

Cap. 2



Secreciones defensivas de invertebrados terrestres.



Ecología química aplicada y perspectiva molecular y ecosustentable de la biodiversidad ecuatoriana

Defensive Secretions of Terrestrial Invertebrates.

Applied Chemical Ecology & Molecular and Eco-Sustainable Perspective of Ecuadorian Biodiversity

 <http://doi.org/10.5281/zenodo.4527693>

Juan Tacoronte Morales

*Investigador Independiente; Senescyt. Ex-Investigador Prometeo N1
ORCID:0000-0001-7325-7788*

María Teresa Cabrera

Universidad de Las Américas

Código JEL: Q01; Q23; Q57

Recibido: 24 de abril de 2018

Aceptado: 11 de julio de 2018

Línea temática: Aprovechamiento de recursos naturales (bióticos) en condiciones sustentables. Prospección química de la Biodiversidad.

Indexado en:

OpenAIRE



Resumen

Los Diplopoda, o milípedos, son invertebrados terrestres con roles básicos de detritivoría dentro de los sistemas de dinámica edáfica de los ecosistemas. Evolutivamente, en calidad de defensas utilizan secreciones repugnatorias, las cuales varían de acuerdo a las especies y familias, y constituyen una extraordinaria fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos cuyo estudio eco-quimiotaxonómico puede facilitar la compleja tarea de identificación taxonómica de las especies y subespecies geográficas en sus hábitat y comprender el mecanismo de relaciones químico-conductuales en la fauna edáfica del oriente ecuatoriano y otras regiones neotropicales. Se genera un banco biomolecular que sustenta la quimio-bioprospección de secreciones defensivas de Diplópodos endémicos de Ecuador (Rino-crícidos, gen. *Rhinocricus*, zonas de Sucumbíos, Orellana e Imbabura) y que fundamenta su inclusión en los programas actuales de conservación sistémica y elucidación estructural (quimio-prospección) de la biodiversidad del Ecuador para identificar componentes biológicamente activos (quinonas, fenoles y vainillina), facilitando el *mapeo molecular* de dichas secreciones a una escala geográfica.

Palabras claves: Secreciones defensivas, Diplopoda, *Rhinocricus*, metabolitos secundario, mapeo molecular.

Para citar este capítulo utilice el siguiente formato:

Tacoronte, J. y Cabrera, M. (julio, 2018). Secreciones defensivas de invertebrados terrestres. Ecología química aplicada y perspectiva molecular y ecosustentable de la biodiversidad ecuatoriana. En P. Navarrete (Ed.), *Un Espacio Para La Ciencia* (pp. 45-94). doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4527693>

Abstract

The Diplopoda, or millipedes, are terrestrial invertebrates with basic detritivory roles within the systems of edaphic dynamics of ecosystems. Evolutionarily, they use disgusting defensive secretions, which vary according to species and families, and constitute an extraordinary source of biologically active secondary metabolites whose eco-chemotaxonomic study can facilitate the complex task of taxonomic identification of geographic species and subspecies in their habitat and understand the mechanism of chemical-behavioural relationships in the edaphic fauna of eastern Ecuador and other neotropical regions. A biomolecular bank is generated that supports the chemo-bioprospection of defensive secretions of Ecuadorian endemics (Rino-crícidos, *Rhinocricus* gene, Sucumbíos, Orellana and Imbabura areas) and that bases its inclusion in the current systems of systemic conservation and elucidation structure (chemo-prospecting) of Ecuador's biodiversity to identify biologically active components (quinones, phenols and vanillin), facilitating *the molecular mapping* of such secretions on a geographic scale.

Key words: Defensive Secretions, Diplopoda, *Rhinocricus*, Secondary Metabolites, Molecular Mapping.

To cite this chapter use the following format:

Tacoronte, J., & Cabera, M. (July 2018). Defensive Secretions of Terrestrial Invertebrates. Applied Chemical Ecology & Molecular and Eco-Sustainable Perspective of Ecuadorian Biodiversity. In P. Navarrete (Ed.), *Un Espacio Para La Ciencia* (pp. 45-94). doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4527693>

Introducción

Todos los organismos son *químico-sensibles* (sensibilidad a sustancias químicas exógenas y autógenas) y todos generan, o utilizan, sustancias (*metabolitos secundarios-semioquímicos-infoquímicos*, feromonas sexuales, de roles, de alarma, de agregación, biomarcadores territoriales y “*huellas químicas o señales químicas*) que influyen en la conducta de otros individuos de la población y en otras especies, dependiendo de este intercambio químico (Ando y Yamakawaa, 2015). Entre las señales químicas se destacan las *secreciones defensivas de los artrópodos*, cuya diversidad molecular y estructural en el *espacio químico* de la biodiversidad (Eisner, Eisner y Siegler, 2005) es amplia. El estudio de las secreciones defensivas de artrópodos se reporta en: coleópteros, milípedos (Kuwahara, Omura, Tanabe, 2002); opiliónidos (Eisner, Rossini, González y Eisner, 2004).

Algunas consideraciones, conceptuales y metodológicas, sobre elucidación estructural, composición y actividad biológica de las secreciones defensivas, incluyendo procedimientos de aislamiento se han descrito (Dossey, 2010). Las secreciones defensivas pueden ser *mezclas poli-componentes* con diferente grado de complejidad molecular en el rango desde 150 hasta 550-680 uma, identificándose: *ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres, hidrocarburos ramificados o lineales, lactonas, fenoles y p-benzoquinonas* con diferente grado de sustitución y monoterpenos. Todos poseen un olor penetrante, elevada fugacidad y persistencia, y pueden generarse y/o almacenarse en glándulas especializadas a concentraciones altas. No obstante, su aislamiento y caracterización molecular es compleja debido a las pequeñísimas cantidades de material asequible. Por ejemplo, las secreciones *quinonoides* generalmente contienen 2 ó 3 quinonas a concentraciones del orden 10^{-6} y muy raramente un solo componente. Estas secreciones están potenciadas en sus mezclas por glucosa, hidrocarburos y trazas de hidroquinona. La variabilidad composicional en las secreciones defensivas de invertebrados-artrópodos (milípedos, insectos y

arácnidos), permite analizar la *diferenciación intra-específica* en **quimiotipos** con gran significación en el *proceso de micro-evolución de las especies*. Los componentes de las secreciones defensivas (metabolitos secundarios) en invertebrados terrestres poseen gran reactividad y actúan como *disruptores de procesos metabólicos* vitales, provocando efectos observables a muy bajas concentraciones, en la adaptación químico-evolutiva, y transmisión de información inter-organismos y poblaciones, etc.

Debe destacarse que la *químio-bioprospección orientada* de la biodiversidad de Ecuador, en sus inicios hoy, permitirá, en corto plazo, la generación de una extensa base de datos molecular y la modelación de estructuras líderes aplicables a la terapéutica clínica y a la agricultura en condiciones de desarrollo sostenible por una sola razón, "químicos, ecólogos y biólogos, en fraternal abrazo, se han lanzado a la aventura: *Un organismo-una molécula-un líder estructural-un producto* para el bienestar del Hombre, protegiendo el patrimonio químico-genético planetario" (Eisner et al., 2005).

Dada la extraordinaria diversidad de metabolitos secundarios en las secreciones defensivas de invertebrados terrestres, su baja concentración, su heterogeneidad y complejidad molecular, para su elucidación se emplean diversas técnicas analíticas y estrategias sistémicas de análisis estructural que permiten, en un tiempo dado, caracterizar los grupos funcionales y fragmentos moleculares e identificarlos, permitiendo valorar tipo de compuesto y su concentración en la mezcla. Estas técnicas analíticas se fundamentan en reacciones cromogénicas, formación de precipitados, interacciones específicas con la radiación electromagnética y técnicas biomoleculares tipo *elisa*, etc.

Grosso modo, para el análisis de secreciones defensivas se puede aplicar esta secuencia de pasos operativos en un diagrama de flujo de prospección química de biodiversidad:

1. Extracción, *in situ* y en condiciones de campo-laboratorio de la secreción defensiva de individuos de diferentes poblaciones

eco-geográficas, mediante perturbación mecánica no letal y su colecta con papel de filtro y/o capilares en condiciones de temperatura y presión normal

2. Conservación de los volúmenes colectados (200-650 microlitros) en condiciones de refrigeración (-10 / -4 °C)
3. Análisis primario (cromatografía de capa fina y columna) y determinación, *grosso modo*, del número de componentes presentes en las muestras de secreción defensiva
4. Diferenciación y aislamiento de fracciones mayoritarias mediante cromatografía de columna y/o raspado de placas y su tratamiento con solventes de polaridad creciente.
5. Caracterización estructural (cromatografía y espectrofotometría, FTIR, RMN, DFX). Identificación de grupos funcionales y fragmentos moleculares presentes.
6. Identificación y Correlación de las señales observadas y su asignación a grupos funcionales y fragmentos moleculares específicos
7. Evaluación preliminar de la *significación químico-evolutiva*, a escala molecular, de la *variabilidad composicional* de las secreciones repugnatorias para cada zona geográfica objeto de estudio y de su bioactividad preliminar (acción microbicida, insecticida y biocida general)
8. Diseño de un *mapeo molecular* y *evaluación de actividad biológica* específica según protocolos estandarizados, incluyendo estudios de correlación estructura-actividad (QSAR).

