

Evaluación de la actividad biológica de extractos de semillas de *Crotalaria pallida* (cascabelito) sobre el modelo *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the biological activity of extracts from *Crotalaria pallida* (streaked rattlepod) seeds using the *Drosophila melanogaster* model

MSc. Gianni Carlos Peñaloza Atuesta,^I MSc. Carlos Alberto Peláez Jaramillo^{II}

^I Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

^{II} Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la búsqueda de metabolitos de origen natural, con actividad biológica promisorio, particularmente la actividad insecticida, es un blanco interesante en las investigaciones sobre productos naturales.

Objetivos: evaluar la bioactividad de extractos de diferente polaridad de semillas de *Crotalaria pallida* Aiton sobre el modelo biológico *Drosophila melanogaster*.

Métodos: la bioactividad de los extractos de diferente polaridad de semillas secas de *C. pallida* se evaluó por ingestión en el modelo biológico; permitiendo purificar y determinar la estructura química del principio activo usando RMN.

Resultados: la bioactividad expresada resultó de dos tipos; uno causó la inhibición de los estados larvarios, evidenciada con la disminución del número de pupas de los tratamientos con respecto a los controles no tratados, la relación dosis-respuesta permitió calcular una CI_{50} de 156,47 ppm; el otro efecto inhibió el paso pupa-adulto, disminuyendo el número de adultos de los tratamientos frente a los controles, estableciéndose una CI_{50} de 7,95 ppm. Con el uso de diferentes ensayos de RMN se determinó el alcaloide *usaramina* como responsable de esta actividad biológica.

Conclusiones : la bioactividad de los extractos de polaridad media/baja permitió el aislamiento de un metabolito con actividad insecticida promisorio, manifestada con la inhibición del normal desarrollo del ciclo de vida de *D. melanogaster*, el extracto no exhibe actividad sobre la oviposición, en el intervalo de concentraciones

evaluado; a bajas concentraciones inhibe la eclosión de pupas y a altas concentraciones afecta el desarrollo de las larvas; actividades que se mantienen al probar el metabolito purificado.

Palabras clave: *Crotalaria pallida*, correlación dosis y respuesta, *Drosophila melanogaster*, estados inmaduros, Usaramina, modelo biológico, relación adulto/pupa (R A/P), CI₅₀.

ABSTRACT

Introduction: the search for metabolites of natural origin with promising biological –particularly insecticidal– activity, is an interesting target for research about natural products.

Objectives: evaluate the bioactivity of extracts of varying polarity from *Crotalaria pallida* Aiton seeds using the *Drosophila melanogaster* biological model.

Methods: an evaluation was conducted of the bioactivity of extracts of varying polarity from dry *C. pallida* seeds by ingestion into the biological model, with the purpose of purifying and determining the chemical structure of the active principle through NMR spectroscopy.

Results: two types of bioactivity were expressed. One caused inhibition of larval stages, evidenced in a smaller number of pupae in treatment controls with respect to non-treatment controls. The dose-response relationship allowed estimation of a CI₅₀ of 156.47 ppm. The other effect inhibited progress from pupa to adult, reducing the number of adults in the treatment vs. control groups, with an CI₅₀ of 7.95 ppm. With the use of various NMR assays, it was determined that the alkaloid *usaramine* was responsible for this biological activity.

Conclusions: the bioactivity of extracts of medium / low polarity permitted the isolation of a metabolite with promising insecticidal activity, manifested in the inhibition of the normal development of the life cycle of *D. melanogaster*. The extract does not show any activity on oviposition in the concentration range studied. At low concentrations it inhibits the eclosion of pupae, whereas at high concentrations it affects larval development. Both activities remained when the purified metabolite was tested.

Key words: *Crotalaria pallida*, dose-response relationship, *Drosophila melanogaster*, immature stages, usaramine, biological model, adult / pupa relationship (A/P R), CI₅₀.

