

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



Caracterización de compuestos epicuticulares del árbol *Triplaris americana*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO

EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA

AUTOR

Jorge Emiliano Deustua Stahr

ASESOR:

Dr. Eric Gabriel Cosio Caravasi

Lima, mayo, 2019

Resumen

Triplaris americana es un árbol de la familia de las poligonáceas que tiene una relación simbiótica mutualista con hormigas de la especie *Pseudomyrmex triplarinus*. Este árbol, que pertenece al grupo de mirmecofitas debido a su afiliación con hormigas, es defendido de herbívoros y parásitos por las hormigas mientras que éstas utilizan el árbol a su favor como nido para la colonia. Este tipo de relaciones simbióticas son sumamente interesantes para muchas áreas de la biología, especialmente para la ecología química y, por lo tanto, su estudio es relevante.

Las ceras epicuticulares son compuestos lipofílicos que forman un revestimiento que cubre todas las partes aéreas de una planta y es fundamental para su supervivencia. Evitan que la planta sufra de una deshidratación descontrolada mientras que también defienden a la planta de patógenos, radiación UV, polvo y polen. Además, son el medio de señalización con el que las plantas interactúan con otras especies, especialmente insectos, mediante compuestos químicos que los insectos son capaces de detectar.

El objetivo de esta tesis es estudiar la química de las ceras epicuticulares de *Triplaris americana* con la aspiración a comprender con más detalle la relación simbiótica entre *Pseudomyrmex triplarinus* y este árbol desde la perspectiva química. Para esto, se analizaron las ceras extraídas de hojas de *Triplaris americana* mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos. El resultado fue un perfil de concentraciones relativas de compuestos altamente hidrofóbicos que provee información útil para un posterior análisis de su función en relación con la percepción de las hormigas.

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Eric Cosio por los buenos chistes y el buen humor.

A mis padres, hermana y familia por la paciencia y el cariño.

A mis amigos por lo mismo.

A la Lic. Eliana Esparza y a Lic. Fabian Limonchi por el constante apoyo durante esta aventura llamada tesis, con muchas ideas, discusiones y asistencia en el trabajo de campo.

Al Prof. Dr. Javier Nakamatsu por haberme entregado su fascinación por la ciencia.

A mis compañeras de laboratorio: Sandra Nakandakari, Brenda D'Acunha y Antonella

Hadzich por ser lo máximo, por el apoyo, por la amistad y, sobre todo, por las risas.



Tabla de contenidos

1.	Introducción.....	1
1.1	Las mirmecofitas.....	2
1.2	El género <i>Triplaris</i>	4
1.3	<i>Triplaris americana</i>	5
1.4	<i>Pseudomyrmex triplarinus</i>	8
1.5	La cutícula y las ceras epicuticulares.....	10
1.6	Biosíntesis de ceras	15
2.	Objetivos.....	19
2.1	Objetivo general.....	19
2.2	Objetivos específicos	19
3.	Materiales y métodos.....	20
3.1	Materiales.....	20
3.1.1	Solventes.....	20
3.1.2	Reactivos	21
3.1.3	Estándares.....	21
3.1.4	Gases.....	22
3.1.5	Instrumentos	22
3.1.6	Material vegetal	23
3.2	Métodos	26
3.2.1	Extracción de ceras epicuticulares por inmersión en solvente	26
3.2.2	Extracción crioadhesiva de ceras.....	27

3.2.3	Extracción de ceras por goteo con pipeta Pasteur	28
3.2.4	Derivatización con BSTFA	28
3.2.5	Estándar de alcanos lineales	29
3.2.6	Cromatografía de gases	30
3.2.7	Análisis de datos.....	30
4.	Resultados.....	32
4.1	Estándares de alcanos	32
4.2	Alcanos lineales saturados	33
4.3	Alcoholes primarios	35
4.4	Aldehídos	37
4.5	Ácidos Grasos	39
4.5.1	Ácidos grasos insaturados	41
4.6	Triterpenoides	43
4.7	Tocoferoles	44
4.8	Ceras totales	45
5.	Discusión	47
5.1	Material vegetal	47
5.2	Alcanos	47
5.3	Ácidos grasos	49
5.4	Alcoholes	50
5.5	Aldehídos	52
5.6	Triterpenoides	53

5.7	Tocoferoles	55
6.	Conclusiones.....	57
7.	Bibliografía.....	59



Tabla de abreviaciones

AMDIS Automated Mass-Spectral Deconvolution and Identification System

CoA coenzima A

BSTFA N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

GC cromatografía de gases

MS espectrometría de masas

NIST National Institute of Standards and Technology

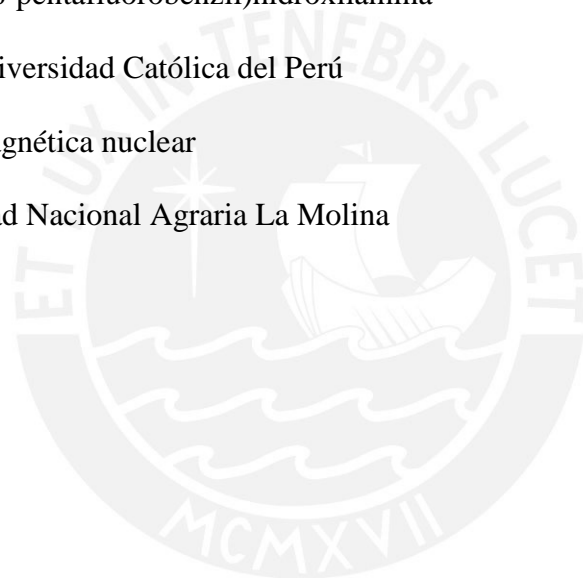
PET polietilentereftalato

PFBHA O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina

PUCP Pontificia Universidad Católica del Perú

RMN resonancia magnética nuclear

UNALM Universidad Nacional Agraria La Molina



Índice de Tablas

Tabla 1. Tiempos de retención de la solución de alcanos estándar.	32
Tabla 2. Abundancias relativas al componente mayoritario de alcanos lineales en extractos de <i>Triplaris americana</i> con distintos métodos de extracción.	34
Tabla 3. Abundancias relativas al componente principal de alcoholes de cadena larga en <i>Triplaris americana</i>	36
Tabla 4. Abundancias relativas de aldehídos en extractos de <i>Triplaris americana</i> comparado por métodos de extracción.	38
Tabla 5. Porcentajes relativos al compuesto mayoritario de ácidos grasos.	40
Tabla 6. Abundancias relativas de ácidos grasos insaturados en comparación con ácido hexanoico que es el ácido graso mayoritario.	42
Tabla 7. Abundancias de los triterpenos mayoritarios relativas al componente principal.	43
Tabla 8. Abundancias relativas de tocoferoles en comparación con ácido hexanoico... ..	45

Índice de Figuras

Figura 1. Interior del domacio de un tallo joven de <i>Triplaris americana</i>	3
Figura 2. Tronco de una <i>Triplaris americana</i> adulta en “Tangarana alley”, Reserva Nacional de Tambopata, Madre de Dios, Perú.....	7
Figura 3. Detalle del tallo de <i>Triplaris americana</i> donde se observa el acceso a los domacios y algunos ejemplares de <i>Pseudomyrmex triplarinus</i>	9
Figura 4. Esquema en el que se muestra la disposición de las capas cuticulares y epicuticulares sobre la epidermis. (Müller y col., 2005).	11
Figura 5. Aspecto común de ceras epicuticulares adaxiales. Micrografía electrónica (Sousa y col., 2003).	11
Figura 6. Estructura de: alcanos lineales (a), alcoholes primarios lineales (b), ácidos grasos lineales (c) y aldehídos lineales (d).	13
Figura 7. Estructura química de los tocoferoles α , β , γ y δ	14
Figura 8. Esqueletos de los principales Triterpenoides vegetales. Lupano (a), Ursano (b), Oleanano (c) y Friedelina (d).....	15
Figura 9. Ruta biosintética de ceras vegetales (adaptado de Samuels y col., 2008).....	18
Figura 10. Ubicación de la Reserva Nacional de Tambopata (a), ampliación de la reserva y ubicación de zona de muestreo (b) y ampliación de los alrededores del Explorer’s Inn cerca a la desembocadura del río La Torre sobre el río Tambopata(c) (Google Maps, 2014).....	24
Figura 11. Ubicación de la ciudad de Lima (a), ampliación de la ciudad de Lima y ubicación de la Universidad Nacional Agraria La Molina (b) y ampliación de la universidad (c) y zona de muestreo (d) (Google Maps, 2014).	25
Figura 12. Hojas de <i>Triplaris americana</i> de diferentes tamaños recién lavadas en el laboratorio.....	26

Figura 13. Mecanismo de la reacción de derivatización con BSTFA (Supelco, 1997)..	29
Figura 14. Abundancia relativa de alcanos mayoritarios en comparación al componente principal.....	35
Figura 15. Abundancia relativa de alcoholes mayoritarios en comparación al componente principal.....	37
Figura 16. Abundancias relativas de aldehídos en extractos de <i>Triplaris americana</i> comparado por métodos de extracción.	39
Figura 17. Abundancias relativas en comparación al compuesto mayoritario.	41
Figura 18. Abundancias relativas de ácidos grasos insaturados en comparación con ácido hexanoico que es el ácido graso mayoritario.	42
Figura 19. Abundancias relativas de triterpenos comparadas por método de extracción.	44
Figura 20. Abundancias relativas de tocoferoles en función de ácido hexanoico.	45
Figura 21. Abundancia relativa de ceras totales en función de la suma de todas las concentraciones.	46
Figura 22. Espectro de masas de n-hentriacontano $C_{31}H_{64}$. Nótese el patrón característico de las masas de los fragmentos de un alcano lineal.....	48
Figura 23. Espectro de masas de ácido n-octadecanoico.....	49
Figura 24. Espectro de masas de 1-trimetilsiloxy-hexacosano.....	51
Figura 25. Espectro de masas de tetracosanal.	53
Figura 26. Espectro de masas de trimetilsilil- α -tocoferol.	56

1. Introducción

Los bosques tropicales, como la Amazonía, son lugares de muy alta biodiversidad y de gran biomasa. Millones de especies habitan estos bosques en una intensa y constante competencia por la supervivencia. En este ecosistema tan dinámico las plantas son atacadas constantemente por herbívoros, parásitos e incluso otras plantas (Coley y Barone, 1996). Esta presión ecológica ha conducido a muchas especies vegetales a evolucionar diversos mecanismos de defensa, metabólicamente costosos, que son fundamentales para la estabilidad y bienestar del ecosistema amazónico.

Las mirmecofitas son un grupo de plantas que han evolucionado junto con especies de hormigas construyendo relaciones simbióticas mutualistas. Algunas de estas relaciones planta-hormiga tienen la particularidad de funcionar como un mecanismo de defensa en favor de la planta. Las hormigas utilizan la planta como hogar y, a cambio del hospedaje, la defienden de posibles agresores. De esta manera, las mirmecofitas aseguran una ventaja con respecto a otras especies en sus ecosistemas. (Schremmer, 1984; Brandbyge, 1986).

Triplaris americana es una especie poco estudiada de árboles perteneciente al grupo de las mirmecofitas y es un gran ejemplo de simbiosis planta-hormiga en el bosque amazónico. Desde la perspectiva de la ecología química, uno puede analizar el funcionamiento de estas relaciones simbióticas a un nivel molecular. Para esto, esta tesis busca analizar la química de las ceras epicuticulares de *Triplaris americana*, que cubren todas las partes aéreas de la planta (e.g. tallos, hojas, pétalos, frutas, etc.), y que son el primer punto de contacto con insectos y otros organismos, para así poder eventualmente indagar sobre los mecanismos mediante los cuales las hormigas identifican los árboles que habitan mediante sus órganos sensoriales. Esta información, además, servirá

posteriormente para entender determinados aspectos subyacentes a esta relación simbiótica planta-hormiga.

1.1 Las mirmecofitas

Las plantas han desarrollado varios tipos de defensas contra herbívoros y parásitos a lo largo de su evolución: físicos, como las espinas; químicos, como la producción de metabolitos secundarios tóxicos en hojas y tallos; ilusorios, como la formación de hojas de colores engañosos que se asemejan a depredadores naturales; etc. El éxito de estas defensas, sin embargo, no es siempre completo. Muchas especies de depredadores evolucionaron a la par de estas defensas desarrollando, por ejemplo, resistencias a metabolitos secundarios tóxicos que tienen la función de disuadir herbívoros. La especie *Triplaris americana* es un árbol perteneciente a una clase de plantas que poseen un sistema particular de defensa. Esta especie, junto con la especie de hormigas *Pseudomyrmex triplarinus*, han desarrollado una relación simbiótica mutualista en la que *P. triplarinus* se ha convertido en el “ejército defensor” del árbol *T. americana* a cambio de alimento y de un lugar para la colonia. Este tipo de defensa de hormigas residentes, llamado mirmecofilia, sólo ha sido eludido por pocos organismos herbívoros en contraste con defensas químicas y físicas (Heil y McKey, 2003), y por lo tanto hace del árbol una especie mucho más exitosa dentro del ecosistema de la Amazonía.

Este tipo de relaciones simbióticas mutualistas entre planta y hormiga no es poco común. Existen muchas especies de árboles mirmecofitas, como por ejemplo árboles del género *Tococa*, *Acacia*, *Cecropia*, *Triplaris*, *Tachigali*, etc. El hábitat de la mayoría de éstos se concentra en la Amazonía y en bosques tropicales africanos; no obstante, se han reportado especies mirmecofitas incluso en Asia y Australia, generalmente en zonas tropicales (Davidson y col, 1993).

A nivel fisiológico, la mayor parte de las mirmecofitas evolucionaron estructuras llamadas domacios para albergar las colonias de hormigas. Estas consisten en estructuras huecas al interior de troncos, tallos u hojas de la planta (figura 1). Ocasionalmente, algunas mirmecofitas proveen de alimento a las hormigas mediante nectarios y en algunos casos cuerpos de alimento (Heil y McKey, 2003).



Figura 1. Interior del domacio de un tallo joven de *Triplaris americana*.

Finalmente, el entendimiento de estos mutualismos ha sido clave para el estudio y prueba de la Teoría de la Defensa de Plantas así como para la biología evolutiva y otros campos de la ecología como, por ejemplo, las redes alimenticias. Estudios recientes sugieren que este tipo de relaciones planta-hormiga son de suma importancia para la estructuración de redes de alimentación en los doseles de bosques tropicales (Heil y

McKey, 2003). A pesar de estos estudios, falta mucho por entender sobre este tipo de simbiosis planta-hormiga y, en especial, existe muy poca información sobre el género *Triplaris*.

1.2 El género *Triplaris*

El género *Triplaris* pertenece a la familia Polygonaceae. Todas las especies crecen rápidamente y consiguen alturas medianas, y ocasionalmente, altas. El tronco es recto, liso y ramificado solamente en el tercio superior del árbol de tal manera que la corona del árbol adquiere forma piramidal. Suelen reproducirse vegetativamente mediante esquejes. Los individuos cortados o talados frecuentemente producen brotes del muñón. (Brandbyge, 1986).

Las estípulas son cilíndricas y caducas, y llegan a 32 cm de longitud. Su estructura es muy parecida a las de los géneros *Ficus* y *Magnoli*. Son pilosos por fuera y glabros por dentro. El género *Triplaris* es estrictamente dioico, lo que quiere decir que los sexos masculino y femenino se encuentran siempre en individuos separados. Por otro lado, las inflorescencias son terminales y muy conspicuas al momento de formar el fruto. Las inflorescencias estaminadas son sésiles o subsésiles y, por eso, tiene forma de lanza. Están siempre rodeadas de un pequeño bracto. Las inflorescencias pistiladas son fundamentalmente parecidas a las estaminadas. Las flores estaminadas son bastante diferentes a las pistiladas especialmente en tamaño. (Brandbyge, 1986).

Los frutos de *Triplaris* poseen alas y, por lo tanto, su principal medio de dispersión es el viento. Caen suavemente al piso, como un paracaídas, y por esta razón tienen la posibilidad de dispersarse a distancias medianas al árbol. Sin embargo, distancias más largas son imposibles debido al peso del fruto y la densidad del bosque. (Brandbyge, 1986).

