmann T, Dobler S.** Time course of pyrrolizidine alkaloid sequestration in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chemoecology* 14:17-23. 2004.

**Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S.** Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecology* 15: 121-125. 2005.

**Naumann C, Hartmann T, Ober D.** Evolutionary recruitment of flavin-dependant monooxygenase for the detoxification of host plant acquired pyrrolizidina alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proceedings of Natural of Academy of Sciences USA* 99: 6085-6090. 2002.

**Ng T B, Liu F, Wang Z T.** Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences* 66: 709-723. 2000.

**Nikaido H, Nakae T.** The outer membrane of gram-negative bacteria. *Advances in microbial Physiology* 20, 163-250. 1979.

**Nikaido H, Vaara M.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 1: 1-32. 1985.

**Nishida R.** Sequestration of plant secondary compounds by butterflies and moths. *Chemoecology* 3/4:127-138. 1995.

**Nishida R.** Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 47:57-92. 2002.



**Nowacki E, Byerrum R U.** A study on the biosynthesis of the *Crotalaria* alkaloids. *Life sciences* 5: 1157-1161. 1962.

**Ober D.** Chemical Ecology of Alkaloids exemplified with the pyrrolizidines. In: *Recent advances in Phytochemistry. Volumen 37. Integrative phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology.* Edited by John T. Romeo. Pergamon Press. Amsterdam. pp 203-230. 2003.

**Ober D, Harms R, Hartmann T.** Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision. *Phytochemistry* 55: 305-309. 2000.

**Olson M E.** Wood, bark, and pit anatomy in *Pittocaulon* (ex *Senecio*, Asteraceae): Water storage and systematics. *Journal of the Torrey Botanical Society* 132: 173-186. 2005.

**Omura T, Sato R.** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 2370-2378. 1964.

**Orr A G, Trigo J R, Witte L, Hartmann T.** Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults against the spider *Nephila maculata* (Araneidae). *Chemoecology* 7: 68- 73. 1996.

**Ortega A, Romero M, Díaz E.** Furanoteremofilanos del *Senecio Praecox*. *Praecoxilina A. Revista Latinoamericana de Química* 6: 136-142. 1975.

**Pasteels J M, Rowell-Rahier M, Randoux T, Braekman J C, Daloze D.** Pyrrolizidine alkaloids of probable host-plant origin in the pronotal and elytral secretion of the leaf beetle *Oreina cacaliae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 55-58. 1988.

**Pasteels J M.** The Value of Defensive Compounds as Taxonomic Characters in the Classification of Leaf Beetles. *Biochemical Systematics and Ecology* 21: 135-142. 1993.

**Pasteels J M, Rowell-Rahier M, Ehmke A, Hartmann T.** Host-derived pyrrolizidine alkaloids in *Oreina* leaf beetles: physiological, ecological and evolutionary aspects. *En: Jolivet PHA, Cox ML (eds) Chrysomelidae biology, vol 2. Ecological studies.* SPB Academic Publishing Amsterdam, pp 213-225. 1996.

**Pasteels J M, Termonia A, Windsor D M, Witte L, Claudine Theuring C, Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloids and pentacyclic triterpene saponins in the defensive secretions of *Platyphora* leaf beetles. *Chemoecology* 11:113–120. 2001.

**Pasteels J M, Theuring C, Windsor D M, Hartmann T.** Uptake and metabolism of [<sup>14</sup>C]rinderine and [<sup>14</sup>C]retronecine in leaf-beetles of the genus *Platyphora* and alkaloid accumulation in the exocrine defensive secretions. *Chemoecology* 13: 55–62. 2003a.

**Pasteels J M, Theuring C, Witte L, Hartmann T.** Sequestration and metabolism of protoxic pyrrolizidine alkaloids by larvae of the leaf beetle *Platyphora boucardi* and their transfer via pupae into defensive secretions of adults. *Journal of Chemical Ecology* 29: 337-355. 2003b.

**Pasteels J M, Hartmann T.** Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in *Oreina* and *Platyphora* leaf beetles: physiological, ecological and evolutionary aspects. *En: New developments in the biology of Chrysomelidae.* Edited by P. Jolivet, J. A. Santiago-Blay and M. Schmitt. SPB Academic Publishing by, The Hague, The Netherlands. pp 677-691. 2004.

**Pelser P B, de Vos H, Theuring C, Beuerle T, Vrieling K, Hartmann T.** Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *Jacobaea* (*Asteraceae*). *Phytochemistry* 66: 1285-1295. 2005.

**Peterson J E, Jago M V.** Toxicity of *Echium plantagineum* (Paterson's Curse). Pyrrolizidine Alkaloid Poisoning in Rats. *Australia Journal of Agriculture Research* 35: 305-315. 1984.

**Prakash A S, Pereira T N, Reilly P E B, Seawright A A.** Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research* 443: 53-67. 1999.

**Qin T-K, Gullan P J.** A cladistic análisis of wax scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae: Ceroplastinae). *Systematic Entomology* 20: 289-308. 1995.

**Quijano L, Calderon J S, Rios T.**  $\alpha$ -Hydroxygeranylfarnesol, a new C25 isoprenoid alcohol, isolated from insect wax. *Chemistry Letters* 11: 1387-1388. 1979a.

**Quijano L, Calderon J S, Rios T.** Structure of ceroplastolic acid: a new sesterterpene isolated from insect wax. *Chemistry & Industry* 17: 592-593. 1979b.

**Quijano L, Veloz R, Calderon J S, Rios T.** Isolation and determination of the structure of albocerol, a new macrocyclic sesterterpene. *Revista Latinoamericana de Química* 6: 196-200. 1975.

**Quijano L, Calderon J S, Rios T.** The structure of ceroplastodiol, a new tricyclic sesterterpene isolated from insect wax. *Experientia* 37: 542-543. 1981.

**Reina M, Mericli A H, Cabrera R, Gonzalez-Coloma A.** Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. *Phytochemistry* 38: 355-358. 1995.

**Reina M, Gonzalez C A, Gutierrez C, Cabrera R, Henriquez J, Villarroel L.** Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. *Phytochemistry* 46: 845-853. 1997.

**Reina M, Gonzalez-Coloma A, Gutierrez C, Cabrera R, Henriquez J, Villarroel L.** Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. *Journal of Natural Products* 61: 1418-1420. 1998.

**Rios T.** Ceroalbolinic acid. A new anthraquinone pigment isolated from *Ceroplastes albolineatus*. *Tetrahedron* 22: 1507-1512. 1966.

**Rios T, Colunga F.** Three new alcohols from insect wax.: ceroplastol I, II, and albolineol. *Chemistry & Industry* 26: 1184-1185. 1965.

**Rios T, Gomez F G.** Albolic acid, a new sesterterpenic acid isolated from insect wax. *Tetrahedron Letters* 34: 2929-2930. 1969.

**Rios T, Perez S C.** Geranylfarnesol, a new acyclic C25 isoprenoid alcohol isolated from insect wax. *Chemical Communications* 5: 214-215. 1969.

**Rios T, Quijano L, Calderon J S.** Albolineol, a sesterterpene with a novel bicyclic skeleton. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 18: 728-729. 1974.

**Rizk A F M.** Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. CRC Press, Boca Raton. 1991.

**Robertson J, Peplow M A, Pillai H.** The synthesis of ( $\pm$ )-heliotridane and (6S,7S)-dihydroxyheliotridane via sequential hydrogen atom abstraction and cyclization. *Tetrahedron Letters* 37: 5825-5828. 1996.

- Rhoades D F, Cates R G.** 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. *In*: Recent Advances in Phytochemistry, Volume 10. Edited by J W Wallace and R L Mansell. New York: Plenum Press. USA. pp 168–213. 1976.
- Robins D J.** Stereochemistry of enzymic processes in the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Experientia* 47: 1118-1122. 1991.
- Robins D J.** Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chemical Society Reviews*. 18: 375-408. 1989.
- Robins D J, Bale M, Crout D H G.** Pyrrolizidine alkaloids. Biosynthesis of monocrotalic acid, the necic acid component of monocrotaline. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 2082-2086. 1974.
- Robinson H, Brettell R D.** Studies in the *Senecioneae* (Asteraceae) I. A new genus, *Pittocaulon*. *Phytologia* 26: 451-453. 1973.
- Röder E.** Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 50: 83-98. 1995.
- Roeder E, Liu K.** Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio integrifolius* var. *fauriri*. *Phytochemistry* 30: 1734-1737. 1991.
- Rothschild M, Aplin R T, Cockrum P A, Edgar J A, Fairweather P, Lees R.** Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths (Lep.) with a discussion on host plant relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 12: 305-326. 1979.
- Rowell-Rahier M, Witte L, Ehmke A, Hartmann T, Pasteels J M.** Sequestration of plant pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid beetles and selective transfer into the defensive secretions. *Chemoecology* 2: 41-48. 1991.
- Rubiolo P, Pieters L, Calomme M, Bicchi C, Vlietinck A, Van den Berghe D.** Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome system. *Mutation Research* 281:143-147. 1992.
- Rzedowski G C de, Rzedowski J y colaboradores.** Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed., 1ª. reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). México, 1406 pp. 2005.
- Saeed H M, Mostafa M H, O'Connor P J, Rafferty J A, Doenhoff M J.** Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms. *FEBS Letters* 519: 205-209. 2002.
- Sander H, Hartmann T.** Site of synthesis, metabolism and translocation of Senecionine N-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 19-31. 1989.
- Schoonhoven L M, van Loon J J A, Dicke M.** Insect plant biology. Second edition. Oxford University press. Great Britain. pp 63-65. 2005.
- Scott J G.** Preparation of microsomes from insects and purification of CYP6D1 from house flies. *Methods in Enzymology* 272: 287-292. 1996.
- Scherrer R, Gerhardt P.** Molecular sieving by the *Bacillum megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology* 107: 718–735. 1971.

**Schmeller T, El-Shazly A, Wink M.** Allelochemical activities of pyrrolizidine alkaloids: interactions with neuroreceptors and acetylcholine related enzymes. *Journal of Chemical Ecology* 23: 399-416. 1997.

**Schulz S, Francke W, Boppré M, Eisner T, Meinwald J.** Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 90: 6834-6838. 1993.

**Seigler D S.** Pyrrolizidine, Quinolizidine and Indolizidine alkaloids. *In: Plant secondary metabolism.* Edited by Kluwer Academic Publishers. United States of America. p 546. 1998.

**Silva K L, Trigo J R.** Structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 637-648. 2002.

**Sivlingham R, Brink N G.** Somatic Mutation Induced by Heliotrine in *Drosophila*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 8: 205-213. 1988.

**Smissen R D.** Asterales (Sunflower). *En: Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0003736]. 1-3. 2002.

**Stamp N.** Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology* 78: 23-55. 2003.

**Stewart M J, Steenkamp V.** Pyrrolizidine Poisoning: A Neglected Area In Human Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 23:698-708. 2001.

**Stirling I R, Freer I K A, Robins D J.** Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. Incorporation of 2-aminobutanoic acid labelled with <sup>13</sup>C or <sup>2</sup>H into the senecic acid portion of rosmarinine and senecionine. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I* 677-680. 1997.

**Svoboda D, Reddy J.** Malignant tumors in rats given lasiocarpine. *Cancer Research* 32: 908-913. 1972.

**Swick R A, Miranda C L, Cheeke P R, Buhler D R.** Effect of phenobarbital on toxicity of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids in sheep. *Journal of Animal Sciences* 56: 887-894. 1983.

**Takabayashi J, Takahashi S.** Role of the scale wax of *Ceroplastes ceriferus* Anderson (Hemiptera: Coccidae) as a defense against the parasitic wasp *Anicetus ceroplastis* Ishii (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Insect behavior* 6: 107-115. 1993.

**Tallarida J R, Murria R B.** Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Second edition. Springer Verlag. New York USA. p 297. 1986.

**Toppel G, Witte L, Riebesehl B, Von Borstel K, Hartmann T.** Alkaloids patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. *Plant Cell Reports* 6:466-469. 1987.

**Trigo J R, Brown Jr. K S.** Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on *Apocynaceae* and *Solanaceae*. *Chemoecology* 1: 22-29. 1990.

