

## ACTIVIDAD GIBERÉLICA DE LOS COMPUESTOS DITERPÉNICOS DERIVADOS DE KAURENO AISLADOS DE *Espeletiopsis santanderensis* Cuatr.

### GIBERELIC ACTIVITY OF DITERPENS COMPOUNDS DERIVATIVES OF KAURENES ISOLATED FROM *Espeletiopsis santanderensis* Cuatr.

Rubén Torrenegra<sup>1</sup>, Dora Luz Gómez<sup>1</sup> y Alba Nohemi Téllez<sup>1</sup>

#### Resumen

De la *Espeletiopsis santanderensis* (Compositae) fueron aislados e identificados cinco derivados de ent-kaureno a los que se les evaluó su actividad giberélica empleando el bioensayo del endospermo. El compuesto GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) fue usado como referencia a concentraciones de  $5 \times 10^{-6}$  a  $5 \times 10^{-1}$  ppm. El 16 $\alpha$ -17-19-ent-kauranotriol a 200 ppm presentó mayor actividad con relación a los demás compuestos ensayados: 16 $\alpha$ -17-ent-kauranodiol, ácido kaur-16-en-19-oico, kaur-16-en-19-al y tetrachirina, con porcentajes de 73.1, 61.9, 35.9 y 10.3, respectivamente.

*Palabras clave:* *Espeletiopsis*, Asteraceae, tetrachirina, ent-kaurenos, actividad giberélica, fitohormonas.

#### Abstract

From *Espeletiopsis santanderensis* (Compositae) were isolated five ent-kaurene derivatives and its growth-regulatory activities were evaluated by using the barley endosperm bioassay. The compound GA<sub>3</sub> was used as reference at concentrations of  $5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-1}$  ppm. The 16 $\alpha$ -17-19-ent-kauranetriol at 200 ppm showed a higher activity in comparison with the compounds: 16 $\alpha$ -17-ent-kauranediol, kaur-16-en-19-oic acid, kaur-16-en-19-al and tetrachyrine with percentages of 73.1, 61.9, 35.9 and 10.3, respectively.

*Key words:* *Espeletiopsis*, Asteraceae, tetrachyrine, ent kaurenes, giberelic activity, phytohormones.

## INTRODUCCIÓN

El estudio químico del género *Espeletiopsis* (Compositae) presenta especial interés desde el punto de vista taxonómico y biológico por la posible actividad giberélica que presentan algunos de sus metabolitos secundarios. Compuestos diterpénicos derivados del ent-kaureno son conocidos como precursores de giberelinas (Guisalberti, 1997; Sembdener, 1980; Téllez, 1990), siendo las giberelinas muy importantes dentro de las plantas, ya que son fitohormonas que están involu-

cradas en la ejecución de los procesos fisiológicos de crecimiento, diferenciación y desarrollo (Davis, 1987).

Para demostrar la actividad giberélica de los extractos de diclorometano, etanólico y compuestos aislados de las hojas de *Espeletiopsis santanderensis* se empleó el método del endospermo de cebada. Su base fisiológica es la inducción de  $\alpha$ -amilasa producida por endospermos

Recibido: septiembre de 2000; aprobado para publicación: febrero de 2001.

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, Colombia. E-mail: rtorrene@javeriana.edu.co.

desembrionados, al responder en cantidades proporcionales a las concentraciones de giberelinas aplicadas (Weaver, 1976).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** La *Espeletopsis santanderensis* se recolectó en el páramo del Almorzadero (departamento de Santander del Sur, municipio de Tona, corregimiento de Berlín, a una altura de 3.450 msnm) y fue depositado en el Herbario Nacional de Colombia bajo el número de radicación 407557.

**Aislamiento.** A 700 g de hojas secas y molidas se les realizó una extracción tipo soxhlet con diclorometano y etanol. El extracto de diclorometano se floculó con una solución de etanol al 50% y el extracto etanólico con agua destilada.