Triplaris es un género de tierras bajas. Habita en un rango de alturas entre 0 y aproximadamente 2000 m sobre el nivel del mar; no obstante, la mayor cantidad de especies sobreviven a alturas menores a 1000 m. Con frecuencia, están restringidas a hábitats húmedos y abiertos como el bosque Amazónico. Todas las especies son pioneras en claros del bosque y son fundamentales en todas las etapas de sucesiones secundarias. Las especies están principalmente distribuidas entre Panamá y Brasil y la mayor concentración de especies ocurre en la región sud-oeste de la cuenca del Amazonas (Brandbyge, 1986).

1.3 *Triplaris americana*

Triplaris americana es una planta perteneciente a las mirmecofitas, al igual que 20 de las 25 especies del género *Triplaris*, debido a su importante afiliación con *Pseudomyrmex triplarinus*. En el Perú, *Triplaris americana* es normalmente conocida con los nombres *Tangarana* o *Palo santo*. Es un árbol de estatura mediana entre 10 y 20 m de altura con troncos estrechos de aproximadamente 30 cm de diámetro, como se puede apreciar en la Figura 2. Posee una corteza suave con manchas de color gris que encarna una serie de espacios vacíos internos, domacios (ver la Figura 1), que como en la mayoría de mirmecofitas están especialmente dedicados a hospedar a las hormigas (Brandbyge, 1986). *Triplaris americana* es la especie más extendida del género. Habita en un rango desde Panamá (Provincia de Darién) hasta el sur de Brasil (Goyaz y Paraná). Ocupa zonas de alturas entre 200 m y 1000 m sobre el nivel del mar, en riberas de río o zonas de bosque secundario con tipos de vegetación más seca.

Las hojas de *Triplaris americana* son ovaladas, 2-2,5 veces más largas que anchas. Tienen dimensiones de entre 25-35 cm de largo por 10-16 cm de ancho. Tienen una forma

puntiaguda, son lisas en el lado adaxial y ligeramente pilosas en el lado abaxial. Poseen entre 20-30 pares de venas laterales (Brandbyge, 1986).





Figura 2. Tronco de una *Triplaris americana* adulta en “Tangarana alley”, Reserva Nacional de Tambopata, Madre de Dios, Perú.

1.4 *Pseudomyrmex triplarinus*

Pseudomyrmex triplarinus (Figura 3) pertenece a un género de hormigas de aguijón, territoriales y muy agresivas. Estas hormigas colonizan su árbol hospedador desde una etapa temprana de su crecimiento, cuando tiene alrededor de 50 cm de altura (Schremmer, 1984). *P. triplarinus*, como también otras especies del género *Pseudomyrmex*, son totalmente dependientes de *T. americana*. Estas hormigas han perdido la capacidad de construir sus propios nidos (Schremmer, 1984), por lo tanto, las estructuras huecas del árbol (domacios) son el único lugar en donde pueden habitar.

A pesar de que muchas plantas mirmecofitas proveen sustancias nutritivas a las hormigas mediante nectarios ricos en aminoácidos y azúcares; y cuerpos de glucógeno y proteína, *T americana* no posee estas cualidades y, por lo tanto, la alimentación de las hormigas ocurre mediante un tercer organismo involucrado en la simbiosis (Bentley, 1977; Fonseca y Ganade, 1996). Se trata de pequeños artrópodos blancos de la especie *Dysmicoccus brevipes* de la familia Pseudococcidae. Estos insectos viven junto con las hormigas dentro de los domacios y producen una suerte de miel que es la fuente de alimento de las hormigas (Schremmer, 1984).

En relación con el árbol, *P. triplarinus* cumple con su parte de la relación simbiótica mediante sus características guerreras. Utilizando sus grandes pinzas y doloroso veneno, las hormigas atacan prácticamente a cualquier intruso u objeto que entre en contacto con su árbol hospedador (Schremmer, 1984). Por ejemplo, estudios realizados por Weir y colaboradores (2011) muestran que sustancias como una hoja de papel son inmediatamente destruidas cuando se colocan en contacto con la superficie de *T. americana*. De esta manera, mantienen al árbol libre de herbívoros como también de parásitos e incluso se sospecha que mantienen el área aledaña al árbol libre de otras especies de plantas competidoras, otorgándole aún mayor ventaja (Curátola, 2009).

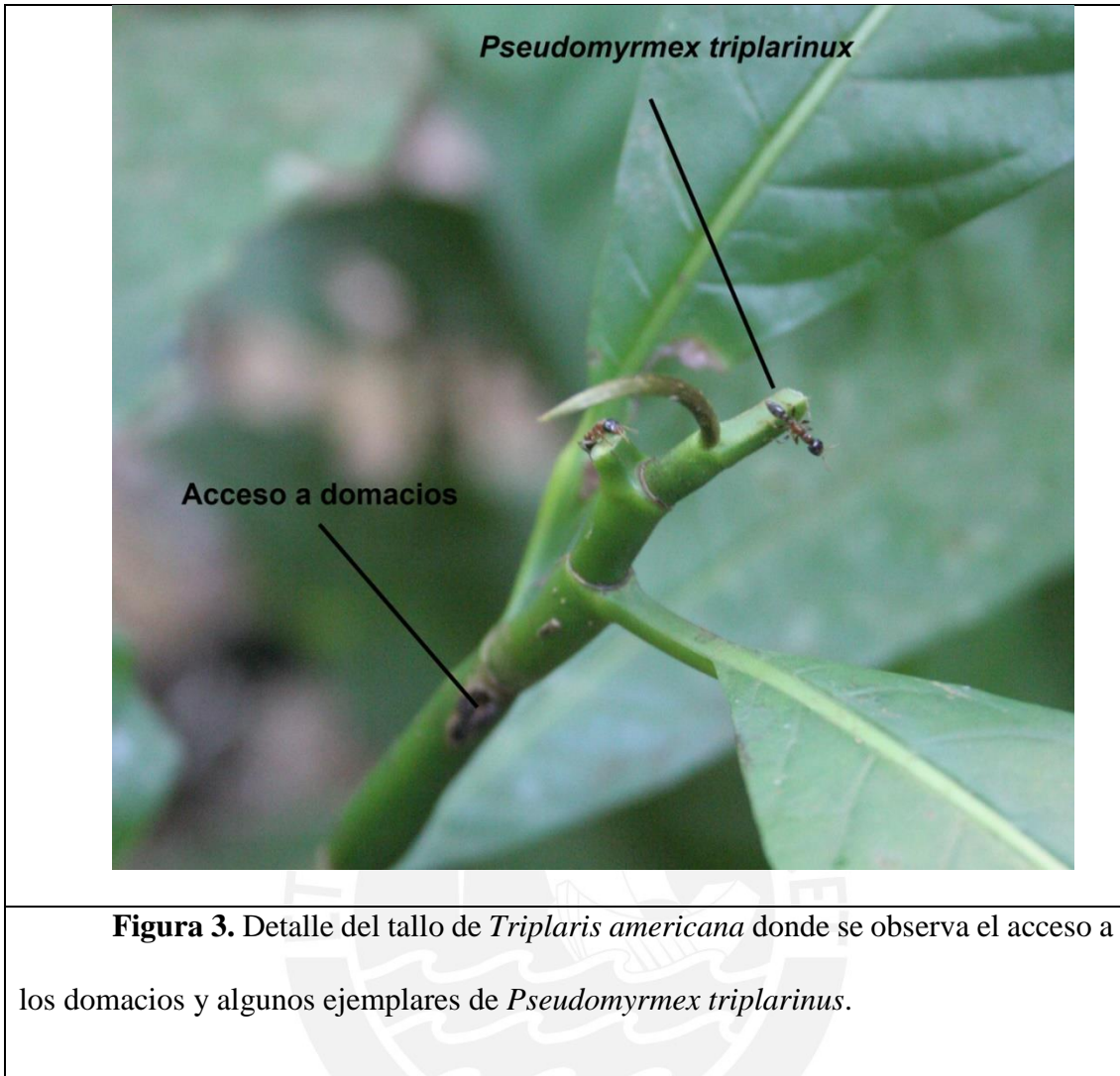


Figura 3. Detalle del tallo de *Triplaris americana* donde se observa el acceso a los domacios y algunos ejemplares de *Pseudomyrmex triplarinus*.

Pseudomyrmex triplarinus puede identificar entre su árbol hospedador y cualquier otra especie, objeto, parásito, etc. Estas hormigas llegan incluso a distinguir entre su propio árbol y otros de la misma especie (Schremmer, 1984). Las hormigas identifican al árbol por medio de compuestos epicuticulares, alojados en hojas y tallos de *T. americana* que pueden detectar con la ayuda de órganos especializados llamados sensilos ubicados en las antenas de las hormigas (Ozaki y col., 2005).

1.5 La cutícula y las ceras epicuticulares

La superficie de las plantas está delineada por una estructura denominada cutícula, que cumple labores fundamentales. La cutícula cubre esencialmente toda el área superficial de las plantas: todos los tallos, hojas, pétalos e incluso frutos de una planta. Es una barrera que protege a la planta de presiones externas ambientales. En cuanto a protección frente al estrés abiótico, sus principales funciones son: evitar la pérdida incontrolable de agua, proteger a la planta de radiación UV y ayudar a minimizar el depósito de polvo, polen y otros contaminantes (Shepherd y Griffiths, 1995; Reina-Pinto y Efremov, 2009; Bourdenx y col., 2011). Esta adaptación es clave en la evolución de las plantas terrestres y una evidencia de ello es la priorización de la producción de ceras de las células epidérmicas. Se calcula que más de la mitad de los ácidos grasos sintetizados por células epidérmicas son dirigidas a la cutícula (Samuels y col., 2008). Además, es la interface con el exterior y, por lo tanto, influencia interacciones con organismos ajenos a las plantas, especialmente insectos, mediante las ceras epicuticulares debido a que es la capa más accesible a los órganos sensoriales de los insectos (Müller y Riederer, 2005; Guhling y col., 2005). Un ejemplo de esta función entre especies está descrita en el trabajo de Bernays (1976) donde muestra que los saltamontes discriminan entre plantas comestibles y no-comestibles por medio del contacto de sus receptores químicos con las ceras epicuticulares.

La cutícula es una capa altamente hidrofóbica conformada por dos materiales que cubren la epidermis del cuerpo de la planta. Uno de ellos es la cutina, un biopolímero formado a partir de ácidos grasos hidroxilados o epoxidados a media cadena de extensiones C_{16} y C_{18} inter-enlazados mediante grupos éster, y glicerol (Samuels y col., 2008; Müller y Riederer, 2005; Eglinton y col., 1967). El otro material, las ceras, se

encuentran sobre y en la cutícula y consisten de una mezcla de compuestos altamente lipofílicos de cadenas alifáticas muy largas conocida como ceras epicuticulares.

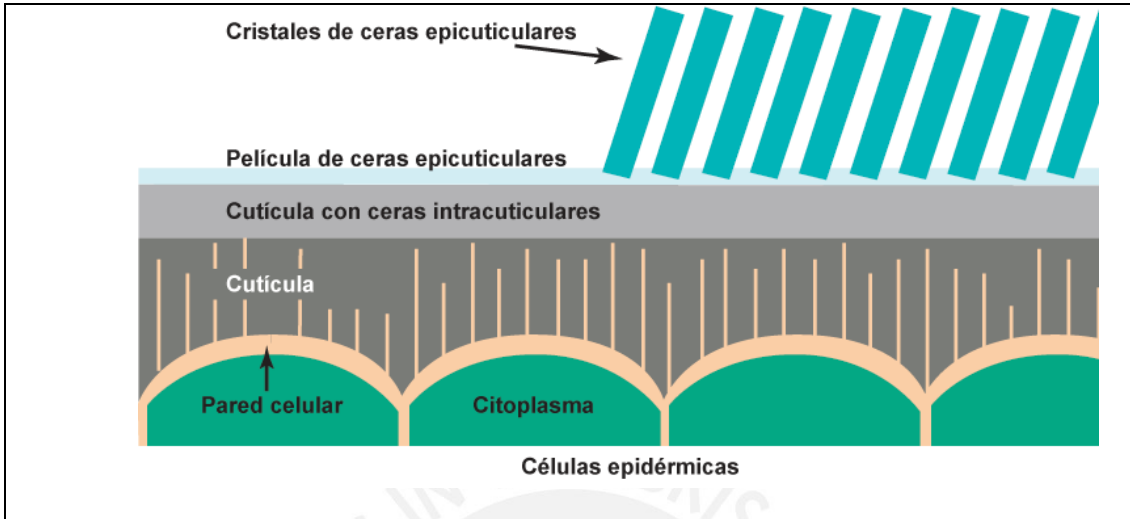


Figura 4. Esquema en el que se muestra la disposición de las capas cuticulares y epicuticulares sobre la epidermis. (Müller y col., 2005).

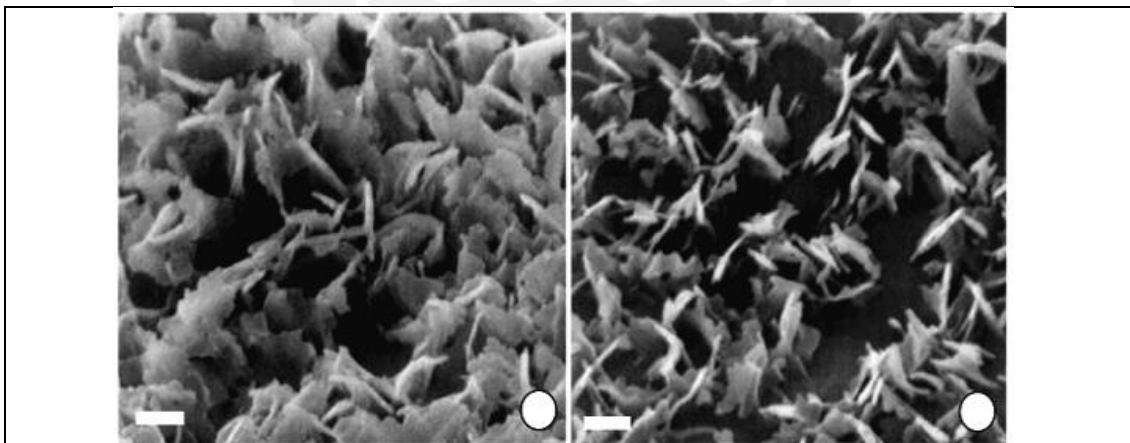


Figura 5. Aspecto común de ceras epicuticulares adaxiales. Micrografía electrónica (Sousa y col., 2003).

En el sentido químico de la palabra, las ceras son ésteres de ácidos grasos y alcoholes primarios de cadenas largas. Sin embargo, cuando se habla de las ceras epicuticulares, se suelen incluir dentro del término *ceras* a compuestos cíclicos como triterpenoides pentacíclicos y flavonoides. Típicamente, estos componentes constituyen entre 20% y 60% de la masa de la cutícula. Los compuestos principales de las ceras epicuticulares son ésteres de ácidos grasos, alcanos, alquenos, alcoholes de cadenas largas y compuestos cíclicos como flavonoides y terpenoides (Müller y Riederer, 2005). Los compuestos mayoritarios en estas categorías son alcanos lineales saturados C₂₁-C₃₅, alcoholes primarios C₂₂-C₄₀ y ácidos grasos C₁₄-C₁₈ y C₂₀-C₂₄; y aldehídos C₂₄-C₃₆, alcoholes secundarios C₂₁-C₃₅, cetonas C₂₁-C₃₅, β-dicetonas C₂₂-C₃₆ y ésteres n-alquilo C₃₆-C₆₀ con hidroxilaciones en media cadena. Por otra parte, los compuestos cíclicos contenidos en las ceras son ácidos triterpenoides pentacíclicos, alcoholes triterpenos, cetonas triterpenas, ésteres triterpenos, flavonoides, tocoferoles y glicósidos (Müller y Riederer, 2005; Wood y col., 2005; Guhling y col., 2005; Shepherd y Griffiths, 1995; Buschhaus y col., 2007). Estudios en *Arabidopsis thaliana* han concluido que la mayor parte de las ceras está constituida por alcanos y sus derivados provenientes de las rutas de síntesis de alcanos que llegan a formar el 70-80% de las ceras totales.

