

# Extractos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* como fago-inhibidores de *Atta cephalotes*

*Lycopersicon esculentum* tomato leaf extracts as phago-inhibitors of *Atta cephalotes* leaf-cutter ants

Francisco Javier Serna C.<sup>1</sup> y Jorge Alberto Correa Q.<sup>2</sup>

**Resumen:** Con el fin de probar la actividad fago-inhibidora (disuasora) de extractos obtenidos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* Miller, se llevó a cabo el fraccionamiento químico de dicho material. Cinco extractos se ensayaron sobre una colonia de laboratorio de hormigas arrieras *Atta cephalotes* (L.). El desengrase con hexano y la partición con diclorometano, mostraron actividad significativa incluso a bajas concentraciones cercanas a 50 ppm. La partición con acetato de etilo presentó una actividad menor pero significativa. Los extractos hexánico (del metanol) y etanólico no actuaron como fago-inhibidores. Se recomienda evaluar los tres extractos cuya actividad fago-inhibidora fue significativa en futuras pruebas de campo.

**Palabras clave:** Disuasor, extractos vegetales, hormigas arrieras.

**Abstract:** The leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) is one of most important crop pests in Colombia. *Lycopersicon esculentum* Miller tomato leaf extracts were chemically fractionated for testing phago-inhibition activity. Five extracts were tried out on an *Atta cephalotes* leaf-cutting ants laboratory colony. Removing grease with hexane and partition with dichloromethane presented significant activity even at concentrations as low as 50 ppm. Partition with ethyl acetate displayed lower but still significant activity. Hexanic (from methanol) and ethanolic extracts did not act as phago-inhibitors. Further field tests are recommended for evaluating the three extracts whose phago-inhibitor activity was significant.

**Key words:** Deterrents, vegetal extracts, leaf-cutting ant.

## Introducción

Las hormigas arrieras de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) se presentan en colonias eusociales y ocurren en relación simbiótica mutualista con un grupo de hongos basidiomicetos, de clasificación incierta, variablemente denominados *Attamyces bromatificus*, *Agaricus bisporus*, *Lepiota procera* o *Leucocoprinus gongilophora* (Agaricales: Lepiotaaceae: Leucocoprinini) (Cherret *et al.*, 1989; Kingle *et al.*, 1994; Chapela *et al.*, 1994). Estos hongos producen polifenol oxidasas, enzimas que desdoblan la celulosa del material vegetal que las hormigas cortadoras le suministran (Cherret *et al.*, 1989): la pared celular vegetal es degradada hasta oligómeros y monómeros que contribuyen principalmente a la nutrición de las larvas, pero también de las adultas. A su vez, las hormigas poseen en su saliva quitinasas que utilizan para degradar la pared celular de los gongilidios, unas estructuras especializa-

das que el hongo *A. bromatificus* expone al consumo de las Attini y que consisten en células ensanchadas. En esta simbiosis también participa una bacteria del género *Streptomyces*, que es llevada en el vuelo nupcial de la hormiga fundadora, y produce potentes sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de *Escovepsis* sp., un hongo parásito que invade los jardines del hongo cultivado por las hormigas (Ariniello, 1999).

La relación ectosimbiótica obligada entre arrieras y hongo permite que aquellas plantas que no pueden ser utilizadas directamente como alimento de las arrieras por sus efectos insecticidas, sí puedan ser aprovechadas como nutrientes de *A. bromatificus*, el cual posee mecanismos para neutralizar esos compuestos antialimentarios naturales de las plantas. De esta manera, las larvas de las arrieras son alimentadas por el hongo que cultivan sus hermanas adultas, las cuales se alimentan directamente de la savia de las hojas que cortan y eligen aquellas hojas

Fecha de recepción: 09 de octubre de 2003.

Aceptado para publicación: 28 de noviembre de 2003.

1 Profesor Asociado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: fjsernac@unal.edu.co

2 Profesor Asociado, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. e-mail: jacorreacq@unalmed.edu.co

con sustancias no formicidas (Cherrett *et al.*, 1989). Mientras la especie fungal se ve favorecida por la simbiosis, ya que es propagada por las cortadoras, éstas se vuelven poblaciones de insectos dominantes por su capacidad de explotar un gigantesco abanico de recursos vegetales.

Poco se ha investigado sobre los Niveles Económicos de Daño que causan los géneros *Atta* spp. y *Acromyrmex* spp., lo que es importante para determinar si –bajo las condiciones que se establecen entre un cultivo y una especie fitófaga– una población se puede considerar como plaga. No obstante, en la mayoría de los cultivos donde las arrieras ocurren se las estima como una “plaga grave”, y hasta como la plaga más relevante en Colombia. Serrano *et al.* (1993) encontraron que en el departamento del Caquetá se puede perder hasta un 98% de la producción de un potrero de pasto *Andropogon gayanus* por causa del daño que producen las arrieras, pues se hallaron potreros con una densidad de hormigueros de 5.000/ha.

Para el combate, el control y el manejo de las hormigas arrieras se ha usado una gama amplia de métodos y productos químicos inorgánicos y orgánicos. Una revisión sobre los métodos utilizados desde el siglo XIX para el control de arrieras se encuentra en Serna (1992).

### **Metabolitos secundarios como fagoINHIBIDORES o repelentes de la alimentación**

Desde mediados del siglo pasado se ha venido especulando sobre la complejidad de la coevolución entre plantas e insectos herbívoros. Esta coevolución se analizaba bajo dos aspectos complementarios: el desarrollo en las plantas de mecanismos de defensa y la adaptación de los herbívoros a estos mecanismos. En cuanto al desarrollo de defensas por las plantas se consideran importantes la textura y estructura anatómica (pelos, tricomas, espinas, etc.), el pH, la presión osmótica de la savia, la ausencia de nutrientes importantes para los insectos y la presencia de metabolitos secundarios llamados “aleloquímicos”: las alomonas y las kairomonas (Febvay *et al.*, 1985).

Muchas especies vegetales, a pesar de encontrarse disponibles en la naturaleza, escapan al ataque de las hormigas cortadoras. Varios son los factores que influyen la decisión de las hormigas de cortar o no las hojas de las plantas: desde la presencia de compuestos secundarios tóxicos para las hormigas, su hongo o ambos, hasta el contenido de humedad foliar. De acuerdo con el tipo de

sustancia presente en el vegetal, ésta puede funcionar ya sea como fagoINHIBIDOR o como repelente. Un fagoINHIBIDOR (o disuasor de la alimentación) es aquel metabolito secundario de origen natural que, al contacto con los palpos labiales y maxilares de los insectos, produce un rechazo de consumo (Dethier *et al.*, 1960). Por su parte, los repelentes son aquellas sustancias que provocan una respuesta motriz orientada en sentido opuesto al origen del estímulo. Los repelentes generalmente son volátiles, mientras que los fagoINHIBIDORES no tienen una presión de vapor apreciable y sólo son detectados después de iniciado el proceso de alimentación (Camps, 1988).