INTRODUCCIÓN

El género *Crotalaria* incluye cerca de 600 especies distribuidas a través de los trópicos y subtrópicos,¹ pertenece a la familia Leguminosae (Fabaceae), tribu Crotalarieae.² En Colombia, se han reportado 19 especies, en su mayoría situadas en zonas cálidas y templadas por debajo de los 2000 m.s.n.m.³ Las especies de *Crotalaria* por su condición de leguminosas tienen un importante valor como forraje, abono verde y fuente de nitrógeno lo cual permite potenciar la aptitud

agrícola de los suelos. La fitoquímica de este género ha permitido identificar un buen número de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran varios tipos de alcaloides,⁴ aminas, flavonoides, coumarinas, lectinas, etc.^{5,6}

Las especies de *Crotalaria*, son consideradas la principal fuente de alcaloides pirrolizidínicos los cuales son tóxicos para mamíferos;⁷ en humanos se han reportado actividades toxicológicas, causadas por alcaloides pirrolizidínicos insaturados, asociados a mecanismos de bioactivación mediados por citocromo P450, que en muchos casos producen metabolitos genotóxicos.⁴⁻⁸

A pesar del reconocido efecto toxicológico atribuido a este tipo de alcaloides, en muchos países incluyendo Colombia, algunas especies de *Crotalaria* son usadas en medicina popular.³ Los alcaloides de tipo retronécico, en especial aquellos de tipo diester macrocíclico, han sido estudiados estructuralmente y evaluados de manera exhaustiva desde la perspectiva farmacológica,⁹ sin embargo no existen reportes que relacionen este tipo de compuestos con una actividad insecticida promisoriosa.

En este trabajo se evaluó la actividad biológica de extractos de diferente polaridad de semillas de *Crotalaria pallida* Aiton, utilizando el modelo biológico *Drosophila melanogaster*. El uso del modelo facilitó el análisis cualitativo y cuantitativo de las fracciones. La combinación de diferentes ensayos de RMN acoplados, sumados a la respuesta del modelo biológico, permitieron establecer que los desplazamientos químicos y la correlación de las señales de RMN para el metabolito responsable de las actividades inhibitorias del ciclo de vida del modelo, corresponden a las reportadas para el alcaloide *usaramina* (figura 1).

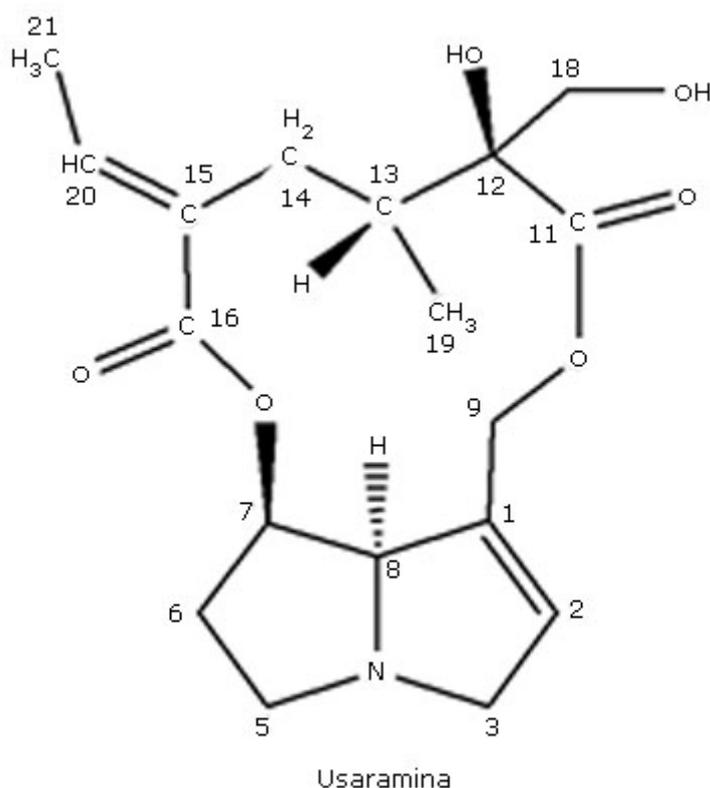


Fig. 1. Representación estructural del alcaloide *usaramina*.