**Trigo J R, Witte L, Brown Jr. K S, Hartmann T and Barata L E S.** Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *Journal of Chemical Ecology* 19: 669-679. 1993.

**Trigo J R, Brown Jr. K S, Henriques S A, Barata L E S.** Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. *Biochemical Systematics and Ecology* 24: 181-188. 1996a.

**Trigo J R, Brown jr. K S, Witte L, Hartmann T, Ernst L, Barata LES.** Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in *Apocynaceae* and *Solanaceae* feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 99-123. 1996b.

**Turner B L.** A new species of *Pittocaulon* (Asteraceae, Senecioneae) from Oaxaca, Mexico. *Phytologia* 79 (1): 43-46. 1995.

**Van Dam N M, Verpoorte R, Van Der Meijden E.** Extreme differences in pyrrolizidine alkaloid levels between leaves of *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* 37: 1013-1016. 1994.

**Van Dam N M, Vuister L W M, Bergshoeff C, De Vos H, Van Der Meijden E.** The "Raison d'etre" of pyrrolizidine Alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent Effects against generalist herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 21: 507-523. 1995.

**Van Dam M N, Witte L, Theuring C, Hartmann T.** Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* 39: 287-292. 1995.

**Van der Berghe D A, Vlietinck A J.** Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol.6 "Assays for Bioactivity ". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. pp. 47-71. 1991.

**Veloz R, Quijano L, Calderon J S, Rios T.** Albocerol, a new macrocyclic sesterterpene. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 6: 191-192. 1975.

**Von Nickisch-Roseneck E, Schneider D, Wink M.** Time-course of pyrrolizidine alkaloid processing in the alkaloid exploiting arctiid moth, *Cretonotos transiens*. *Zeitschrift für Naturforschung* 45c: 881-894. 1990.

**Von Nickisch-Roseneck E, Wink M.** Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Chemical Ecology* 19: 1889-1903. 1993.

**Vrieling K, Smit W, Van der Meijden E.** Tritrophic interactions between aphids (*Aphis jacobaeae* Schrank), ant species, *Tyria jacobaeae* L., and *Senecio jacobaea* L. lead to maintenance of genetic variation in pyrrolizidine alkaloid concentration. *Oecologia* 86:177-182. 1991.

**Vrieling K, De Vos H, Van Wijk C A M.** Genetic analysis of the concentrations of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio jacobae*. *Phytochemistry* 32: 1141-1144. 1993.

**Wang H, Ng T B.** Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61: 1-6. 2002.

**Weber S, Eisenreich W, Bacher A, Hartmann T.** Pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. *Phytochemistry* 50: 1005-1014. 1999.

**Wang Yu-P, Yan J, Fu P P, Chou M W.** Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. *Toxicology Letters* 155: 411-420. 2005.

**Weller S J, Jacobson N L, Conner W E.** The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 557-578. 1999.

**White I N.** The role of liver glutathione in the acute toxicity of retrorsine to rats. *Chemical and Biological Interactions* 13: 333–342. 1976.

**Wink M, Schneider D.** Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of the aposematic and alkaloid-exploiting moth *Cretonotos*. *Naturwissenschaften* 75: 524–525. 1988.

**Wink M, Schneider D, Witte L.** Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloid-derived pheromones in the Arctiid moth, *Cretonotos trasiens*: Stereochemical conversion of heliotrine. *Zeitschrift für Naturforschung* 43c: 737–741. 1988.

**Witte L, Ehmke A, Hartmann T.** Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77: 540–543. 1990.

**Witte L, Ernst L, Adam H, Hartmann T.** Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloid-containing *Senecio* species. *Phytochemistry* 31: 559–565. 1992.

**Yamanaka H, Nagao M, Sugimura T.** Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the salmonella/mammalian-microsomet test. *Mutation Research* 68: 211–216. 1979.

**Yan C, Huxtable R.** Quantitation of the hepatic release of metabolites of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127: 58–63. 1994.

**Yan C C, Huxtable R J.** The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicol* 33: 627–634. 1995a.

**Yan C C, Huxtable R J.** Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 130:132–139. 1995b.

## **12. APÉNDICE**

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

#### **METODOLOGÍA**

*Determinación de la actividad antioxidante de los extractos diclorometánico y metanólico de las diferentes especies de Pittocaulon.*

##### *Obtención de los extractos*

Las muestras de flores, tallos y raíces de las cinco especies de *Pittocaulon* recolectadas, previamente secas y molidas se extrajeron con solventes orgánicos de polaridad ascendente: primero se hicieron tres extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posteriormente al mismo material vegetal se le hicieron tres extracciones con MeOH. Ambos extractos fueron llevados a sequedad.

*Capacidad inhibidora del radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) (Bors et al., 1992).*

Para el cernimiento primario se utilizaron concentraciones de 1000 ppm de los extractos disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). Se emplearon como controles positivos el  $\alpha$ -tocoferol y la quercetina. Tres pozos de una placa de ELISA recibieron cada uno 50  $\mu$ l de una solución de extracto y 150  $\mu$ l de una solución etanólica de DPPH 133.33  $\mu$ M (concentración final 100  $\mu$ M). La mezcla se protegió de la luz y se dejó reaccionar por 30 min con agitación constante a 37°C, posteriormente se determinó la densidad óptica

(DO) en un lector de ELISA a 515 nm. La actividad antioxidante frente al radical DPPH se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = ([\text{DOcontrol} - \text{DOproblema}] / \text{DOcontrol}) \times 100$$

$$\text{DOcontrol} = \text{DPPH } 100 \mu\text{M}$$

$$\text{DOproblema} = \text{DPPH } 100 \mu\text{M más sustancia problema}$$

***Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata (TBARS) (Ng et al., 2000).***

*Lipoperoxidación inducida con FeSO<sub>4</sub> y determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

En células de cerebro de rata se evaluó la capacidad de inhibir la lipoperoxidación inducida por FeSO<sub>4</sub> de los extractos de las diferentes especies de *Pittocaulon* ya enunciadas.

En la evaluación primaria (cernimiento) se utilizaron 500 ppm de extracto disuelto en DMSO y como controles positivos quercetina y el  $\alpha$ -tocoferol. Utilizando el método 280/205 se determinó el contenido de proteínas por al homogenizado de cerebro de rata en buffer de fosfatos 4.5 mM (pH 7.4) y después se ajustó a 2.5 mg de proteínas/ml de homogenizado. Se agregaron 400  $\mu$ l del homogenizado de cerebro y 50  $\mu$ l de solución del extracto a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, la mezcla se incubó a 37°C con agitación constante durante 30 min, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ l de una solución salina (0.9 % de NaCl) de FeSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M (concentración final 10  $\mu$ M) y se incubó la mezcla a 37°C con agitación constante durante 60 min. Después, se agregaron 500  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% (mezcla 1:1 de una solución de NaOH 0.05 N y solución de ácido tricloroacético al 30 %), se incubó en hielo durante 5 min, se centrifugó por 10 min



a 10000 rpm a temperatura ambiente, se calentó en baño María a 90°C por 30 min y se tomaron 1000 µl del sobrenadante para determinar su densidad óptica (DO) a 540 nm. El porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de la lipoperoxidación} = [(TBARS_0 - TBARS_1/TBARS_0)] \times 100$$

**TBARS<sub>0</sub>** = nmoles de TBARS por mg de proteína en la reacción control

**TBARS<sub>1</sub>** = nmoles de TBARS por mg de proteína en presencia del extracto

#### ***Determinación de la Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) (Tallarida y Murria, 1986).***

Para la determinación de CI<sub>50</sub> de los extractos activos se realizaron tres o más experimentos independientes. Luego de obtener las curvas se hizo un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Dunett para establecer los valores que presentan una diferencia significativa con respecto al control. Después se graficaron los valores significativos vs el logaritmo de la concentración y de allí se seleccionaron los datos que estaban comprendidos entre un 20 y un 80% de la inhibición máxima, a los cuales se les hizo una regresión lineal de donde se calculó el valor de la CI<sub>50</sub> para cada una de las rectas con la fórmula  $Y=mx+b$ . Posteriormente se obtuvo el promedio y el error estándar de las CI<sub>50</sub>s, siendo éste el valor final.

#### ***Resultados de la inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS)***

Para determinar el porcentaje de actividad inhibitoria de la lipoperoxidación, primero se realizó un cernimiento con los veintiocho extractos a una concentración de 1000 ppm. A esta concentración la gran mayoría de las muestras presentaron una alta

actividad inhibitoria, por lo tanto se decidió disminuir la concentración a la mitad (500 ppm), y tomar como medida de actividad para determinar la  $CI_{50}$ , los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor del 80%. Del número total de extractos, diez no alcanzaron a superar este valor de inhibición, los dieciocho restantes presentaron un porcentaje de inhibición superior al 80%. Casualmente, las muestras más activas fueron los extractos diclorometánicos de raíz de todas las especies analizadas. Asimismo, tres de los extractos de raíces en metanol (*P. praecox* (93.13 %), *P. velatum* (92.0 %) y *P. hintonii* (94.07 %)) presentaron una muy buena actividad inhibitoria a 500 ppm. Por otro lado, todas las muestras de flores extraídas en metanol fueron activas, pero de los extractos de flores en diclorometano sólo el de *P. bombycophole* (88.71%) y el de *P. velatum* (92.98%) mostraron un porcentaje de inhibición considerable. Por último, los extractos de tallos en diclorometano no presentaron una actividad significativa, a diferencia de los de metanol, los cuales, exceptuando los de *P. filare* (61.18%), fueron todos activos. Los resultados obtenidos en el cernimiento se muestran en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS) de los extractos diclorometánico y metanólico obtenidos de tallos, raíces e inflorescencias de las diferentes especies de *Pittocaulon*. \* Extractos que presentaron baja actividad en el cernimiento a 500 ppm.

| Espece                  | Muestra                                | Concentración (ppm) | TBARS (nmol/mg de prot) | % Inhibición  |
|-------------------------|--|---------------------|-------------------------|---------------|
| <b>Control</b>          | -----                                  | -----               | 8.349                   | <b>0.00</b>   |
| <i>P. praecox</i>       | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 500                 | 0.737                   | <b>91.09</b>  |
|                         | Tallos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 5.100                   | <b>38.29*</b> |
|                         | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 5.429                   | <b>32.66*</b> |
|                         | Raíz MeOH                              |                     | 0.582                   | <b>93.13</b>  |
|                         | Tallos MeOH                            |                     | 0.622                   | <b>92.66</b>  |
|                         | Flores MeOH                            |                     | 0.384                   | <b>95.53</b>  |
| <i>P. velatum</i>       | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   |                     | 0.691                   | <b>91.63</b>  |
|                         | Tallos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 5.176                   | <b>37.36*</b> |
|                         | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 0.566                   | <b>92.98</b>  |
|                         | Raíz MeOH                              |                     | 0.678                   | <b>92.00</b>  |
|                         | Tallos MeOH                            |                     | 1.651                   | <b>80.53</b>  |
|                         | Flores MeOH                            |                     | 0.420                   | <b>95.11</b>  |
| <i>P. bombycophole</i>  | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   |                     | 0.580                   | <b>92.98</b>  |
|                         | Tallos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 4.492                   | <b>45.64*</b> |
|                         | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> |                     | 0.910                   | <b>88.71</b>  |
|                         | Raíz MeOH                              |                     | 3.745                   | <b>55.83*</b> |
|                         | Tallos MeOH                            |                     | 0.374                   | <b>95.59</b>  |
|                         | Flores MeOH                            |                     | 0.364                   | <b>95.76</b>  |
| <i>P. hintonii</i>      | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 1.160               | <b>85.96</b>            |               |
|                         | Tallos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 5.950               | <b>27.99*</b>           |               |
|                         | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 4.482               | <b>45.76*</b>           |               |
|                         | Raíz MeOH                              | 0.503               | <b>94.07</b>            |               |
|                         | Tallos MeOH                            | 1.565               | <b>81.54</b>            |               |
|                         | Flores MeOH                            | 1.148               | <b>86.64</b>            |               |
| <i>P. filare</i>        | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 0.994               | <b>87.98</b>            |               |
|                         | Tallos CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 6.096               | <b>26.23*</b>           |               |
|                         | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | n.d.                | n.d.                    |               |
|                         | Raíz MeOH                              | 3.030               | <b>64.26*</b>           |               |
|                         | Tallos MeOH                            | 3.291               | <b>61.18*</b>           |               |
|                         | Flores MeOH                            | n.d.                | n.d.                    |               |
| <b>Control positivo</b> | Alfa tocoferol                         | 430                 | 1.66                    | <b>82.28</b>  |
|                         | Quercetina                             | 3.383               | 1.27                    | <b>86.61</b>  |

Para el cálculo de las concentraciones que inhiban el 50% (CI<sub>50</sub>), se emplearon los extractos que en el cernimiento mostraron una actividad inhibitoria superior al 80%. De las muestras analizadas las que tuvieron mayor actividad fueron las raíces extraídas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los valores de CI<sub>50</sub> para *P. praecox*, *P. velatum*, *P. bombycophole*, *P. hintonii* fueron de 55.54±1.28, 74.46±2.45, 86.19±4.64 y 160.82±5.37, respectivamente. Los extractos de flores en MeOH presentaron valores de CI<sub>50</sub> un poco más altos que los de las raíces en MeOH. Los tallos en MeOH presentaron los valores más bajos de CI<sub>50</sub>. El extracto más activo de todos los que se probaron, fue el de flores en MeOH de *P. bombycophole* con un valor de CI<sub>50</sub> de 39.78±1.97 (**Tabla 25**).