Al respecto de estos compuestos que afectan la herbivoría de las hormigas, la literatura reporta diversos ejemplos. Los campesinos de Honduras acostumbraban sembrar camote (Convolvulaceae) en los hormigueros, el cual producía “jugo en sus hojas que las hormigas no gustaban de él, abandonando el hormiguero” (Moncayo, 1954). Así mismo acontece con las hojas de *Jacquinina pungens*, y con el efecto tóxico de las hojas de ñame *Dioscorea cayenensis* (Dioscoreaceae), que provocan muerte de los nidos de la arriera *Acromyrmex octospinosus* (Beraldo y DaSilva, 1988). La resistencia del *D. cayenensis* a *Ac. octospinosus* es de origen químico; se encontró que el compuesto antialimentario eran saponinas de naturaleza terpenoide, esteroide o esteroide alcaloide. Estos compuestos son tóxicos para los hongos (Febvay, 1985). En el noroccidente de México se ha utilizado como control de la hormiga arriera una planta denominada “yerba de pero” que ha sido identificada como *Senecio enrenbergianus* de la familia Asteraceae. La planta se mezcla con un cebo que se esparce alrededor del nido, las hormigas lo llevan dentro y la colonia empieza a ser destruida (Weber, 1972).

Hormigueros incipientes de *Atta sexdens rubropilosa* fueron tratados en laboratorio con una mezcla de hojas de gergelim (*Sesamum orientale*) y eucalipto, presentándose un incremento de la cantidad de hojas cargadas hacia el nido con respecto al forrajeo habitual; sin embargo, pocos días después se observó una declinación del jardín del hongo y a los 32 días de tratamiento se habían extinguido los hormigueros (Hebling *et al.*, 1986).

En otro ensayo (Howard *et al.*, 1988) se usaron cuatro disuasores (fagoINHIBIDORES) químicos de *Atta cephalotes*: cariofileno y cariofileno epóxido, provenientes de hojas de *Hymenea courbaril*; cariofileno epóxido y kolavenol, provenientes de *H. courbaril* y de *Melampodium divaricatum*; y cariofileno epóxido, kolavenol y nerolidol, provenien-

tes de *Vismia baccifera*. Estos autores comprobaron que el nerolidol y el cariofileno epóxido son compuestos que producen un efecto altamente disuasor de la alimentación (fagoínhibidor) de las hormigas cortadoras, aun en concentraciones bajas, mientras el klavenol produce un efecto significativamente menor en la fagoínhibición y el cariofileno produce el efecto fagoínhibidor en concentraciones altas.

### **Actividad fungicida**

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas pueden causar la muerte de las hormigas cortadoras directamente, a través de la ingestión de savia, o indirectamente por reducción de la biomasa del hongo simbiote. En el último caso las larvas son privadas de su fuente de nutrientes.

Las hojas de sésamo (ajonjolí) (*S. indicum*) son atacadas vorazmente por las hormigas, lo que sugiere que la presencia de compuestos atrayentes o estimulantes puede enmascarar la ocurrencia de posibles tóxicos del hongo; se sugiere que una lignina furfurínica es la responsable de la inhibición del crecimiento del hongo (Pagnocca, 1990). También se ha propuesto que productos como el kolavenol reducen la fecundidad de las reinas, interfieren en el desarrollo de las larvas o inhiben el desarrollo enzimático necesario para el crecimiento fúngico sobre el material de hojas (Howard *et al.*, 1988).

La presencia de sustancias liposolubles dotadas de propiedades antifúngicas involucra diferentes grupos de plantas y hongos, como *Avena sativa* y dos especies de *Walburgia* (Canallaceae) (Pagnocca, 1990).

En un estudio realizado en 1979 en el departamento del Meta, Colombia, se ofrecieron hojas cortadas de *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) a las colonias de hormigas arrieras, las cuales fueron consumidas en menos de 24 horas. Este tratamiento, repetido por tres noches consecutivas, dió como resultado el cese de actividades de herbivoría por períodos de cuatro meses a cinco años. Se presume que el efecto de la *C. ensiformis* sobre las colonias de arrieras se debe a la acción del fungicida dimethyl-homopterocarpin contenido en las hojas de *C. ensiformis* (Mulenax, 1979).

Estos ejemplos muestran que el área de investigación en metabolitos secundarios es una herramienta promisoría en estudios agronómicos de manejo integrado de

plagas. Con este fin, en el presente trabajo se evaluó el efecto fagoínhibidor de cinco extractos fitoquímicos, obtenidos a diferentes polaridades y concentraciones, de las hojas del tomate *L. esculentum* sobre una colonia de *A. cephalotes* mantenida en laboratorio; así mismo, se encontraron las concentraciones mínimas a las cuales fueron activos los extractos.

## **Materiales y métodos**

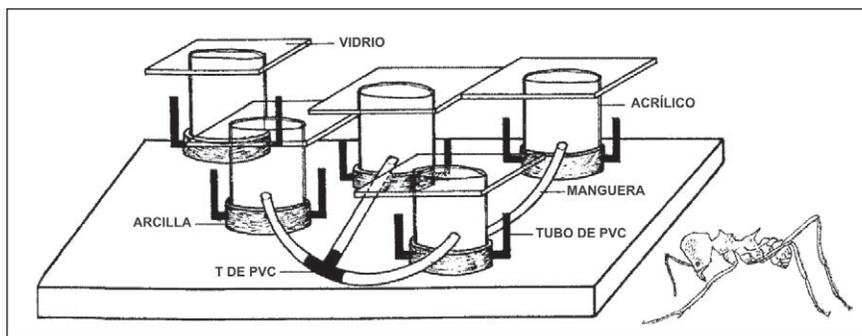
### **Establecimiento de la colonia de laboratorio**

En la vereda La Tebaida, municipio de San Luis (Antioquia, Colombia), fue recolectada una colonia con dos meses aproximadamente de fundada. En un cajón portanúcleos, utilizado para transportar colonias de abejas (*Apis mellifera*), se introdujeron hormigas reina, jardineiras, forrajeras y el hongo simbiote, y fueron trasladadas al insectario de Entomología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