La aplicación de conceptos y métodos de la química orgánica analítica a los procesos de aislamiento, identificación de grupos funcionales, caracterización de fragmentos y tipo de correlaciones estructura-composición-concentración de metabolitos componentes de secreciones defensivas juega un papel fundamental en la aplicación de los conceptos de ecología química y prospección química de la biodiversidad. Entre estos

conceptos analíticos se destaca, por su facilidad operativa, sencillez y alta resolución en procesos de separación e identificación de metabolitos en mezclas mono- y policomponentes, la cromatografía de placa delgada (CPD). Esta técnica, dada su sencillez y fácil manipulación en condiciones de campo y laboratorio, es muy útil para valorar, preliminarmente, composición y tipo de metabolitos presentes en mezclas de productos naturales, incluyendo las secreciones defensivas de invertebrados terrestres. El dato básico que se obtiene con esta técnica es el *valor de R_f* que es típico para cada sustancia en unas condiciones dadas. Otro método de identificación y caracterización de grupos funcionales y fragmentos moleculares específicos es la espectroscopia infrarroja. Cada molécula presenta un espectro FTIR característico (huella dactilar con bandas específicas asociadas a longitudes de onda absorbidas en la zona del infrarrojo), con información cualitativa acerca de los fragmentos que componen dicha sustancia e identificar metabolitos secundarios, incluyendo las secreciones defensivas. La espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN, ¹H y ¹³C) permite estudiar el comportamiento de ciertos fragmentos poliatómicos inducidos por campos magnéticos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo o fragmento molecular determinado están relacionadas con su estructura molecular. Esta técnica resulta ser de las más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y dinámica de moléculas y metabolitos secundarios en disolución. Para el análisis de mezclas complejas de sustancias y metabolitos secundarios se utilizan los acoplamientos GC-MS. La idea esencial es realizar la separación cromatográfica de los componentes de la mezcla, que una vez separados, mediante Cromatografía gaseosa-CG, se inyectan secuencialmente al espectrómetro de masas para obtener los espectros de cada uno de ellos. La CG-MS es un método universalmente utilizado para perfiles composicionales de secreciones defensivas de invertebrados, específicamente para el estudio de metabolitos secundarios volátiles de secreciones repugnatorias de milípedos (Arab, Zacarin, Fontanetti y Camargo-Mathias, 2003), debido a su especificidad, sensibilidad, posibilidad

real de identificación estructural (con y sin estándar de referencia) y uso de librerías de espectros.

Diplópodos (Milípedos)

Los Miriápodos, invertebrados pertenecientes al Phylum Arthropoda, se dividen en cuatro Clases: Pauropoda, Symphyla, Diplopoda y Chilópoda, y comprenden unas 14000 especies distribuidas en todas las zonas geográficas del planeta (Hoffman, Golovatch, Adis y De Morais, 1996). Los diplópodos (milípedos) son los más diversos, con aproximadamente 12000 especies (Cupul-Magaña, Valencia-Vargas, Bueno y Shelly, 2014; Zhang, 2013). Estos organismos frente a un ataque de depredadores responden, enrollándose con la cabeza hacia el centro, o eyectando una secreción repugnatorial, de color marrón o amarillento y olor *fenólico*, de acción repelente para el atacante (Hopkin y Read, 1992). Del total de especies descritas, para la zona Neotropical se han detallado unas 1800. Los Milípedos se diferencian por una variedad de formas y tamaños, desde 2 mm hasta 35 cm en longitud (Minelli y Golovatch, 2001) y pueden tener desde 11 hasta más de 100 segmentos (Barnes, 1982). Por lo general son de color negro o marrón, aunque hay algunas especies con una brillante coloración aposemática o son bioluminiscentes (Marek, Shear y Bond, 2015). Muchas especies poseen un par de órganos sensoriales conocido como *órganos Tömösvary*, localizados en la base de las antenas (Sierwald & Bond, 2007; Lewis, 2008). Los ojos de los milípedos consisten en una serie de ocelos planos simples u *ocellaria*, aunque las especies cavernícolas (*Causeyella* y *Trichopetalum*), son ciegas.

Los cuerpos de los milípedos pueden ser aplanados o cilíndricos, y están compuestos de numerosos segmentos metaméricos, o diplosegmentos cada uno con un exoesqueleto. Debido a que carecen de una cutícula cerosa, los milípedos son susceptibles a la pérdida de agua y debe pasar la mayor parte de su tiempo en ambientes con elevada humedad (Capinera, 2008). Los milípedos, en algunas órdenes, poseen extensiones del cuerpo, en forma de quilla o *paranota*, que puede variar ampliamente en forma, tamaño, y textura; siendo su función protectora.

Ecología e Historia natural

Los milípedos, invertebrados terrestres y nocturnos, habitan en todas las zonas biogeográficas (excepto la Antártida) incluyendo cavernas con diferentes regímenes termodinámicos, y ocupan casi todos los hábitats terrestres (Golovatch y Kime, 2009; Shelley y Golovatch, 2011) y pueden alcanzar densidades superiores a 1.000 individuos por metro cuadrado. Los milípedos constituyen parte integrante de la *macrofauna edáfica*, influyendo en los ciclos biogeoquímicos y en la dinámica del suelo. Frecuentemente presentan una *distribución agregada* y un *patrón de actividad estacional*, relacionada con la humedad zonal, pluviosidad y procesos reproductivos determinada por factores edáficos y climáticos. Ocupan tres tipos de *microhabitats* en bosques tropicales: superficie del suelo y partes aéreas de las plantas; manto vegetal y suelo; y espacios en las cortezas de los árboles y restos vegetales en descomposición. En términos ecológicos en los Milípedos es más importante la biomasa que el número absoluto de individuos. Son detritívoros generalistas. Para Diplópodos de la región Amazónica se ha considerado que son exclusivamente fungívoros.

No obstante la riqueza de la megafauna edáfica del Ecuador, específicamente la fauna de diplópodos, se enfatizará en especies del orden Spirobolida-Rinocrícidos para los cuales se reconocen secreciones defensivas policomponentes de tipo quinonoide (hidroquinonas y quinonas), una elevada riqueza de especies en la región neotropical amazónica, ausencia de una base de datos sobre ecología química y su fácil manipulación y alta relación masa crítica vs. volumen de secreción defensiva.

La composición de las secreciones defensivas de los diplópodos varía según la familia y la especie (Eisner, Alsop y Meinwald, 1978; Huth, 1999). Su estudio eco-químico-taxonómico facilita la tarea de identificación taxonómica de las especies y sub-especies geográficas en sus hábitat y comprender el mecanismo de relaciones químico-conductuales en la fauna edáfica del oriente ecuatoriano y otras regiones neotropicales (Williams, Singh y Caleb-

Williams, 1997; Demi y Huth, 2000), permitiendo, además, nuevas perspectivas, *moleculares* para la conservación de especies raras y/o en peligro de extinción. Estas secreciones repugnatorias pueden constituir *per se* una fuente, ecológicamente sostenible, de metabolitos secundarios biológicamente activos (*nuevas entidades estructurales y entidades farmacológicas potencialmente escalables*) con acción microbiocida potencial. (Eisner et al., 1996). *Glomerida* secreta alcaloides, *Callipodida* y *Chordeumoidea* fenoles, *Polydesmida* produce cianuro de hidrógeno, compuestos cianogénicos y nitro-alquenos; y *Colobognatha* (Polyzoniidae) terpenoides (ver Arab, Zacarin, Fontanetti y Camargo-Mathias, 2003). La composición química de las secreciones de benzoquinonas en los órdenes *Julida*, *Spirobolida* y *Spirostreptida* (*Juliformia*) es la mejor documentada. Los estudios confirman que los compuestos volátiles producidos son irritantes y repelentes para insectos y mamíferos reconocidos como depredadores potenciales de milípedos, y tóxicos a hongos, nemátodos y bacterias (ver Sierwald y Bond, 2007; Valderrama, Robinson, Attygale y Eisner, 2000). Las p-quinonas di-, tri- y tetra-alquil, o alquilmetoxi-sustituidas han sido reportadas previamente como sustancias defensivas en algunas especies de diplópodos (Eisner, Eisner, Attygalle, Deyrup y Meinwald, 1998; Demange, 1993). El compuesto 2-metil-1,4-benzoquinona, hallado en *Rhinocricus padbergi* (orden Spirobolida) y en otras especies (ver Arab et al., 2003), es altamente tóxico y persistente (ver Valderrama et al., 2000). La secreción defensiva de *Rhinocricus duvernoyi* Karsch, 1881, un diplópodo endémico de Cuba, está constituida mayoritariamente por p-benzoquinonas y también descrita para especies africanas de diplópodos de géneros *Metiche* y *Archispirostreptus* (Wood, Hanke, Kubo, Carrol y Crews, 2000).

Para el caso de la prospección química de la biodiversidad de invertebrados terrestres de la República del Ecuador, no existen reportes que detallen la composición química y actividad biológica de las secreciones defensivas de milípedos. De acuerdo a lo explicado, este trabajo de investigación planteó realizar el análisis de la composición química de las secreciones defensivas

de milípedos para: facilitar la generación de datos estructurales y estudios de modelación -diseño de vías metabólicas; optimización de procesos de síntesis de análogos iso-estructurales; implementación de enfoques eco-sistémicos y *farmacéuticos* con potencial aplicación en diversas esferas de la actividad humana; incremento del valor agregado de la biodiversidad, como recurso estratégico, y fuente eco-sostenible de metabolitos secundarios; aplicación de una perspectiva de ecología química y metodologías de químico-bioprospección a la biodiversidad autóctona de Ecuador. Dada la no existencia de conocimiento estructural sobre composición química de las secreciones repugnatorias de los Diplópodos que constituyen el componente biomásico fundamental de la fauna edáfica ecuatoriana, y su posibilidad de aplicación en la obtención de agentes microbiocidas de amplio espectro, se decidió estudiar, preliminarmente, estas secreciones en poblaciones de Diplópodos que habitan en diferentes regiones eco-geográficas de Ecuador. Actualmente, no obstante la implementación de estrategias nacionales de conservación y aprovechamiento de la biodiversidad autóctona como recurso, no existen estudios de prospección química sobre la composición de las secreciones defensivas de invertebrados terrestres de la edafo-fauna de Ecuador, específicamente Milípedos (Diplópodos, Miriápodos), que permitan la implementación de una visión molecular sistémica en las políticas de conservación y de aprovechamiento avanzado de dicho recurso a escala nacional.