**Tabla 25.** Valores de CI<sub>50</sub> para cada una de las muestras de las especies de *Pittocaulon* que fueron activas en el cernimiento de actividad inhibidora del radical DPPH. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett; los valores  $p \leq 0.01$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

| Especie                | Muestra                                | CI <sub>50</sub> (ppm) |
|------------------------|--|------------------------|
| <i>P. praecox</i>      | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 55.54±1.28             |
|                        | Raíz MeOH                              | 134.78±12.39           |
|                        | Tallos MeOH                            | 224.62±13.71           |
|                        | Flores MeOH                            | 118±5.92               |
| <i>P. velatum</i>      | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 74.46±2.45             |
|                        | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 117.87 ±1.72           |
|                        | Raíz MeOH                              | 254.60±6.45            |
|                        | Tallos MeOH                            | 204.45±20.36           |
| <i>P. bombycophole</i> | Flores MeOH                            | 109.54±2.55            |
|                        | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 86.19±4.64             |
|                        | Flores CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 175.74±8.96            |
|                        | Tallos MeOH                            | 148.78±10.11           |
| <i>P. hintonii</i>     | Flores MeOH                            | 39.78±1.97             |
|                        | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 160.82±5.37            |
|                        | Raíz MeOH                              | 281.06±11.83           |
|                        | Tallos MeOH                            | 300.35±10.09           |
| <i>P. filare</i>       | Flores MeOH                            | 207.39±4.86            |
|                        | Raíz CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | 157.57±6.62            |

**Resultados de la capacidad reductora del radical libre DPPH de los diferentes extractos de *Pittocaulon* spp.**

Únicamente cinco de los veintiocho extractos probados, presentaron una buena actividad inhibitoria del radical libre en el cernimiento a 500 ppm. Las flores en MeOH, con valores de 91.0%, 93.03%, 93.36% y 93.79% para *P. praecox*, *P. hintonii*, *P. velatum* y *P. bombycophole*, respectivamente, fueron los que mayor actividad inhibitoria mostraron. Las flores de *P. velatum* (94.41%) y las de *P. bombycophole* (89.02%) extraídas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> también arrojaron una buena actividad reductora del radical DPPH. De nuevo, como ocurrió en el análisis de TBARS las raíces extraídas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> siguen en actividad a las flores, aunque éstas no son activas en esta prueba como sí lo fueron en la de inhibición de la peroxidación de lípidos. Por último los tallos de *Pittocaulon* spp. extraídos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y en MeOH presentaron una muy baja actividad reductora de radicales (Tabla 26).

**Tabla 26.** Cernimiento de la actividad inhibitoria del radical DPPH para las diferentes muestras de *Pittocaulon*.

| Muestra/especie                            | % Inhibición del radical libre DPPH (1000 ppm) |                   |                        |                    |                  |
|--|--|-------------------|------------------------|--------------------|------------------|
|  | <i>P. praecox</i>                              | <i>P. velatum</i> | <i>P. bombycophole</i> | <i>P. hintonii</i> | <i>P. filare</i> |
| <b>Raíz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>   | 68.07  | 57.27             | 65.37                  | 46.66              | 64.18            |
| <b>Tallos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b> | 37.28  | 36.37             | 70.63                  | 42.27              | 40.48            |
| <b>Flores CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b> | 68.25  | 94.41             | 89.02                  | 62.72              | nd               |
| <b>Raíz MeOH</b>                           | 46.50  | 55.14             | 43.02                  | 46.50              | 23.17            |
| <b>Tallos MeOH</b>                         | 18.31  | 54.99             | 40.72                  | 48.75              | 26.50            |
| <b>Flores MeOH</b>                         | 91.00  | 93.03             | 93.79                  | 93.36              | n.d.             |

En el análisis de la CI<sub>50</sub>, se aprecia un comportamiento similar al presentado por los extractos que fueron activos en TBARS, observándose que la mayor actividad

inhibitoria fue presentada por flores de *P. bombycophole* extraídas en MeOH con un  $CI_{50}$  de  $51.38 \pm 4.08$ . Los otros extractos activos de flores en MeOH de *P. velatum*, *P. praecox* y *P. hintonii*, tuvieron valores de  $69.42 \pm 7.36$ ,  $89.78 \pm 5.82$  y  $120.59 \pm 8.39$ , respectivamente (**Tabla 27**). La determinación de la  $CI_{50}$  para los otros dos extractos activos (*P. velatum* y *P. bombycophole* en  $CH_2Cl_2$ ) no se realizó, debido a que al disolver las muestras en DMSO se formó un precipitado. Estas muestras fueron centrifugadas para evitar algún tipo de interferencia en la lectura, pero se presentó un abatimiento importante de la actividad.

**Tabla 27.** Valores de  $CI_{50}$  para cada una de las muestras de las especies de *Pittocaulon* que fueron activas en el cernimiento de DPPH. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett; los valores  $p \leq 0.01$  se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

| Muestra Flores MeOH    | $CI_{50}$         |
|------------------------|-------------------|
| <i>P. praecox</i>      | $89.78 \pm 5.82$  |
| <i>P. velatum</i>      | $69.42 \pm 7.36$  |
| <i>P. bombycophole</i> | $51.38 \pm 4.08$  |
| <i>P. hintonii</i>     | $120.59 \pm 8.39$ |

### Discusión

Dieciocho de los veintiocho extractos probados, obtenidos de las diferentes especies de *Pittocaulon*, presentaron la capacidad de inhibir la lipoperoxidación inducida con  $FeSO_4$  en macerados de cerebro de rata, con un rango de inhibición que va desde el 80 hasta el 96%. La actividad fue dependiente de la polaridad del solvente empleado para la obtención del extracto. Así, los extractos más activos fueron los de raíces en

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con valores de CI<sub>50</sub> comprendidos entre 55 y 160 ppm. La actividad de estos extractos puede ser atribuida a un compuesto o una mezcla de compuestos que sean comunes en las raíces de todas las especies que comprenden el género *Pittocaulon*.

Con respecto a la actividad inhibidora del radical DPPH, las muestras que presentaron mayor actividad fueron las flores en MeOH de las cuatro especies analizadas. Del mismo modo, las muestras de flores en MeOH, mostraron una buena actividad antioxidante en la técnica de TBARS, siendo la muestra más activa la de flores de *P. bombycophole*. Aunque no se han reportado compuestos de tipo fenólico en ninguna de las plantas que componen el género *Pittocaulon*, la actividad antioxidante e inhibidora del radical DPPH de los extractos metanólicos de las flores, pueda estar mediada por compuestos de este tipo, tales como flavonoides o sus respectivos glicósidos, reportados en el género *Senecio* (Bohm y Stuessy, 2001), además de su reconocida propiedad como agentes antioxidantes. Aunque son pocos los estudios antioxidantes con compuestos previamente reportados para este género, tales como sesquiterpenos del tipo eremofilano y alcaloides pirrolizidínicos, no se deben descartar al momento de buscar posibles responsables de estas actividades.

## **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

*Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos diclorometánico y metanólico de las diferentes especies de Pittocaulon.*

### **METODOLOGÍA**

#### *Obtención de los extractos*

Los extractos fueron preparados de acuerdo al procedimiento descrito previamente para la actividad antioxidante.

*Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana - Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Van der Berghe y Vlietinck, 1991).*

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos, la metodología es la siguiente:

Se empleó como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1). Para el inóculo se tomaron, con un asa de siembra estéril, 4 ó 5 colonias del microorganismo a ensayar y se sumergió en 10 ml de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260). Para cada microorganismo de prueba, se incubó el tubo de cultivo a 37 °C por 24 horas, o hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml). Para la siembra de los microorganismos se sumergió un hisopo en el caldo inóculo y se esparció mediante estrías en por lo menos tres direcciones, sobre la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton (Bioxon 110-1) y se dejó secar. Para solubilizar los extractos se emplearon como solventes cloroformo



(CHCl<sub>3</sub>) y MeOH. Posteriormente, se impregnaron los sensidiscos de 5 mm de diámetro, hechos de papel Whatman N° 5, con 2 mg del extracto a probar. Luego se dejó evaporar el solvente durante 12 horas, para ser colocados manualmente sobre la superficie del agar. Como control positivo se empleó cloramfenicol (25 µg/sensidisco). Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con cada uno de los solventes empleados. Por último las placas con las muestras y las placas con los controles se dejaron incubando a 35 °C por 24 horas. Para interpretar los resultados se midieron, con una regla de calibración en milímetros, las zonas de inhibición. En todos los casos, la prueba se hizo por triplicado y se reportaron los valores promedio en mm.

***Actividad antifúngica - Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Ng, 2002)***

Para los hongos, se utilizó como medio de cultivo estándar agar Czapek (Sigma). El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas petri (100 x 15 mm) con 20 ml de agar de papa dextrosa, en el cual se inocularon las esporas del hongo. Después de que el micelio se ha desarrollado, se colocan los discos previamente impregnados con el extracto a probar, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Se usaron concentraciones de 2 mg de extracto por disco. Los discos se colocaron a una distancia de 30 mm del límite micelial. Las placas se incubaron a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se hubiera desarrollado. Como control negativo se emplearon discos con 10 µl del solvente empleado para disolver los extractos y dejándolos evaporar durante 12 horas. Como control positivo, se utilizaron sensidiscos de Ketoconazol a una concentración de 7 µg/disco. Las pruebas se hicieron por

triplicado. Para considerar un extracto como activo, únicamente se observó si existían zonas de inhibición (Wang y Ng, 2002).

***Microorganismos y medios de cultivo.***

La actividad antibacteriana de cada extracto fue realizada contra las bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* (ATCC27155), *Shigella boydii* (ATCC8700), *Vibrio cholerae* No-01(no patógena), *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Vibrio cholerae* CDC V 12, las cuales corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor. Las bacterias Gram-positivas empleadas fueron: *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* (ATCC12398) y *Staphylococcus epidermidis*. Ambos tipos de bacterias fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán.

Las cepas de hongos utilizadas en los bioensayos de actividad antifúngica fueron: *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme* y *Rhizoctonia solanii* donadas por el Laboratorio de Fisiología vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala y por el Dr. Rodolfo de la Torre.