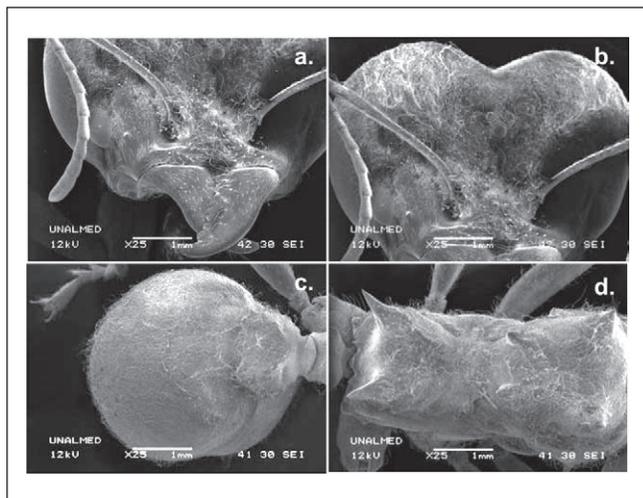
Se establecieron diez cámaras de arcilla que se destinaron a la cría del hongo, el alojamiento de la reina y las obreras Attini, y los desechos de alimentación (Figura 1). Las cámaras constan de bases de arcilla de 22 cm de diámetro y 4 cm de alto, barnizadas por fuera con el fin de mantener su humedad interna. Sobre estas arcillas se pegaron cilindros transparentes de acrílico de 3 mm de grosor, 20 cm de diámetro y 20 cm de altura. Sobre los cilindros acrílicos se colocaron tapas de vidrio plano transparente de 4 mm de grosor. El desplazamiento de las hormigas entre las cámaras era permitido por medio de mangueras plásticas transparentes de 2 cm de diámetro aproximado, que se conectaban a dos huecos que se practicaron a cada cámara en la parte inferior de los cilindros acrílicos.

### **Determinación taxonómica**

La determinación taxonómica de la especie de hormiga arriera, con la cual se trabajó en la presente investigación, se hizo aplicando la clave para hormigas del género *Atta* de Colombia elaborada por Mackay y Mackay (1986) y comparando con especímenes clasificados en el Museo Entomológico Francisco Luis Gallego (UNCM). Se llegó a la conclusión de que se trataba de ejemplares de la especie *Atta cephalotes* (L.). En la Figura 2 se observan microfotografías electrónicas de un soldado de *A. cephalotes* tomadas en la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.



**Figura 1.** Cámaras interconectadas en las que se mantuvo una colonia de laboratorio de *Atta cephalotes*.



**Figura 2.** Partes corporales de una soldado de *A. cephalotes*: a) mandíbulas, b) cabeza, c) gaster y d) mesosoma (microscopía de barrido, 85X).

### **Estabilización de la colonia**

Se colocaron en el hormiguero hojas de varias plantas de fácil consecución para observar las preferencias alimentarias de las hormigas: almendro (*Terminalia catapa*), miona (*Espatodea campanulata*), azuceno (*Nerium oleander*) y Reina Carlota (*Acalypha wilkesiana*); esta última especie tuvo gran aceptación y por ello se seleccionó para ofrecerla diariamente a las forrajeras. Las condiciones de humedad y temperatura del laboratorio se midieron todos los días en hojas de registro con un termohigrógrafo marca Haenni®.

Bajo estas condiciones, con el fin de buscar la mejor adaptación, estabilización del corte y desarrollo del hormiguero, la colonia fue mantenida durante un

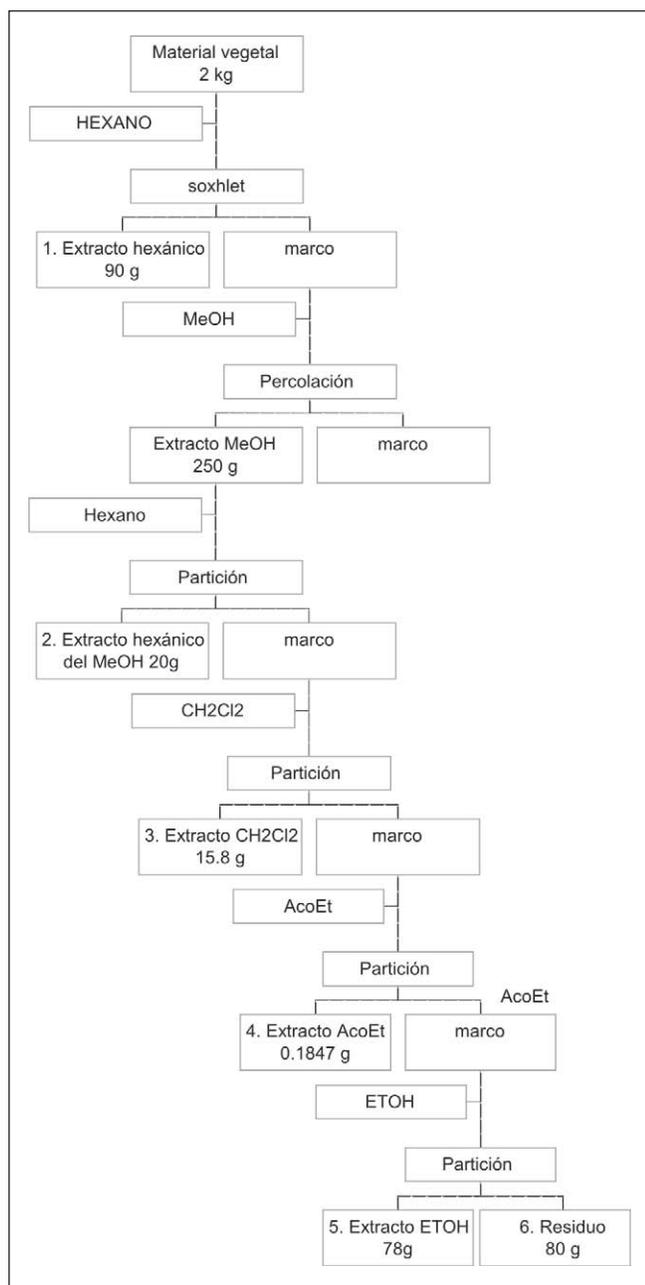
año antes de empezar a realizar las pruebas de laboratorio. La regularidad en la actividad de consumo de forraje, el aumento continuo de la población (obreras y soldados) y el incremento del crecimiento de las esponjas (gongilidios) del hongo en varias cámaras, fueron los parámetros cualitativos que se tuvieron en cuenta como indicadores de un buen desarrollo de la colonia.

Las condiciones ambientales registradas, bajo las cuales esta colonia mantuvo un desarrollo apropiado, fueron las siguientes: temperaturas entre 21 y 23° C para los meses fríos (mayo y septiembre) y entre 23 y 25° C en los más cálidos (febrero y marzo). La humedad relativa (HR) osciló entre 60 y 67% en los meses menos húmedos (junio y julio); entre 75 y 80% en los húmedos (abril) y entre 80 y 88% para aquellos muy húmedos (mayo). Un ambiente con poca iluminación y días lluviosos fueron condiciones que también favorecieron la actividad del hormiguero. Con la ayuda de un polímetro se midió la humedad relativa dentro de las cámaras de cría y cultivo del hongo; a lo largo de una semana se hicieron observaciones varias veces en el día. La aguja marcaba 84% HR y la oscilación fue mínima.