MÉTODOS

Colonias de *Drosophila melanogaster* (CEPA CANTON)

Las colonias de moscas, genéticamente estables, se obtuvieron del laboratorio del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) del instituto de Química de la universidad de Antioquia donde son mantenidas a una temperatura promedio de 23 °C, con una humedad relativa del 65 % y un fotoperíodo de 12 horas.¹⁰

Material vegetal

La recolección de la especie *C. pallida* se realizó en el municipio de Girardota, departamento de Antioquia, Colombia, a una altura de 1300 m.s.n.m con una temperatura promedio de 22 °C. El espécimen se encuentra depositado bajo el voucher N° HUA 157910, en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia.

Extractos totales

Las semillas se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente se molieron en un molino marca CONDUX-WERK® modelo LV15M, el material homogeneizado se extrajo con solventes de diferente polaridad, iniciando con éter de petróleo (fracción 45-60 °C), el marco desengrasado se secó y se extrajo con diclorometano, posteriormente se extrajo nuevamente el marco seco con metanol, todos los extractos se obtuvieron en un sistema Soxhlet. Los extractos se concentraron por rotaevaporación usando un equipo marca BÜCHI® modelo RE 111.

Para garantizar la solubilidad de los extractos en el alimento de *D. melanogaster* se emulsificaron utilizando el tensoactivo TWEEN-80 (Polioxietilen sorbitan monooleato), adicionando 7 % (v/v) del tensoactivo a una mezcla agua/extracto; posteriormente se sometió la mezcla a la acción mecánica para disminuir el tamaño de partícula y homogeneizar la dispersión, los extractos de diferente polaridad fueron emulsificados bajo las mismas condiciones y su bioactividad probada en el modelo biológico. Las pruebas de bioactividad dirigida se realizaron por la ingestión del alimento mezclado con el extracto emulsificado, con esta metodología se evaluó el ciclo de vida del insecto.

Extracto de alcaloides totales

El análisis de los extractos totales por TLC, reveló la presencia de alcaloides lo que motivó su extracción. Las semillas secas y molidas se desengrasaron con éter de petróleo (fracción 45-60 °C), luego el material vegetal se secó, se humectó con hidróxido de amonio (NH₄OH) en agua al 5 %, el material alcalinizado se extrajo con diclorometano en un sistema Soxhlet, por un tiempo de 8 horas; este extracto se concentró en rotaevaporador hasta 1/3 del volumen original, luego se aciduló con HCl al 5 % en embudo de separación, se recuperó la fase acuosa y se alcalinizó hasta pH 8 con solución acuosa de hidróxido de amonio al 5 %. La solución alcalinizada se extrajo con diclorometano, las fracciones de diclorometano se juntaron para concentrarlas en rotaevaporador. El extracto de alcaloides totales se sometió al proceso de solubilización en agua y posterior emulsificación para la evaluación biológica.

Separaciones cromatográficas

Al concentrar en rotaevaporador los extractos de diclorometano apareció un sólido, que se probó fue soluble en MeOH, este sólido se analizó por cromatografía en capa fina (TLC), los corridos se realizaron sobre placas de sílica gel 60 unida a aluminio (MERCK[®] 5554) que se asperjaron con el reactivo de Dragendorff, encontrándose dos compuestos ($R_{f1} = 0,87$ y $R_{f2} = 0,37$) que producen respuesta positiva a la prueba de alcaloides.