No existen estudios, a escala nacional, sobre la composición de las secreciones defensivas de invertebrados terrestres endémicos de la fauna edáfica de Ecuador ni sobre la acción microbiocida de estas secreciones repugnatorias, así como tampoco existen bases de datos sobre *mapping* de metabolitos secundarios y sus correlaciones bioquímico-estructurales, eco-geográficas y evolutivas. A pesar de jugar un rol importante dentro de la macrofauna edáfica, así como en la dinámica y composición del suelo, no existen investigaciones que aporten en pro de su conservación ni que revelen el potencial que poseen las secreciones defensivas de este grupo, lo que hace de esta investigación científica la base

del conocimiento en ecología química-quimio-bioprospección de las secreciones defensivas y su potencial aplicación en procesos de formulaciones bioactivas como microbicidas, e insecticidas específicos, además de entender el comportamiento de las especies a nivel molecular con respecto a las condiciones edafoclimáticas y eco-geográficas, partiendo de un potencial marcador químico-evolutivo y como pilar fundamental para escalar, productivamente, la diversidad molecular de productos naturales a tal nivel, así como en los taxonómico y ecológico, generando una alta competitividad y un alto valor agregado intelectual, patrimonial y tecnológico, contribuyendo en gran medida al incremento del conocimiento de los recursos naturales bióticos de Ecuador.

Considerando lo anteriormente expuesto se estableció como hipótesis de trabajo, durante la investigación, la siguiente: *“la composición de las secreciones defensivas de los rinocricidos autóctonos variará en cada localidad.”*

La utilización racional de la biodiversidad como recurso estratégico, que permita generar derivados con alto valor agregado a partir de metabolitos secundarios y líderes moleculares aislados de invertebrados terrestres tipo artrópodos, específicamente Milípedos, ha sido reflejado en las actuales direcciones de investigación básica y aplicada y lineamientos de desarrollo, fundamentadas en los lineamientos generales del Plan Nacional del Buen Vivir (Senplades, 2009; 2013).

Esta visión, *molecular*, permitiría, además, desarrollar y diseñar nuevas políticas de conservación sistémica de la biodiversidad desde posiciones de uso y potenciación de derivados *ava*, generados por las especies en su interacción multifactorial, específicamente químico-biológica y micro-evolutiva con el medio ambiente. En este marco conceptual, legal y gubernamental, la bioprospección, y específicamente la *prospección química de la biodiversidad*, con mínimo impacto sobre las poblaciones de especies y su entorno eco-geográfico, se articula como una herramienta que, utilizada apropiadamente, puede conducir al

aumento del conocimiento sobre nuestros recursos naturales y a su aplicación en procesos de desarrollo productivo, que conduzcan a mejorar el ingreso y la calidad de vida de los ciudadanos, así como potenciar y optimizar el proceso de conservación de la biodiversidad del genofondo faunístico y botánico, lo cual puede ser aplicado a los ecosistemas de Ecuador.

La inmensa riqueza de la biodiversidad de Ecuador tiene un potencial importante para el desarrollo de la química-bioprospección, fundamentándose en las políticas del país propuestas en el Plan Nacional del Buen Vivir (Senplades, 2013) mencionando como un lineamiento estratégico (7.2-m):

Fomentar la investigación y los estudios prospectivos sobre el uso sustentable y la conservación de la biodiversidad, por lo que por medio de la generación de un valor agregado a la biodiversidad molecular basándose en búsqueda sistémica de fuentes naturales y su aplicación en procesos de desarrollo productivo como procesos farmacéuticos, agroquímicos e industriales.

Fundamentados en la serie conceptual *Un organismo → un sistema enzimático → una molécula → una estructura líder → una aplicación* y enfocándose en fuentes poco o nada estudiadas y que por medio de su uso determinen un papel fundamental en la protección racional de la biodiversidad, facilitando la comprensión de la necesidad de su conservación sistémica.

En este contexto, la búsqueda de una fuente de metabolitos secundarios bioactivos (química-bioprospección) a partir de las secreciones defensivas de Diplópodos, que no han sido estudiada desde el punto de vista químico (composición, caracterización, variabilidad eco-geográfica y efecto biológico), permitirá generar fuentes eco-sostenibles y escalables de nuevas entidades estructurales fármaco-lógicamente activas, constituyendo una herramienta conceptual-metodológica de incalculable valor para el desarrollo de nuevos enfoques eco-sistémicos orientados a la

protección y conservación de poblaciones y comunidades de diplópodos en estrecha relación con las condiciones ambientales.

El objetivo general del trabajo presentado fue *determinar la composición, y variación estructural comparativa, de las secreciones defensivas (metabolitos secundarios) de diplópodos Rinocrícidos que habitan en diferentes zonas eco-geográficas específicas de Ecuador: provincias de Sucumbíos, Francisco de Orellana e Imbabura.*

Metodología

Áreas de estudio y localización de zonas de colecta

Las áreas de estudio corresponden a centros de desarrollo, evolución y alta concentración de metabolitos secundarios de la biodiversidad Ecuatoriana (*hot-spot*), donde se incluyen Amazonia y el norte del Ecuador (corredor interandino amazonia-zona costera). Estas áreas de estudio son zonas de bosque tropical lluvioso con un gradiente latitudinal entre 280 y 1700 msnm, donde la diversidad biológica endémica supera el 75% y concentra el mayor número de especies de invertebrados de Ecuador. La georreferenciación de los puntos de colecta se determinó con un equipo GPS-GPSMAP-64-GARMIN (2015) y fue el promedio de tres puntos

- **Sucumbíos.** Punto de colecta: **Itaya**, parroquia de Tarapoa, cantón Cuyabeno, provincia de Sucumbíos. *Latitud:* 0°22'59,11"S; *Longitud:* 76°32'4,09"O
- **Orellana.** Punto de colecta: **Palmar del Rio**, Provincia de Orellana, altura de 280 msnm. *Latitud* 0°18'2,37"S; *Longitud* 76°56'0,91"O
- **Imbabura.** Punto de colecta: **Cahuasqui**, *Latitud* 0°31'2,34"N; *Longitud* 78°51'3'55,16"O

Población

Las poblaciones de milípedos, (Espirobólidos-Rinocrícidos), están en el rango discreto de $n \geq 30$ (individuos), lo que facilita la evaluación, al azar, de la variable fundamental: *composición de secreción defensiva para sub-poblaciones geográficamente diferenciadas*, en las mismas condiciones de análisis, minimizando el número de nuestras así como todo impacto ecológico-antrópico sobre las poblaciones objeto de estudio. Dado el *carácter homogéneo de las sub-poblaciones*, se aplicó un *muestreo aleatorio simple* para un máximo de muestras de 2,88

individuos por zona de colecta para un total de 12 muestras, en una población global de 30 individuos pertenecientes a la familia Rinocricidae (figura 1). En cada localidad se tomaron tres muestras con tres replicas cada una, lo que generó un total de 27 réplicas; en los resultados de cada provincia se aplica una metodología particular en dependencia de las condiciones de colecta y número de individuos observados, pero siempre intentando obtener, al menos, el volumen suficiente de secreción (500 – 600 $\mu\text{l}/\text{Vol.}$), (J. Tacoronte, comunicación personal, 2014/2016).

Métodos

Fase de Campo. La fase de campo se desarrolló durante febrero-mayo del 2016, en Sucumbíos (Itaya); Francisco de Orellana (Palmar del Rio), e Imbabura (Cahuasqui).

Colecta de Diplópodos. Para cada localidad de muestreo se identificó una zona de colecta; se aplicaron parcelas de 20 x 20 (400 m²) para búsquedas exhaustivas diurnas en todos los micro-hábitats posibles.

Los individuos colectados se examinaron taxonómicamente a nivel de gonóporos (segmentos 5-9) para diferenciar los sexos y especies de diplópodos que existen en el área; se procedió a coleccionar tres individuos machos (fotografiados, pesados y medidos); todos los individuos fueron geo-referenciados para geo-posicionar el lugar de colecta y realizar un análisis de distribución geográfica posterior. Los parámetros para la selección de los individuos en las zonas de muestreo fueron:

- *Aspectos morfológicos* de cada espécimen colectado: longitud y grosor (diámetro del individuo). Longitud: 4-10 cm y Diámetro (l): 0.5-1.0 cm.
- *Accesibilidad geográfica.*
- *Volumen total de secreción defensiva por individuo* analíticamente útil para ensayos químicos. Volumen mínimo: 200 microlitros (200 μL) y Volumen máximo: 500-650 microlitros (500-650 μL).

Fase de Laboratorio

Todas las muestras se analizaron a 25 °C. Todos los reactivos, solvente y aditivos químicos se utilizaron sin purificación. La conservación de los especímenes *voucher* se desarrolló:

Terrario 1. Caja de plástico: 22 cm de largo, 15 cm de ancho y 14 cm de altura, con masa de tierra cubriendo el 40 % del terrario; las condiciones de iluminación: 12 horas de luz y 12 horas de tiempo nocturno. Se aplicaban 10 ml de agua por aspersion cada 3 días, la alimentación de los individuos colectados como *voucher* eran pequeños pedazos de fruta y pan que se colocaban cada 4 días. Se revisaba el estado de los individuos una vez a la semana

Extracción y Aislamiento

Para obtener las secreciones defensivas (eyectadas por los ozóporos localizados en la parte dorso-lateral del cuerpo) de coloración marrón-rojiza intensa, los individuos fueron estimulados mediante presión. La secreción contenida (aprox. 650-800 µg/individuo) se absorbe sobre papel de filtro Whatman 40 y se refrigera a -10 °C (figura 2). El papel de filtro se extrae con éter dietílico (5 x 2 mL) y los extractos son concentrados con flujo de N₂ (g) hasta sequedad y fueron almacenados a -10 °C en viales *ependorf* de 1 mL, sellados con parafilm para los análisis posteriores. A cada vial, con el extracto seco, se adiciona DCM (dicloro-metano, 1 mL), se agitó, se filtra a través de frita de cerámica de 0,45 µm, y se inyecta en el equipo de GC-MS (20 µl).