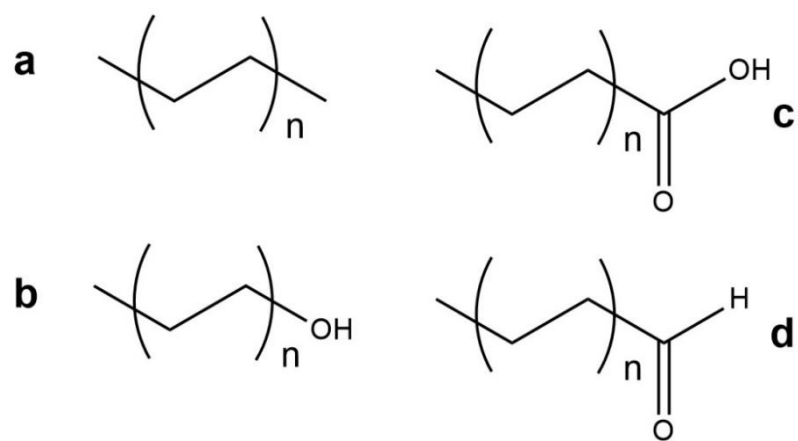
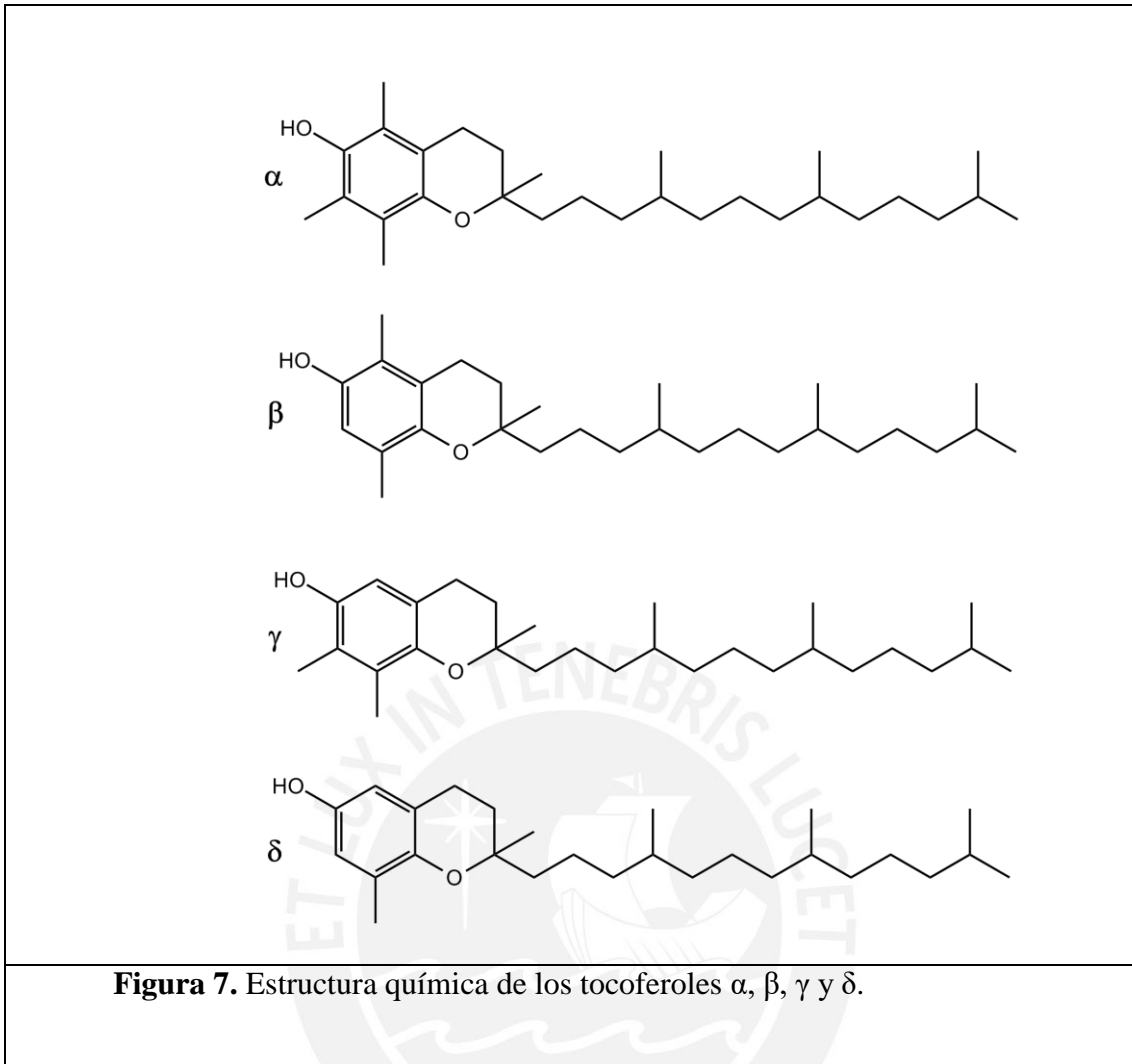
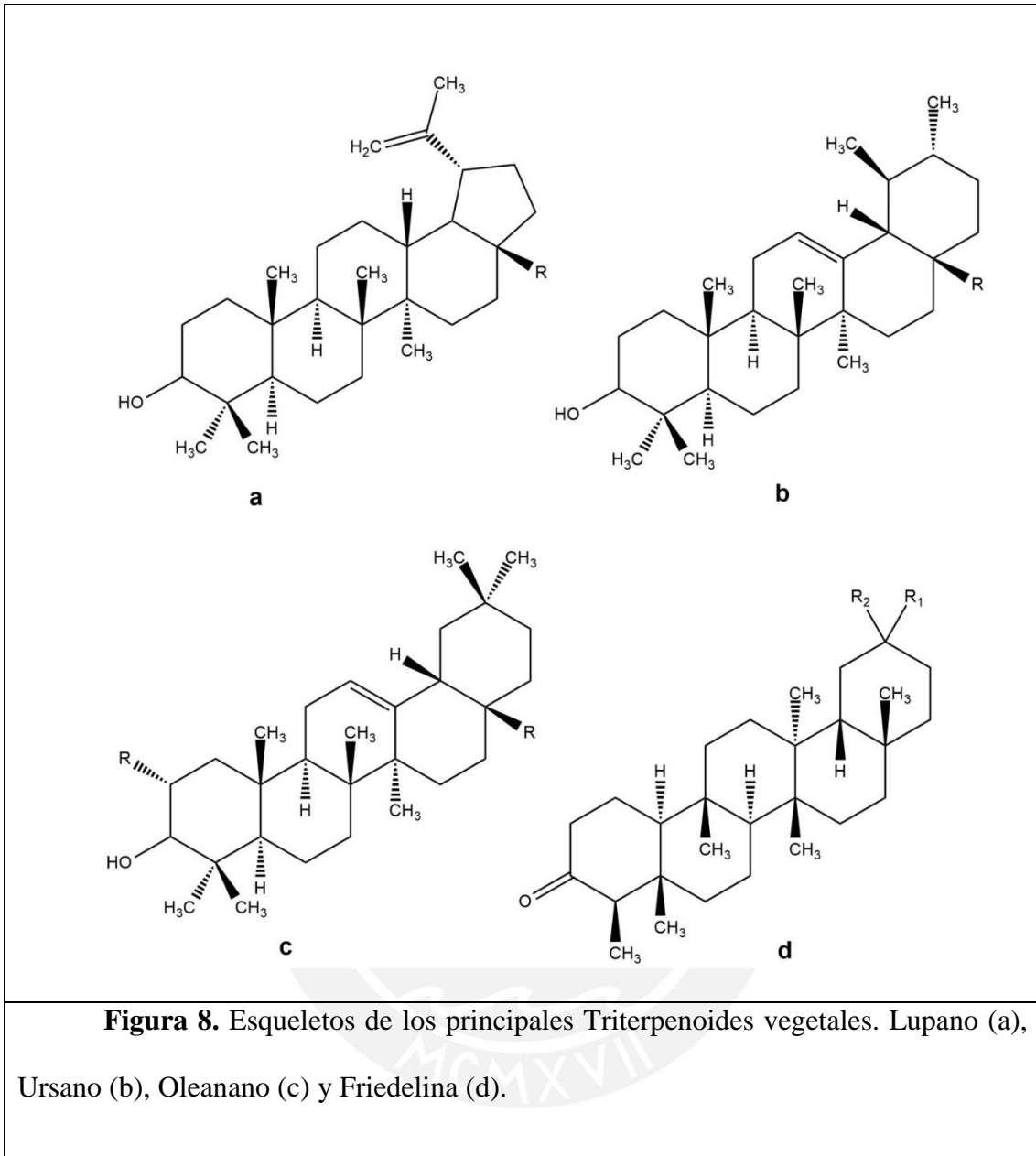


Figura 6. Estructura de: alcanos lineales (a), alcoholes primarios lineales (b), ácidos grasos lineales (c) y aldehídos lineales (d).





En cuanto a los triterpenoides, se ha reportado una gran variedad de triterpenoides en ceras vegetales, especialmente ceras intracuticulares. Algunos ejemplos de estos son lupeol, α y β amirina, ácido ursólico, ácido oleanólico, friedelina y sus respectivos derivados (Figura 8) (Buschhaus y col., 2007; Nordby y col., 1994; Courtney y col., 1983).



1.6 Biosíntesis de ceras

Las rutas biosintéticas de ceras no están completamente elucidadas aún. Sin embargo, estudios recientes de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* han aportado al entendimiento de la biosíntesis y transporte de ceras epicuticulares vegetales (Bourdenx y col., 2011; Koorneef y col., 1989). Se identificaron y caracterizaron genes involucrados en dichos procesos y además se realizaron estudios bioquímicos que respaldaron estas

exploraciones. Las ceras son sintetizadas en las células epidérmicas de las plantas mediante la adición de bloques de C_2 de acetil-coenzima A (acetil-CoA) para formar cadenas alifáticas de extensiones entre 24 y 34 carbonos. Esto ocurre en 3 etapas distintas. La primera etapa consiste en la producción de ácidos grasos C_{16} y C_{18} en los leucoplastos mediante la condensación de acetil-CoA con un grupo de dos carbonos de una proteína transportadora de malonil acilo (ACP) catalizada por el complejo de proteínas sintetizadoras de ácidos grasos (FAS). Los ácidos grasos C_{16} y C_{18} son parte de la lipogénesis general de la planta y son intermediarios centrales en todas las clases de lípidos esenciales para la planta (Harwood y col., 2005; Ohlrogge y col., 1995, Samuels y col., 2008). En la segunda etapa, parte de estos ácidos grasos son esterificados a CoA y son transportados al retículo endoplasmático mediante un proceso que no está completamente elucidado (Kunst y col., 2003). Allí, los ácidos grasos son elongados por acción de enzimas ácido graso elongadoras para convertirse en ácidos grasos de cadena muy larga, entre C_{20} y C_{34} (Kunst y col., 2003; Samuels y col., 2008). De forma similar al proceso que ocurre en los leucoplastos para la producción de ácidos grasos de cadena corta (C_{16} y C_{18}), la elongación ocurre en aumentos de grupos C_2 , provenientes de malonil-CoA y no de malonil-ACP. Se sabe que existen varias enzimas específicas para cada tamaño de cadena que catalizan este proceso, sin embargo no está todavía claro cuántas participan ni sus mecanismos de acción específicos. Estos compuestos elongados están principalmente dedicados a la producción de ceras epicuticulares (Samuels y col., 2008).

La tercera etapa consiste en la reducción de los ácidos grasos elongados a los componentes principales de las ceras y está dividida en dos rutas importantes. La primera ruta consiste en la síntesis de alcoholes primarios de cadenas de C_{26} , C_{28} , C_{30} y C_{32} (Baker, 1982) y ésteres de grupos acilo, aromáticos, alifáticos largos (C_{16} y C_{18}) y muy largos

(C₂₄-C₃₆) estos últimos pertenecientes a la etapa de elongación (Jetter y col., 2006). Los alcoholes primarios en ceras epicuticulares tienen normalmente la misma extensión, par, que los ácidos grasos elongados y por lo tanto se piensa que deben ser sintetizados mediante la reducción del grupo ácido. Estudios con *Arabidopsis thaliana* sugieren que la misma maquinaria de elongación en la etapa anterior es responsable de la reducción de los ácidos grasos a alcoholes primarios y que la ruta a través de un intermediario aldehído no es muy probable. Sin embargo, todavía existe muy poca evidencia para poder explicar completamente la maquinaria enzimática asociada a esta reducción (Samuels y col., 2008).

Por otro lado, la segunda etapa consiste en la síntesis de alcoholes secundarios, alcanos y cetonas (Jetter y col., 2006). Los productos de esta síntesis se caracterizan por ser compuestos de cadenas impares de carbonos en contraste con los alcoholes primarios y ácidos grasos. Está establecido que, al igual que la producción de alcoholes primarios, la formación de estos compuestos de cadenas impares parte de los ácidos grasos de cadenas muy largas y que por lo tanto es un proceso que compite con la síntesis de alcoholes primarios. La evidencia experimental sugiere que es muy poco probable que la descarboxilación de ácidos grasos perteneciente a esta ruta ocurra directamente en el mismo paso que la elongación de ácidos grasos como parece suceder en la síntesis de alcoholes primarios. Por lo tanto, se piensa que esta reacción ocurre en pasos separados. Además, la biosíntesis de alcoholes secundarios y cetonas ocurre en pasos separados a partir de los alcanos que funcionan como intermediarios. La formación de alcanos se lleva a cabo mediante la pérdida en lugar de la adición de C₁. Esto está confirmado mediante la evidencia de que compuestos homólogos de alcanos y de ácidos grasos presentes en ceras epicuticulares están desfasados entre sí por un carbono de tal manera que el alcano equivalente posee uno menos que el ácido graso (Samuels y col., 2008). Sin embargo, la

mecánica de estos procesos todavía queda por aclarar. Varias hipótesis se han planteado, y la más probable sugiere que el proceso ocurre mediante la descarboxilación de un aldehído intermediario (Figura 9) (Samuels y col., 2008).

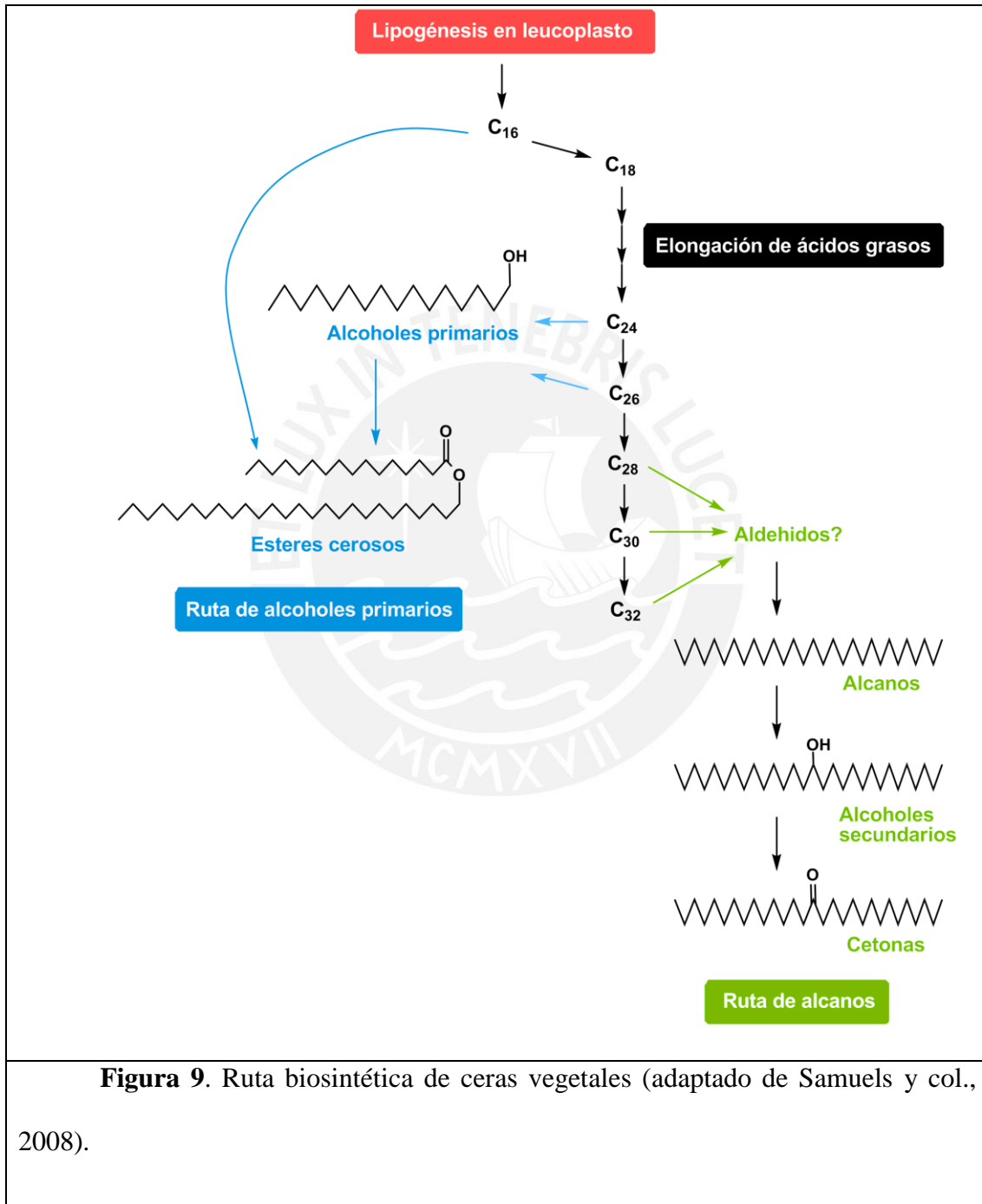


Figura 9. Ruta biosintética de ceras vegetales (adaptado de Samuels y col., 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

En vista de que la información bioquímica sobre *Triplaris americana* es casi inexistente, el objetivo general de esta tesis es determinar un perfil de compuestos presentes en la superficie de *Triplaris americana* mediante la caracterización de las ceras epicuticulares de las hojas. Esto, con el afán de contribuir a mejorar el entendimiento de la simbiosis entre *Triplaris americana* y *Pseudomyrmex triplarinus* mediante la identificación de compuestos químicos relevantes en la interacción.