La separación de estos compuestos se realizó en columna de vidrio (1,0 cm diámetro x 30 cm de largo) empacada con sílica gel 60 (MERCK[®]. Kieselgel 60G, Art. 7731), utilizando mezclas con diferentes proporciones de MeOH y acetato de etilo. De la fracción más polar (90 % MeOH: 10 % acetato de etilo) se obtiene el alcaloide mayoritario (R_{f2}) purificado, posteriormente se evaluó la bioactividad y se realizó el análisis estructural por RMN.

Bioensayo: interrupción del ciclo de vida

Para evaluar la bioactividad de los extractos totales, se seleccionó un intervalo amplio de concentraciones (0,0 – 10000 ppm). El ensayo se realizó en viales de vidrio (5 cm de ancho X 10 cm de alto, con un volumen aproximado de 50 mL), en los cuales se depositó el volumen de extracto correspondiente a cada concentración y se completó a un volumen final de 15 mL con el alimento para *D. melanogaster*, que se prepara con 450 mL de agua, 7,0 g de agar, 50,0 g de harina de maíz, 15,0 g de levadura, 40 mL de melaza y 2,5 mL de ácido propiónico. Los viales se dejaron en reposo por 12 horas antes de realizar el cruce de los individuos.

En cada vial se depositaron tres parejas de individuos jóvenes, de cuatro días de edad. El tiempo de cruce varió con el objeto del análisis. Para realizar el recuento de huevos las parejas se cruzaron durante 24 horas. Para la evaluación del ciclo de vida completo los individuos se cruzaron por 48 horas.¹⁰

Identificación de los metabolitos

La identificación del principio activo purificado, se realizó mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear, en un equipo marca BRUKER[®] AMX 300, con 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C, se realizaron ensayos 1-D ¹³C, 1-D ¹H y 2-D ¹H-¹³C HMBC, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹H COSY. Los espectros fueron tomados en DMSO-d₆ a 25 °C.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados con tres repeticiones independientes (n=3). Se realizaron los análisis de regresión para las variables número de individuos y concentración de los extractos, Anova entre ensayos con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV. Los análisis de regresión fueron analizados a un nivel de significancia del 0,05.

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra el recuento de los individuos del modelo en los estados huevo, pupa y adulto, para el alimento suplementado con el extracto de diclorometano. Ensayos idénticos para los extractos metanólico y de éter de petróleo (fracción 45-60 °C), permitieron establecer que ninguno de los extractos presenta actividad inhibitoria sobre la oviposición del modelo biológico, y que sólo el extracto de polaridad media baja (diclorometano) exhibe actividad promisoría sobre los otros estados del ciclo de vida de *D. melanogaster*.