**Identificación.** A 4 g del extracto de diclorometano se le realizó una cromatografía en columna con sílica gel G 60 (56.4 g). La muestra se eluyó con mezclas de éter de petróleo-diclorometano en proporciones 10:1, 10:1.5, 10:2, 8:2, 7:3, 6:4 y 1:1, diclorometano y mezclas de diclorometano-metanol (9.5:0.5; 9.1:0.9). De las mezclas éter de petróleo-diclorometano se obtuvieron los compuestos I, II y III. Los compuestos IV y V se obtuvieron en mezclas de diclorometano-metanol.

La identificación de estos compuestos se realizó por medio de parámetros fisicoquímicos y métodos espectrocópicos I.R modelo 1430 Perkin Elmer; RMN  $^1\text{H}$  (90, 400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (22.5, 100 MHz) en un Jeol FX 90 Q y un Bruker AMX-400, respectivamente. Como referente interno, (TMS).

**Evaluación de la actividad giberélica.** A los extractos de diclorometano, etanólico y compuestos diterpénicos derivados del ent-kaureno aislados de las hojas de *Espeletopsis santanderensis* (I, II, III, IV y V) se les determinó la actividad reguladora de crecimiento empleando el bioensayo del endospermo de cebada (*Hordeum vulgare* cv L-4/T97) propuesto por el doctor M.

Pinto de la Universidad de Santiago de Chile (Pinto, 1998, com. pers.). El método utilizado es una modificación del protocolo establecido por Jones (1967).

**Tratamiento del grano.** Se hicieron germinar 700 granos de cebada y se les cortó transversalmente la parte del embrión. Se sumergieron los semigranos en hipoclorito de sodio al 1% durante veinte minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Luego se pusieron las semillas en inbición durante 48 horas a 25 °C. Se esterilizaron los frascos que contenían 0.5 ml de buffer acetato  $2 \times 10^{-3}$  M (pH = 4.8) y 0.5 ml de cloruro de calcio 0.04 M. Se pesaron diez mitades de endospermo y se puso en cada frasco (numeral 2) 1 ml de la soluciones, tanto del patrón  $\text{GA}_3$  ( $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-1}$  ppm) como de las muestras (100, 150 y 200 ppm), completando así un volumen final de 2 ml. Se incubaron durante veinticuatro horas a 25 °C con agitación continua (menos de 40 oscilaciones/minuto).

Transcurridas las veinticuatro horas se maceraron los granos con el medio y se les agregó 3 ml de agua estéril. Luego fueron puestos en un tubo de centrifuga a 2.000 rpm durante diez minutos y se les midió el volumen final del sobrenadante.

**Cuantificación (método yodométrico)** (Bauer, 1986). Se tomaron 1.5 ml de almidón 0.04% + 0.9 ml de agua estéril, se preincubaron a 37.5 °C, se les agregó 0.1 ml del sobrenadante (extracción) y se incubaron durante 7.5 minutos exactos a la temperatura anteriormente indicada. Se detuvo la reacción agregando 1 ml de solución de yodo + 4.5 ml de agua y se midió el valor de absorbancia a un  $\lambda$  620 nm. Para cada tratamiento se realizaron cinco réplicas, incluyendo los blancos. El coeficiente de variación para cada medida estuvo por debajo de 7%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se valoró la actividad giberélica de los extractos de diclorometano (extracto 1), etanólico (extracto 2) y compuestos aislados (figura 1): Kaur-16-

en-19-al (I), tetrachirina (II), ácido kaur-16-en-19-oico (III), 16 $\alpha$ -17-ent-kauranodiol (IV) y 16 $\alpha$ -17-19-ent-kauranotriol (V) de las hojas de *Espeletopsis santanderensis* empleando el método del doctor M. Pinto de la Universidad de Santiago de Chile con la variedad colombiana *Hordeaum vulgare* cv L-4/T97 (Pinto, 1998). Para ello se emplearon concentraciones de 100, 150 y 200 ppm de las muestras (extractos y compuestos aislados) y se compararon las actividades amilásicas exógenas<sup>2</sup> que fueron inducidas mediante estas concentraciones, frente a un patrón de referencia GA<sub>3</sub> en un rango de concentraciones de 5 x 10<sup>-5</sup> a 5 x 10<sup>-1</sup> ppm.