2.2 Objetivos específicos

El primer objetivo fue identificar y caracterizar los compuestos mediante la comparación de espectros de masas e índices de Kovats con información previamente reportada en la literatura. El segundo objetivo fue hallar un perfil de concentraciones relativas entre compuestos e identificar los compuestos mayoritarios de las ceras epicuticulares. Para lograr el objetivo general, se decidió separar las ceras epicuticulares en clases de compuestos: alcanos, alcoholes, aldehídos, ácidos grasos y terpenoides, debido a la complejidad de la mezcla en la epicutícula.

Además, se comparó las diferencias entre métodos de extracción mecánicos y químicos para evaluar su especificidad en cuanto a la profundidad de extracción de ceras epicuticulares.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Solventes

Se utilizaron solventes de grado analítico o cromatográfico (GC, HPLC) para todos los experimentos realizados en este trabajo de tesis y se utilizó agua purificada Tipo I (Milli Q, Millipore, Billerica, EE.UU.)

Fisher Scientific (Nueva Jersey, EE.UU.)

1. Hexanos
2. Diclorometano

JT Baker (Phillipsburg, EE.UU)

1. Acetona
2. Diclorometano
3. Cloroformo
4. Hexanos
5. Metanol

Merck (Darmstadt, Alemania)

1. Cloroformo
2. n-Hexano

3.1.2 Reactivos

Macherey-Nagel (Düren, Alemania)

1. Metil 8
2. BSTFA

3.1.3 Estándares

Sigma Aldrich (St. Louis, EE.UU)

1. n-Octano C_8H_{18}
2. n-Nonano C_9H_{20}
3. n-Decano $C_{10}H_{22}$
4. n-Undecano $C_{11}H_{24}$
5. n-Tetradecano $C_{14}H_{30}$
6. n-Pentadecano $C_{15}H_{32}$
7. n-Hexadecano $C_{16}H_{34}$
8. n-Heptadecano $C_{17}H_{36}$
9. n-Octadecano $C_{18}H_{38}$
10. n-Nonadecano $C_{19}H_{40}$
11. n-Eicosano $C_{20}H_{42}$
12. n-Heneicosano $C_{21}H_{44}$
13. n-Docosano $C_{22}H_{46}$
14. n-Tetraeicosano $C_{24}H_{50}$
15. n-Octaeicosano $C_{28}H_{58}$
16. n-Dotriacontano $C_{32}H_{66}$

3.1.4 Gases

Linde Gas (Lima, Perú)

1. Helio (UHP)
2. Nitrógeno (UHP)
3. Nitrógeno líquido (UHP)
4. Aire sintético

3.1.5 Instrumentos

Agilent (Santa Clara, EE.UU.)

1. Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II
2. Cromatógrafo de gases Agilent 7890B
3. Espectrómetro de masas cuadrupolo HP 5971
4. Espectrómetro de masas cuadrupolo Agilent 5977B
5. Columna de cromatografía de gases HP-5ms ((5%-fenil)-methilpolisiloxano), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria.
6. Columna de cromatografía de gases DB-5ms ((5%-fenil)-methilpolisiloxano), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria.

Büchi (Flawil, Suiza)

1. Rota-evaporador, R-3

Pierce (Rockford, EE.UU)

1. Bloque termostatzado con agitación magnética, Reacti-Therm™, módulo de calentamiento y agitación y unidad de evaporación.

Genéricos

1. Bolsas para hornear PET

3.1.6 Material vegetal

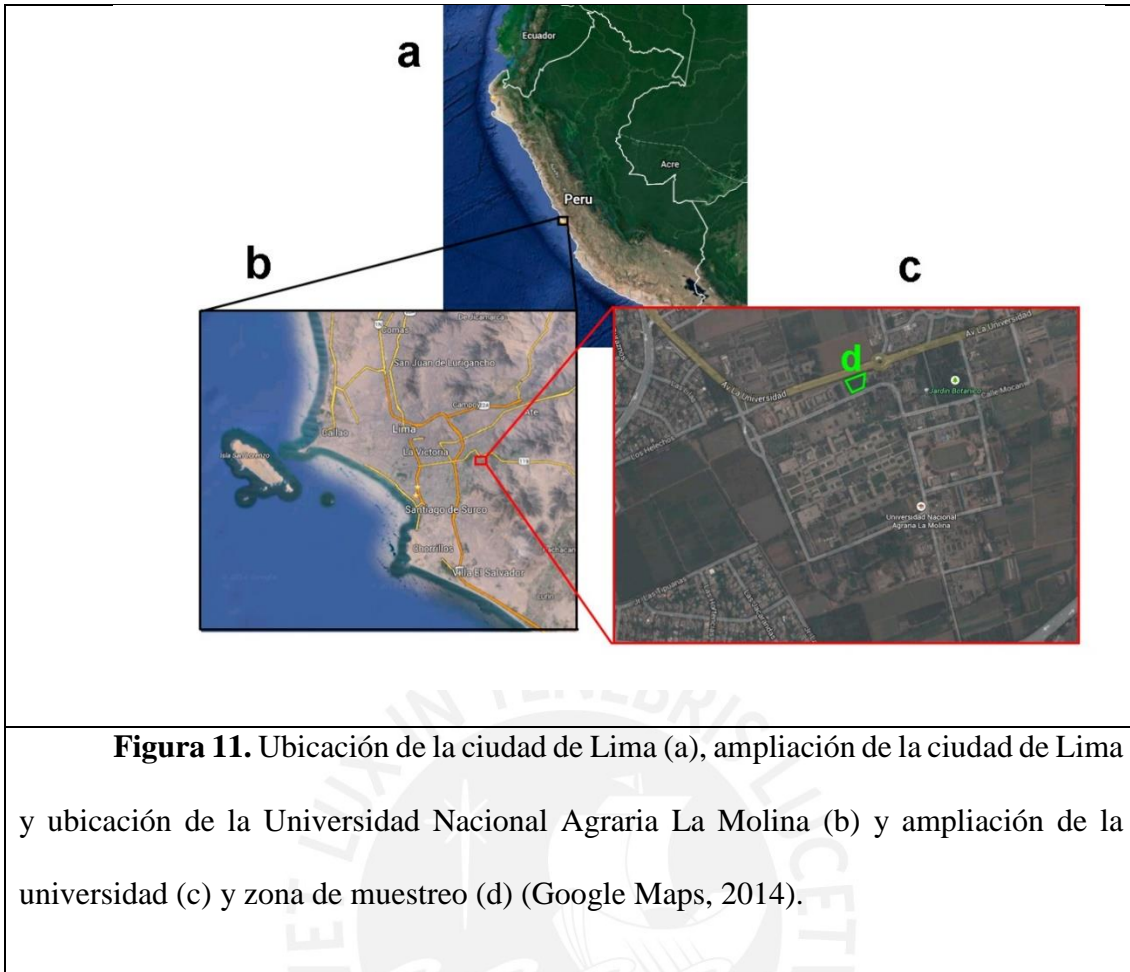
Todas las muestras de *Triplaris americana* fueron tomadas únicamente de dos lugares: la Reserva Nacional de Tambopata en Madre de Dios y la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Las recolecciones en la Reserva Nacional de Tambopata se llevaron a cabo en una zona denominada "Tangarana Alley" aproximadamente en la marca de 600 m de la trocha "Main" en los alrededores de la estación de investigación de la PUCP en los terrenos del albergue Explorer's Inn. En esta zona se encuentran aproximadamente 10 ejemplares de *Triplaris americana* de diferentes edades y estaturas.

Las muestras fueron extraídas principalmente de individuos entre 1 m y 2 m de estatura debido a la dificultad de tomar muestras de árboles más grandes. Todos los individuos muestreados poseían colonias saludables de *Pseudomyrmex triplarinus* y por lo tanto la dificultad de muestreo se debe a las picaduras de las hormigas. Se tomaron directamente hojas seleccionadas o secciones periféricas de ramas nuevas que contenían hojas en buen estado y salud. Inmediatamente después, las muestras se colocaron en una caja de polietileno con tapa y se humedecieron ligeramente con agua para realizar el viaje a Lima en avión. Las muestras permanecieron entre 5 h y 48 h separadas de la planta antes de ser procesadas en el laboratorio.



Figura 10. Ubicación de la Reserva Nacional de Tambopata (a), ampliación de la reserva y ubicación de zona de muestreo (b) y ampliación de los alrededores del Explorer's Inn cerca a la desembocadura del río La Torre sobre el río Tambopata(c) (Google Maps, 2014).

Otras muestras se tomaron del campus de la UNALM, específicamente del jardín de la Facultad de Ingeniería Forestal. Allí se tomaron secciones de tallo con hojas, de ramas bajas de individuos entre 20 m y 30 m de altura. Ninguno de estos árboles albergaba colonias de *Pseudomyrmex triplarinus* debido principalmente al clima de la ciudad de Lima.



Una vez en el laboratorio, todas las muestras de *Triplaris americana* fueron lavadas con agua a presión, luego enjuagadas con agua destilada y finalmente secadas a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. En este proceso se trató de minimizar la interferencia de contaminantes atmosféricos y biológicos.



Figura 12. Hojas de *Triplaris americana* de diferentes tamaños recién lavadas en el laboratorio.

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de ceras epicuticulares por inmersión en solvente

Una vez en el laboratorio las muestras fueron sometidas a una extracción por solvente. Las hojas de *T. americana* se remojaron brevemente en una bandeja de vidrio borosilicato con aproximadamente 400 mL de solvente y cubierta por un pliego de papel aluminio para evitar la evaporación del solvente y la condensación de agua del ambiente. Se realizaron extracciones con n-hexano, diclorometano y cloroformo, con diferentes tiempos y número de sumersiones por hoja. Se intentó, en la medida de lo posible, no

permitir que el solvente alcance la epidermis y el interior de la hoja. Luego la solución resultante se evaporó hasta total sequedad en un rotaevaporador utilizando temperaturas y presiones favorables para el tipo de solvente empleado. El sólido blanco resultante fue luego disuelto en 5 mL de solvente y colocado en un vial. A continuación, la solución de 5 mL fue concentrada, bajo flujo de N₂ gas y ligero calentamiento, hasta aproximadamente 300 µL (Shepherd y col., 1995). Finalmente, esta solución se utilizó en los ensayos cromatográficos.

3.2.2 Extracción crioadhesiva de ceras

En paralelo a la extracción por solvente, se realizaron extracciones crioadhesivas (Riedel y col., 2003). Un grupo de hojas lavadas fueron cortadas en pedazos cuadrados de 2cm de largo por 2cm de ancho aproximadamente. Estos pedazos fueron luego sumergidos en agua destilada y luego colocados entre dos monedas de aluminio de aproximadamente 1 cm de diámetro. A continuación, se sumergió el sistema nuevamente en agua destilada y luego en nitrógeno líquido manteniendo la presión entre las monedas con una pinza. Una vez congelada la muestra, se procedió a retirar las monedas del nitrógeno e, inmediatamente, a separar la moneda colocada en la zona adaxial de la hoja. De esta manera, se logra arrancar únicamente las ceras epicuticulares de la hoja bajo la moneda de aluminio. Finalmente las monedas fueron colocadas en un Erlenmeyer aproximadamente 200ml de diclorometano. Este proceso se repitió con 25 monedas.

A continuación, se introdujo el Erlenmeyer con las monedas dentro de un baño ultrasónico. Se dejó uniformizar la mezcla por 15 min en ultra sonido. Luego se separó la parte orgánica de la parte acuosa (resultado del proceso crioadhesivo) de la solución y se evaporó a sequedad. El sólido blanco resultante fue disuelto en 5 mL de diclorometano o

cloroformo y luego se colocó en un vial. Finalmente, bajo flujo de nitrógeno gas y leve calentamiento, se concentró la solución hasta 300 μ L.

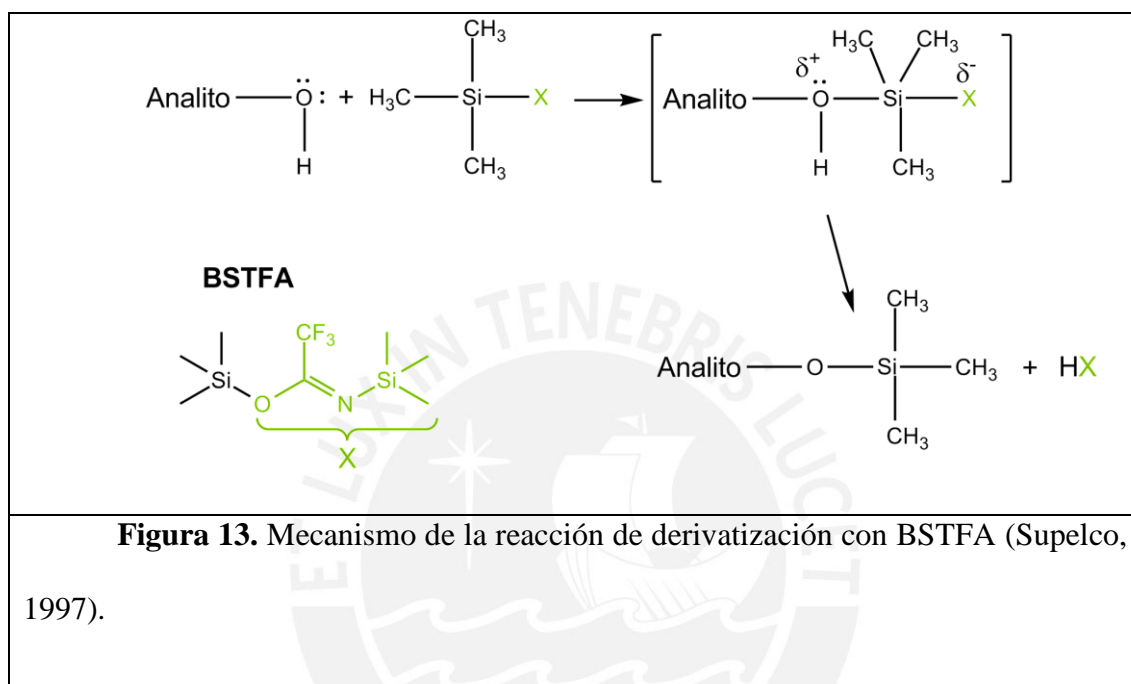
3.2.3 Extracción de ceras por goteo con pipeta Pasteur

Además de los métodos anteriores, se extrajeron ceras epicuticulares utilizando la acción de bombeo de pipetas Pasteur (Feakins y Sessions, 2010). Se vertieron 5 mL de cloroformo en vaso de precipitado de 100 mL. A continuación, con ayuda de la pipeta Pasteur se procedió a succionar un poco del solvente y luego esparcirlo por ambos lados de una hoja de *Triplaris americana*, previamente lavada, de tal manera que el solvente caiga dentro del vaso de precipitado arrastrando las ceras. Este procedimiento se repitió 10 veces. A continuación, la solución resultante fue colocada en un vial de 5 mL y luego se procedió a evaporar bajo flujo de nitrógeno hasta alcanzar aproximadamente los 300 μ L de solución.