### **Fraccionamiento del material vegetal**

Luego de hacer varias consultas con los campesinos del oriente antioqueño (Antioquia, Colombia) indagando sobre aquellas plantas que no son atacadas por las arriaras, fue posible establecer que una de las que más evitan las hormigas *A. cephalotes* era el tomate (*Lycopersicon esculentum*). Por tal motivo, esta especie vegetal se escogió para elaborar los extractos químicos.

Dos kilogramos de hojas de *L. esculentum*, variedad chonto Santa Cruz (J. Noreña, CORPOICA, Antioquia, com. pers.), fueron secados y molidos, para luego someterlas a desengrase con hexano en el extractor Soxhlet® y luego a una percolación en frío con metanol (MeOH). El extracto en este último solvente se fraccionó a través de una serie de particiones con los siguientes solventes: hexano, diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etilo (AcO-Et), y etanol (EtOH). Los solventes eran recuperados calentando los extractos en un rotaevaporador. La Figura 3 compila el procedimiento descrito.

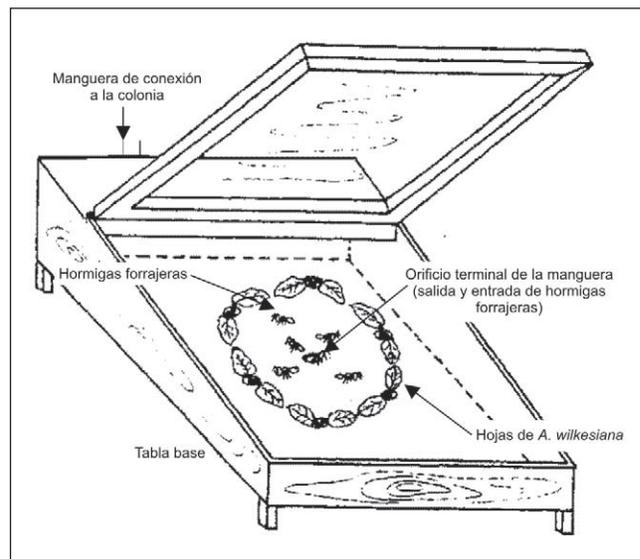


**Figura 3.** Diagrama de flujo del procedimiento para fraccionar 2 kg de hojas secas y molidas de *Lycopersicon esculentum* con diferentes solventes.

### Cámara de observación

Para llevar a cabo las pruebas de fagoINHIBICIÓN de los extractos, se diseñó una cámara de alimentación y observación acoplada a la colonia de hormigas de laboratorio. Internamente, en la tabla-base, la cámara lleva seis orificios dispuestos en forma circular donde se introdujeron hojas de *A. wilkesiana*. Estos orificios se

ubican equidistantes en un radio de 30 cm a partir de un orificio central por donde ingresan las hormigas a la cámara (Figura 4).



**Figura 4.** Cámara de observación utilizada en las pruebas de fagoINHIBICIÓN.

### Diseño estadístico de bioensayos

Para evaluar la actividad fagoINHIBIDORA de los diferentes extractos se usó un diseño de bloques completos al azar, cada uno de los cuales consistió de seis unidades experimentales divididas en dos tipos de tratamientos: tres orificios de la cámara de observación contenían cada uno dos hojas de *A. wilkesiana* (Euphorbiaceae) (Figura 5) impregnadas con el extracto en la concentración a evaluar determinada en ppm; los tres orificios restantes contenían cada uno dos hojas de la misma planta sin extracto pero impregnadas con etanol (EtOH). El etanol comercial (70% de concentración) fue el solvente elegido para las diluciones, de acuerdo con las pruebas preliminares de fagoINHIBICIÓN realizadas (Figura 6), las cuales no presentaron diferencias significativas. Para cada extracto se prepararon y evaluaron varias concentraciones menores o cercanas a 1000 ppm ya que biológicamente se considera poco útil evaluar concentraciones superiores.

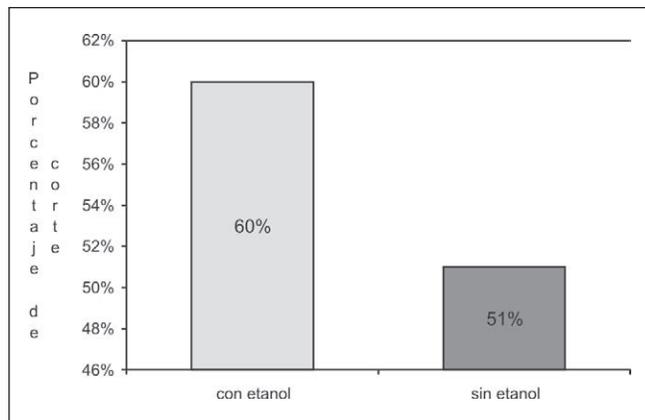
### Resultados y discusión

Cada dato de la Tabla 1 corresponde al promedio de las tres (3) unidades experimentales en cada una de las tres repeticiones o bloques, de acuerdo con el porcentaje

de área foliar de *A. wilkesiana* retirado por las hormigas forrajeras de láminas foliares previamente sometidas a dos clases de tratamientos: hojas con el extracto a la concentración seleccionada (HCE) y hojas sin el extracto (HSE), pero tratadas con etanol, el solvente elegido para las diluciones.



**Figura 5.** Planta de Reina Carlota (*Calypha wilkesiana*).



**Figura 6.** Actividad forrajera con etanol comercial destilado ( $F = 1.95$ ,  $P < 0.18$ ).

Un análisis preliminar de los datos de la Tabla 1, permitió ordenar los extractos de acuerdo con su actividad fagoínhibidora. El extracto 1 (hexánico de desengrase) y el extracto 3 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del MeOH) se pueden considerar como muy activos, incluso a bajas concentraciones de 33 y 49 ppm, respectivamente; los extractos 4 (AcOEt del MeOH) y 5 (EtOH del MeOH) se clasifican como activos y el extracto 2 (hexánico del MeOH) no registró actividad biológica aparente bajo este diseño.

Las diferencias de corte más pronunciadas (HCE vs. HSE) se obtuvieron con los extractos 1 (hexánico de desengrase), extracto 3 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), extracto 4 (AcOEt) y extracto 5 (EtOH). Sin embargo, en los extractos 4 y 5 no fue tan marcado el contraste a bajas concentraciones: 100 y 55 ppm para el extracto 4, y 100 ppm para el extracto 5. Por el contrario, con los extractos 1 (hexánico de desengrase) y 3 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) se obtuvieron valores muy contrastantes incluso a concentraciones muy bajas (33 y 49 ppm respectivamente).

Los valores obtenidos para los extractos hexánico (del metanol) (extracto 2) y etanólico (del metanol) (extracto 5), no expresaron actividad fagoínhibidora aparente, incluso a altas concentraciones (1.055 ppm y 1.000 ppm, respectivamente).