**Tabla 28.** Extractos de *Pittocaulon* que presentaron actividad antimicrobiana y las bacterias contra las que fueron activos.

| <b>Extracto</b>  | <b>Bacteria</b>  | <b>Halo de inhibición (mm)</b>   |
|--|--|--|
| <i>P. velatum</i> tallos<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> <li>• 7.00</li> </ul>                 |
| <i>P. hintonii</i> tallos<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> </ul>                                 |
| <i>P. hintonii</i> tallos<br>MeOH                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> </ul>                                 |
| <i>P. hintonii</i> raíz<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> <li>• 7.00</li> </ul>                 |
| <i>P. bombycophole</i> flores<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> <li>• 8.00</li> </ul>                 |
| <i>P. bombycophole</i> flores<br>MeOH                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> <li>• 7.00</li> </ul>                 |
| <i>P. bombycophole</i> tallos<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> caso clínico</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> <li>• 8.00</li> <li>• 8.00</li> </ul> |
| <i>P. bombycophole</i> tallos<br>MeOH                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> <li>• 7.00</li> </ul>                 |
| <i>P. bombycophole</i> raíz<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> <li>• 8.00</li> </ul>                 |
| <i>P. bombycophole</i> raíz<br>MeOH                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> </ul>                                 |
| <i>P. praecox</i> tallos<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> <li>• 7.00</li> <li>• 8.00</li> </ul> |
| <i>P. praecox</i> flores<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7.00</li> </ul>                                 |
| <i>P. praecox</i> Flores<br>MeOH                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Vibrio cholerae</i> Tor</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8.00</li> <li>• 7.00</li> </ul>                 |

## Resultados

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de las especies de *Pittocaulon* se muestran en la **Tabla 28**. De esta información se puede apreciar que los extractos probados tuvieron una actividad antibacteriana moderada y no presentaron actividad antifúngica. Trece de los veintiocho extractos probados presentaron actividad antibacteriana. De los extractos activos ocho fueron de muestras en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y las cinco restantes, en MeOH. De las partes analizadas, los extractos de tallos fueron los que mayor actividad antibacteriana presentaron, seguidos de las inflorescencias y por último las raíces. Los extractos de tallos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de cuatro de las cinco especies presentaron actividad antibacteriana. Los extractos más activos fueron los de *P. bombycophole*, ya que todas las muestras mostraron actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano, además todos fueron activos contra *Bacillus subtilis*. Después de *P. bombycophole*, las muestras que presentaron mayor actividad fueron los extractos de *P. praecox* con tres muestras activas (flores CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, tallos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y los de *P. hintonii* (raíz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tallos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH) con igual número. Para *P. velatum*, sólo los tallos extraídos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> presentaron actividad. Los extractos metanólico y diclorometánico de *P. filare* no mostraron ningún tipo de actividad antimicrobiana. Las muestras activas, inhibieron principalmente el crecimiento de bacterias gram positivas (*S. epidermidis*, *S. aureus* y *B. subtilis*). La actividad contra bacterias gram negativas sólo se vio reflejada en la inhibición del crecimiento de *Vibrio cholerae* Tor y una cepa aislada de un caso clínico.

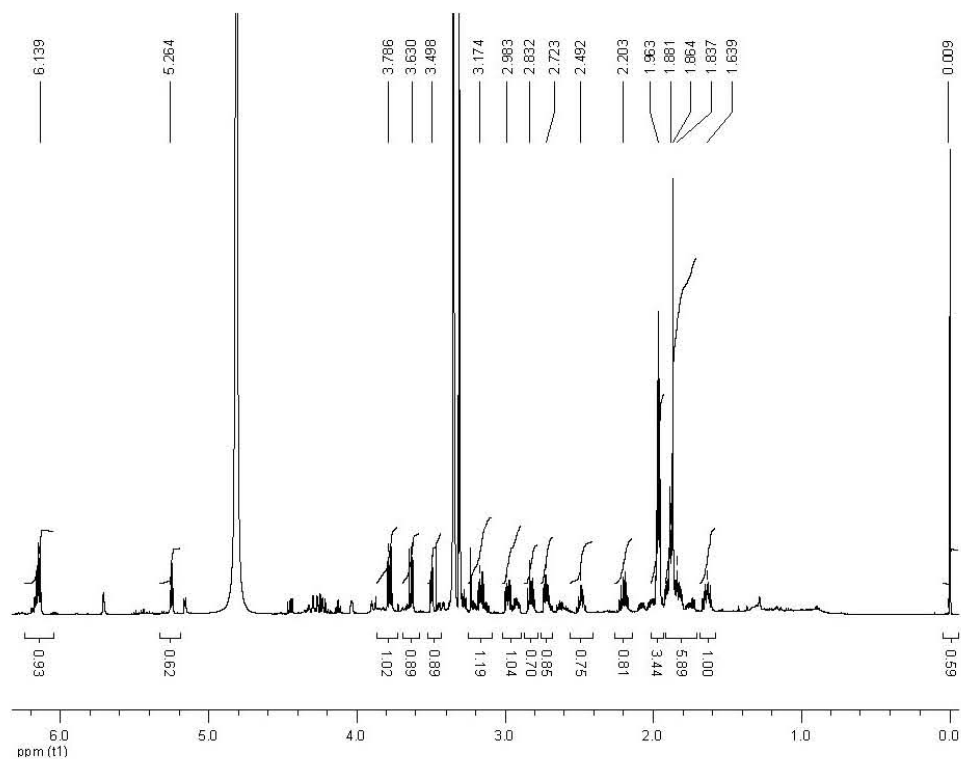
### ***Discusión***

Los resultados obtenidos mostraron que los extractos probados presentaron una actividad antibacteriana moderada, principalmente contra bacterias gram negativas. Las diferencias existentes entre la sensibilidad de las cepas bacterianas en relación con los extractos probados, puede ser debida a la composición estructural de las bacterias. Las bacterias gram-negativas tienen una membrana fosfolipídica con lipopolisacáridos, lo que hace la pared celular impermeable a solutos lipofílicos (Nikaido y Vaara, 1985). Por otro lado, las bacterias gram-positivas pueden ser más susceptibles, debido quizás, a que solo tienen una capa de peptoglicanos externa, la cual no es una barrera de permeabilidad efectiva (Scherrer y Gerhardt, 1971; Nikaido et al., 1979; Cimanga et al., 2002).

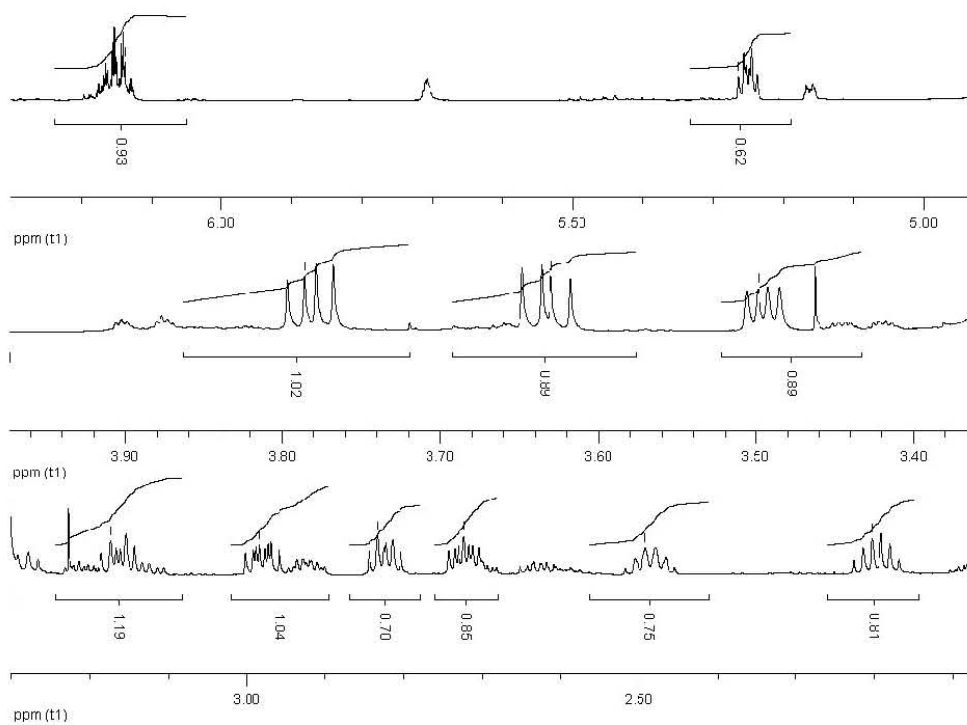
Estudios fitoquímicos realizados previamente en especies del género *Senecio* y *Pittocaulon*, mostraron como principales metabolitos, alcaloides pirrolizidínicos y sesquiterpenos del tipo furanoeremofilano. Para *Pittocaulon*, los extractos diclorometánicos fueron los que presentaron mayor actividad. De igual manera, de todos los tejidos probados, los tallos fueron los más activos. Acorde con la metodología de extracción, ambos tipos de compuestos, alcaloides y sesquiterpenos, pueden ser los responsables de tal actividad, debido a que se ha reportado su presencia en tallos y pueden ser extraídos con solventes de mediana polaridad como el diclorometano. Adicionalmente, para este tipo de compuestos se ha reportado una actividad antimicrobiana moderada (Jain y Sharma, 1987; Reina et al., 1995; Reina et al., 1997; Reina et al., 1998; Garduño-Ramírez et al., 2001; Hol y Van Veen, 2002). La actividad

antibacteriana también puede ser atribuida a otro tipo de sustancias, permitiendo pensar en un efecto sinérgico dado por la mezcla de diferentes clases de compuestos.