Para el caso de estudio (especímenes colectados en las zonas eco-geográficas descritas *vide supra*) se tomó un vial que contiene entre 10-15 mg (secreciones de 3 individuos machos) de residuo seco, se le añadió 1 mL de éter, y se efectuó el ensayo de la rodamina en amoníaco acuoso (25 %). A una alícuota de esta solución etérea se añadió cianoacetato de etilo y amoníaco (1:0,75 v/v) observándose una coloración azul violácea, típico para estructuras quinónicas. A la disolución etérea se le realizó una cromatografía en placa delgada CCF (Silicagel-60 F₂₅₄, detección a 254 y 356 nm n-hexano / acetato de etilo 85:15 v/v) y se observó

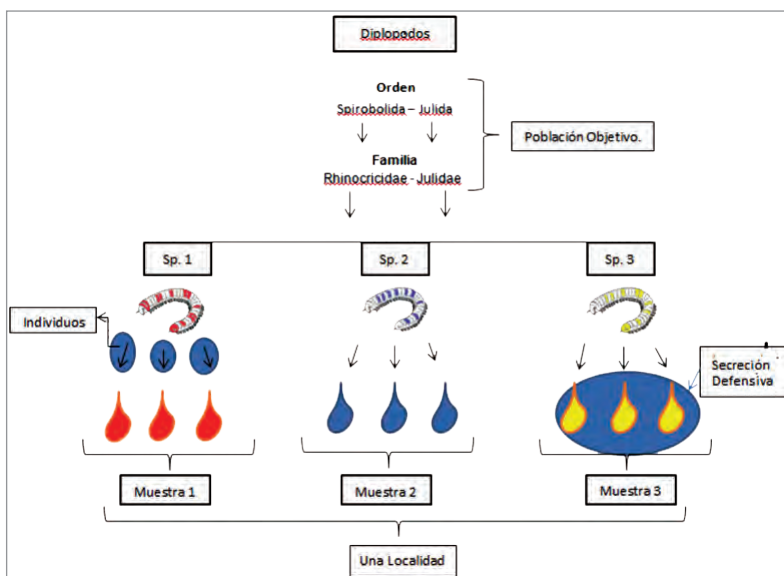


Figura 1. Proceso de colección de muestras (elaborado por autor*, 2016, UCE)

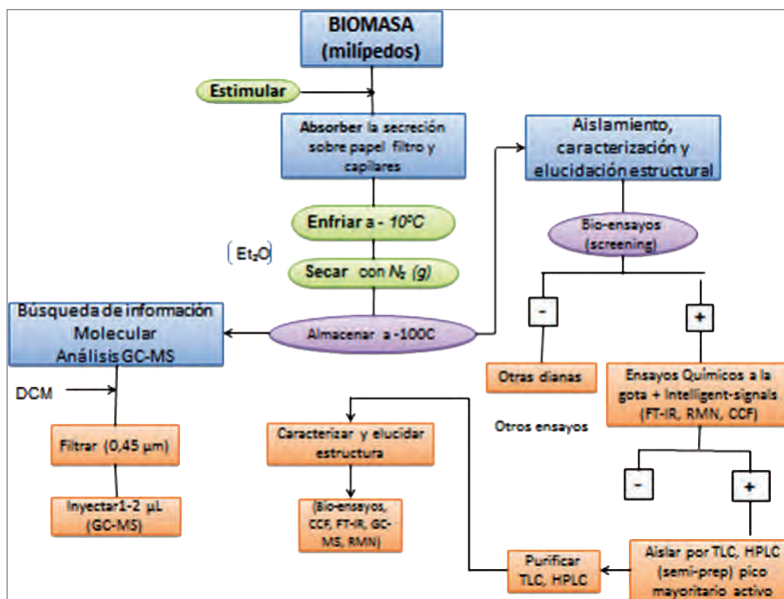


Figura 2. Metodología de trabajo empleada para el aislamiento caracterización y elucidación estructural de metabolitos secundarios y secreciones defensivas de milípedos (elaboración autor*, 2016)

la aparición de manchas coloreadas específicas para cada componente de la secreción defensiva. La disolución etérea (10 mL) se percoló sobre una columna de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4 con 2 % de AgNO_3) de 250 mm de longitud y 8 mm de diámetro, utilizando como fase móvil una mezcla de n-hexano/acetato de etilo (85: 15 v/v) (110 mL) y se monitorea por CCF.

Se colectaron por separado las fracciones y se concentraron al vacío para su análisis por cromatografía de capa fina analítica (CCF, 50 mm largo x 50 mm de ancho, Silicagel-60 F₂₅₄, detección a 254 y 356 nm), eluyendo con una mezcla de n-hexano / acetato de etilo (85: 15 v/v) y amoníaco como agente cromogénico. Se efectuó un segundo análisis, empleando cromatoplasmas impregnadas con disolución acuosa al 3% de ácido oxálico y utilizando como eluyente una mezcla de benceno / acetato de etilo (10: 2 v/v). Para elucidar estructuralmente el componente activo mayoritario observado en las CCF anteriores, se desarrolló una CCF preparativa (200 mm largo x 200 mm de ancho, Silicagel-60, 2 mm de espesor, detección a 254 y 356 nm). Se aplicó 500 µL de una solución correspondiente a las fracciones aisladas previamente.

Se eluyó por un tiempo de 45 min. a temperatura ambiente con una mezcla de n-hexano/acetato de etilo (85: 15 v/v) y amoníaco como agente cromogénico. Una vez terminada la elusión se extrajo la mancha mayoritaria mediante raspado con espátula, se disolvió en DCM (2 mL), se filtra sobre frita de 0,45 µm, y se secó al vacío hasta obtener un residuo sólido de color intenso. Para el caso de colecta con capilares, la secreción defensiva, se colecta en condiciones de campo mediante tubos capilares (10cm de longitud y 0,1mm de diámetro y suave manipulación de este con la secreción defensiva y transportación hasta el laboratorio. Para minimizar las pérdidas de secreción defensiva en los individuos colectados más pequeños (zona de colecta Imbabura-Cahuasqui), los individuos se cubren con papel de filtro y se perturban mecánicamente de manera suave hasta que toda la secreción defensiva sea expulsada o se observe un cambio en la coloración de la secreción eyectada.

Caracterización molecular

Las muestras (volumen de trabajo 500-600 microlitros) listas se trasladaron a los laboratorios Proinstra S.A., Quito y Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador donde se realizaron los análisis químicos para determinar la estructura y composición de las secreciones defensivas aisladas de los diplópodos.

Análisis Espectrofotometría infrarroja (FT-IR)

Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrofotómetro PHILIPS ANALYTICAL FTIR PU-9600, las muestras se prepararon en pastillas de bromuro de potasio (KBr) a 25°C y discos de silicio. Alternativamente se registraron los espectros en un sistema JASCO-Canvas 4600, Japón, en pastillas de CsBr a 25 °C

Espectroscopía RMN (resonancia magnética nuclear)

Los espectros de RMN se registraron en un equipo BRUKER AC-250 a 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) protónicos están dados en ppm, usando tetrametilsilano como referencia interna (TMS, $\delta = 0,0$) y como solvente CDCl_3 . Los desplazamientos químicos (δ) para ^{13}C están referidos al pico central del solvente CDCl_3 a 77,03 ppm.

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)

El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 6890 (Palo Alto, CA, USA) con sistema de detección tipo cuadrupolo 5973, (GC-MS). Las separaciones fueron llevadas a cabo a través de una columna capilar de tipo Ultra 2 (J & W Scientific, USA), 12 m de largo y 0,22 m diámetro interno. Como gas portador He a un flujo de 1 mL/min. Rampa de temperatura: 60 °C con incrementos de 10 °C/min hasta 300 °C (isotérmico 5 min.). Tiempo de corrida 30 min. Volumen de inyección 2 μL a una temperatura de 280 °C, en modo de split (relación 1:10). La fuente de ionización fue IE a 70 eV operando a 230 °C. Modo de adquisición: *Full Scan*. Rango de m/e 40-700. Para la caracterización estructural se utilizaron y consultaron las bases de

datos donde se reporta la composición química de las secreciones defensivas de invertebrados de diferentes clases y familias (www.pherobase.com). Utilizando las fuentes reportadas y los datos de m/e provenientes del GC-MS, se postulan las estructuras más probables y sus mecanismos de fragmentación.

Resultados

Áreas de estudio y localización de zonas de colecta

Las áreas de estudio corresponden a centros de desarrollo, evolución y alta concentración de metabolitos secundarios de la biodiversidad Ecuatoriana (*hot-spot*), donde se incluyen Amazonia y el norte del Ecuador (corredor interandino amazonia-zona costera). Estas áreas de estudio son zonas de bosque tropical lluvioso con un gradiente latitudinal entre 280 y 1700 msm, donde la diversidad biológica endémica supera el 75% y concentra el mayor número de especies de invertebrados de Ecuador. La georreferenciación de los puntos de colecta se determinó con un equipo GPS-GPSMAP-64-GARMIN (2015) y fue el promedio de tres puntos:

- **Sucumbíos.** Punto de colecta: **Itaya**, parroquia de Tarapoa, cantón Cuyabeno, provincia de Sucumbíos. *Latitud:* 0°22'59,11"S; *Longitud:* 76°32'4,09"O.
- **Orellana.** Punto de colecta: **Palmar del Río**, Provincia de Orellana, altura de 280 msnm. *Latitud* 0°18'2,37"S; *Longitud* 76°56'0,91"O.
- **Imbabura.** Punto de colecta: **Cahuasqui**, *Latitud* 0°31'2,34"N; *Longitud* 78°51'3'55,16"O.

Población

Las poblaciones de milípedos, (Espirobóolidos-Rinocrícidos), están en el rango discreto de $n \geq 30$ (individuos), lo que facilita la evaluación, al azar, de la variable fundamental: *composición de secreción defensiva para sub-poblaciones geográficamente diferenciadas*, en las mismas condiciones de análisis, minimizando el número de nuestras así como todo impacto ecológico-antrópico sobre las poblaciones objeto de estudio. Dado el *carácter homogéneo de las sub-poblaciones*, se aplicó un *muestreo aleatorio simple* para un máximo de muestras de 2,88.