Las Figuras 7 a 11 representan los contrastes de actividad de forrajeo en hojas con y sin extracto (HCE y HSE). En todas las figuras, las barras de la izquierda representan los promedios de nueve valores obtenidos como porcentaje de área foliar retirada por las forrajeras en hojas con extracto (HCE), y las barras de la derecha representan los promedios de otros nueve valores obtenidos como porcentaje de área foliar retirada por las forrajeras en hojas sin extracto (HSE), sólo con el solvente. En principio, cualquiera de los extractos obtenidos de las hojas de tomate podría considerarse como fagoínhibidor potencial para proteger cultivos susceptibles al ataque por *A. cephalotes*.

A fin de reconocer estos datos como muestras representativas de la población estadística, para cada grupo de datos brutos (18 datos), por extracto y por concentración, se elaboró un análisis de varianza (ANAVA). Las pruebas de homogeneidad de varianzas resultaron no significativas ( $P < 0.1$ ) lo que confirma la homogeneidad de las mismas. Además, en las ANAVA se detectó efecto de bloques, lo que demuestra que el diseño de bloques completamente al azar utilizado en el presente trabajo es adecuado.

**Tabla 1.** Daño foliar ocasionado por las hormigas arrieras expresado como porcentaje de corte de la lámina foliar, en ensayos de laboratorio con diferentes concentraciones de extractos del tomate *Lycopersicon esculentum* M. Cada dato corresponde al promedio de tres unidades experimentales.

Extracto		Daño foliar (% de corte)					
TIPO	Concentración (ppm)	HCE			HSE		
		BLQ 1	BLQ 2	BLQ 3	BLQ 1	BLQ 2	BLQ 3
1 Hexánico desengrase	990	53.3	23.3	20	53.3	56.7	46.7
	330	23.3	11.7	8.3	56.7	66.7	56.7
	99	36.7	30	21.7	50	73.3	46.7
	33	36.7	53.3	46.7	76.7	66.7	63.3
2 Hexánico (de MeOH)	1055	53.3	43.3	46.7	63.3	50	46.7
	422	50	50	46.7	50	53.3	60
3 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (de MeOH)	980	46.7	50	40	63.3	70	96.7
	490	46.7	50	50	93.3	61.7	53.3
	122.5	33.3	40	33.3	53.3	36.7	66.7
	49	46.7	50	68.3	60	63.3	78.3
4 AcOEt (de MeOH)	923.5	1.7	10	--	50	56.7	--
	185	16.7	16.7	53.3	43.3	46.7	80
	100	33.3	15	23.3	43.3	33.3	30
	55.5	16.7	50	30	40	40	33.3
5 EtOH (de MeOH)	1000	21.7	20	30	43.3	30	20
	500	26.7	13.3	20	46.7	20	26.7
	100	16.7	43.3	40	20	36.7	26.7

HCE: Hojas con extracto.

HSE: Hojas sin extracto.

BLQ: Bloque o repetición.

MeOH: Metanol.

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano.

AcOEt: Acetato de etilo.

EtOH: Etanol.

Los extractos hexánico y etanólico (del metanol), no tuvieron significancia estadística ni siquiera a 1.055 ppm, la concentración más alta que se preparó (Figuras 9 y 11). Aparentemente, estos extractos no presentan ningún efecto sensorial cuando entran en contacto con los palpos labiales y maxilares de las hormigas cortadoras. Por tanto, estos extractos no resultan promisorios para evaluar en campo.

Nótese que para la partición hexánica del MeOH (extracto 2) y para la partición en EtOH del MeOH (extracto 5), las pruebas son estadísticamente no significativas, lo que indica que tales extractos no mostraron marcada actividad fago-inhibidora, ni siquiera a las concentraciones de 1.055 y 1.000 ppm, respectivamente (Figuras 8 y 11).

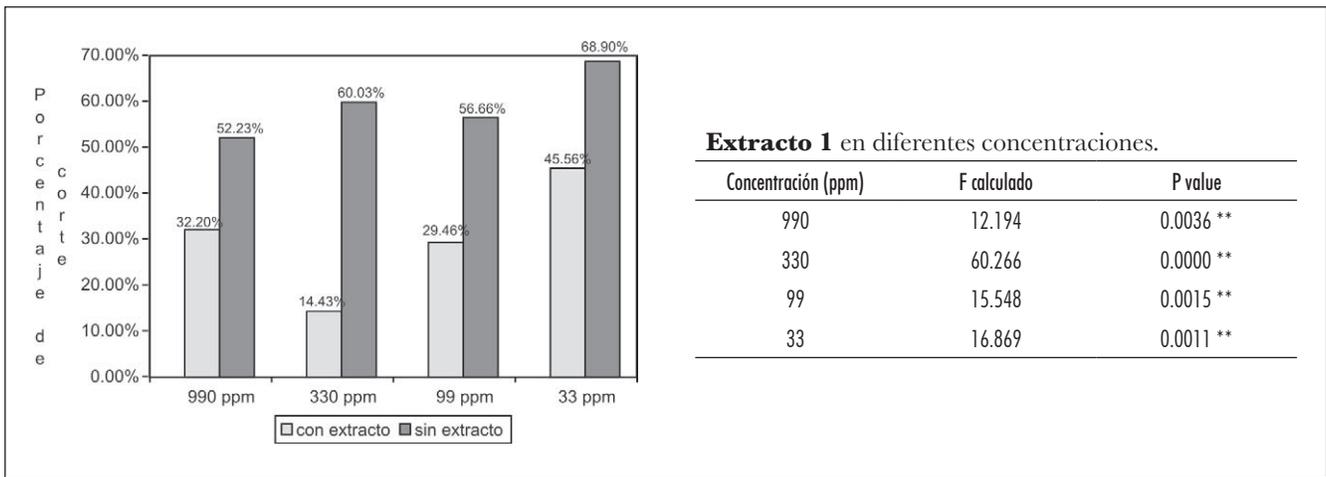
El desengrase hexánico (extracto 1) fue el extracto que presentó la mejor actividad a la concentración más baja de todas (33 ppm) (Figura 7). Compuestos que repelen hormigas cortadoras de hojas, han sido

encontrados en esta fracción lipídica de extractos de plantas y muchos de ellos pertenecen al grupo de los terpenoides (Pagnocca, 1990).