## **ESPECTROS**

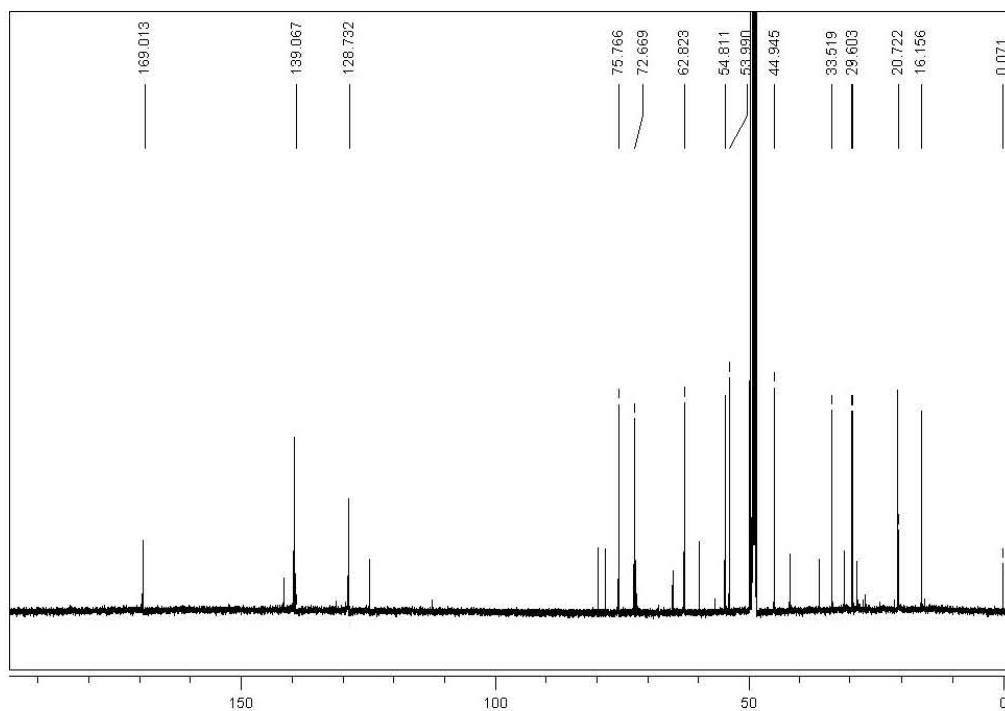


**Espectro 1.** RMN de protón del 7-angeloil-dihidroxi-heliotridano.

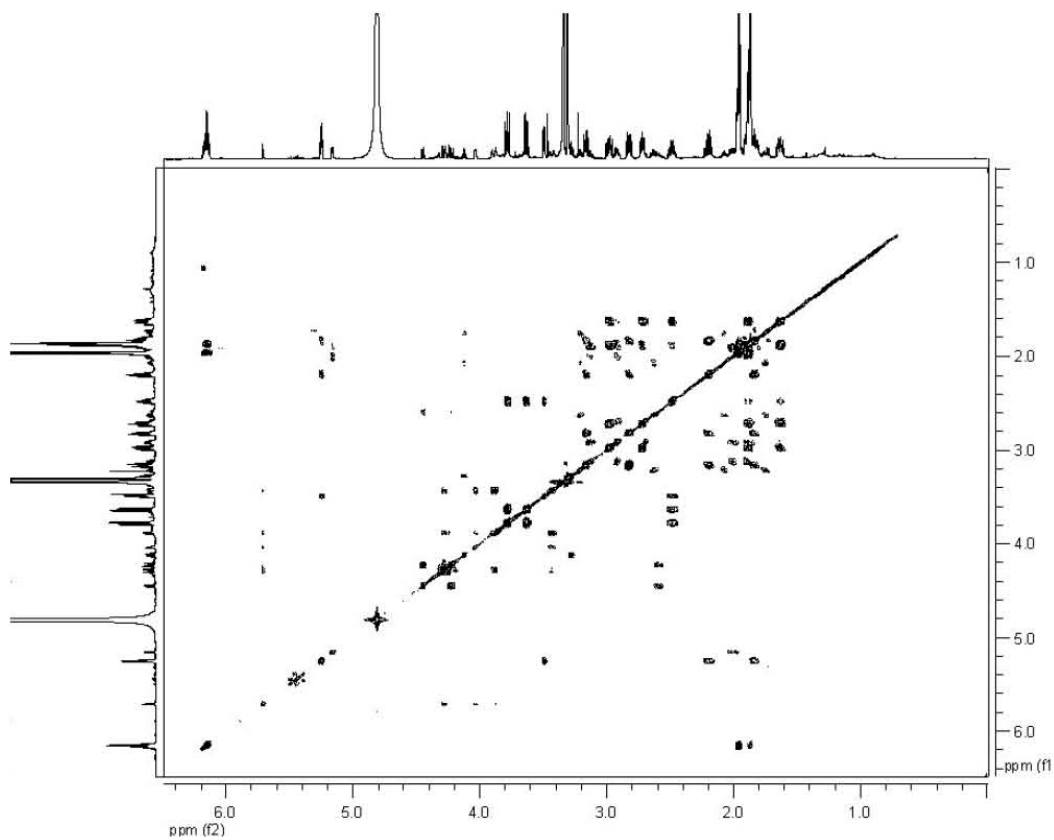


**Espectro 2.** Ampliación del RMN de protón del 7-angeloil-dihidroxi-heliotridano.

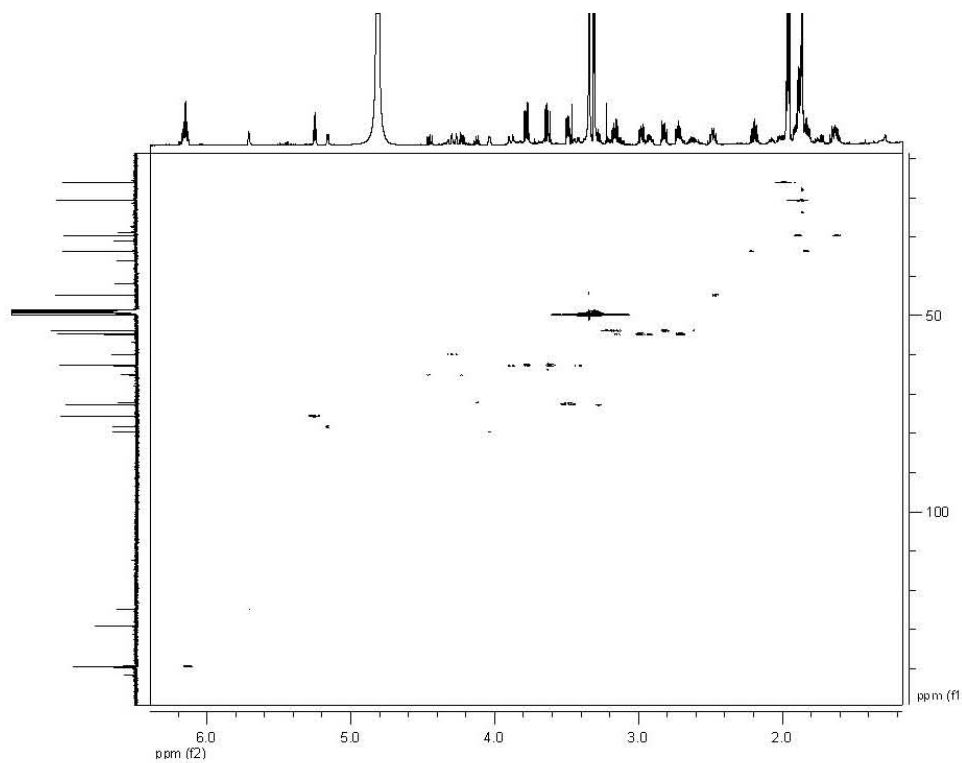




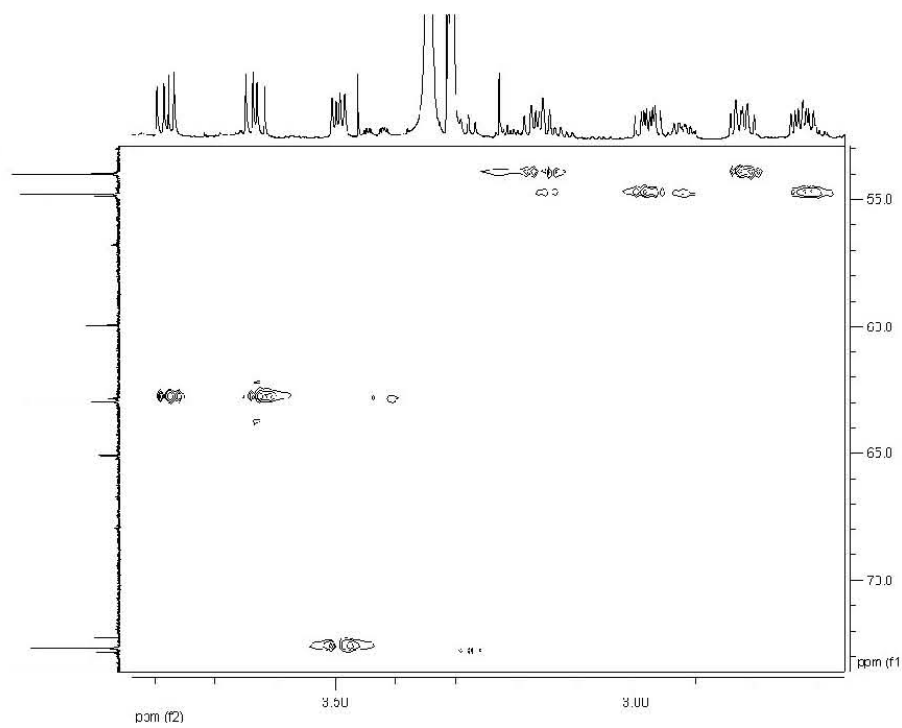
**Espectro 3.** *RMN de  $^{13}C$  del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano.*



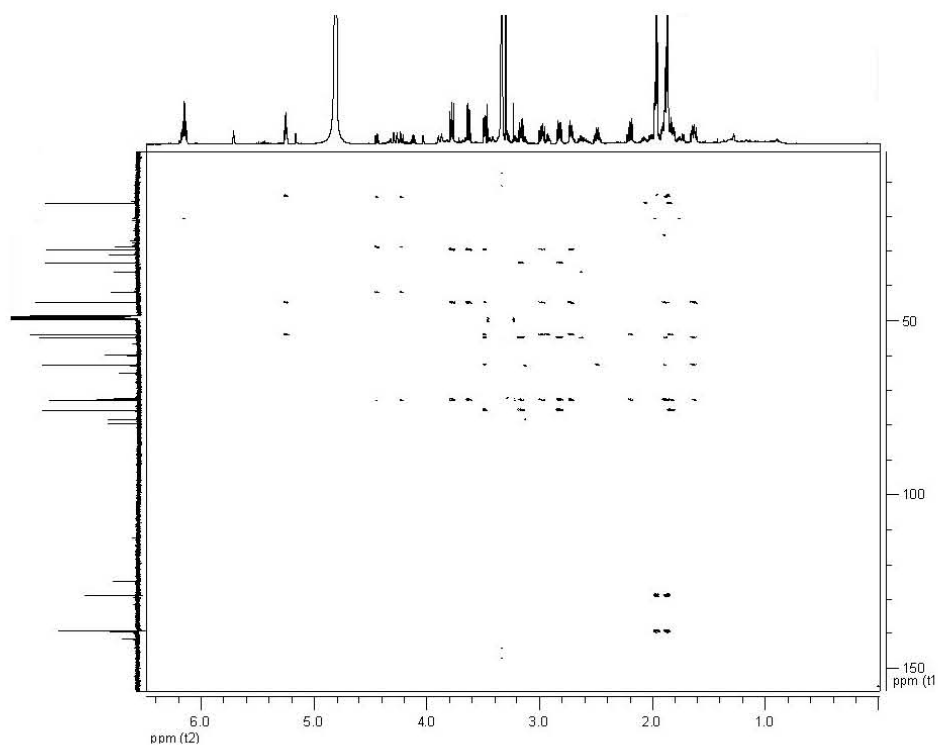
**Espectro 4.** *COSY H-H del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano*



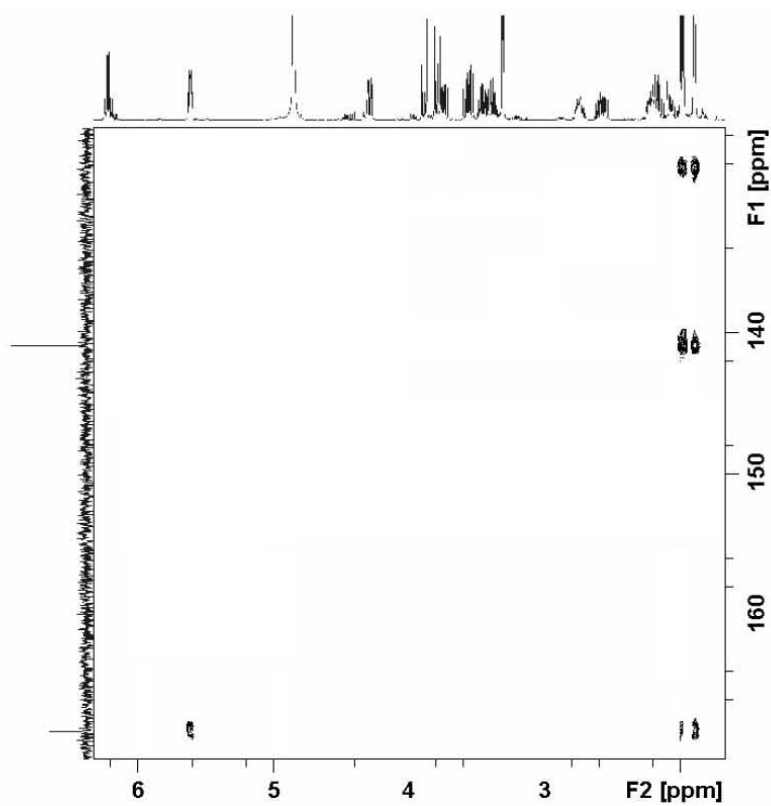
**Espectro 5.** *HSQC del 7-angeloil-dihydroxiheliotridano*