1. Caso de estudio Palmar del Río, Provincia Francisco de Orellana: (Latitud 0°18'2,37" S; Longitud 76°56'0,91" O) gen. *Rhinocricus* sp

Los individuos colectados de esta especie alcanzan, como promedio, 150-180 mm de longitud, un diámetro de 1.4 cm y un peso promedio de 20-28 gramos. Ejemplares adultos 10 individuos (figuras 3a, b), se capturaron en la Empresa Palmar del Río (latitud 0° 19' S y longitud 77° 04' W), El Coca, Francisco de Orellana, 175 Km al este de Quito (*voucher specimen* 0001, Centro de Biología, Universidad Central del Ecuador, 2016). Para obtener la secreción defensiva, los individuos fueron estimulados mediante presión en la parte posterior. La secreción obtenida (aprox. 610-630 µg/individuo) se absorbe sobre papel de filtro Whatman No.4 y es refrigerada (-4/-10 °C). El papel de filtro se extrae con éter dietílico frío (5 x 2mL) y los extractos son concentrados con flujo de aire (35-40 °C) y utilizados para los análisis posteriores. Los individuos, después de la perturbación y extracción de la secreción repugnatorial, se liberan directamente en la zona de colecta. La taxonomía preliminar, a escala de campo y en ejemplares *voucher*, se fundamentó en los siguientes parámetros: Presencia de línea frontal en el *labrum* (Spirobolida-Rhinocricidae-Rhinocricus), Número de segmentos superior a 32-40, Vista del *collum* y del segundo segmento (presencia de una sutura en la parte inferior del *collum*) y rugosidades en la parte inferior del 2do segmento (Rhinocricidae-Rhinocricus), Posición del ozóporo (zona izquierda del esclerito mesozonal; Spirobolida). Ocellia circular. Las mediciones de los ejemplares (en milímetros) se realizaron determinando el largo total desde la cabeza al ápice del epiprocto; el ancho se tomó al nivel del séptimo segmento; el número de segmentos incluye desde el *collum* hasta el epiprocto.

2. Caso de estudio Itaya, Provincia de Sucumbíos: (Latitud: 0°22'59,11"S; Longitud: 76°32'4,09"O)

Los individuos colectados de esta especie alcanzan, como promedio, 16-18 cm de longitud (valor extremo 210mm desde la cabeza al ápice del epiprocto), un diámetro de 1.5 cm (séptimo segmento), un peso promedio de 22-28 gramos y un número de



Figura 3a. Milípedo Rhinocricidae, gen. *Rhinocricus* sp. Palmar del Rio (foto autor, 2016).



Figura 3b. Especimen voucher 0001 (Palmar del Rio) de milípedo gen. *Rhinocricus* sp. Placa Petri con secreción defensiva (foto autor*, 2016, UCE).

segmentos entre 36 y 42 (desde el *collum* al epiprocto). Ejemplares adultos 6 individuos (figuras 4a y 4b), se capturaron en Itaya (*voucher specimen* 0002, Centro de Biología, Universidad Central del Ecuador, 2016). La secreción eyectada (aprox. 620-650 μg /individuo) se absorbe sobre papel de filtro Whatman No.4 y se procede de manera similar a la descrita para caso 1.

3.- Caso de estudio Cahuasquí Provincia Imbabura: (Latitud 0°31'2,34"N; Longitud 78°513'55,16"O)

Los individuos colectados de esta especie alcanzan, como promedio, 3,5-5,8 cm de longitud (valor extremo 62 mm desde la cabeza al ápice del epiprocto), un diámetro de 0,5 cm (séptimo segmento), un peso promedio de 0,7-1,2 gramos, presentando una coloración más aposemática, fondo negro-verdoso con ligeras líneas amarillas en cada segmento. Ejemplares adultos 8 individuos (figuras 5a y 5b), se capturaron en Cahuasquí, a 45 Km de Ibarra (*voucher* 0003, Centro de Biología, Universidad Central del Ecuador, 2016). La secreción defensiva, de coloración amarillenta, se obtiene por estimulación mecánica de los individuos machos en papel de filtro (baja ceniza). La secreción eyectada (aprox. 40-70 microlitros / individuo) se procesa similar a Casos 1 y 2.



Figura 4 a y b. Secreción defensiva y sus cristales población Itaya (foto autor*, 2016, UCE).



Figura 5a. Spirobólido-Rinocrícido población Cahuasqui. Secreción defensiva (foto autor*, 2016).



Figura 5b. Spirobólido-Rinocrícido población Cahuasqui. Vista de los gonopodios (foto autor*, 2016).

Discusión

1. Caso de estudio Palmar del Rio, Provincia Francisco de Orellana

La aplicación, en condiciones eco-sustentables, de la propuesta metodológica descrita *grosso modo* en figura 2, permite la aplicación de una percepción químico-ecológica en la prospección química de la biodiversidad como recurso estratégico para el aislamiento y la generación de derivados con alto valor agregado. El estudio analítico inicial de esta secreción con el test de rodanina en amoniaco acuoso y el ensayo con KI, sugirió la existencia de para-quinonas, corroborado al observar una coloración azul violáceo al tratar la solución etérea de la secreción defensiva con cianoacetato de etilo/ amoniaco. La solución etérea (10 mL) se percola por una columna de fosfato de calcio (CaHPO_4 impregnado, vía húmeda, con 2% de AgNO_3 , 30 cm de longitud x 1.0 cm de diámetro), utilizando como solvente una mezcla de n-hexano / acetato de etilo 85:15 v/v (100 mL). Los eluatos obtenidos (110 mL) se analizan por cromatografía de placa delgada (Silicagel- poliéster con detector UV, 5x5 cm, tiempo de corrida 15 min; Silicagel-fosfato de calcio sobre placas de vidrio aditivadas con fluoresceína activas a 254 nm 2 x 5, tiempo de corrida 30 min.). Se reveló la existencia de un compuesto con R_f 0.5, utilizando como eluyente n-hexano/acetato de etilo 50:50 v/v y agente cromogénico (desarrollador de color) amoniaco. Al emplear cromatoplasmas de gel de Sílice G impregnadas con una solución acuosa (3%) de ácido oxálico, y eluyendo con benceno-acetato de etilo (10:2 v/v), se reveló el mismo resultado: R_f 0.47. El estudio mediante CG-MS reveló la existencia de varios componentes con diferente masa molecular. El residuo aceitoso obtenido, de color marrón oscuro, es sometido a análisis espectrofotométrico. El estudio del espectro FTIR (figura 6) evidencia bandas intensas 1660-1580 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$ 1654 y 1665 cm^{-1} , $\nu\text{C}=\text{C}$ 1587 cm^{-1}) atribuibles a para-benzoquinonas substituidas (1654 cm^{-1}). En la zona 1320-1100 cm^{-1} se observan bandas de intensidad media

(1313 cm^{-1} , 1196 cm^{-1}) pertenecientes a vibraciones de valencia y deformacionales en el grupo C-CO-C; en la región $1200\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ se distingue una banda intensa en 1108 cm^{-1} que se atribuye a vibraciones de valencia asimétricas del grupo C-O-C típica para éteres, así como en 1013 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de valencia simétricas de los mismos. Esta consideración se corrobora por la presencia de bandas en 2990 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} características para vibraciones asimétricas de valencia de $-\text{OCH}_3$ y 1475 cm^{-1} atribuible a vibraciones de deformación asimétricas y simétricas de $-\text{OCH}_3$. En 1380 cm^{-1} se observa una señal correspondiente a vibraciones deformacionales simétricas de $-\text{CH}_3$ (C-H), y en 2950 cm^{-1} asignables a vibraciones de valencia del grupo (CH_3). Estos datos sugieren la existencia de una parabenzoquinona disustituida.

Los espectros **RMN ^1H y ^{13}C** (figuras 7a y 7b) corroboran la estructura propuesta como una p-benzoquinona 2,3-disustituida. En el espectro RMN- ^1H se observan 4 señales: singlete a 1.87 ppm (3H) típico para grupos metilo CH_3 (entorno molecular olefina-oxo-sustitución); singlete en 3.92 ppm (3H) atribuible a O-CH_3 ; señal en forma de doblete a 6.53 ppm (1H) y una señal en forma de

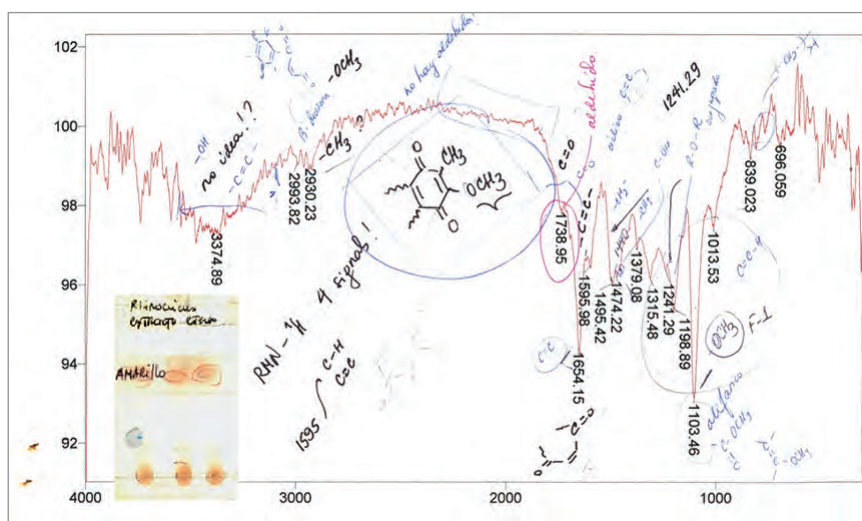


Figura 6. Espectro FTIR del componente mayoritario aislado de la secreción defensiva del milípedo *Rhinocricus* sp. Palmar del Rio (del autor*, 2016, UCE).

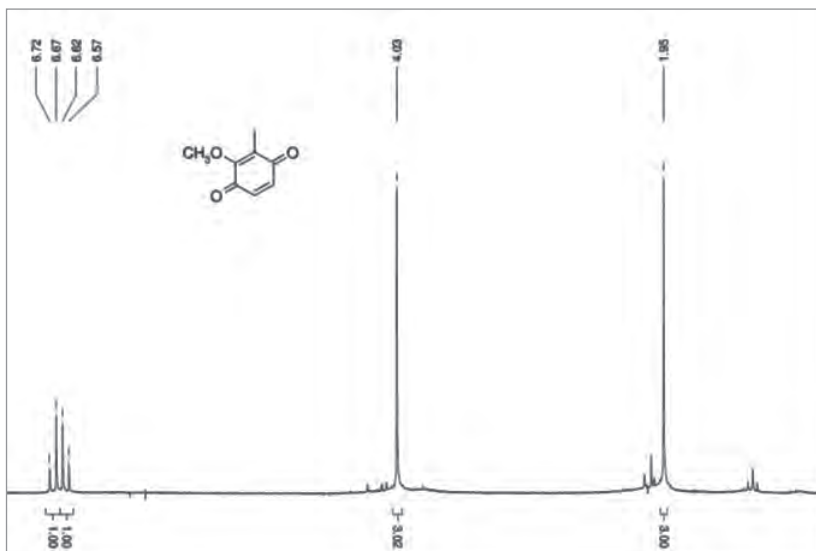


Figura 7a. RMN-1H (ppm) componente mayoritario de la secreción defensiva de *Rhinocricus* sp (autor*, 2016).