3.2.4 Derivatización con BSTFA

Para determinar los compuestos extraídos de las plantas, se trabajó principalmente con cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC-MS). La polaridad de los grupos polares OH de alcoholes y ácidos grasos presentes en las muestras interaccionan fuertemente con silanoles libres en la columna cromatográfica imposibilitando una buena separación y, por lo tanto, una buena identificación de una serie de compuestos. Por esta razón, la derivatización de los grupos OH a grupos trimetilsilil apolares es necesaria para el análisis cromatográfico. Para esto se evaporaron a sequedad las soluciones obtenidas de las extracciones y se redisolvieron en 20 μ L de N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) en un vial de 2 mL con inserto de 200

μL. A continuación la solución fue calentada a 130°C por 20 minutos y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, la solución resultante fue evaporada a sequedad bajo flujo de nitrógeno para luego redisolverla en 125 μL de cloroformo en un vial con un inserto de 200 μL.



3.2.5 Estándar de alcanos lineales

Para poder calcular el índice de retención de Kovats, es necesario realizar un cromatograma de alcanos lineales conocidos. Para esto se preparó una solución de 16 alcanos a partir de estándares puros de la marca Sigma-Aldrich en diclorometano. Se utilizaron los siguientes n-alcenos: C8, C9, C10, C11, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C28 y C32. La solución final de la mezcla de alcanos, tuvo una concentración de 1,3 mg/mL de cada uno de ellos.

3.2.6 Cromatografía de gases

Todas las muestras fueron separadas por cromatografía de gases y analizadas por espectrometría de masas. La cromatografía de gases se llevó a cabo en dos equipos: un HP 5890 Serie II acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo HP 5971 y un Agilent 7890B acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo Agilent 5977B. Se utilizaron columnas no polares DB5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm) en el equipo HP y HP5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm) en el equipo Agilent. Se utilizó Helio UHP, como gas portado, con un flujo constante de 0.9 mL/min mantenido electrónicamente. El volumen de inyección fue de 1,0 μL de muestra, la temperatura del inyector, 280°C y la temperatura de la interfase al módulo de masas, 300°C. El programa de temperatura del horno consistió en un estado isotérmico a 60°C por 5 min seguido de un calentamiento de 10°C/min hasta 150°C y luego otro de 5°C/min hasta 310°C donde se mantuvo isotérmicamente por 15 min más. El espectrómetro de masas estuvo configurado para funcionar en modo de ionización electrónica con una energía de ionización de 70 eV y en modo de barrido, escaneando desde 50 m/z hasta 600 m/z.

3.2.7 Análisis de datos

Los datos adquiridos mediante este instrumento fueron revisados y analizados utilizando el software AMDIS y NIST. Estos programas permiten manipular y, sobretudo, permiten identificar compuestos mediante la comparación de similitudes entre los espectros obtenidos experimentalmente y los contenidos en las bases de datos del NIST 2011.

Asimismo, se calcularon los índices de Kovats de todos los compuestos analizados. Los índices de Kovats se calculan utilizando los tiempos de retención cromatográficos de cada compuesto analizado y de una mezcla estándar de alcanos de

longitudes conocidas. Los índices de Kovats a diferencia de los tiempos de retención permiten comparar separaciones cromatográficas indistintamente de los equipos y condiciones. De tal manera es posible utilizar datos cromatográficos previamente calculados y mantenidos en una base de datos.

El índice de Kovats para una cromatografía no isotérmica se calcula de la siguiente manera.

Ecuación 1

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right]$$

Donde:

I = Índice de retención de Kovats

n = número de carbonos del n-alcano con tiempo de retención inmediatamente menor al desconocido.

N = número de carbonos del n-alcano con tiempo de retención inmediatamente mayor al desconocido.

t_r = tiempo de retención

4. Resultados

4.1 Estándares de alcanos

Se analizó mediante cromatografía de gases la solución de estándares de alcanos lineales previamente preparada. Del cromatograma obtenido se anotaron los tiempos de retención para poder calcular los índices de Kovats para todas las muestras.

Alcano	Tiempo de retención (min)
C10	7,8852
C11	10,0470
C14	14,8758
C15	16,4253
C16	18,0967
C17	19,866
C18	21,6907
C19	23,5269
C20	25,3597
C21	27,1478
C22	28,8913
C24	32,2038
C28	38,1879
C32	43,4219

Tabla 1. Tiempos de retención de la solución de alcanos estándar.

4.2 Alcanos lineales saturados

El resultado del análisis de alcanos utilizando los tres métodos de extracción es bastante parecido. Todas las muestras analizadas contienen n-hentriacontano ($C_{31}H_{64}$) seguido de n-nonacosano y finalmente n-heptacosano, mayoritariamente. Se encontraron alcanos de longitudes menores pero en proporciones bastante menores a los anteriores. Tanto la extracción por sumersión en solvente como crioadhesiva presentaron alcanos. La extracción por lavado con solvente extrajo únicamente los compuestos más abundantes y además en menor concentración. Los alcanos lineales saturados fueron observados tanto en muestras derivatizadas con BSTFA como muestras sin derivatizar.



Alcanos lineales	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
C13	0,05%		
C14	0,43%		
C15	0,16%		
C16			
C17	0,81%		
C18	0,55%		0,20%
C19	0,52%		
C20	0,76%		1,01%
C21	0,68%		0,21%
C22	1,20%		1,30%
C23	2,27%		2,79%
C24	2,32%		4,04%
C25	4,70%		11,03%
C26	4,69%		8,22%
C27	10,29%	4,58%	29,09%
C28	5,29%		10,70%
C29	55,36%	60,97%	52,55%
C30	7,33%		10,41%
C31	100,00%	100,00%	100,00%
C32	4,02%		

Tabla 2. Abundancias relativas al componente mayoritario de alcanos lineales en extractos de *Triplaris americana* con distintos métodos de extracción.

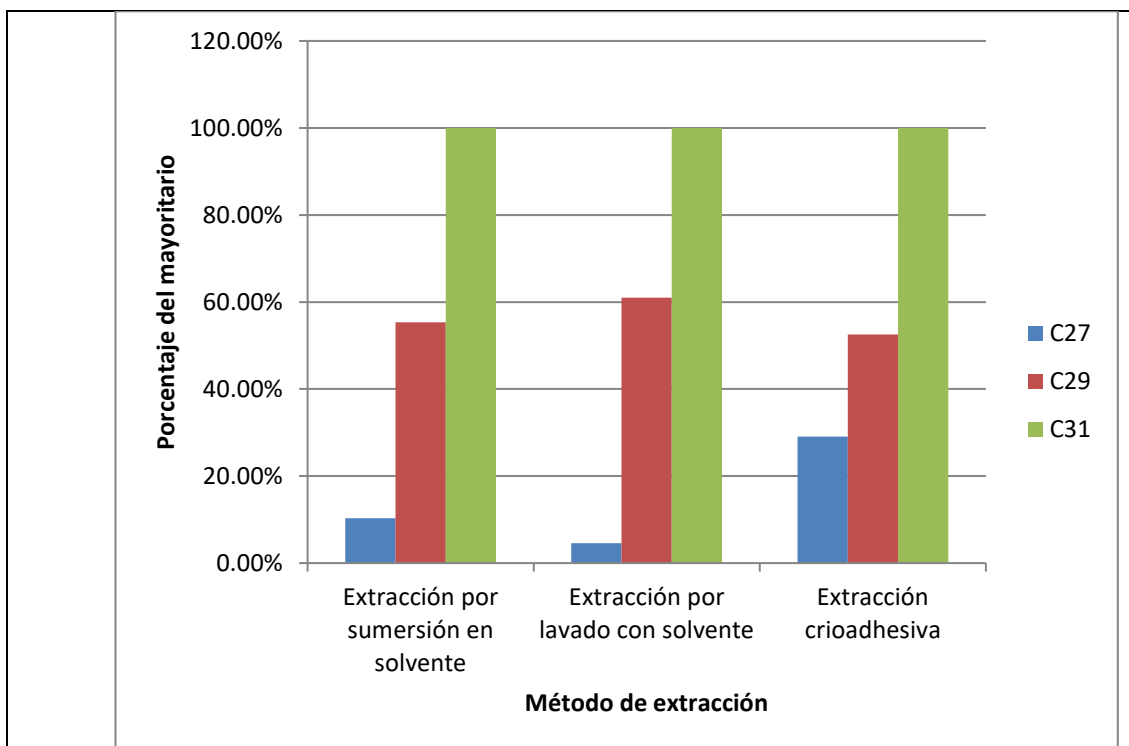


Figura 14. Abundancia relativa de alcanos mayoritarios en comparación al componente principal.

4.3 Alcoholes primarios

Se encontraron alcoholes de extensiones entre 12 y 30 carbonos siendo los más abundantes n-triacontanol (C30), n-octacosanol (C28) y n-hexacosanol (C26). Mediante las extracciones por sumersión en solvente y por lavado con solvente el alcohol predominante es n-triacontanol (C30) seguido de n-octacosanol (C28); mientras que mediante extracción criogénica el alcohol mayoritario es n-hexacosanol (C26) seguido de n-triacontanol (C28). Estos resultados fueron observados en muestras derivatizadas con BSTFA.

El método de sumersión en solvente extrajo la mayor variedad de compuestos, mientras que el método de lavado por solvente extrajo la menor.

Alcoholes lineales	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
C12	0,37%		
C13			
C14	0,20%		
C15			
C16			
C17			
C18	7,15%	2,29%	3,94%
C19			
C20			
C21			
C22	1,39%		
C23			
C24	8,30%	1,17%	51,09%
C25			1,97%
C26	13,40%	4,82%	100,00%
C27			
C28	55,11%	27,55%	99,93%
C29			
C30	100,00%	100,00%	50,26%

Tabla 3. Abundancias relativas al componente principal de alcoholes de cadena larga en *Triplaris americana*.

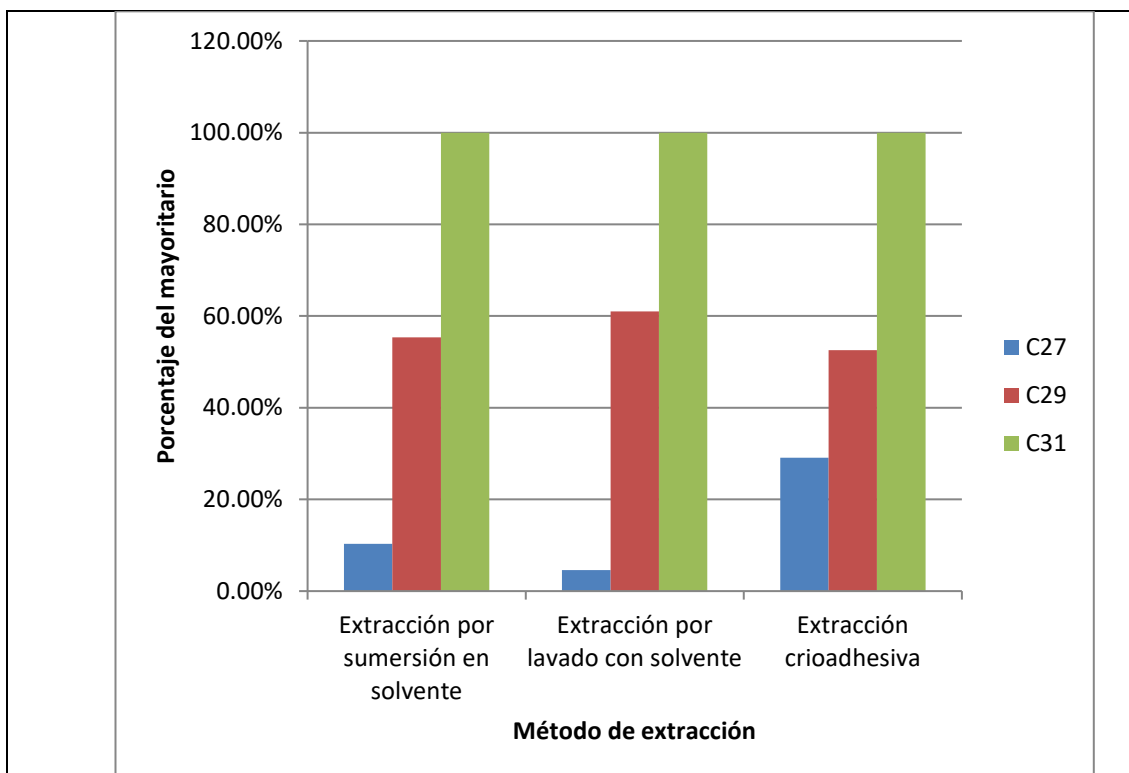


Figura 15. Abundancia relativa de alcoholes mayoritarios en comparación al componente principal.

4.4 Aldehídos

Los aldehídos más abundantes en las muestras de *Triplaris americana* son n-dotriacontanal (C32), n-triacontanal (C30) y n-octacosanal (C28). Tanto en las extracciones por lavado en solvente como por sumersión en solvente se mantiene este patrón, sin embargo en las extracciones crioadhesivas el compuesto mayoritario fue n-octacosanal (C28) seguido de n-triacontanal (C30) y finalmente n-dotriacontanal (C32). Estos resultados se obtuvieron principalmente de muestras sin derivatizar.

Aldehídos lineales	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
C9	0,41%		
C10	0,15%		
C11	0,02%		
C12	0,04%		
C13	0,55%		
C14	0,08%		
C15	0,89%		
C16	0,05%		
C22	0,32%		
C24	27,84%	1,85%	16,66%
C25	3,86%	0,51%	
C26	47,77%	7,25%	79,03%
C27	4,96%	0,59%	
C28	78,04%	8,34%	100,00%
C29	1,38%		
C30	82,33%	10,24%	55,91%
C31	4,45%		
C32	100,00%	100,00%	46,37%

Tabla 4. Abundancias relativas de aldehídos en extractos de *Triplaris americana* comparado por métodos de extracción.

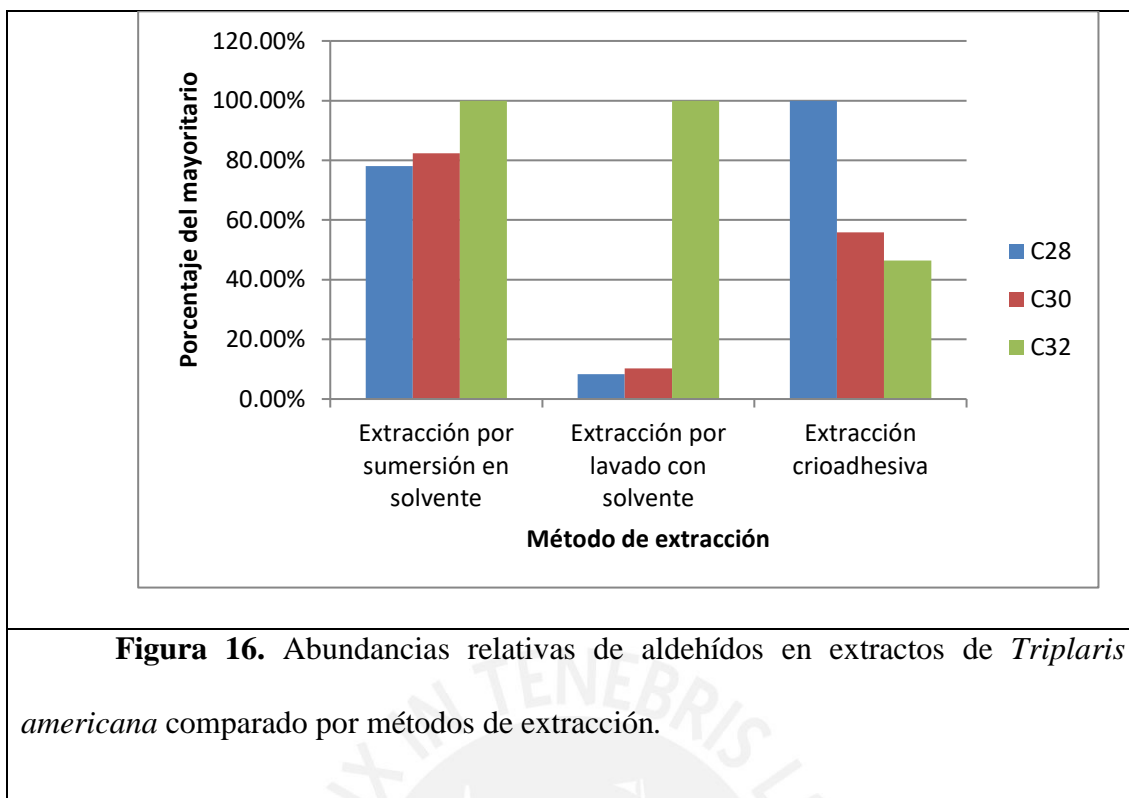


Figura 16. Abundancias relativas de aldehídos en extractos de *Triplaris americana* comparado por métodos de extracción.