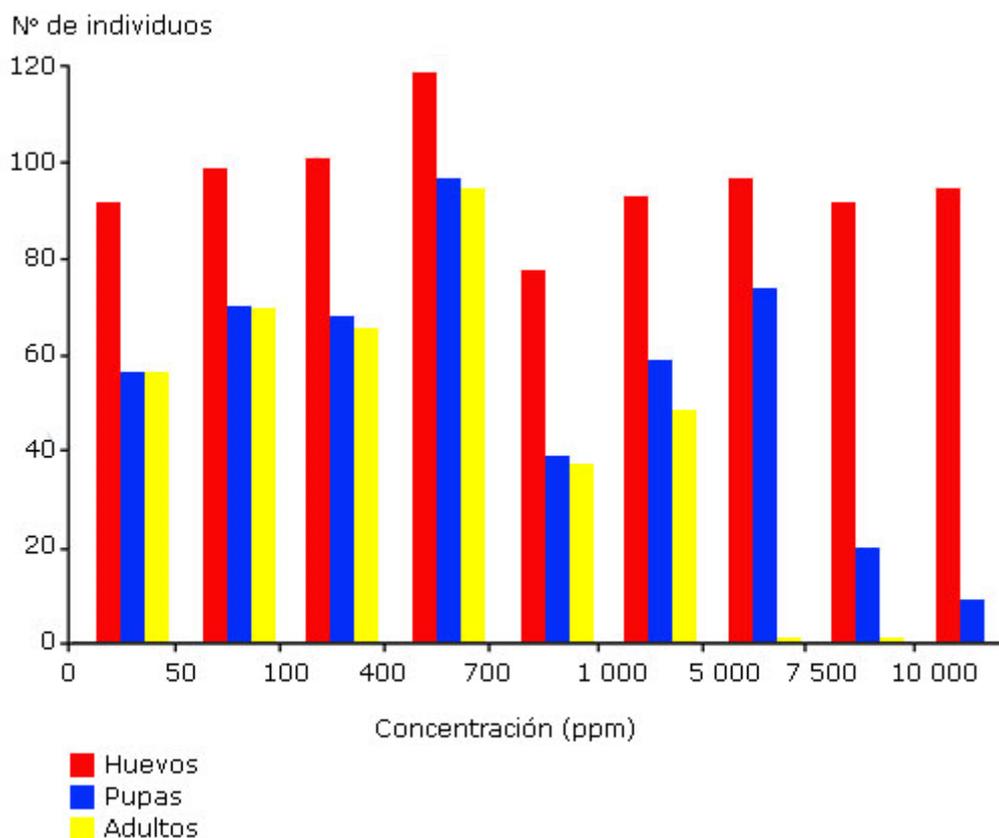


Fig. 2. Recuento de individuos para el ensayo con extracto total de diclorometano de semillas de *C. pallida*.

Con el recuento de los individuos en los estados pupa y adulto se establecieron relaciones importantes entre la bioactividad presentada por la fracción de diclorometano y el intervalo de concentraciones utilizado para los bioensayos de la misma; esta fracción presentó dos efectos inhibitorios diferentes sobre el ciclo de vida del modelo como se puede apreciar en la figura 2. Uno de ellos, está relacionado con la disminución del número de pupas en los tratamientos con respecto al control y el otro exhibe una marcada inhibición sobre el paso pupa-adulto.

Actividad biológica del alcaloide purificado

El compuesto mayoritario (Rf_2) se purificó utilizando cromatografía en columna, con el análisis de varianza se planteó un modelo matemático que describe la relación entre las variables dosis y respuesta, con un alto grado de significancia estadística (Tabla 1), un p-valor menor que 0.05 demuestra esta afirmación, se calculó una CI_{50} de 156.47 ppm para la actividad inhibitoria del alcaloide purificado sobre los estados inmaduros del modelo (larvas). Igualmente el análisis de varianza de la actividad del alcaloide *usaramina* sobre los estados maduros del modelo (pupas) proporcionó un modelo matemático (Tabla 1) con el cual se calculó una CI_{50} de 7.95 ppm, la relación dosis-respuesta en este caso también resultó estadísticamente significativa a un nivel del 95 % de confianza ya que se obtuvo un p-valor de 0.0045.

Tabla 1. Modelos de regresión para las actividades del alcaloide *usaramina* sobre los estados larva y pupa del modelo *D. melanogaster*

Actividad	Parámetros del modelo	p-valor
Larva	Pupas = 127,741-6,2149* sqrt (concentración)	0,01
Pupa	Adultos = 111,15-21,6836* sqrt (concentración)	0,0045

Análisis estructural del metabolito purificado

La asignación de las señales de ¹H RMN y de ¹³C RMN (Tablas 2 y 3 respectivamente), se realizó utilizando la combinación de diferentes ensayos de RMN 1-D ¹³C, 1-D ¹H2-D ¹H-¹³C HMBC, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹H COSY con lo cual se logró definir el alcaloide *usaramina*, ver figura 1, como la estructura del metabolito responsable de las actividades inhibitorias sobre *D. melanogaster*.