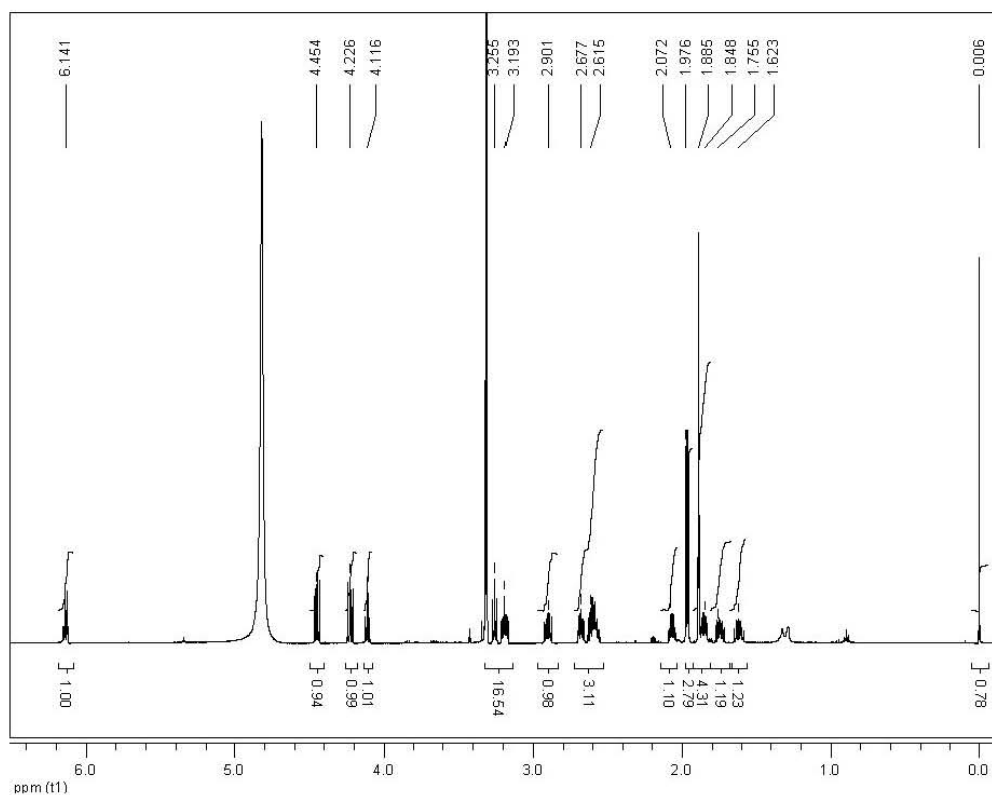
**Espectro 6.** *Ampliación del HSQC del 7-angeloil-dihydroxiheliotridano*



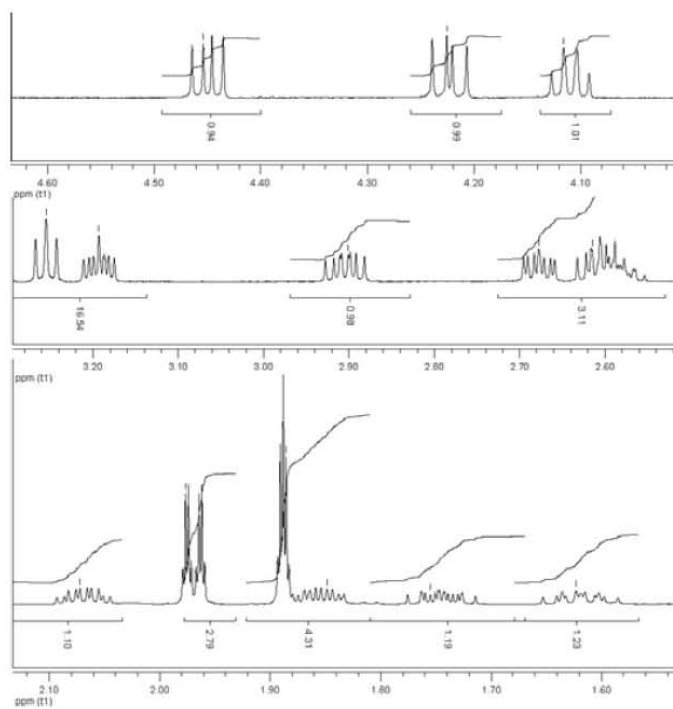
**Espectro 7.** *HMBC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano*



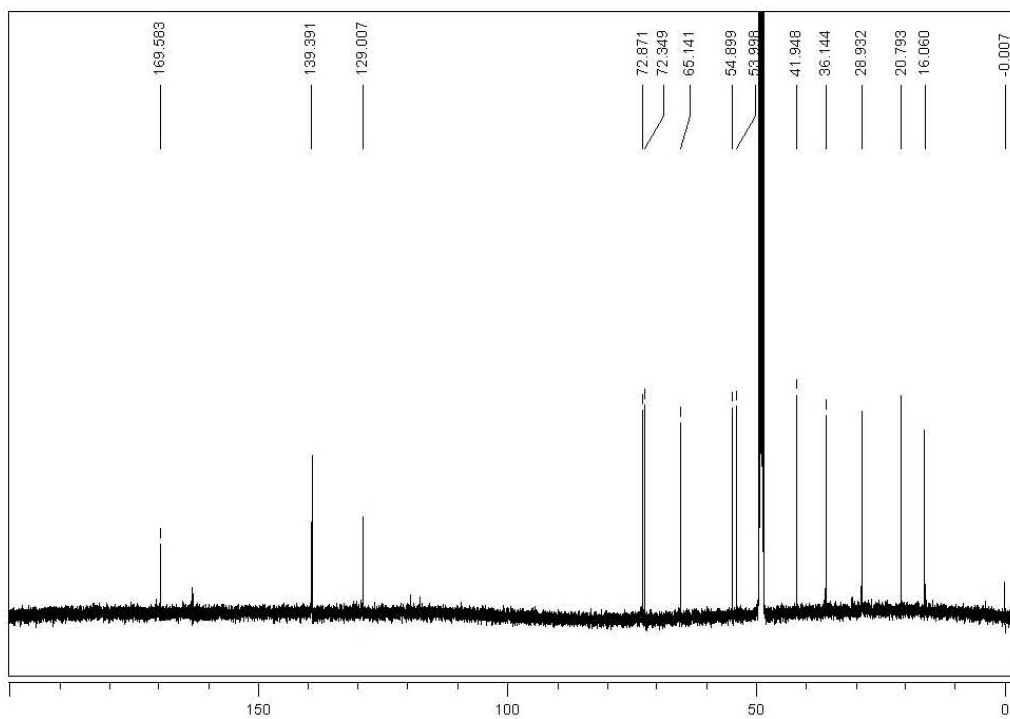
**Espectro 8.** *Ampliación del HMBC del 7-angeloil-dihidroxiheliotridano*



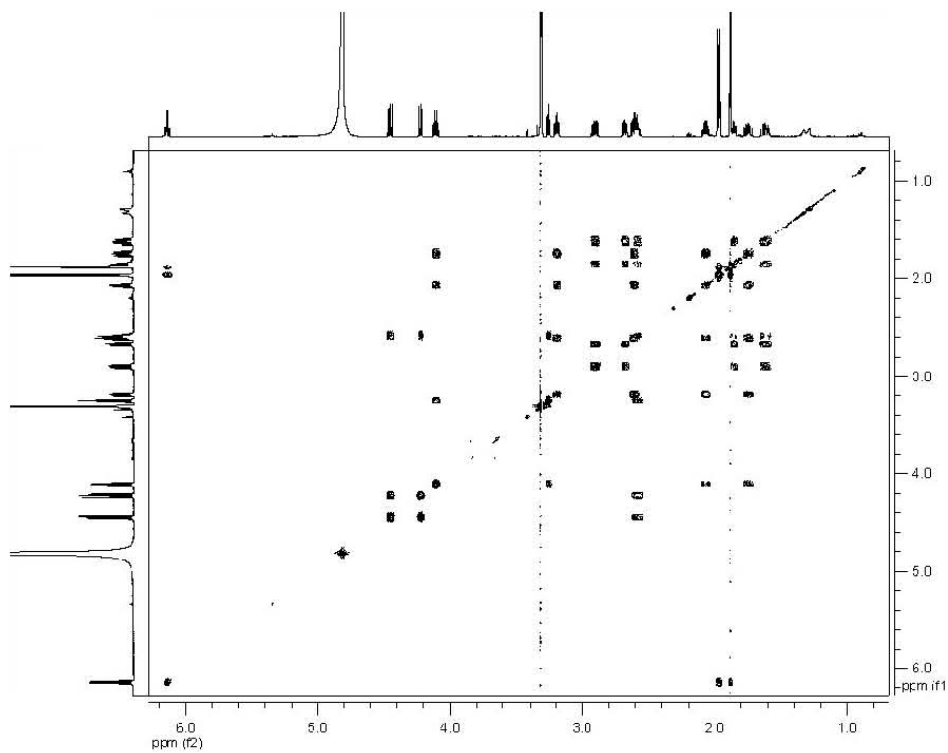
**Espectro 9.** *RMN de protón del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano*



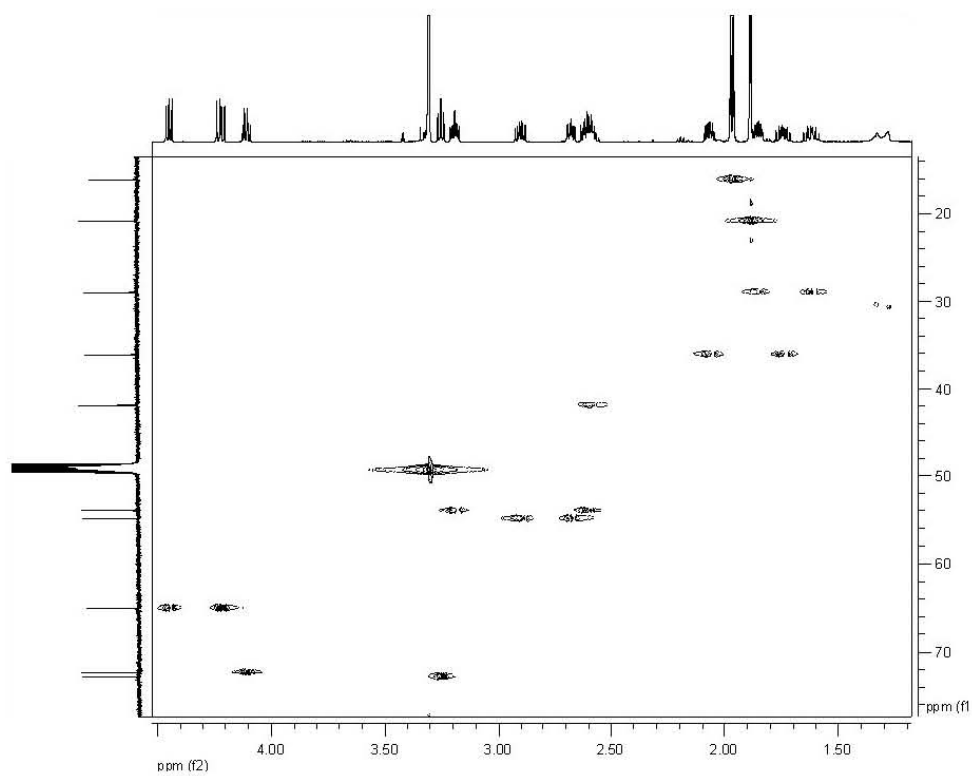
**Espectro 10.** *Ampliación del RMN de protón del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano*



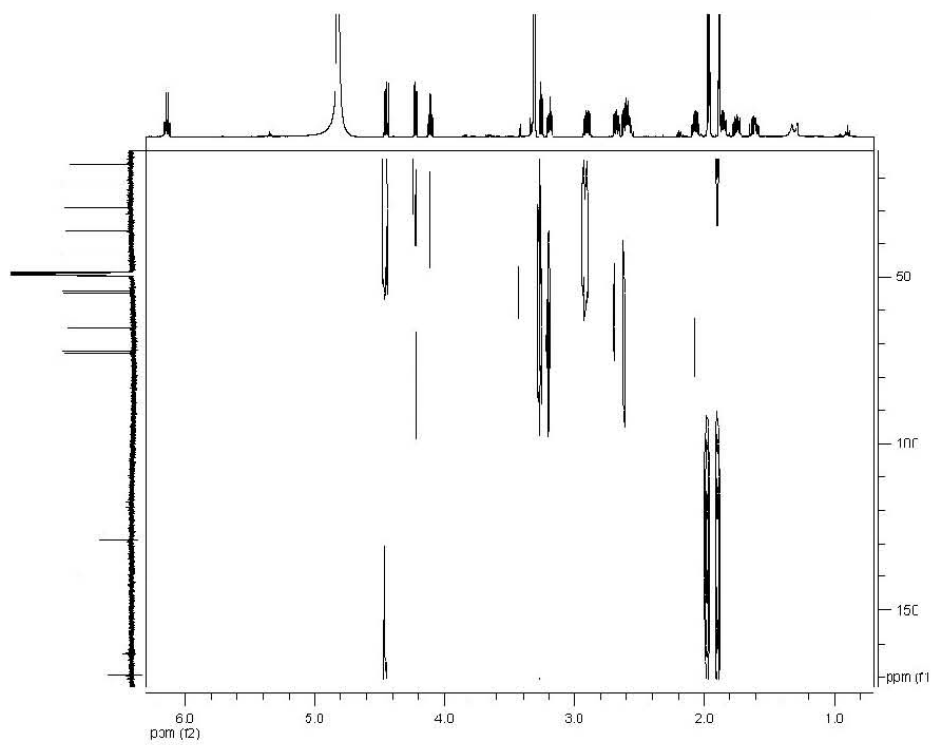
**Espectro 11.** *RMN de Carbono 13 del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano*