4.5 Ácidos Grasos

Se encontró una variedad de ácidos grasos lineales de extensiones entre 9 y 32 carbonos en muestras derivatizadas con BSTFA. Al igual que el análisis de alcanos y alcoholes, mediante el método de extracción por sumersión en solvente se halló la mayor variedad de compuestos frente al método de lavado por solvente que extrajo la menor cantidad de solventes.

Los ácidos grasos más abundantes en las ceras epicuticulares de *Triplaris americana* fueron, en orden de abundancia relativa, ácido hexadecanoico (C16), ácido octadecanoico (C18), ácido tetracosanoico (C24), ácido hexacosanoico (C26) y ácido tetradecanoico (C14).

Ácidos Grasos Lineales	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
C6		0,44%	
C8		0,25%	
C9	0,85%	0,13%	
C10	0,11%	0,11%	
C11	1,51%		
C12	7,13%	5,82%	1,54%
C13	0,43%	0,00%	0,92%
C14	10,61%	4,09%	3,64%
C15	4,68%	1,01%	0,63%
C16	100,00%	100,00%	100,00%
C17	2,70%	0,62%	0,29%
C18	44,74%	59,65%	74,29%
C19			
C20	1,08%	0,51%	
C21			
C22	4,73%	6,11%	0,16%
C23			
C24	19,83%	22,48%	
C25	1,67%	0,00%	
C26	13,06%	15,35%	
C27			
C28			
C29			
C30			
C31			
C32	10,07%		

Tabla 5. Porcentajes relativos al compuesto mayoritario de ácidos grasos.

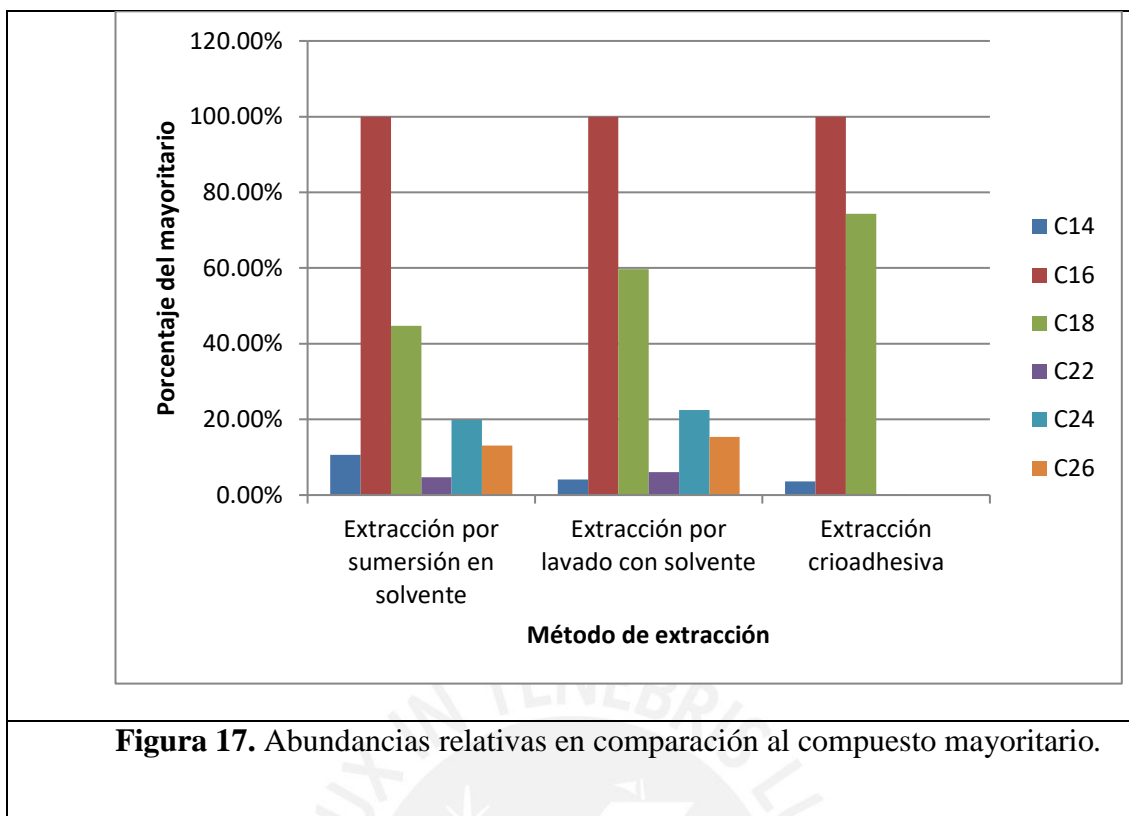


Figura 17. Abundancias relativas en comparación al compuesto mayoritario.

4.5.1 Ácidos grasos insaturados

Además de los ácidos grasos lineales y saturados, se detectaron algunos ácidos grasos insaturados derivados de C₁₆ y C₁₈. Estos fueron identificados mediante la comparación de espectros de masa con otros reportados en la base de datos NIST y de índices de retención. Los compuestos más abundantes de esta clase fueron el ácido oleico y linoleico. Los resultados fueron tomados de análisis de muestras derivatizadas con BSTFA.

Ácidos insaturados	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
Ácido cis-9-Hexadecenoico	2,95%	0,88%	0,54%
Ácido trans?-9-Hexadecenoico	2,62%		
Ácido Linoleico	5,83%	13,96%	7,13%
Ácido Oleico	16,03%	66,76%	10,77%
Ácido 11-trans-Octadecenoico	1,24%	0,88%	0,61%
Ácido hexanoico	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 6. Abundancias relativas de ácidos grasos insaturados en comparación con ácido hexanoico que es el ácido graso mayoritario.

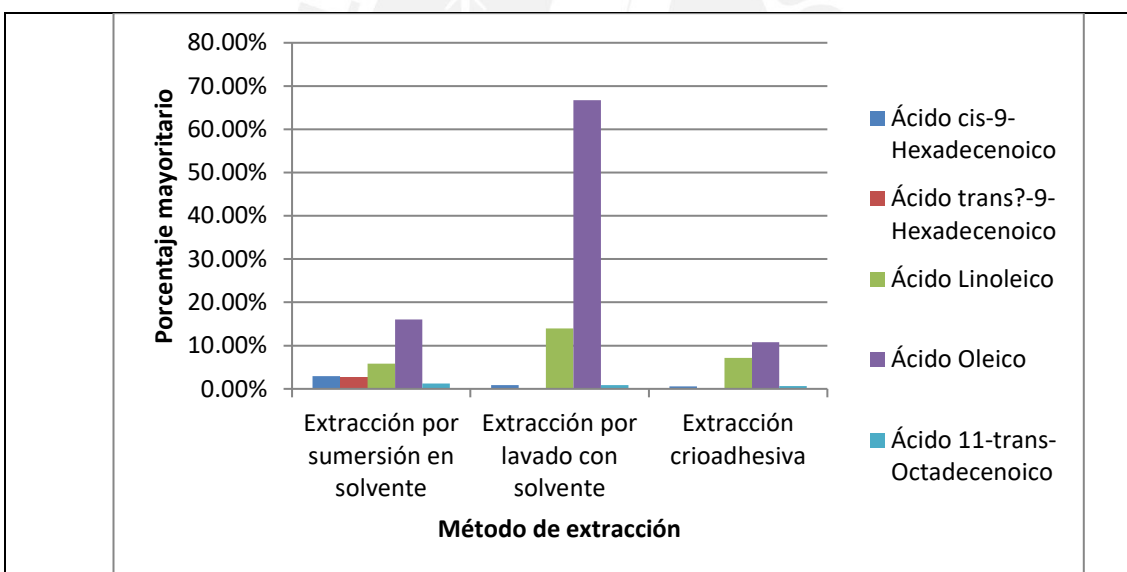


Figura 18. Abundancias relativas de ácidos grasos insaturados en comparación con ácido hexanoico que es el ácido graso mayoritario.

4.6 Triterpenoides

Mediante todos los métodos de extracción los triterpenoides pentacíclicos fueron los compuestos predominantes en abundancia en comparación a los alcanos, alcoholes, ácidos grasos y aldehídos.

Triterpeno	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente	Extracción crioadhesiva
Eicosahidropiceno	16,50%	65,94%	44,27%
Octadecahidro-2H-picen-3-ona	17,35%	9,98%	
D:C-Friedoolean-8-en-3-ona	14,40%		
Lanosta-8,24-dien-3-ona	100,00%	63,76%	42,42%
D:A-Friedooleanan-3-ol, (3 α)-	95,94%		74,97%
Friedelan-3-ona	47,45%	100,00%	100,00%

Tabla 7. Abundancias de los triterpenos mayoritarios relativas al componente principal.

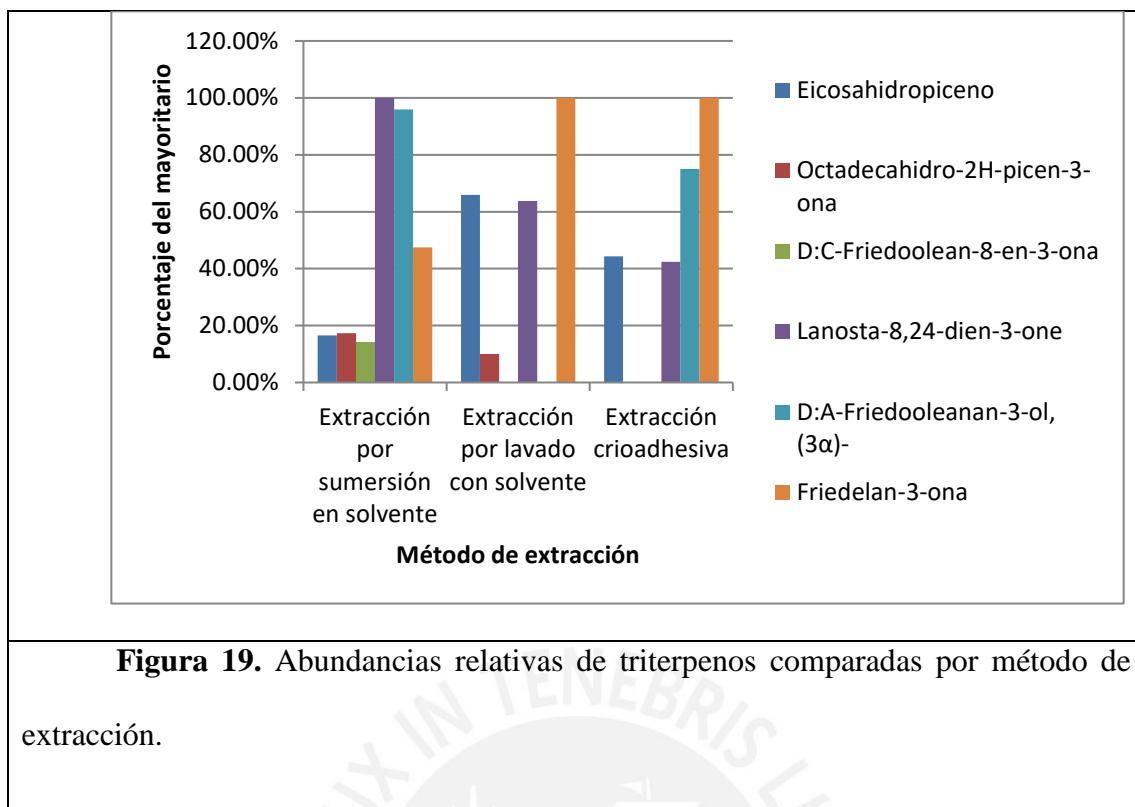


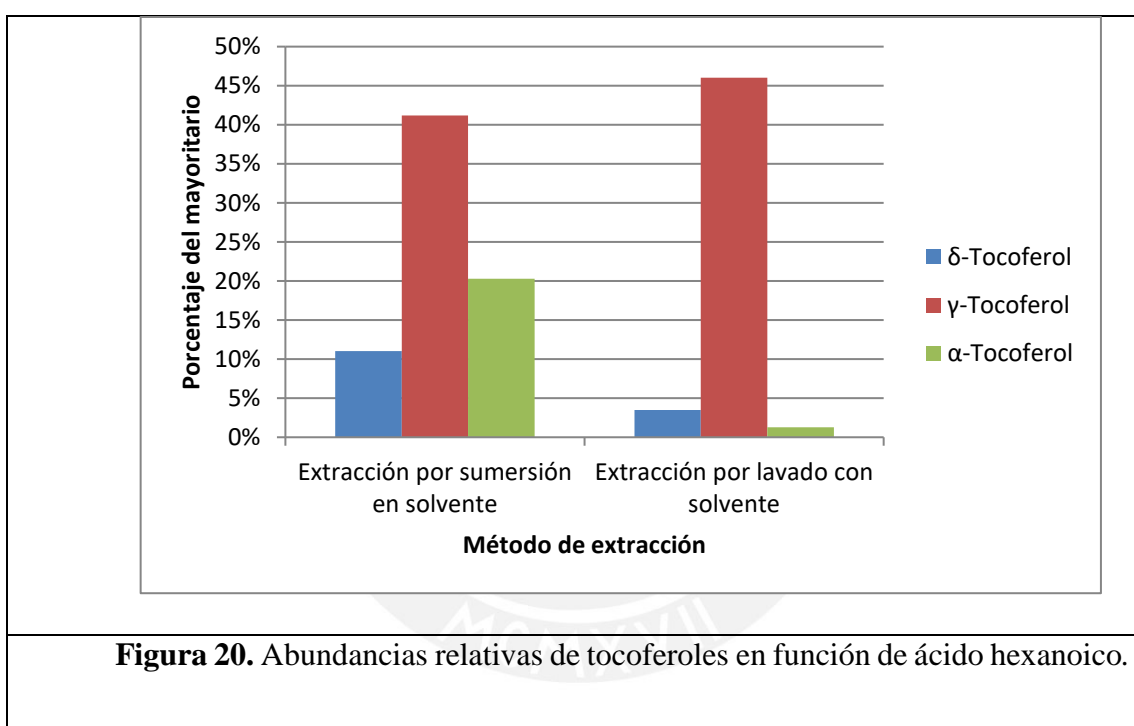
Figura 19. Abundancias relativas de triterpenos comparadas por método de extracción.

4.7 Tocoferoles

Se encontró α , γ y δ -tocoferol en las muestras extraídas con el método de sumersión en solvente. A pesar de que se observaron estos compuestos tanto en muestras derivatizadas con BSTFA como en las otras, se utilizaron las muestras derivatizadas para comparar las abundancias. El más abundante fue γ -tocoferol.