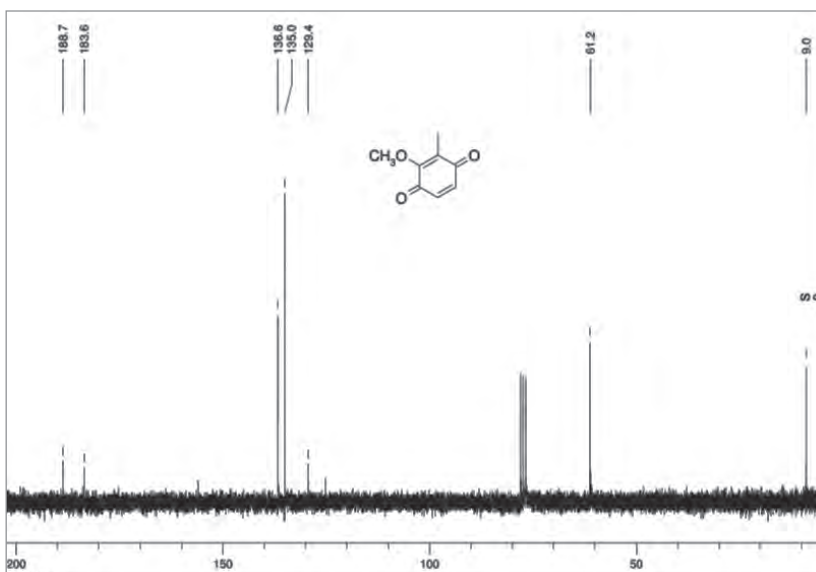


Figura 7b. RMN-13C (ppm) componente mayoritario de la secreción defensiva de *Rhinocricus* sp (autor*, 2016)

doblete en 6.75 (1H) típico de sistema olefínico dicarbonílico α,β conjugado, característico de benzoquinonas 2,3-disustituidas. El espectro RMN- ^{13}C muestra 8 señales entre 11.22 ppm y 188.34 ppm que corroboran la existencia del sistema cíclico dicarbonílico α,β -insaturado conjugado: 188.34 ppm (C-1); 129.40 (C-2); 156.15 ppm (C-3); 175.52 ppm (C-4); 136.45 ppm (C-5); 137.85 ppm (C-6); 11.22 ppm (C-7); 59.48 ppm (C-8).

La estructura propuesta para el componente mayoritario de la secreción defensiva del milípedo espirobólido-rinocrícido ecuatoriano *Rhinocricus sp.*, aislado a partir de individuos colectados en Palmar del Río, derivada de los análisis de FTIR y RMN (RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$), se observa en la figura 8.

Esta benzoquinona natural ha sido descrita para especies de diplópodos espirobólidos de la mega-edafofauna del continente africano (gen. *Metiche* y *Archispirostreptus*) (De Bernardi et al., 1982), y para especies que habitan archipiélagos tropicales americanos (Mesa, Tacoronte, Montes, Tobellas y Garrido, 2009) y para especies europeas.

2. Caso de estudio Población de Itaya, Provincia Sucumbíos

El desarrollo de los test micro-analíticos (pequeños volúmenes de procesos desarrolladores de color) para detección de quinonas, tanto el micro-ensayo de rodanina en amoniaco acuoso como la prueba con KI, no reportó evidencia sobre la presencia de para-quinonas o quinonas sustituidas en la secreción defensiva de esta población objeto de estudio. En este contexto, se aplicó un sencillo test basado en la reacción de FeCl_3 (5 mL, 2 % en agua) con 25 microlitros de la secreción defensiva en un tubo capilar. La mezcla reaccionante adquirió una coloración azul-violeta, indicando la presencia de fenoles. La solución etérea (5 mL) se hace pasar por una pipeta de Pasteur rellena con CaHPO_4 y 2% de AgNO_3 , de 10 cm de longitud x 0.5 cm de diámetro, utilizando como solvente una mezcla de n-hexano / acetato de etilo 85:15 v/v (50 mL). El análisis mediante cromatografía de placa delgada sobre placas de Silicagel-poliéster de 5 x 5 cm, de los eluatos obtenidos (60

mL) reveló la existencia de dos compuestos: Rf 0.35, y Rf 0.42, utilizando como eluyente n-hexano/acetato de etilo 50:50 v/v) y agente revelador desarrollador de color, vapores de ácido sulfúrico concentrado. El estudio mediante CG-MS (figura 9) reveló la existencia de 2 componentes con diferente masa molecular y proporción composicional.

El estudio FTIR permitió observar una banda ancha en $3\,357\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a vibración de valencia νOH y otra en la zona de los doblajes en el plano a $1\,244\text{ cm}^{-1}$ (δCO), ambas señales típicas de alcoholes y fenoles. Se apreciaron bandas de aromáticos ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$) en el intervalo de $3\,050$ a $3\,100\text{ cm}^{-1}$ y $1\,450$ a $1\,665\text{ cm}^{-1}$. La existencia de señales entre $2\,928$ y $2\,857\text{ cm}^{-1}$ y otra señal en $1\,103\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a vibraciones de valencia $\nu\text{Csp}^3\text{ H}$ y $\nu\text{C-O-C}$, respectivamente, sugieren fragmentos $-\text{OCH}_3$ unidos al núcleo aromático. La ausencia de señales en la zona de las vibraciones de valencia νCO ($1\,670$, carbonilo) descarta que existan quinonas como metabolitos mayoritarios en la secreción. El análisis RMN- ^1H de la secreción bruta presenta señales aromáticas dadas por un multiplete a $7,650$ y $6,300\text{ ppm}$ y dos singletes a $3,780$ y $4,020\text{ ppm}$ de fragmentos $-\text{OCH}_3$ que corrobora lo considerado vía FT-IR. La estructura propuesta para el componente mayoritario de la secreción defensiva del milípedo ecuatoriano *Rhinocricus sp.*, aislado a partir de individuos colectados en Itaya, Sucumbíos, derivada de los análisis de FTIR y (RMN- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$), se aprecia en la figura 10.

3. Caso de estudio Población de Cahuasqui, Provincia Imbabura

El desarrollo de los test micro-analíticos para detección de quinonas para la secreción defensiva eyectada por milípedos de la zona de colecta Cahuasqui, Imbabura no reportó evidencia sobre la presencia de para-quinonas o quinonas substituidas en la secreción defensiva de esta población objeto de estudio. Se aplicó el ensayo para detección de fenoles basado en la reacción de FeCl_3 (5 mL, 2 % en agua) con 25 microlitros de la secreción defensiva en un tubo capilar. La mezcla reaccionante adquirió una coloración azul-verdosa, indicando la presencia de fenoles con

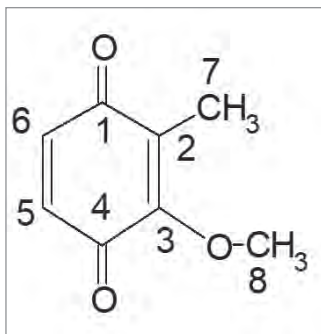


Figura 8. Derivado mayoritario aislado de la secreción defensiva de *Rhinocricus* sp: 2-metil-3-metoxi-para-benzoquinona.

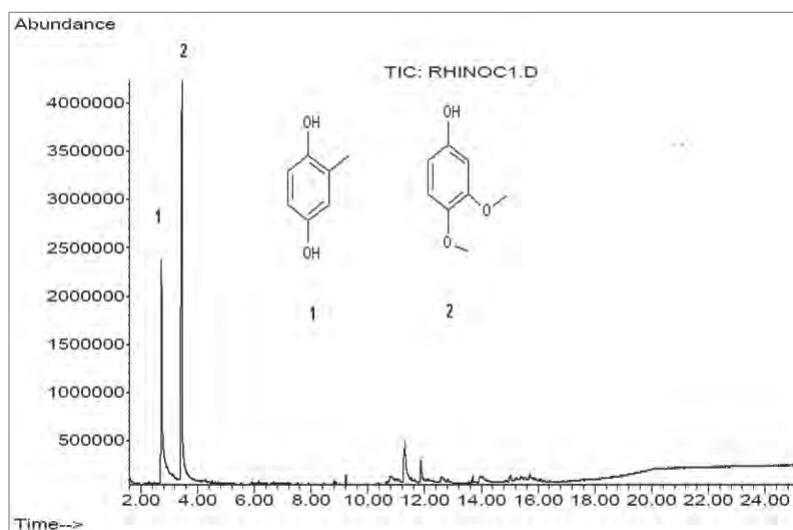


Figura 9. Perfil cromatográfico de las secreciones defensivas de milípedos *spirobólididos-rinocrícidos* *Rhinocricus* de la población perteneciente a Itaya, Sucumbíos. (autor*, 2016, UCE).

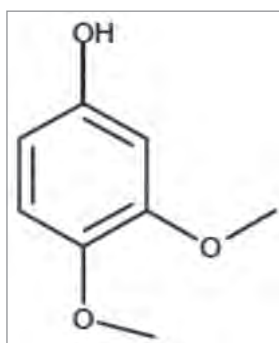


Figura 10. 3,4-dimetoxifenol, metabolito mayoritario en la secreción defensiva de los milípedos población Itaya, Sucumbíos.

substituyentes oxigenados potenciales. En este contexto, se decidió aplicar un microensayo (a la *gota-cromogénico-precipitado*) orientado a la detección de grupos funcionales tipo carbonilos (aldehídos y cetonas). Se aplicó el ensayo del reactivo de Tollens, un agente de oxidación suave, que al reaccionar con aldehídos se produce el correspondiente ácido carboxílico y los iones plata se reducen simultáneamente a plata metálica formando un espejo en la superficie interna del recipiente de reacción. La aparición de un tenue espejo de plata fue una prueba positiva para aldehído. La solución etérea (5 mL) se hace pasar por una pipeta de Pasteur rellena con CaHPO_4 de 10 cm de longitud x 0.5 cm de diámetro, utilizando como solvente una mezcla de n-hexano / acetato de etilo 85:15 v/v (50 mL). El análisis mediante cromatografía de placa delgada (Silicagel-poliéster de 5 x 5 cm), de los eluatos obtenidos (60 mL) reveló un único compuesto: R_f 0.45, utilizando como eluyente n-hexano/acetato de etilo (50:50v/v) y agente revelador desa-rrrollador de color, vapores de ácido sulfúrico concentrado. El estudio mediante CG-MS (figura 11), reveló la existencia de un componente con una concentración superior a 80%.