Tabla 2. Señales ¹H RMN para el alcaloide *usaramina*

Protón sobre el Carbono N°	δ (ppm)	Protón
2	6.15	1H, s
3	a 3.30	1H, dd
	b 3.80	1H, s ancho
5	a 2.45	1H, dd
	b 3.10	1H, m
6	a 2.00	1H, dd
	b 2.25	1H, m complejo
7	4.93	1H, s ancho
8	4.25	1H, s ancho
9	a 4.15	1H, d
	b 5.25	1H, d
13	1.79	1H, d
14	a 1.90	1H, m
	b 2.10	1H, m
18	3.50	2H, s
19	0.80	3H, d
20	6.40	1H, q
21	1.79	3H, d

El espectro fue tomado en DMSO-d6

Tabla 3. Señales ^{13}C RMN para el alcaloide *usaramina*

Nº CARBONO	δ (ppm)
1	134.23
2	134.82
3	64.30
5	52.90
6	29.65
7	75.71
8	76.93
9	61.32
11	174.69
12	81.31
13	37.07
14	33.71
15	132.96
16	168.77
18	67.14
19	12.08
20	135.67
21	14.23

El espectro fue tomado en DMSO-d6

DISCUSIÓN

El uso del modelo *Drosophila melanogaster*¹¹ permitió evaluar la actividad biológica de los extractos totales de diferente polaridad, éter de petróleo (fracción 45-60 °C), diclorometano y metanol, en su orden; encontrándose actividad biológica promisorio en el extracto de diclorometano, caracterizada por la inhibición de los estados inmaduros del modelo, lo que causó la disminución de las poblaciones de pupas y de adultos de los tratamientos frente a los controles no tratados. La oviposición del modelo biológico no se afectó por la presencia de ninguno de los extractos ya que no existe correlación estadísticamente significativa entre las variables dosis y respuesta.

La actividad expresada por el extracto total de diclorometano sobre el estado de pupa y la ausencia de actividad sobre la oviposición del modelo biológico no permite atribuir la bioactividad de este extracto únicamente sobre los estados larvarios del modelo biológico, ya que también es factible que exista afectación en la viabilidad de los huevos.

El modelo biológico facilitó el fraccionamiento del extracto crudo con actividad promisorio hasta la obtención del metabolito purificado, al exhibir un aumento en la actividad inhibitoria del paso pulpa-adulto a concentraciones tan bajas como 20 ppm a medida que se avanzaba en la purificación del alcaloide usaramina. La magnificación

de la actividad específica del principio activo sobre la disminución del número de pupas se evidenció en concentraciones superiores a 50 ppm; en ningún caso el alcaloide purificado presentó actividad sobre los adultos del modelo.

Los modelos matemáticos derivados del análisis estadístico de las correlaciones dosis-respuesta permitieron establecer que de las dos actividades biológicas expresadas por el modelo *D. melanogaster* la inhibición del paso pulpa-adulto resultó ser la más relevante ya que se necesita una concentración casi veinte veces menor para inhibir la eclosión del 50 % de las pupas, que la necesaria para inhibir el mismo porcentaje en los estados larvarios de una población.

La estructura del alcaloide *usaramina* se logró determinar al comparar los desplazamientos químicos para el compuesto aislado de semillas de *C pallida* reportados en la literatura, pudiéndose señalar que existe una estrecha relación que admite establecer la estructura del compuesto.