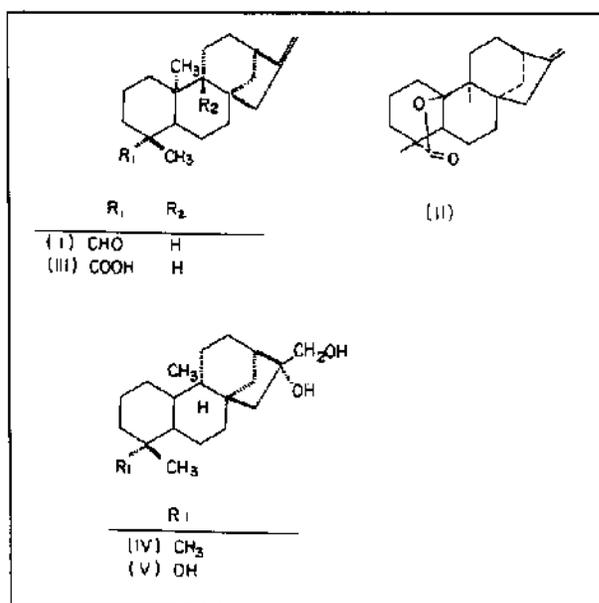


Figura 1. Estructura química de los compuestos aislados en *Espeletopsis santanderensis*

Es necesario indicar que las concentraciones utilizadas para las muestras fueron diferentes, ya que se hicieron ensayos previos que mostraron que por debajo de 100 ppm estos compuestos (precursores de giberelinas) y extractos no presentaron liberación de  $\alpha$ -amilasas considerables que se hubiesen podido detectar por la técnica espectrofotométrica (complejo yodo-almidón) (Bauer, 1986).

**Determinación del equivalente de la actividad amilásica.** Para la determinación del equivalente de la actividad amilásica obtenida para cada una de las muestras a concentraciones de 100, 150 y 200 ppm frente al patrón de referencia GA<sub>3</sub>, se tomó como base la mayor actividad exógena de 55.4  $\mu$ g- $\alpha$ -amilasa obtenida por el patrón a una concentración de 0.5 ppm, equivalente ésta al

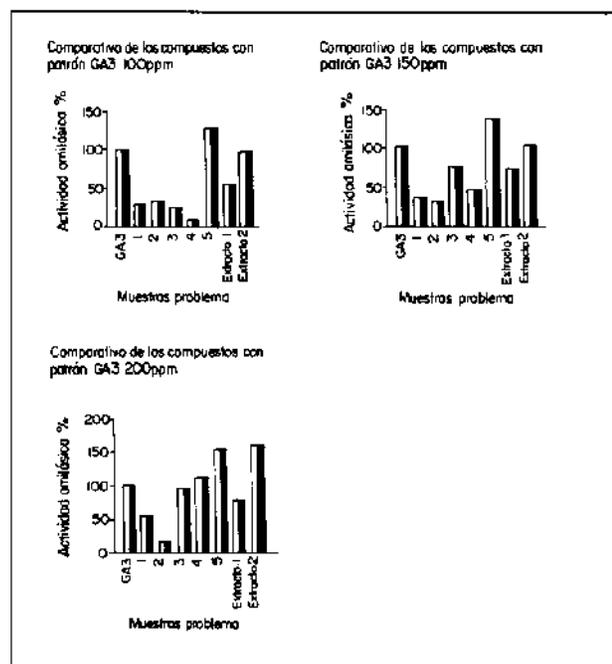


Figura 2. Comportamiento de los compuestos a diferentes concentraciones frente al patrón de referencia GA<sub>3</sub>