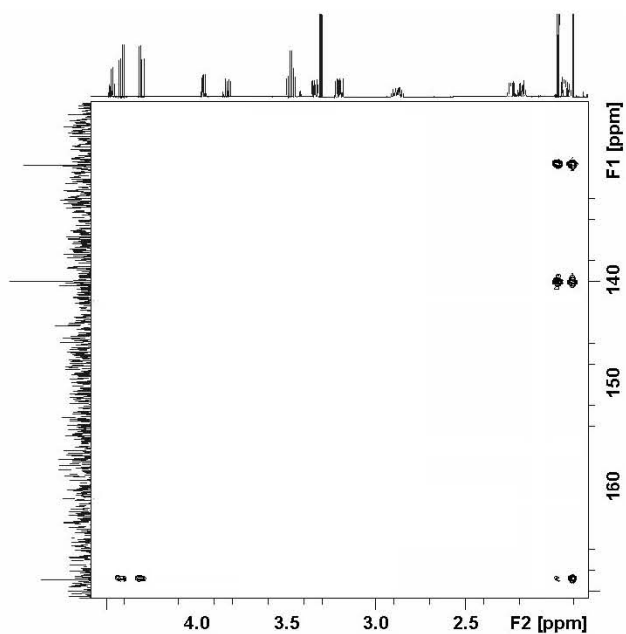
**Espectro 12.** *COSY H-H del 9-angeloil-dihidroxiheliotridano*



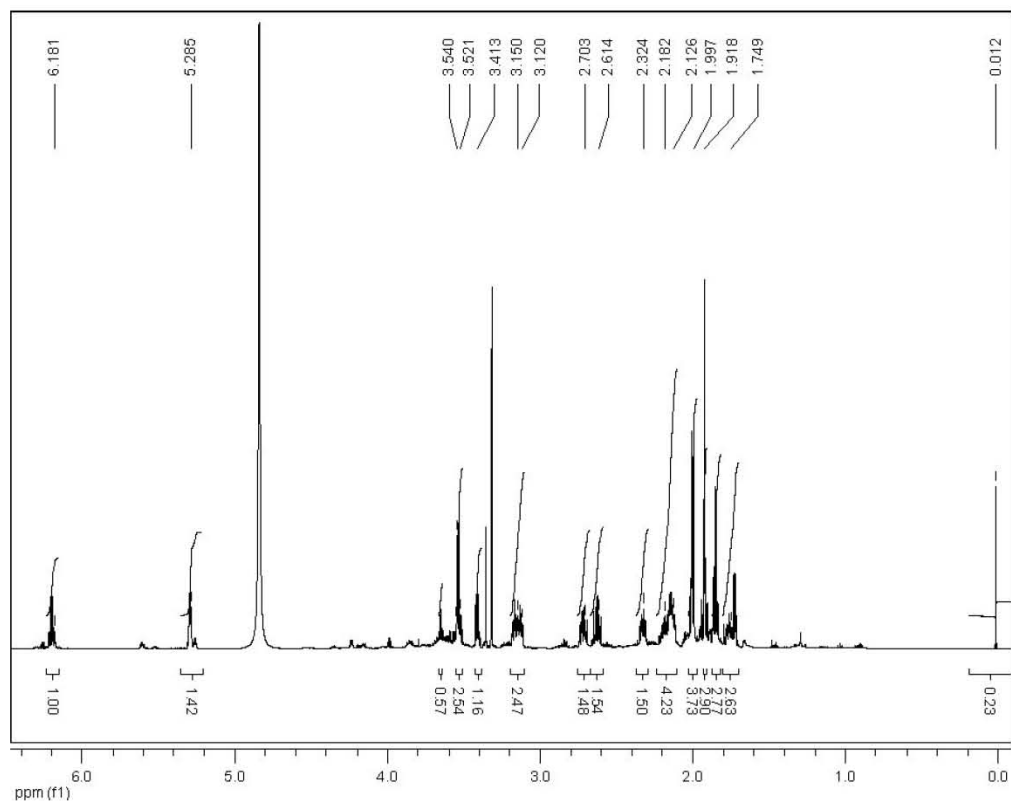
**Espectro 13.** *HSQC del 9-angeloil-dihydroxiheliotridano*



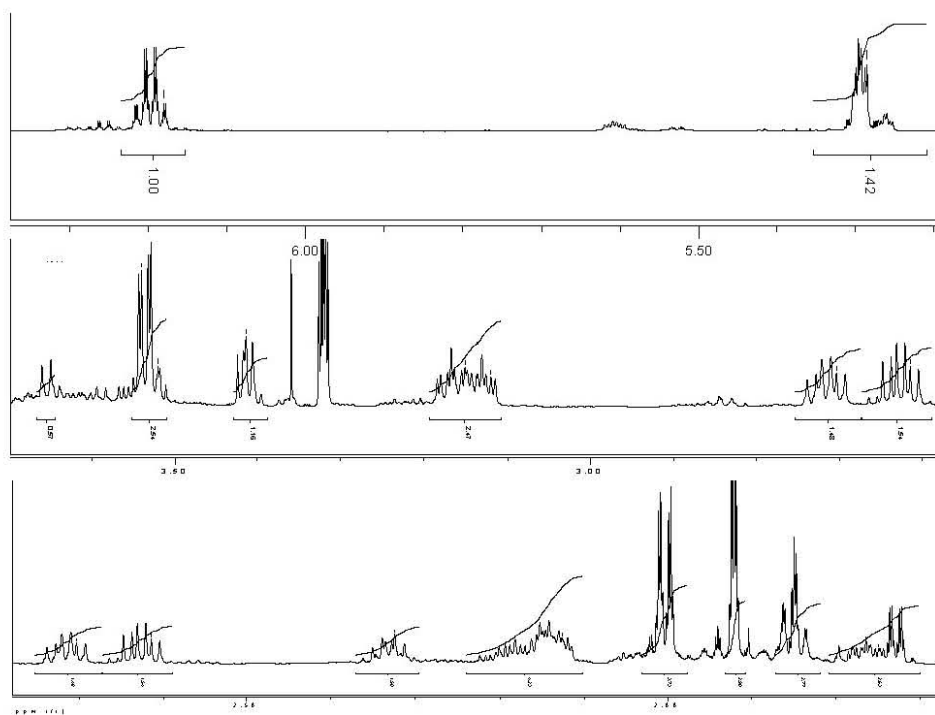
**Espectro 14.** *HMBC del 9-angeloil-dihydroxiheliotridano*



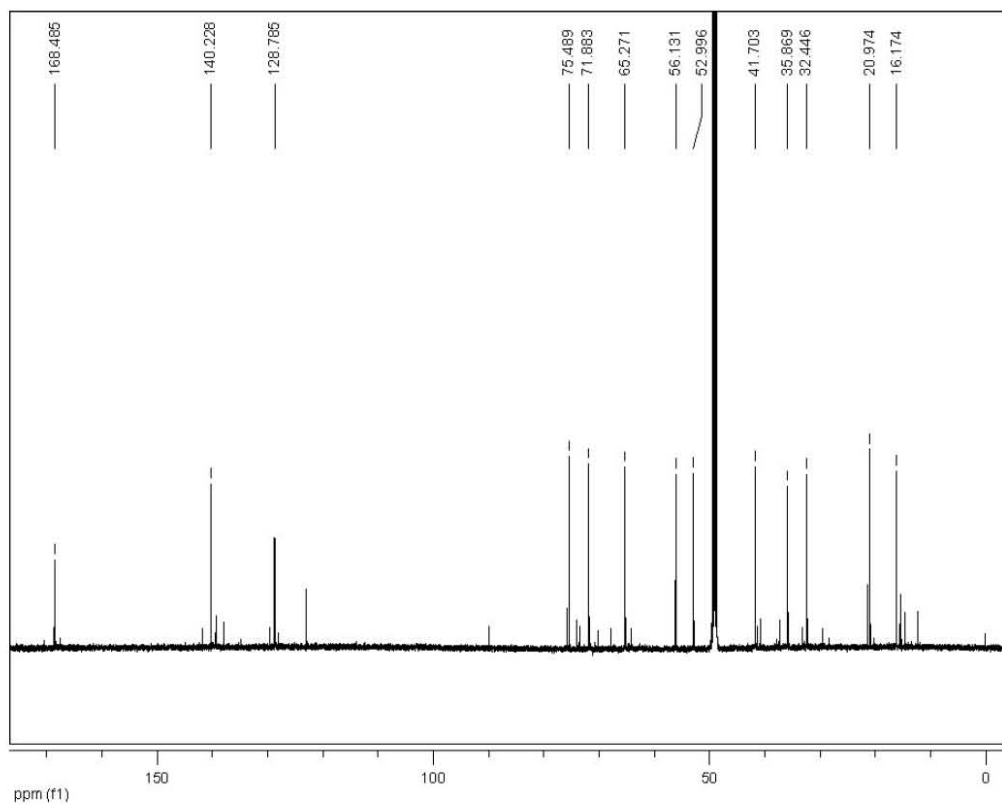
**Espectro 15.** Ampliación del HMBC del 9-angeloil-dihydroxiheliotridano