En el espectro¹ H RMN es importante destacar la señal del protón sobre el carbono enumerado como 20 con un desplazamiento químico (6,40 ppm) que correlaciona muy bien con los reportes para el alcaloide *usaramina* y no así para su isómero *retorsina* (5,71 ppm);¹²⁻¹⁴ de la misma forma, la separación de las señales de los protones ubicados sobre el carbono 9 (DH9 = 1,1 ppm), corresponde a un anillo macrocíclico diéster de doce miembros.¹² Los desplazamientos químicos de ¹³ C RMN (Tabla 3) confirman la presencia de 18 carbonos en la molécula, dos de ellos cuaternarios correspondientes a grupos carbonilo con ambiente químico diferente (C11 y C16) con un desplazamiento de 174,69 y 168,77 ppm respectivamente, el carbono 16 corresponde a un carbonilo a-b insaturado. Los desplazamientos químicos de los carbonos que conforman la base néica son consistentes con los reportados en la literatura. Particularmente, los desplazamientos a campo bajo de las señales para los carbonos C1 y C2 (134,23 y 134,82 ppm respectivamente), confirman la presencia de una insaturación en el anillo pirrolizidínico.¹⁵⁻¹⁷ Los espectros bidimensionales, muestran que todos los acoplamientos corresponden a la estructura propuesta.

Se logró determinar mediante el análisis de bioactividad y diferentes ensayos de RMN que el alcaloide de tipo retronéico conocido como *usaramina* es el responsable de las actividades inhibitorias observadas sobre el ciclo de vida de *D. melanogaster*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores AiS, Tozzi AMGdA, Trigo JR. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2009 Oct; 37(4): 459-69.
2. Ko HH, Weng JR, Tsao LT, Yen MH, Wang JP, Lin CN. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004 Feb 23; 14(4): 1011-4.
3. Bernal HY, Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales - Fondo colombiano de investigaciones científicas. Flora de Colombia: *Crotalaria* (Fabaceae-Faboideae) 4. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; 1986.
4. Asres K, Sporer F, Wink M. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 *Ethiopian Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004 Oct; 32(10): 915-30.
5. Devendra BN, Srinivas N, Solmon KS. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of *in vivo* & *in vitro* propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012 Jan; 5(1): 37-41.

6. Wink M, Mohamed GIA. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003 Aug; 31(8):897-917.
7. Xia Q, Chou MW, Edgar JA, Doerge DR, Fu PP. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Cancer Lett*. 2006 Jan 8; 231(1):138-45.
8. Pitanga BPS, Silva VDg, Souza CS, Junqueira HA, Fragomeni BON, Nascimento RP, et al. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *NeuroToxicology*. 2011 Dec; 32(6): 776-84.
9. Xia Q, Yan J, Chou MW, Fu PP. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. *Toxicology Letters*. 2008 May 5; 178(2):77-82.
10. Granados H, Saez J, Saldarriaga N, Moreno ME, Pelaez C, Brun N, et al. In vitro insecticidal activity of the *Annona* aff. *spraguei* seeds (Annonaceae) on two biological model of diptera order: *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti*. *Afinidad*. 2001; 57(491):44-8.
11. Kim SI, Jung JW, Ahn YJ, Restifo LL, Kwon HW. *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2011 Dec; 14(4):509-17.
12. Logie CG, Grue MR, Liddell JR. Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*. 1994; 37(1):43-109.
13. Mattocks AR. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press; 1986.
14. Segall HJ, Dallas JL. ¹H NMR Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*. 1983; 22(5):1271-3.
15. Marín Loaiza JC, Ernst L, Beuerle T, Theuring C, Céspedes CL, Hartmann T. Pyrrolizidine alkaloids of the endemic Mexican *genus Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. *Phytochemistry*. 2008 Jan; 69(1):154-67.
16. Medina JCM, Gauze GF, Vidotti GJ, Sarragiotto MH, Basso EA, Peixoto JLB. Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. *Tetrahedron Letters*. 2009 Jun 3; 50(22):2640-2.
17. Molyneux RJ, Roitman JN, Benson M, Lundin RE. ¹³C NMR spectroscopy of Pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*. 1982; 21(2):439-43.

Recibido: 3 de mayo 2013.

Aprobado: 16 de febrero de 2014.

Autor para la correspondencia:

MSc. *Giann Carlos Peñaloza Atuesta* . Universidad del Tolima, Ibagué – Colombia.
Correo electrónico: giann.carlos@gmail.com