Tabla 1. Comparación de los compuestos a diferentes concentraciones frente al patrón GA<sub>3</sub>

Muestras	Actividad amilásica % frente al patrón		
	100 ppm	150 ppm	200 ppm
1	27.8	36.1	55.05
2	32.49	31.05	15.7
3	25.81	75.81	94.9
4	8.3	46.39	112.45
5	127.07	137.36	153.25
Extracto 1	53.61	74.37	76.89
Extracto 2	98.01	103.79	160.65

<sup>2</sup> Actividad amilásica exógena es la actividad obtenida por la muestra problema menos su respectivo blanco (solvente).

100% de la actividad (tabla 1 y figura 2). Estos resultados permitieron ubicar las muestras problema en tres grupos:

- **Primer grupo:** actividades amilásicas por debajo del patrón de referencia.
- **Segundo grupo:** actividades amilásicas fluctuantes por encima y por debajo del patrón de referencia.
- **Tercer grupo:** actividades amilásicas por encima del patrón de referencia.

Dentro del primer grupo se ubican el extracto diclorometano y los compuestos I, II y III. En el segundo grupo, el extracto etanólico y el compuesto IV; en el tercero, el compuesto V.

**Relación estructura-actividad.** Al comparar las actividades y las características estructurales de los compuestos aislados (diterpenos de tipo entkaureno) se deduce que:

- La presencia del grupo -OH en la posición del carbono 17, para los compuestos IV y V a una concentración de 200 ppm, incrementa la actividad giberélica. Para el compuesto V en 1.61 veces con respecto al compuesto III y en 2.78 veces con respecto al compuesto I. Para el compuesto IV en 1.18 veces con respecto al compuesto III y en 2.04 veces con respecto al compuesto I. En la

literatura se afirma que la presencia de grupos polares en los carbonos 15 y 16 disminuyen la actividad giberélica (Villalobos, 1994).

- Las sustancias con mayor grado de oxidación en el carbono 19 presentan mayor actividad giberélica a 200 ppm, como se demuestra en los compuestos III con respecto a I en 1.72 veces y V con respecto a IV en 1.36 veces.
- Es posible que la presencia del grupo metilo en posición 9 en el compuesto II a una concentración de 200 ppm disminuya la actividad de la lactona diterpénica. En la literatura se afirma que la presencia de un anillo lactónico en C-19/C-20 aumenta la actividad de un compuesto (Villalobos, 1994).
- Al comparar la actividad entre los extractos a 200 ppm se obtuvo que el extracto etanólico es 2.09 veces más activo que el de diclorometano.

## AGRADECIMIENTOS

A Colciencias y a la Universidad Javeriana por la financiación de esta investigación que hace parte del proyecto «Química y actividad biológica de especies del género *Espeletia*» código 1203-5-04-95. Al doctor Rodrigo Brito del Laboratorio Corpoica (Mosquera). Al profesor Jairo Tovar de la Pontificia Universidad Javeriana.

## REFERENCIAS

- Bauer JD. 1986. *Análisis clínicos, métodos e interpretación*. Reverte, Barcelona. pp. 651-653.
- Davis J. 1987. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Nijhoff Publishers, Martinus.
- Guisalberti EL. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia* LXVIII 4:303-325.
- Jones RL. 1967. The bioassay of gibberellins. *Planta (Berlin)* 72:155-161.
- Sembdener G. 1980. *Encyclopedia of plant physiology*. Springer, Berlín 9, 281.
- Téllez A. 1990. Fitoquímica de la *Espeletia* Killipi Cuatr. y actividad giberélica de algunos de sus compuestos aislados. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana.
- Villalobos N. 1994. Gibberellin-like activity of some tetracyclic diterpenoids from *Elaeostelinum* species and their derivatives. *Phytochemistry* 37(3):635-639.
- Weaver J. 1976. *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Trillas, México. pp. 74-82.