El estudio FTIR revela una banda centrada en 3400 cm^{-1} relacionada con enlaces intra-moleculares por puente de hidrógeno O-H y la presencia de grupos OH. El grupo carbonilo tipo aldehído muestra una banda espectral a $1690\text{-}1702\text{ cm}^{-1}$ debido al enlace C=O. En el intervalo entre 1600 y 1400 se observan vibraciones modales atribuidas a interacciones C-C correspondientes a anillos aromáticos, específicamente grupo fenilo. Entre 1260 y 1030 se detectan bandas de interacciones entre O-H y C-O del grupo hidroxilo con el anillo aromático. En este intervalo, la banda espectral en 1215 cm^{-1} se asigna a interacciones C-O del grupo OH (hidroxilo fenólico) enlazado a un anillo aromático. Las bandas 1268 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} se asignan a interacciones C-O arilo en grupos metoxilos enlazados a núcleos aromáticos. Entre 600 y 900 cm^{-1} , se observan bandas a 860 and 815 cm^{-1} asignables a vibraciones fuera del plano de enlace C-H. Las bandas espectrales descritas son indicativas de un patrón de sustitución en el anillo tipo 1,2,4 característico de la vainillina

(figura 12). El estudio FTIR permitió observar una banda ancha en $3\,357\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a vibración de valencia νOH y otra en la zona de los doblajes en el plano a $1\,244\text{ cm}^{-1}$ (δCO), ambas señales típicas de alcoholes y fenoles. Se apreciaron además, bandas características de aromáticos ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$) en el intervalo de $3\,050$ a $3\,100\text{ cm}^{-1}$ y $1\,450$ a $1\,665\text{ cm}^{-1}$. La existencia de señales entre $2\,928$ y $2\,857\text{ cm}^{-1}$ y otra señal en $1\,103\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a vibraciones de valencia $\nu\text{Csp}^3\text{-H}$ y $\nu\text{C-O-C}$, respectivamente, sugieren la potencial existencia de fragmentos moleculares $-\text{OCH}_3$ que pueden estar unidos al núcleo aromático. La ausencia de señales en la zona de las vibraciones de valencia νCO ($1\,670$, carbonilo) descarta la posibilidad de quinonas como metabolitos mayoritarios en la secreción. El análisis por RMN- ^1H de la secreción bruta presenta señales características aromáticas dada por un multiplete a $7,650$ y $6,300\text{ ppm}$ y dos singletes a $3,980$ y 10 ppm atribuibles a fragmentos $-\text{OCH}_3$ y CHO que corroboran lo considerado vía FT-IR. La estructura propuesta para el componente mayoritario de la secreción defensiva del milípedo ecuatoriano *Rhinocricus sp.*, aislado a partir de individuos colectados en Cahuasqui, Imbabura, derivada de FTIR y RMN ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) se observa en la figura 12.

Consideraciones generales

El análisis de la composición química de las secreciones defensivas de Milípedos facilita la generación de una data estructural para estudios de evolución química de metabolitos secundarios en zonas eco-geográficas de Ecuador; modelación de vías metabólicas básicas a escala regional, diseño de síntesis de derivados con potencial aplicación en diversas esferas de la actividad humana; incrementando el valor agregado (intelectual, patrimonial y tecnológico) de la biodiversidad como fuente eco-sostenible de metabolitos secundarios bioactivos, resultado de aplicar la químio-bioprospección a la biodiversidad (República de Ecuador), y facilitando la comprensión de la necesidad de su conservación sistémica y molecular.

Dada la no existencia de conocimiento estructural sobre composición química de las secreciones repugnatorias de

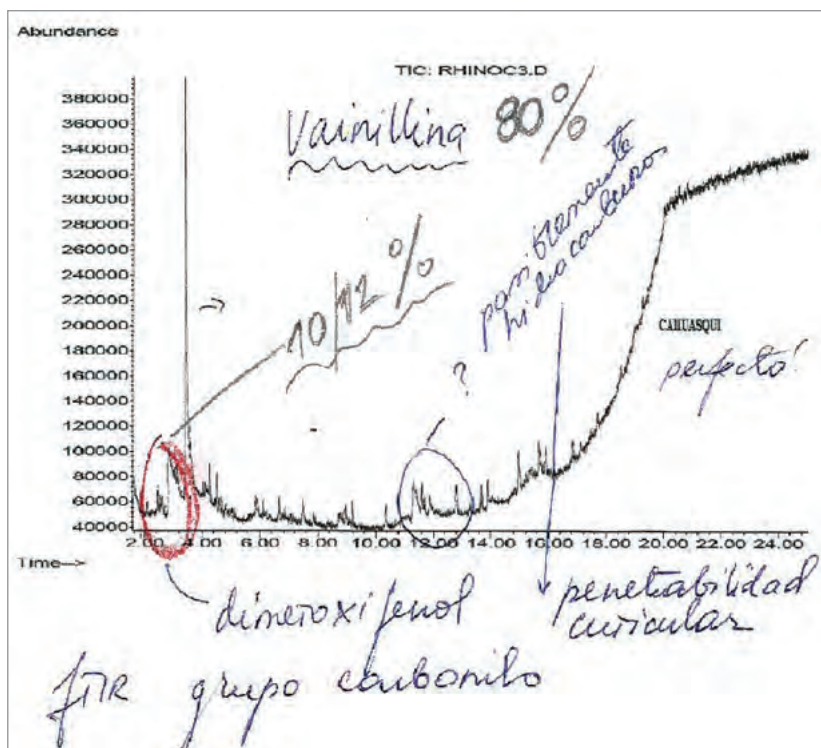


Figura 11. Perfil cromatográfico de las secreciones defensivas de milípedos *Rhinocricus* de la población Cahuasqui, Imbabura (autor*, 2016, UCE).

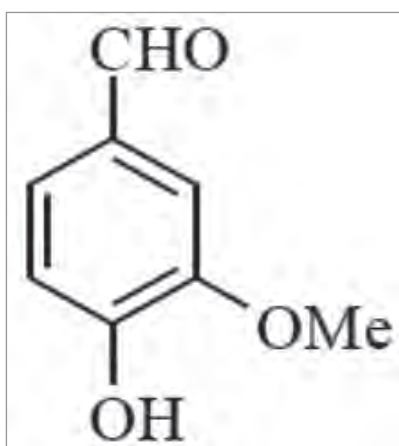


Figura 12. Estructura propuesta para componente mayoritario de secreción defensiva de Milípedos espirobólidos que habitan zona de Cahuasqui.

las diversas poblaciones geográficas de milípedos de Ecuador, que constituyen el componente biomásico fundamental de la fauna edáfica ecuatoriana, y su posibilidad de aplicación en la obtención de agentes microbiocidas de amplio espectro, se decidió estudiar, preliminarmente, estas secreciones en tres poblaciones de milípedos: *Palmar del Rio*, *Itaya* y *Cahuasqui*. En una aproximación preliminar intentando aplicar, *grosso modo*, el concepto de integrar, y poblar *estructuralmente*, el espacio químico de secreciones defensivas de milípedos endémicos de la familia Rhinocricidae, el criterio de selección de estas poblaciones geográficas se sustentó en los conceptos bio-geoquímicos fundamentales:

- Endemismo fitogeográfico con potencial singularidad estructural en la secreción defensiva de Milípedos.
- Carácter endémico de la especie descrita y poblaciones geográficamente diferenciadas (70-150 Km).
- Posibilidad de correlacionar morfología-metabolismo/metabolito secundario-patrones eco-geográficos, en la búsqueda de *quimiotipos específicos* o biomarcadores que facilitasen la clasificación sistemática de las especies o sub-especies de milípedos.
- Aplicabilidad de los metabolitos secundarios aislados y extraídos de las secreciones defensivas como NEE-NEF y como sistemas líderes de diseño para una bioquímica aplicada avanzada y su integración sistémica a estrategias de conservación.
- El estudio de las secreciones defensivas de cada población de Spirobólidos-Rinocricidos- *Rhinocricus* se orientó hacia la evaluación de los perfiles analíticos (GC-MS, RMN) y composicional con el objetivo de crear una base de datos estructural y valorar la existencia de *quimiotipos geográficos específicos*.

El estudio de las secreciones defensivas de estas tres poblaciones reveló la existencia de una notable variabilidad estructural entre

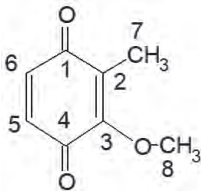
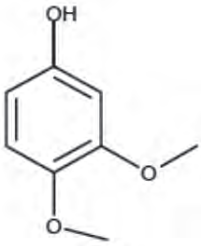
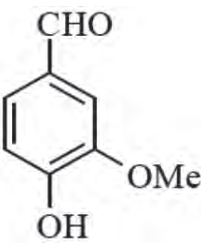
sus componentes totales y componentes mayoritarios. De manera general se observa que los componentes fundamentales de estas secreciones son quinonoides: derivados fenólicos, benzoquinonas, aldehídos y probablemente mezclas de hidrocarburos o alcanos de alto peso molecular (tabla 1).

El análisis (GC-MS, FTIR y RMN) de los componentes volátiles, presentes en las secreciones defensivas de milípedos ecuatorianos de la zona oriental, permitió identificar la presencia de 14 componentes y 3 compuestos mayoritarios (% del componente en la mezcla total, tabla 1), e identificar **3** *quimiotipos* en las 3 poblaciones eco-geográficamente diferenciadas.