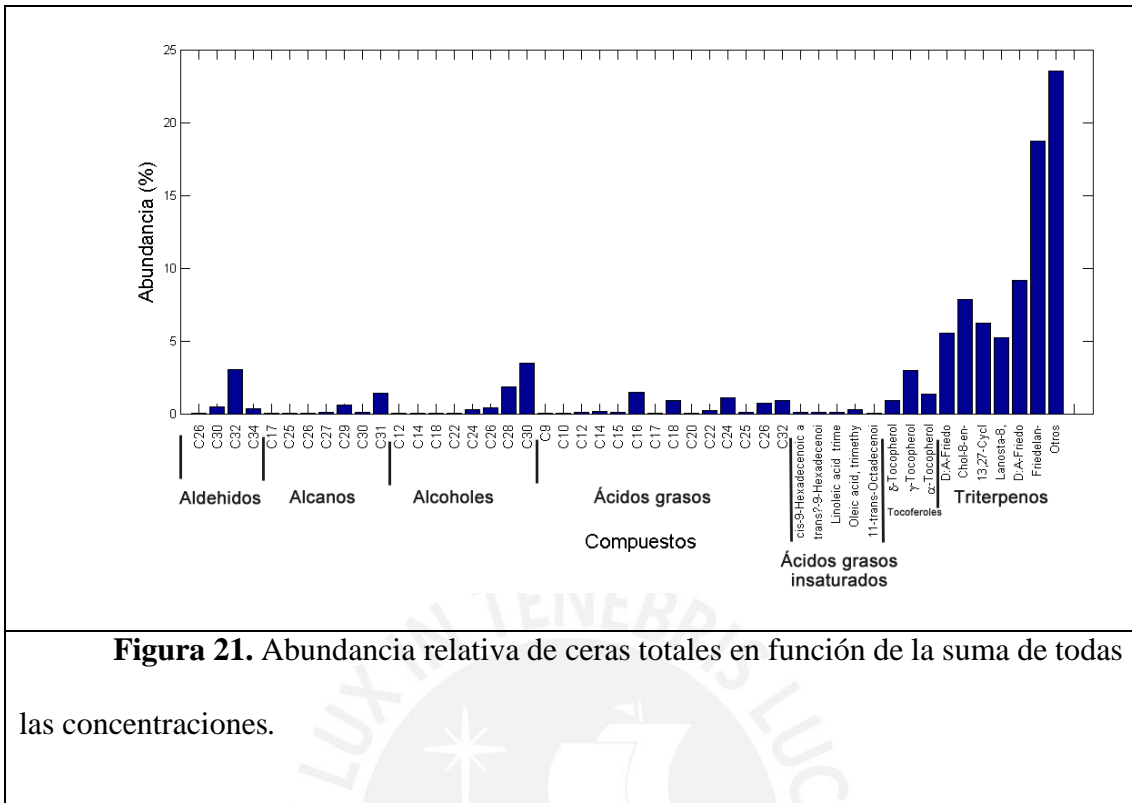
Tocoferoles	Extracción por sumersión en solvente	Extracción por lavado con solvente
δ -Tocoferol	11%	3%
γ -Tocoferol	41%	46%
α -Tocoferol	20%	1%
Ácido hexanoico	100%	100%

Tabla 8. Abundancias relativas de tocoferoles en comparación con ácido hexanoico.



4.8 Ceras totales

Se decidió hacer la comparación de todos los grupos de ceras encontrados con la información obtenida de las muestras extraídas por sumersión en solvente debido a la mayor variedad de compuestos observados en ellas. Los triterpenoides representaron la mayor concentración de ceras epicuticulares seguidos de alcoholes, ácidos grasos alcanos y aldehídos.



5. Discusión

5.1 Material vegetal

En un primer momento se pensó que la especie de Tangarana situada en la universidad agraria era distinta a la de los especímenes encontrados en la selva. Los individuos de “Tangarana alley” fueron identificados por personal del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Marcos durante una visita a la Reserva Nacional de Tambopata como *Triplaris americana* mientras que los encontrados en la UNALM estaban etiquetados como *Triplaris peruviana*. La literatura indica que *Triplaris americana* y *Triplaris peruviana* son dos especies distintas con diferencias morfológicas (Brandbyge, 1986). Sin embargo, al hacer un análisis más detallado de la nervadura de las hojas y la química epicuticular de ambas especies se llegó a la conclusión que probablemente los individuos de la UNALM estén mal etiquetados y que ambos grupos son de la misma especie.

5.2 Alcanos

Todas las muestras analizadas presentaban alcanos saturados lineales. Los más abundantes resultaron ser alcanos mayores, especialmente n-hentriacontano, n-nonacosano y n-heptacosano. Este resultado se repitió en los tres métodos de extracción utilizados y por lo tanto garantiza que son compuestos ubicados en las capas más externas de la epicutícula.

Se seleccionaron los mejores cromatogramas de cada método de extracción y se procedió a buscar e identificar los alcanos presentes en las mezclas. Para esto se buscó el característico patrón de espectro de masas de alcanos que consiste en un pico base $[C_4H_9]^+$ ($m/z = 57$) fragmentos que incrementan en $[C_4H_9 + n(CH_2)]^+$ y disminuyen

exponencialmente en abundancia. El fragmento de masa (m/z) más grande es la masa del alcano completo $[M]^+$ y posee una abundancia ligeramente mayor que los fragmentos adyacentes. Una vez identificados los espectros, se procedió a confirmar la longitud de la cadena mediante el índice de Kovats.

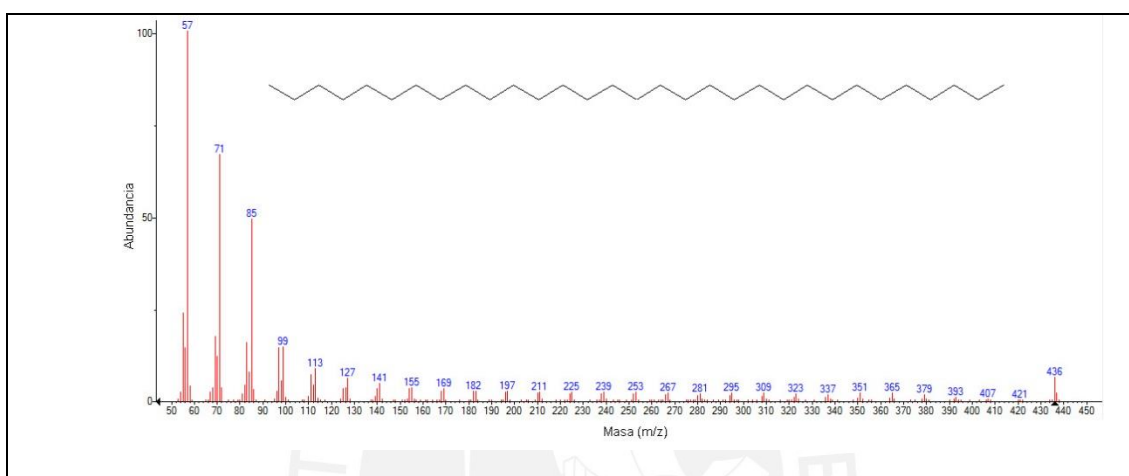


Figura 22. Espectro de masas de n-hentriacontano $C_{31}H_{64}$. Nótese el patrón característico de las masas de los fragmentos de un alcano lineal.

La presencia de alcanos de cadena larga en las ceras epicuticulares ha sido reportada previamente en otras especies y suele ser la clase de compuestos mayoritaria en las ceras epicuticulares vegetales (Buschhaus y col., 2007). Además, los alcanos mayoritarios encontrados en este estudio están dentro del rango de tamaño reportado en literatura previa desde C_{25} a C_{35} (Jetter y col., 2001). La predominancia de las cadenas de carbono impares en comparación a las pares en este estudio ha sido previamente observada y está asociada a la ruta biosintética de alcanos a partir de ácidos grasos (ver Figura 9) (Eglinton y col., 1967; Bourdenx y col., 2011).

5.3 Ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron identificados mediante el análisis GC/MS de muestras previamente derivatizadas para conseguir a sustituyentes trimetilsilil en los grupos hidroxilo. De esta manera se mejora la estabilidad y se reduce la polaridad de moléculas como los ácidos grasos. Al igual que en el caso de los alcanos, los ácidos grasos fueron encontrados mediante los tres métodos utilizados en este estudio y, por lo tanto, queda claro que se encuentran en la epicutícula de la hoja y no dentro de ella.

Los espectros de masas de los ácidos trimetilsililados son característicos en poseer los siguientes fragmentos mayoritarios: el pico base $[C_4H_9O_2Si]^+$ ($m/z = 117$), $[Si(CH_3)_2OH]^+$ ($m/z = 75$), $[Si(CH_3)_3]^+$ ($m/z = 73$), $[C_5H_{10}O_2Si]^+$ ($m/z = 132$) producido por rearrreglo de McLafferty y $[M - CH_3]^+$. Todos los ácidos grasos fueron identificados con este patrón de fragmentación. Luego, se procedió a comparar los índices de Kovats de ácidos grasos separados en los cromatogramas con los reportados previamente en la base de datos del NIST para confirmar la extensión de los ácidos grasos.

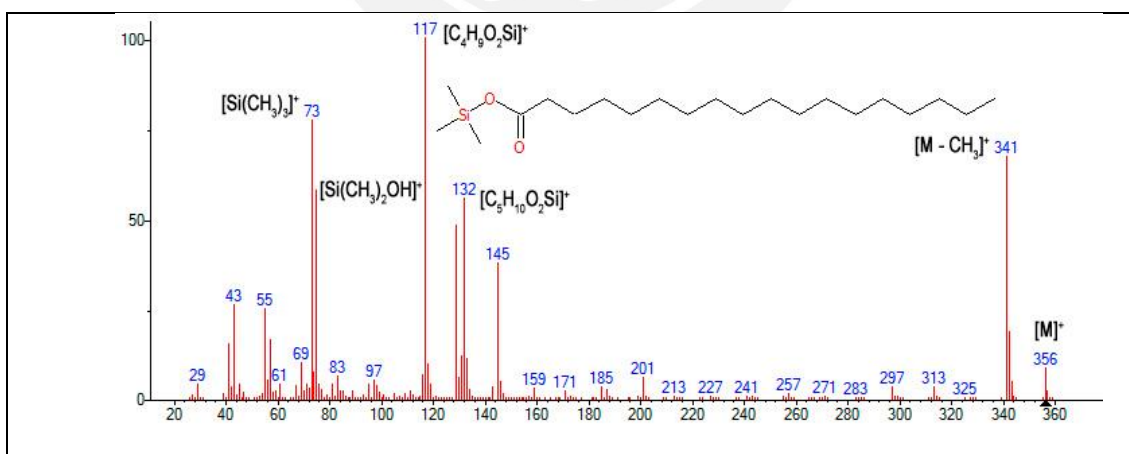


Figura 23. Espectro de masas de ácido n-octadecanoico.

En orden de abundancia, los ácidos grasos mayoritarios hallados en la superficie de *Triplaris americana* fueron C₁₆, C₁₈, y C₁₄, sin embargo también se observaron C₂₂, C₂₄ y C₂₆. Los ácidos grasos C₁₆ y C₁₈, son los productos de la lipogénesis de las plantas que luego son extendidos a cadenas entre C₂₂ y C₃₂ para luego convertirse en los compuestos alifáticos epicuticulares (Samuels y col., 2008), es decir de los alcanos, aldehídos y alcoholes encontrados en la presente investigación. La menor concentración de ácidos de cadenas largas frente a las cortas puede estar relacionado con el hecho que la ruta de los alcoholes primarios está directamente acoplada al proceso de elongación y por lo tanto no deberían de haber intermediarios de cadenas largas en concentraciones considerables. Además, la ruta de alcanos está en competencia por estos compuestos también, y colabora con la reducción de ácidos grasos de cadenas muy largas

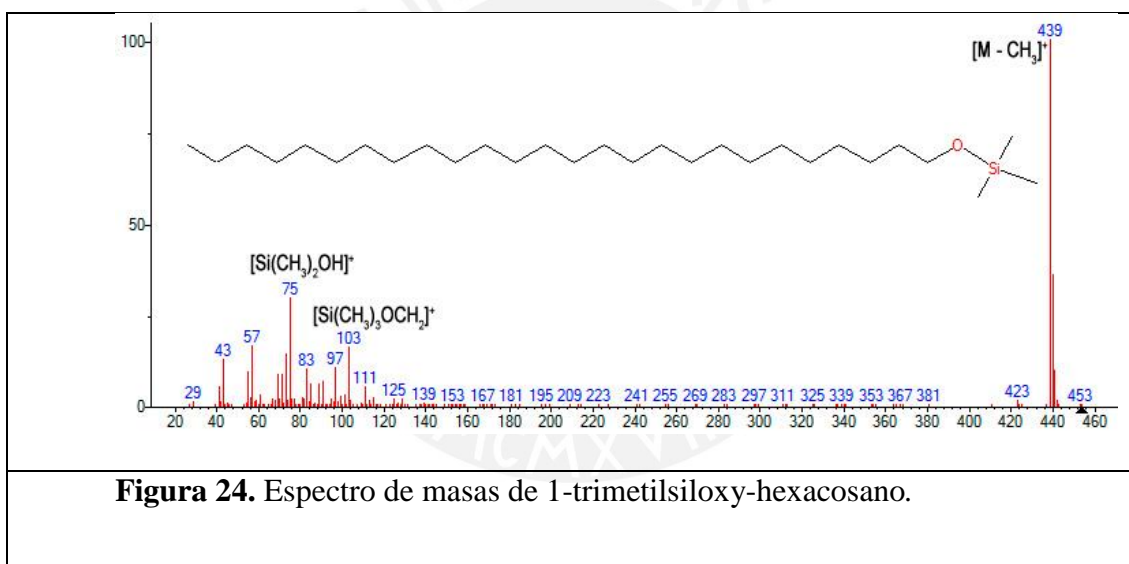
Además de los ácidos grasos saturados encontrados, se observaron derivados insaturados de los homólogos C₁₆ y C₁₈, de los cuales, los más abundantes fueron ácido oleico y linoleico. La identificación de estos compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de masa con otros provistos por la base de datos del NIST. El análisis de estos compuestos se realizó a partir de las muestras derivatizadas por BSTFA. Estos compuestos han sido reportados previamente en ceras epicuticulares como ésteres de terpenos (Gültz y col., 1987; Bianchi y col., 1993).

5.4 Alcoholes

Los alcoholes al igual que los ácidos grasos poseen grupos hidroxilo que les proporciona una polaridad muy alta que dificulta el proceso de separación por cromatografía debido a las interacciones con la fase estacionaria y la dificultad de volatilización. Por esta razón, los extractos de ceras epicuticulares de *Triplaris americana*

fueron derivatizados con BSTFA para trimetilsilar estos grupos y conseguir lecturas más fiables.

Luego, la identificación de los alcoholes primarios presentes en los cromatogramas se llevó a cabo mediante el análisis de espectros de masas. Los alcoholes trimetilsililados producen un patrón característico de fragmentación que nos permite identificar tanto la naturaleza del alcohol como también su extensión. El pico base del espectrograma pertenece al fragmento $[M - CH_3]^+$, que es el resultado de la pérdida de un metilo del grupo trimetilsilano. El segundo fragmento más importante es $[Si(CH_3)_2OH]^+$ ($m/z = 75$) y finalmente el tercer fragmento es $[Si(CH_3)_2OCH_2]^+$ ($m/z = 103$).