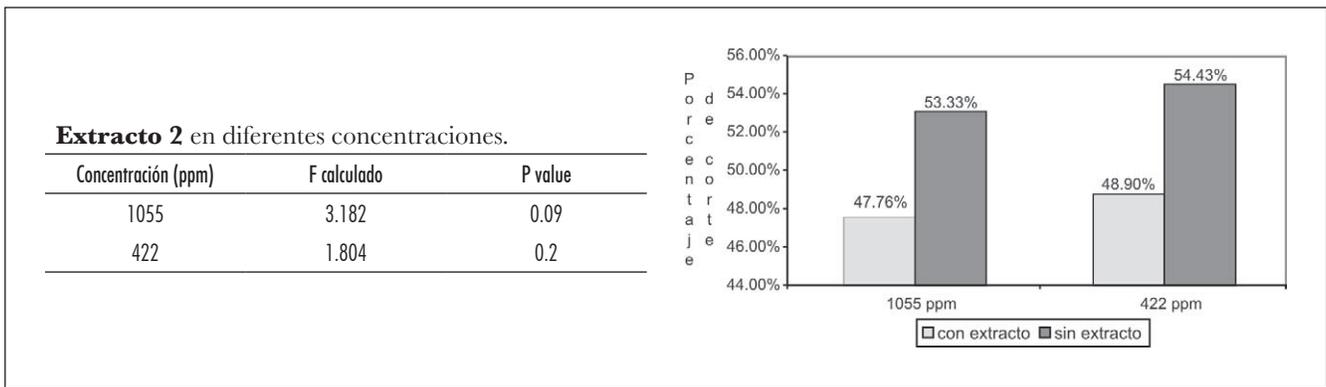
El extracto diclorometánico (extracto 3) también resultó muy promisorio como fago-inhibidor a baja concentración (49 ppm); un análisis de esta fracción podría dar lugar al reconocimiento de otras sustancias lipídicas y no lipídicas involucradas en la disuasión (Figura 9).

El extracto de AcOEt (extracto 4) en concentraciones de 100 ppm y 55 ppm presentó poca actividad; nótese que a concentraciones mayores de 923.5 y 185 ppm, las diferencias son muy notorias lo que hace evidente una importante bioactividad (Figura 10).

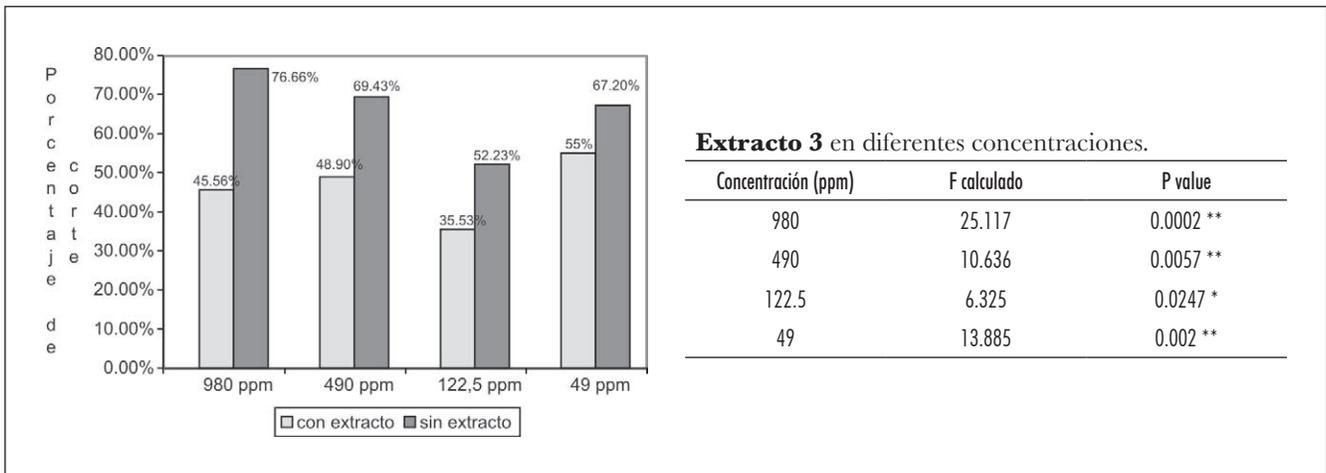
El análisis estadístico confirma lo observado en forma general en la Tabla 1. Los extractos más activos a las concentraciones más bajas fueron: extracto hexánico de desengrase a 33 ppm, el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 49 ppm y el extracto en AcOEt a 185 ppm.



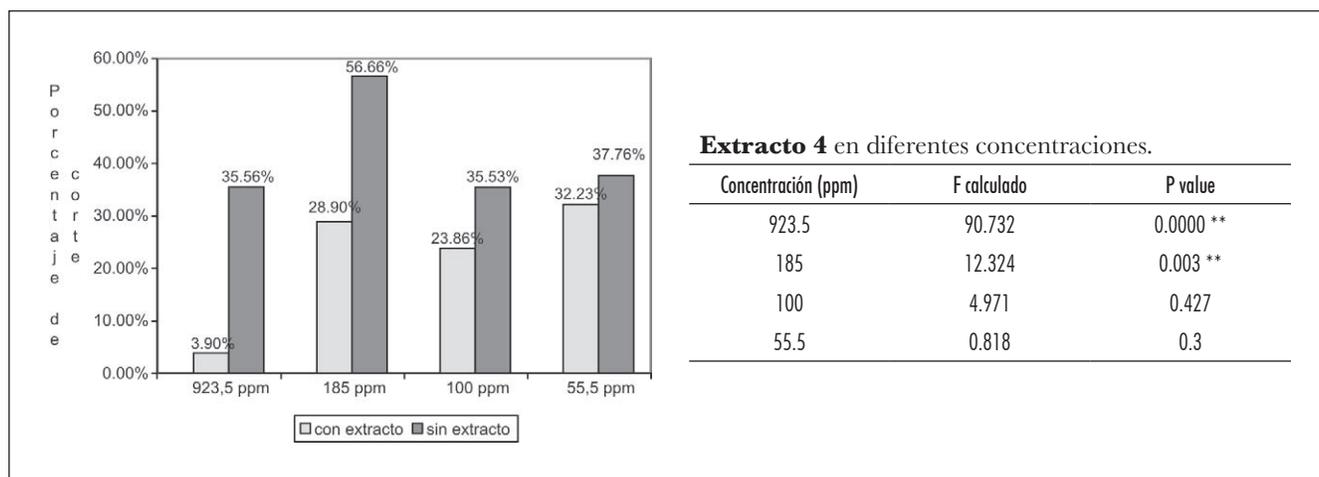
**Figura 7.** Actividad de forrajeo con el extracto hexánico (desengrase).