**Espectro 16.** RMN de protón de la 7-angeloil-turneformicina

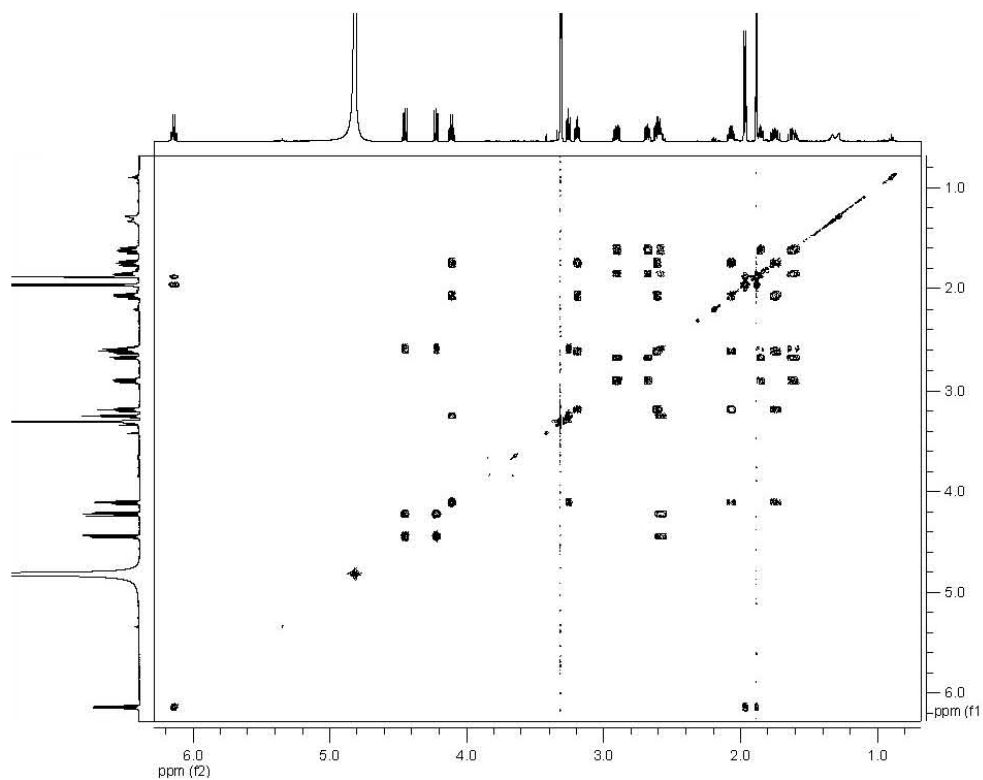


**Espectro 17.** Ampliación del RMN de protón de la 7-angeloil-turnefordina

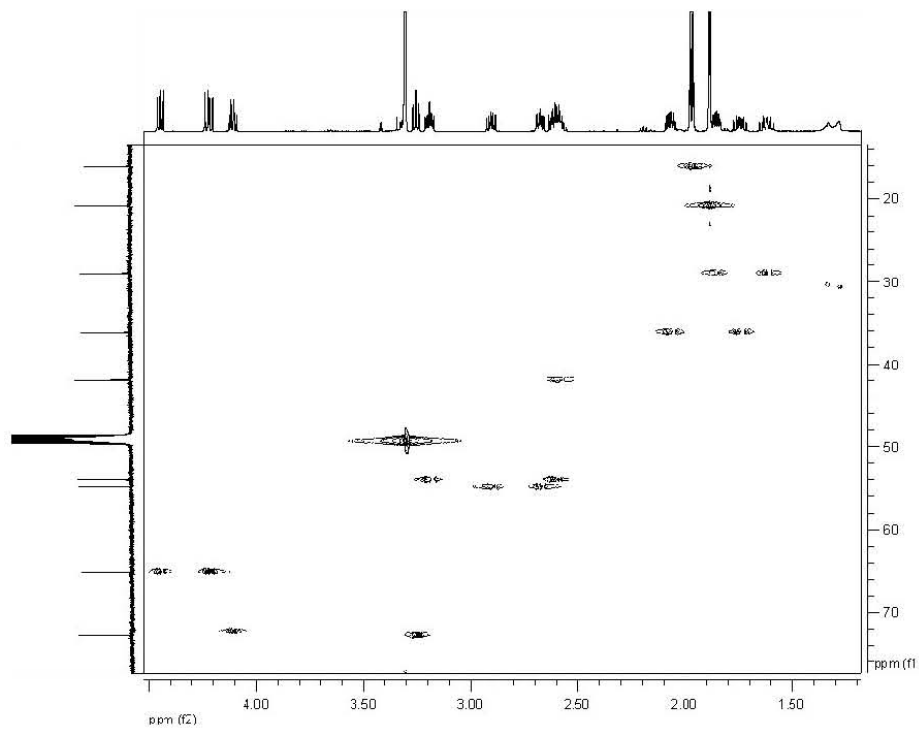


**Espectro 18.** RMN de Carbono 13 de la 7-angeloil-turnefordina

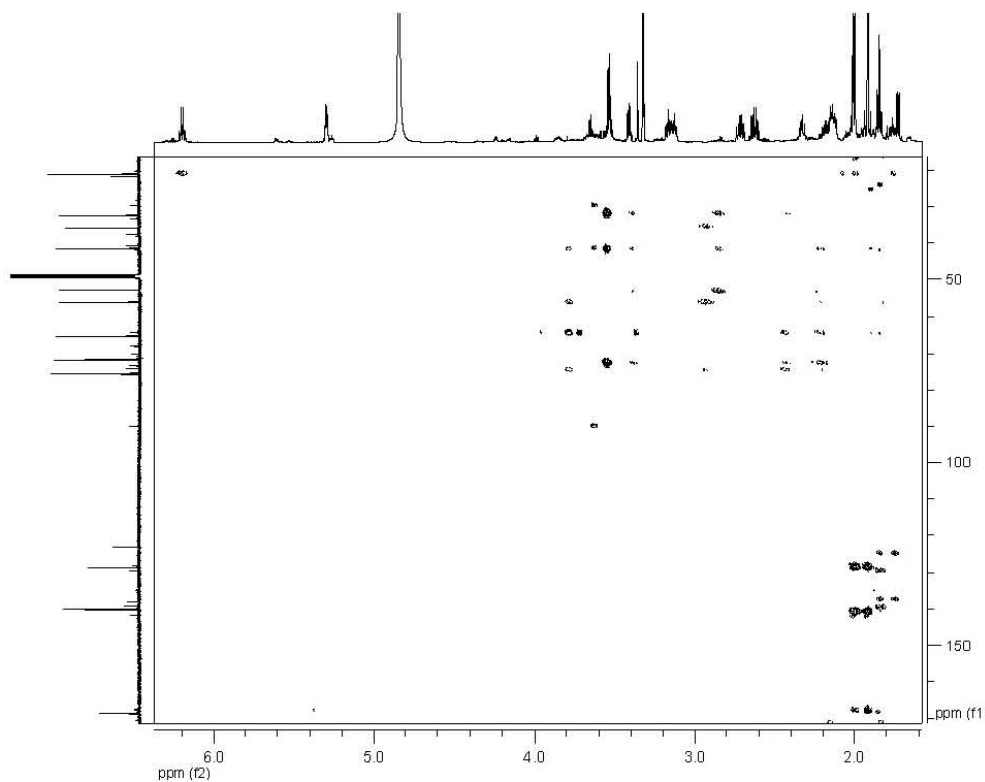




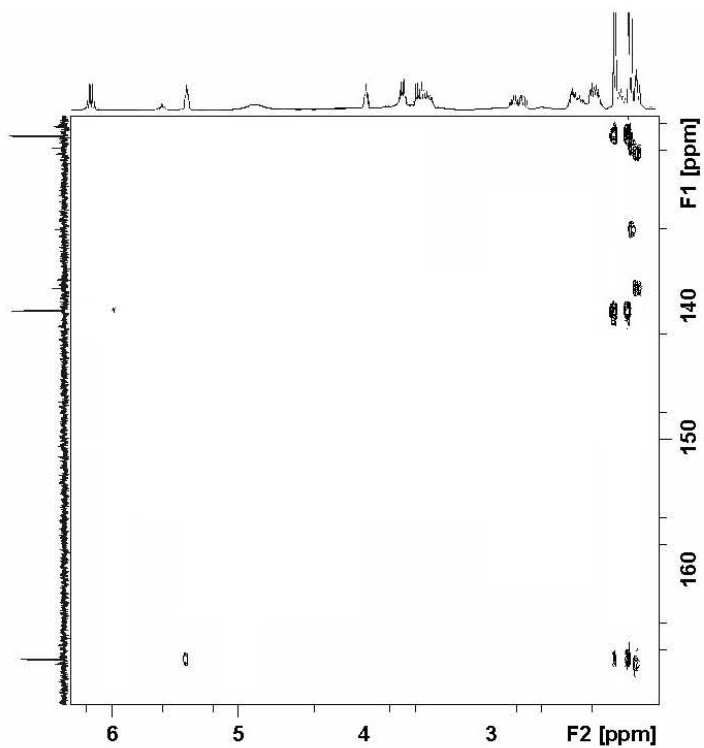
**Espectro 19.** *COSY* de la 7-angeloil-turneforcidina



**Espectro 20.** *HSQC* de la 7-angeloil-turneforcidina



Espectro 21. HMBC de la 7-angeloil-turneformicina



Espectro 22. Ampliación del HMBC de la 7-angeloil-turneformicina

**ARTÍCULO**

## *Ceroplastes albolineatus*, the first scale insect shown to sequester pyrrolizidine alkaloids from its host-plant *Pittocaulon praecox*

Juan Camilo Marín Loaiza<sup>1</sup>, Carlos L. Céspedes<sup>1,2</sup>, Till Beuerle<sup>3</sup>, Claudine Theuring<sup>3</sup> and Thomas Hartmann<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitoquímica, UBIPRO. FES Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. De Los Barrios 1, Tlalnepantla 54090. Estado de Mexico, México

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Depto. Ciencias Básicas, Universidad del Bio-Bio. Av. Andres Bello s/n, Casilla 447. Chillán, Chile

<sup>3</sup>Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig, Mendelssohnstrasse 1, D-38106 Braunschweig, Germany

**Summary.** The occurrence of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in *Pittocaulon* (ex *Senecio*) *praecox* (Asteraceae) a species endemic to Mexico was established. The above-ground plant organs contain the 1,2-saturated monoester 7-angeloyl-dihydroxyheliotridane together with a small proportion of its 9-angeloyl isomer as major alkaloid. The monoesters are accompanied by the macrocyclic otonecine derivative senkirkine. Roots contain only related macrocyclic PAs with senecionine, senkirkine and platyphylline as major components; monoesters are absent. The broom-like succulent stems of *P. praecox* are infested by the scale insect *Ceroplastes albolineatus* conspicuously visible by its huge wax cover. All life-history stages, i.e. females, eggs, first instar nymphs (crawlers) and the wax cover were found associated with PAs. The measured PA concentrations clearly indicate sequestration. The highest PA concentrations (mg / g dry weight) reached are: mature females, 0.44; eggs, 0.58; crawlers, 0.37; wax cover, 0.08. The host plant as well as in the infesting scale insect contain the PAs exclusively as free bases. As a phloem-feeder *C. albolineatus* must acquire the PAs with the ingested phloem sap. This appears plausible since in *Senecio* species PA are transmitted and circulated through the phloem path. It is suggested that PAs may protect particularly the crawlers as the most endangered stage in the life-cycle of the scale insect.

**Key words.** *Pittocaulon praecox* – Asteraceae – *Ceroplastes albolineatus* – Homoptera (Coccidae) – pyrrolizidine alkaloid – sequestration – phloem-feeder – chemical defense

### Introduction

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are plant secondary constituents assumed to play an important role in plant chemical defense, particularly against insect herbivores (Hartmann 1999; Eisner *et al.* 2002; Hartmann 2004). PAs are found scattered within the angiosperms. Most prominent families with PA-containing genera are the Asteraceae (e.g., *Senecio*, *Eupatorium*), the Boraginaceae (e.g., *Heliotropium*),

Apocynaceae (e.g., *Parsonia*, *Prestonia*), Fabaceae (mainly *Crotalaria*) and Orchidaceae (e.g., *Phalaenopsis*) (Hartmann & Witte 1995). These taxa contain a rich structural diversity of more than 400 PAs. Some insects that became adapted to PA-containing plants evolved the ability to recruit this plant defense and integrate it into their own defenses against predators or parasitoids. The ability to sequester PAs appears to be phylogenetically widespread among insects. Within the Coleoptera several leaf beetles concentrate plant-acquired PAs in their exocrine defense secretions (Pasteels & Hartmann 2004) and flea beetles of the genus *Longitarsus* sequester PAs from their plant hosts (Dobler *et al.* 2000). In the Lepidoptera sequestration of PAs is associated with evolutionary radiation within the danaine and ithomiine butterflies (Nymphalidae) and arctiid moths (Trigo *et al.* 1996; Nishida 2002; Conner & Weller 2004). Single examples of sequestration are known from the Orthoptera, i.e. the grasshopper *Zonocerus variegatus* (Bernays *et al.* 1977; Biller *et al.* 1994), and Hemiptera, i.e. the Brazilian bug *Largus rufipennis* (Klitzke & Trigo 2000). In the Homoptera the phloem-sucking aphid *Aphis jacobaeae*, sequesters PAs from *Senecio* species like *S. jacobaea*, *S. silvaticus* and *S. inaequidens* (Witte *et al.* 1990).

Here we report on another example of PA sequestration within the Homoptera but this time not of an aphid but a scale insect, i.e. *Ceroplastes albolineatus* (Coccidae) living on *Pittocaulon* (ex *Senecio*) *praecox* (Asteraceae). The genus *Pittocaulon* is endemic to Mexico; it comprises five species and has been segregated from the huge cosmopolitan genus *Senecio*. This segregation is supported by means of classical methods (Robinson & Brettell 1973) as well as by molecular phylogenetic techniques (Bain & Golden 2000). *P. praecox* is a shrub or small tree with broomstick-like succulent branches. The stems of *P. praecox* are often infested by *C. albolineatus*, easily recognizable by the thick clusters of wax that cover the scales (Fig. 1). *C. albolineatus* develops on the sap of the *P. praecox* stems. It has two generations per year Narada & Lechuga (1971). The first begins in spring (March-May) when the newly hatched crawlers attach to the stems and lasts until July-August when the eggs are laid. The second generation lasts from end of fall (September-October) until February. Adult females mature in May-July (first generation), December-January (second generation)

Correspondence to: Thomas Hartmann, e-mail: t.hartmann@tu-bs.de and Carlos L. Céspedes, e-mail: cespedes\_leonardo@yahoo.com