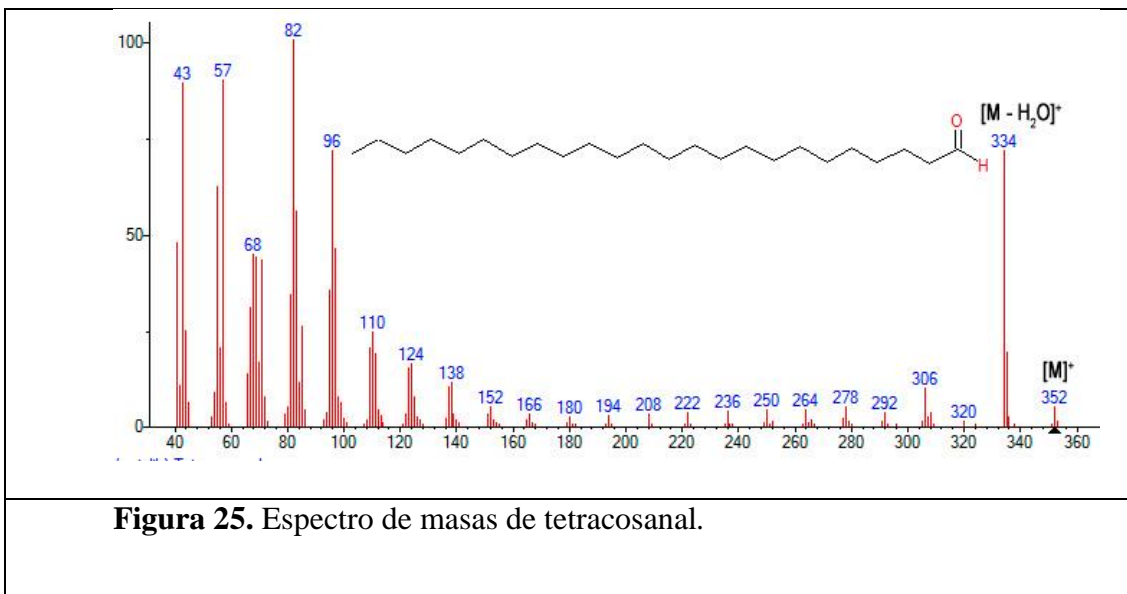


Los alcoholes observados mayoritarios son C_{30} , C_{28} y C_{26} en orden de abundancia. Esta observación, junto con la observación de ácidos grasos y alcanos, resulta estar de acuerdo con las rutas biosintéticas de ceras alifáticas epicuticulares. Una vez terminada la elongación de ácidos grasos, estos son reducidos primero a aldehídos y luego a alcoholes mediante una reacción enzimática que todavía no se encuentra totalmente elucidada (Samuels y col., 2008).

5.5 Aldehídos

Los aldehídos fueron analizados sin derivatizar de muestras provenientes de los tres métodos de extracción. A diferencia de las otras clases de compuestos, los aldehídos parecieron estar presentes en menores concentraciones que alcoholes, ácidos grasos y alcanos. Como ya se ha mencionado, estudios previos sugieren que los aldehídos son intermediarios en la ruta biosintéticas de alcanos y alcoholes primarios a partir de ácidos grasos (Samuels y col., 2008). Esto se confirma debido a que, nuevamente, se observaron aldehídos homólogos de C₃₀, C₂₈ y C₂₆ en mayor abundancia.

La ionización electrónica para la espectrometría de masas produce una fragmentación típica de aldehídos que consiste en 5 picos importantes ($m/z = 43, 57, 82, 96$ y $M - 14$). El fragmento dependiente de la longitud del compuesto es $[M - H_2O]^+$. Esta información fue utilizada para identificar los aldehídos presentes en la muestra. A diferencia de todas las otras clases de compuestos estudiadas en este trabajo, la base de datos de espectros de masas del NIST no tiene información espectroscópica de aldehídos mayores a C₂₄ razón por la cual no se pudo comparar los espectros de masas de los compuestos encontrados. Es necesario confirmar la naturaleza de los aldehídos encontrados en este estudio, próximamente, mediante la comparación de espectros de masas con estándares sintetizados a partir de alcoholes primarios (Hansjakob y col., 2010).



Por otro lado, la separación de aldehídos por GC suele ser pobre ya que los picos del cromatograma no se definen muy bien e interfieren con los de otros compuestos parecidos. Por esta razón, es común derivatizar las muestras de aldehídos previamente. Normalmente se utilizan derivatizaciones con dimetilacetal y PFBHA (Berdyshev y col., 2010). Esto también debe ser tomado en cuenta en próximos estudios de este tipo.

5.6 Triterpenoides

Los triterpenoides fueron los compuestos más variados y mayoritarios en el presente estudio. Esto fue un problema por dos razones. Primero, la cantidad y variedad de estos compuestos interfirió fuertemente con otros compuestos presentes en la mezcla de ceras y por lo tanto muchos picos del cromatograma fueron muy poco puros. Por otra parte, muchos de los triterpenos pentacíclicos tienen diferencias estructurales muy pequeñas entre sí lo que hace muy difícil su identificación únicamente por espectrometría de masas. Es necesaria una separación previa de estos compuestos para analizarlos independientemente del resto. Además, hacen falta métodos de análisis más específicos

para resolución de estas estructuras como RMN (Vlahov y col). La identificación de estructuras en este estudio se llevó a cabo únicamente mediante la comparación de espectros de masa con los recopilados en la base de datos del NIST. No se pudo hacer una comparación con estándares y por lo tanto la identificación es solamente referencial utilizando identificaciones con R. Match mayores a 500 y picos con purezas a partir de 15.

A pesar de esto, hay 6 compuestos predominantes presentes en las muestras analizadas que pudieron ser parcialmente identificadas por comparación con la base de datos NIST con valores de comparación entre 600 y 900. Especialmente, los compuestos con mayor puntaje fueron Friedelan-3-ona (~900), D:C-Friedoolean-8-en-3-ona (~820) Lanosta-8,24-dien-3-ona (~800), 4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona (~880) y 2,2,4a,6a,8a,9,12b,14a-Octametil-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,12,12a,12b,13,14,14a,14b-eicosahidropiceno (~850).

El perfil de compuestos alifáticos (alcanos, alcoholes, ácidos grasos y aldehídos) encontrados en *Triplaris americana* es muy similar al de composiciones de ceras de otras especies reportadas en la literatura (Samuels y col., 2008; Buschhaus y col., 2007; Müller y Riederer, 2005). Sin embargo, la variedad y abundancia de triterpenos es mayor a la reportada normalmente en otras especies como se puede observar en los resultados. Hay, sin embargo, ejemplos de ceras epicuticulares con altas concentraciones de triterpenoides, como en los olivos, y algunos cítricos que, sin embargo, no poseen asociaciones con hormigas. En ellos se han encontrado compuestos como Friedelan-3-ona que hemos visto muy abundantemente en las ceras de *Triplaris americana* en el presente estudio (Bianchi y col., 1993; Gültz y col., 1987). Esta característica fuera de lo común, puede estar relacionada con las interacciones de *Triplaris americana* con

Pseudomyrmex triplarinus. Artículos anteriores aseveran que, por ejemplo, las ceras epicuticulares del género *Macaranga* de plantas mirmecofitas poseen altas concentraciones de triterpenoides y que, probablemente, esto favorezca a una especie de hormigas (Markstädter y col., 2000).

Por otro lado, no queda totalmente clara la especificidad de la locación de los triterpenoides encontrados a la epi o intra cutícula. Hace falta estudiar esto, mediante la comparación entre métodos mecánicos y químicos de extracción. La literatura sugiere que los compuestos triterpenoides están comúnmente concentrados en la intracutícula de las plantas y que su presencia en la epicutícula suele ser observada en menor medida (Buschhaus y col., 2007; Buschhaus y col., 2011).

5.7 Tocoferoles

Los tocoferoles fueron identificados por espectrometría de masas e índices de retención. Los espectros de masas poseen dos fragmentos característicos en los tocoferoles: $[M]^+$ y otro que está formado por el anillo bencénico con sus respectivos metilos, el grupo trimetilsiloxi y parte del segundo anillo oxigenado. Se pudieron identificar correctamente α y δ -tocoferol ya que difieren en masa entre si y de β y γ -tocoferol. Sin embargo, β y γ -tocoferol solo varían en la posición de un metilo en el anillo bencénico. Es necesario un estudio de RMN para confirmar su estructura.

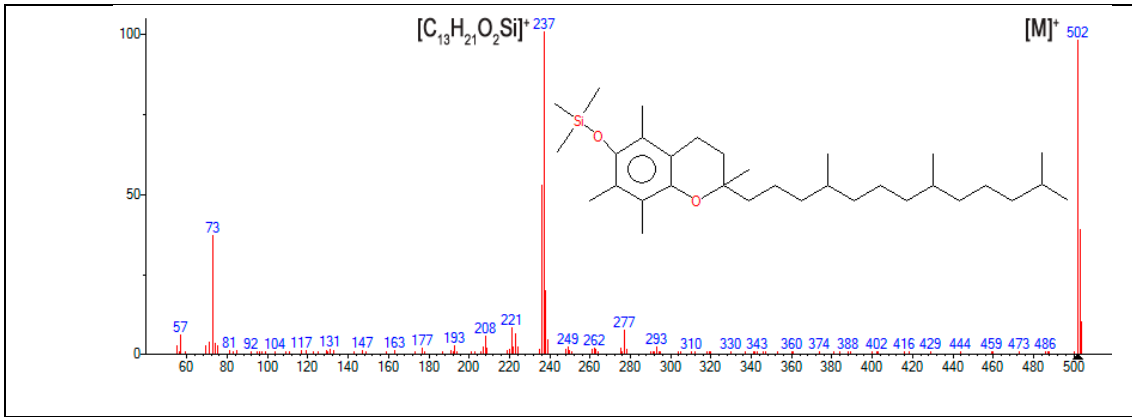


Figura 26. Espectro de masas de trimetilsilil- α -tocoferol.



6. Conclusiones

Primero, se logró caracterizar cualitativamente la composición de homólogos de 4 clases fundamentales de compuestos alifáticos de cadenas largas en las ceras epicuticulares de *Triplaris americana*. Se pudo observar las características cadenas impares en alcanos y pares en alcoholes primarios, ácidos grasos y aldehídos. Además, las extensiones más abundantes de estos compuestos fueron coherentes con los resultados publicados en la literatura sobre ceras epicuticulares (Samuels y col., 2008; Bourdenx y col., 2011).

Por otro lado, la implementación de distintos métodos de extracción produjo una diferencia importante en los resultados obtenidos. Esto fue corroborado con la literatura (Jetter y col., 2001) y, por lo tanto, se llegó a la conclusión de que para aumentar la selectividad de extracción a capas más superficiales de la epicutícula es necesario abandonar los métodos de extracción por solvente a favor de los métodos mecánicos como la extracción crioadhesiva y extracción con adhesivos como goma arábica (Markstädter y col., 2000; Riedel y col., 2003). Sin embargo, las extracciones con solvente revelan información crucial sobre la química de capas más profundas, como las ceras intracuticulares.

Con respecto a los triterpenoides hallados en las ceras epicuticulares, es importante notar que las estructuras están sugeridas en base a las identificaciones con la base de datos del NIST. Sin embargo, es preciso ampliar el estudio de los triterpenoides presentes en las ceras epicuticulares de *Triplaris americana* para confirmar completamente su estructura. Se sugiere una etapa previa de extracción en solvente y cromatografía de columna, además de modificaciones en el método cromatográfico para lograrlo. Asimismo, debido a la similitudes entre terpenoides, es necesario complementar esta con otras técnicas analíticas, como RMN, para una correcta

identificación de compuestos. Como se ha discutido, los triterpenoides muy probablemente estén relacionados con las interacciones planta-hormiga entre *Triplaris americana* y *Pseudomyrmex triplarinus*, y, por lo tanto, son especialmente interesantes en esta línea de investigación.



7. Bibliografía

Augusto, F., Pires Valente, A. L. (2002). Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends Anal. Chem.* **21**, 428-438.

Baker, E. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. *The plant Cuticule*, ed. D Cutler, KL Alvin, CE Prince, pp. 139-165. London: Academic.

Bentley, B. (1977). Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **8**, 407-427.

Bernays, E. A., Blaney, W. M., Chapman, R. F., Cook A. G. (1976). The ability of *Locusta migratoria* L. to perceive plant surface waxes. *Symp. Biol. Hung.* **16**, 35-40.

Bianchi, G., Vlahov, G., Anglani, C., Murelli, G. (1993). Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry.* **32**, 49-52.

Birkemeyer C., Kolasa A., Kopka J. (2003). Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography–mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J. Chromatogr. A.* **89**, 89-102.

Bourdenx, B., Bernard, A., Frédéric, D., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., Pervent, M., Vile, D., Haslam, R., Napier, J., Lessire, R., Joubès, J. (2011). Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* **156**, 29-45.

Brandbyge J. (1986). A revision of the genus *Triplaris* (Polygonaceae). *Nord. J. Bot.* **6**, 545-570.

Buschhaus, C., Herz, H., Jetter, R. (2007). Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Ann. Bot.* **100**, 1557-1564.

Buschhaus, C., Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces?. *J. Exp. Bot.* **62**, **4**, 841-853.

Coley, P.D., Barone J. A. (1996). Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 305-335.

Courtney, J., Lassak, E., Speirs, G. (1983). Leaf wax constituents of some myrtaceous species. *Phytochemistry.* **22**, **4**, 947-949.

Curatola, G. (2009). Patrones de distribución espacial de *Triplaris americana* en Tambopata, Perú. Tesis de grado PUCP.

Davidson, D., McKey, D. (1993). The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *J. Hym. Res.* **2**, **1**, 13-83.

Feakins, S., Sessions, A. (2010). Controls on the D/H ratios of plant leaf waxes in an arid ecosystem. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **74**, 2128-2141.

Fonseca, C. R., Ganade G. (1996). Asymmetries, compartments and null interactions in Amazonian ant-plant community. *J. Anim. Ecol.* **65**, 339-347.

Guhling, O., Kinzler, C., Dreyer, M., Bringmann, G., Jetter R (2005). Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *J. Chem. Ecol.* **31**, 2323-2341.

Gülz, P.G., Scora, R., Müller, E., Marner, F.J. (1987). Epicuticular leaf waxes of *Citrus halimii* stone. *J. Agric. Food Chem.* **35**, **5**, 716-720.

Harwood, J.L. (2005). Fatty acid biosynthesis. *Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation*, ed. D Murphy, pp. 27-66. Oxford: Blackwell.

Hefetz A. (2007). The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. A review. *Myrmecol. News.* **10**, 59-68.

Heil M., McKey D. (2003). Protective Ant-plant Interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annu. Rev. Ecol. Evol. System.* **34**, 425-453.

Jetter, R., Schäffer, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiol.* **126**, 1725-1737.

Jetter, R., Kunst, L., Samuels, L. (2006). Composition of epicuticular waxes. *Biology of the Plant Cuticle*. Oxford, UK: Blackwell.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., Thield, F. (1989). A genetic and phenotypic description of *Eceriferum (cer)* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered.* **80**, 118-122.

Kunst, L., Samuels, A.L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progr. Lipid Res.* **42**, 51.

Luan, T., Li G., Zhang Z. (2000). Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for rapid determination of trans-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **424**, 19-25.

Markstädter, C., Federle, W., Jetter, R., Riederer, M., Hölldobler, B. (2000). Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. *Chemoecology.* **10**, 33-40.

Müller, C., Riederer, M (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* **31**, 2621-2651.

Nordby, H., McDonald, R. (1994). Friedelin, the major component of grapefruit epicuticular wax. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 708-713.

Ohlrogge, J., Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* **7**, 957-970.

Ozaki, M., Wada-Katsumata, A. Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokahari, F., Satoji, Y., Nisimura, T., Yamaoka, R. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by chemosensory sensillum. *Science Mag.* **309**, 311-314

Reina-Pinto J, Yephremov A (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 540-549.

Riedel, M., Eichner, A., Jetter, R. (2003). Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* blanco pitchers. *Planta.* **218**, 87-97.

Samuels, L., Kunts, L., Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 683-707.

Schremmer, F (1984). Untersuchungen und Beobachtungen zur Ökoethologie der Pflanzenameise *Pseudomyrmex triplarinus*, welche die Ameisenbäume der Gattung *Triplaris* bewohnt. *Zool. Jb. Syst.* **111**, 385-410.

Shepherd, T., Griffiths W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* **171**, 469-499.

Shepherd, T., Robertson, G. W., Griffiths, D. W. (1995). Compositional analysis of intact alkyl esters in leaf epicuticular wax of swede by capillary gas chromatography and electron-impact mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **6**, 65-73.

Sousa E., dos Santos R., Aguiar F., de Senna C. (2003). The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt cv. *Purpurea* Boom (Commelinaceae) leaves. *Braz. Arch. Boil. Technol.* **46**, 4.

Vlahov, V., Rinaldi, G., Del Re, P., Giuliani, A. (2008) ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the different components of epicuticular waxes of olive fruit (*Olea europea*) dritta cultivar. *Analytica Chimica Acta.* **624**, 184-194.

Wen, M., Buschhaus, C., Jetter, R. (2006). Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* l. *Phytochemistry.* **67**, 1808-1817.

Wood, W (2005). A comparison of mandibular gland volatiles from ants of the bull born acacia, *Acacia collinsii*. *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 651-658.