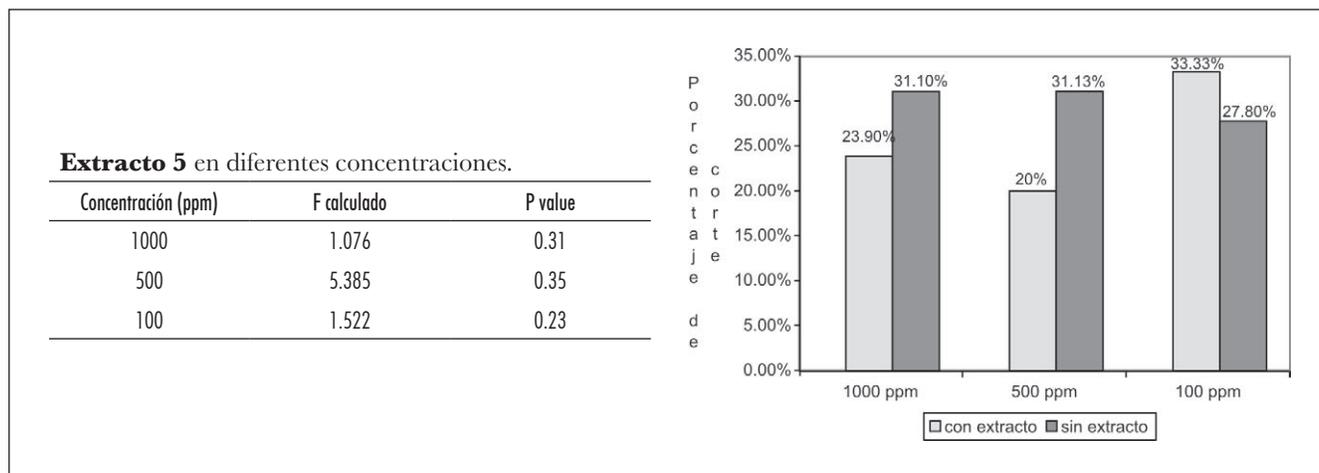
**Figura 8.** Actividad de forrajeo con la partición hexánica (del MeOH).



**Figura 9.** Actividad de forrajeo con la partición  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (del MeOH).



**Figura 10.** Actividad de forrajeo con la partición AcOEt (del MeOH).



**Figura 11.** Actividad de forrajeo con la partición EtOH (del MeOH).

Los resultados también indican que el diseño en bloques al azar es adecuado para evaluar extractos de plantas en el sistema acoplado cámara-hormiguero.

Los extractos vegetales se pudieron ordenar, de acuerdo a su actividad fago inhibidora, en la siguiente secuencia:

El extracto 1 (hexánico inicial) y el extracto 3 (con diclorometano) se catalogan como muy activos; el extracto 4 (con acetato de etilo) como activo. Al extracto 2 (partición hexánica del extracto metanólico), y al 5 (partición con EtOH), no se les comprobó actividad biológica bajo el diseño utilizado.

Los extractos más efectivos presentaron actividad fago inhibidora a concentraciones relativamente bajas de 33 ppm para el hexánico y 44 ppm para el extracto con diclorometano. Estos dos extractos, en diluciones cercanas a 50 ppm, son promisorios para ensayos de campo, ya que el nivel de fago inhibición que producen a tan bajas concentraciones podría hacer económica y práctica su utilización.

### ***Función ecológica de la fracción lipídica***

Los resultados experimentales que señalan una mayor actividad fago inhibidora del extracto hexánico de des-

engrase, entran a hacer parte de, por lo menos, un centenar de trabajos que muestran la composición química de los extractos lipídicos epicuticulares de las plantas, así como la participación de los mismos o de sus constituyentes en las interacciones ecológicas entre las plantas y los insectos.

De acuerdo con Eigenbrode y Espelie (1995), se pueden hacer varias consideraciones respecto a la fracción lipídica. Los trabajos experimentales que han usado este tipo de sustancias demuestran que los extractos de lípidos en varias plantas, o sus componentes químicos, presentan marcada actividad aleloquímica en cuanto a la fago-inhibición, la fagoestimulación o la toxicidad. La acción de los componentes químicos de estos extractos sobre algunos insectos herbívoros constituye uno de los mecanismos que explican la resistencia a ciertas plagas en una serie de cultivos como la cebolla, el nabo, la col, el repollo, la soya, la cebada y el trigo.

La mayoría de las ceras epicuticulares de las plantas, asociadas con la cutina, tienen como componentes básicos a sustancias alifáticas entre las que se cuenta: n-alcanos, ésteres, alcoholes, ácidos y, minoritariamente, aldehídos, cetonas, dicetonas y triterpenoides.

De acuerdo con Correa (1991), las pruebas con extractos y algunas sustancias individuales que han llevado a cabo varios grupos de investigación, han arrojado datos promisorios: los extractos de lípidos epicuticulares extraídos de retoños de algodón estimulan la alimentación del gorgojo *Anthonomus grandis*, siendo la fracción activa una mezcla de ésteres. Por otra parte, el extracto clorofórmico de plantas no hospederas reducen la alimentación del saltahojas *Chorthippus parallelus* (Hemiptera: Cicadellidae). Así mismo, los extractos de lípidos superficiales aislados de variedades resistentes de arroz al ataque del saltamontes *Nilaparvata lugens*, inhiben la alimentación de este insecto cuando los extractos se aplican en la superficie de plantas susceptibles.

También, la fracción hidrocarbonada del haba (*Vicia faba*), constituida por los n-alcanos C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> y C<sub>33</sub>, estimula la alimentación del áfido del guisante *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae). Otros n-alcanos de cadena más corta (C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub> y C<sub>23</sub>), extraídos del lípido epicuticular del sorgo, inhiben la alimentación de *Locusta migratoria* (Acrididae). Los alcoholes grasos hexacosanol (C<sub>26</sub>) y octacosanol (C<sub>28</sub>) estimulan la alimentación en larvas del gusano de seda *Bombyx mori* (Bombycidae); tales al-

coholes son comunes en los lípidos epicuticulares de las hojas de morera.

Por su lado, los ácidos grasos libres de cadena corta (C<sub>8</sub> a C<sub>13</sub>) evitan el establecimiento del áfido *Myzus persicae* (Aphididae) sobre superficies vegetales y artificiales. Para los ácidos grasos libres de cadena larga (> C<sub>20</sub>), que comprenden una gran proporción de los lípidos superficiales de algunas plantas, aún no se ha explorado si afectan o no el comportamiento de los insectos. Se sabe que los triterpenoles  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina inhiben la alimentación de *L. migratoria* cuando se agregan a discos de harina de trigo. Para el “gusano ejército” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), y para la larva de la mazorca del maíz *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), el crecimiento de sus larvas es mayor cuando se alimentan con follaje de maíz exento de los lípidos epicuticulares.

La presentación de efectos tóxicos por el uso de extractos lipídicos aún no aporta datos muy concluyentes y sólo se ha reportado la alteración del crecimiento de larvas.

Howard *et al.* (1988) sugieren que deben hacerse estudios sobre terpenoides y otros compuestos lipídicos disuasores de las hormigas. Así mismo, consideran que la elucidación de los mecanismos por los cuales éstos ejercen efectos tóxicos, puede iluminar muchos detalles sobre la simbiosis hormiga-hongo y pueden mostrar nuevos y significativos indicios sobre los mecanismos naturales de resistencia de las plantas contra los ataques de insectos y hongos.

Para los extractos diclorometánico (extracto 3) con muy buena actividad a 33 ppm y el extracto AcOEt (extracto 4) con actividad importante a 185 ppm, se requieren estudios de separación fitoquímica, con el fin de reconocer la naturaleza química de las particiones y la identidad de las sustancias contenidas. Otros compuestos involucrados en la fago-inhibición pueden ser de naturaleza alcaloide o flavonoide (Camps, 1988).

Una de las barreras químicas más importantes a la alimentación de los herbívoros son los taninos, que pueden ser de dos clases: hidrolizables o condensados. Los primeros son derivados de la glucosa, como el ácido gálico. Los taninos condensados tienen un elevado peso molecular, con sabor astringente y efecto repelente sobre algunos animales. Varias sustancias tánicas están involucradas en la actividad inhibidora de la alimentación de los insectos,

entre ellos, el ácido gálico, el ácido hexahidroxi-difénico, la procianidina, la demissina y la solanina.

El tomate contiene solanina, como la mayoría de las solanáceas, y es el alcaloide predominante en la papa (*Solanum tuberosum*). La búsqueda de variedades de papa resistentes al ataque del escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* permitió descubrir dicha resistencia en una especie silvestre de Sudamérica, *S. demissum*, atribuyéndose esta propiedad a la presencia de un alcaloide esteroide, la demissina, relacionada con la solanina (Camps, 1988).

Los resultados de este estudio permiten considerar que el sistema acoplado cámara-colonia constituye un diseño novedoso y eficaz para evaluar la actividad de forrajeo de las hormigas cortadoras en el laboratorio.

Futuras pruebas en campo deberían incluir el extracto con acetato de etilo (AcOEt) con la sugerencia de trabajarlo a concentraciones un poco mayores, por encima de 100 ppm; así mismo, se recomienda realizar un fraccionamiento del extracto hexánico dirigido por ensayos de bioactividad en la colonia de laboratorio.

En cuanto a la preparación de los extractos se debe obtener mayor cantidad de extracto con acetato de etilo y someterlo a una purificación exhaustiva guiada por ensayos de bioactividad. También es recomendable fraccionar y purificar el extracto etanólico, aún sabiendo que su actividad en la colonia no fue significativa.

Una promisoriosa recomendación que requeriría ensayos controlados, es sugerir que las hojas de tomate que son desechadas en cultivos locales o cercanos, sean utilizadas para elaborar extractos primarios utilizándolos en bioensayos en la colonia de laboratorio.

## Agradecimientos

A la Fundación Buen Pastor (Medellín, Colombia) por su apoyo económico. Al Profesor Hernán Gómez por su asesoría en el trabajo estadístico. A Erika Valentina Vergara, por su paciencia en la digitación, sugerencias y toma de fotografías. Al Profesor Carlos García, por su constante atención a la colonia y su asesoría fitoquímica. A la ingeniera Ángela María Uribe, por lograr el apoyo económico y logístico para adelantar este estudio. Al Profesor Alejandro Madrigal por su asesoría. A los Profesores Alejandro Toro y Horacio Sierra, y al señor Medardo, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Uni-

versidad Nacional de Colombia, sede Medellín, quienes permitieron la toma de fotos. A Norelhy Quimbayo.

## Bibliografía

**Ariniello, L. 1999.** Protecting paradise. Fungus-farming ants ensure crop survival with surprising strategies and partnerships. *Bioscience* 49(10), 760-763.

**Beraldo, M.J.H. y O.A. DaSilva. 1988.** Plantas tóxicas: Toxicidade vegetal e desenvolvimento de formigueiros da tribo Attini. *En: Curso de atualização no controle de formigas cortadeiras.* 2 p.

**Camps, F. 1988.** Capítulo 3. Relaciones planta-insecto: insecticidas de origen vegetal, pp. 69-86. *En: Bellés, X. (ed.). 1988. Insecticidas biorracionales: nuevas tendencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas –CSIC-. Madrid, España.* 405 p.

**Chapela, I. H.; S.A. Rehner; T.R. Schultz y U.G. Mueller. 1994.** Evolutionary history of the symbiosis between fungus-grown ants their fungi. *Science* 266, 1691-1694.

**Cherret, J.M.; R. J. Powell y D.J. Stradling. 1989.** The mutualism between leafcutting ants and their fungus. *Insect-fungus interactions. En: 14th Symp. Royal Entomol. Soc. Cap. 4; pp. 93-120.*

**Correa, J.A. 1991.** Metabolitos secundarios de la especie *Lycopersicon esculentum* M. (tomate). Departamento de Química. Universidad Nacional, sede Medellín. Seminario de Maestría. (Sin publicar). 57 p.

**Dethier, V.G.; B.L. Barton y C.N. Smith. 1960.** The designation of terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology* 53(1), 134-136.

**Eigenbrode, S.D. y K.E. Espelie. 1995.** Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annual Review of Entomology* 40, 171-194.

**Febvay, G.; P. Bourgeois y A. Kermarrec. 1985.** Antiprédateurs pour la fourmi attiniae, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae), chez certaines espèces d'ignames (Dioscoreaceae) cultivées aux Antilles. *Agronomie* 5(5), 439-444.

**Hebling B., M.J.A.; O.C. Bueno; O.A. Silva y S.C. Pagnocca. 1986.** Efeitos do gergelim no crescimento de sauerios iniciais de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel 1908. *En: GTFC, Boletín No. 3, 7-8.*

**Howard, J. J.; J. Cazin Jr. y D.F. Wiemer. 1988.** Toxicity of terpenoid deterrents to the leaf cutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. *J. Chem. Ecol.* 14 (1), 59-69.

- Mackay, W. y E. Mackay. 1986.** Las hormigas de Colombia: arrieras del género *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). Revista Colombiana de Entomología 12, 23-30.
- Moncayo M., E. 1954.** La hormiga arriera. Monografía del Curso de Entomología Económica. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, 28 p.
- Mulenax, C. H. 1979.** The use of Jackbean (*Cannavalia ensiformis*) as a biological control for leaf cutting ants (*Atta* sp.). Biotropica 11 (4), 314.
- Pagnocca, F. C. 1990.** Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. Bulletin of Entomological Research 80, 349-352.
- Serna C., F. J. 1992.** *Atta* spp., *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera : Formicidae). Cronologías en control y tendencias en investigación. Monografía de Entomología Económica (Carrera de Ingeniería Agronómica). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. 64 p.
- Serrano, M. S., S. L. Lapointe y A. Villegas. 1993.** Caracterización del daño de la hormiga cortadora de pastos *Acromyrmex landolti* (Forel) (Hymenoptera : Formicidae) sobre el establecimiento de *Andropogon gayanus* en los Llanos Orientales de Colombia. Revista Colombiana de Entomología 19 (1), 21-26.
- Weber, N.A. 1972.** Gardening ants: the attines. The American Philosophical Society. 146 p.