Resulta necesario resaltar que de los 14 compuestos identificados, 2 no son reportados para la familia Spirobolida en condiciones continentales y pueden constituir un primer reporte para poblaciones amazónicas. Solamente son reportados quinonas para esta familia (Spirobolida) y a su vez son componentes mayoritarios en las secreciones defensivas. Esto es atribuible a diferencias que existen dentro de una misma población debido a cambios relacionados con el entorno (presencia de depredadores y variaciones en las fuentes de alimentación) que generan variaciones en las proporciones de los componentes mayoritarios. El metabolito secundario *3,4-dimetoxifenol* no se encuentra reportado para el orden Spirobolida, familia Rhinocricidae y género *Rhinocricus*, que habita en la región amazónica de Ecuador (o a escala de Amazonia, en general) en los cuales no se reportan compuestos de naturaleza fenólica polihidroxilados O-metilados, típicos en las secreciones defensivas de los grupos taxonómicos (familias) Callipodida y Chordemoidea donde si existe los compuestos de esta naturaleza como componentes mayoritarios. Debe destacarse su distribución global como nueva unidad estructural-NUE en las secreciones de las 3 poblaciones de estudio de la región oriental y nor-oriental del Ecuador.

Estos reportes de derivados fenólicos como NUE permiten considerar una diferenciación químico-evolutiva o químico-ecológica debido al aislamiento por condiciones geográficas,

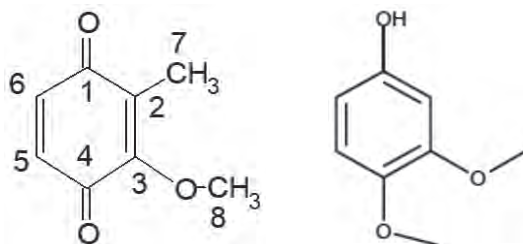
Tabla 1. Componentes mayoritarios de las secreciones defensivas y porcentaje.

Población (SPG)	Total de compuestos detectados	Componente mayoritario	% del componente en la mezcla total
Palmar del Rio Latitud 0°18'2,37" S; Longitud 76°56'0,91" O	8	1 benzoquinona 	51
Itaya Latitud: 0°22'59,11"S; Longitud: 76°32'4,09"O	2	1 	66
Cahuasqui Latitud 0°31'2,34" N; Longitud 78°51,3'55,16" O	4	1 	80

modificaciones de fuentes alimentarias, condiciones edafoclimáticas, estructuras de las biotas (fauna-flora) y la presencia de determinados depredadores o competidores locales. Estos factores a su vez modulan, fenotípica y genotípicamente, las variaciones composicionales y la naturaleza química de las secreciones de estos milípedos, orientadas hacia el incremento de la efectividad de las mismas por la presencia de fenol, y un aumento de los índices de agresividad y/o repelencia, en comparación con composiciones repugnatorias basadas en estructuras de tipo quinona. En este contexto, debe considerarse,

además, la posibilidad de dos mecanismos diferentes de acción defensiva para estos metabolitos:

- Vía generación de derivados mediante reacción con los componentes amino de las membranas de la epicutícula de los depredadores invertebrados y
- Acción cáustica-oxidante sobre mucosas y tracto respiratorio.



Un resultado inesperado, por su potencial significación ecológica y evolutiva, fue el descubrimiento de *4-hidroxi-5-metoxibenzaldehído (vainillina)* en el quimiotipo 3 (Población de Cahuasqui, con un 12% de dimetoxifenol). Este compuesto no ha sido descrito previamente en las secreciones repugnatorias, siendo este el primer reporte para la fauna edáfica de milípedos (endémicos) en la Amazonia ecuatoriana, para la familia y género analizado. La existencia de este metabolito secundario en las secreciones defensivas de especies de espirobólidos y *Rhinocricus* del oriente ecuatoriano está relacionada, probablemente, a causas alimentarias. Los milípedos, detritívoros por excelencia, son capaces de secuestrar metabolitos secundarios pertenecientes a especies botánicas, que en nuestro caso serían orquídeas género *Vanilla sp.*, que habitan en la zona de colecta. Las orquídeas y sus semillas al caer al suelo forman parte del detrito que es consumido por estos milípedos.

En nuestro estudio se ha observado una gran variabilidad y heterogeneidad en las sustancias que constituyen las secreciones defensivas de los milípedos en las poblaciones en estudio (variación intra-específica) asociadas, tanto a nivel inter-específico como

intra-específico, con variaciones de edad, fase de desarrollo biológico, sexo, sub-especies, estación del año, población o la evolución del mecanismo de secreción, además de la dieta de los individuos, lo cual adiciona aún mayor variabilidad a la química de los metabolitos secundarios de las secreciones repugnatorias. También, dentro de una misma familia o clase si existe algún grado de aislamiento geográfico, se favorecen variaciones en la composición química de sus secreciones con respecto a los componentes mayoritarios debido a que los depredadores (invertebrados y vertebrados) no son los mismos, ni su presión ecológica, en dos zonas geográficamente distantes. Las condiciones eco-geográficas en la Amazonia ecuatoriana favorecen procesos evolutivos de rápida diferenciación a nivel molecular (*variaciones concentracionales de componentes mayoritarios y sistemas enzimáticos oxidantes a nivel de hemolinfa*) que transcurren en cortos períodos de tiempo y en pequeños espacios eco-geográficos alcanzando gran heterogeneidad molecular.

El estudio de los patrones moleculares de distribución geográfica y variaciones de las composiciones en las secreciones repugnatorias de diplópodos permite valorar tendencias de la micro-evolución química intra-especie y sus dependencias vs. parámetros ecológicos, bióticos y edafo-climáticos. El *mapping* (mapeo) de los resultados alcanzados revela una significativa heterogeneidad geográfica de los quimiotipos observados en las secreciones defensivas de milípedos en las zonas oriental y nor-oriental de Ecuador (Amazonia e Imbabura) y los componentes mayoritarios identificados y cuantificados para cada población de espirobólidos y gen *Rhinocricus*. Plantear una hipótesis sobre la diversidad química (molecular) que se observa en las secreciones defensivas y sus probables causas en un área geográfica según las condiciones de estudio, considerando las evidencias experimentales (GC-MS, RMN, FT-IR) y ausencia de fuentes informativas relevantes, implica un reto conceptual-metodológico serio y un elegante desafío biológico, químico y ecológico.

La data sobre mapeo de las secreciones defensivas de milípedos de espirobólidos y gen. *Rhinocricus* se muestra en la figura 13. Puede observarse la variación en la distribución eco-geográfica de las secreciones defensivas, sus componentes mayoritarios y la existencia de *quimiotipos geográficos específicos*.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, las posibles causas de estas variaciones intra-específicas observadas en la composición de las secreciones defensivas (figura 13) son:

- Micro-evolución molecular a nivel de citocromo oxidasa (P-450 mitocondrial) dado por la generación de benzoquinonas y derivados fenólicos.
- Metilación de grupos hidroxilos a través de un incremento diferencial de la actividad de metil-transferasas generado por presiones eco-geográficas y micro-evolución selectiva.
- Las variaciones composicionales en los quimiotipos observados en las poblaciones de espirobólidos *Rhinocricus* sp. de la

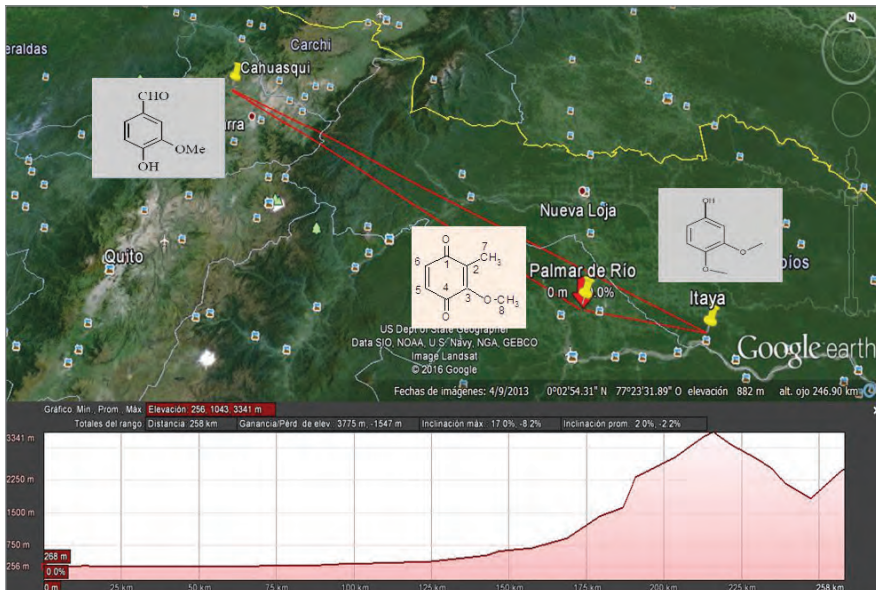


Figura 13. Mapeo geográfico-molecular de los componentes mayoritarios de las secreciones defensivas de Milípedos espirobólidos del oriente y nor-oriental ecuatoriano (elaborado por autor*, 2016, UCE).

zona oriental y nor-oriental del Ecuador, en las condiciones de estudio, pueden estar relacionadas a una constante pre-distribución de poblaciones (fauna edáfica milípedos) desde la región amazónica central. Esto permite considerar una marcada micro evolución específicamente orientada hacia la composición fenólica de estas poblaciones que corrobora la *quimiotipia geográfica* (quimiotipos globales y quimiotipos de macro-evolución) hacia el Caribe y América del Norte.

- Incremento de la presión de depredadores en zonas antropizadas y no antropizadas o de poco impacto.
- Variaciones en las fuentes alimentarias (composición del estrato de humus, dieta fundamental de estos detritívoros) que ha generado un incremento de la capacidad de secuestro de metabolitos secundarios de origen botánico (vainillina).
- ¿Por qué específicamente estas variaciones estructurales? Estas mezclas policomponentes, termodinámicamente, generan mezclas sinérgicas de bajo punto de fusión, a temperatura ambiente, que permita su eyección en estado líquido y gran coeficiente de fugacidad para prolongar tiempo de acción repelente, así como un incremento de la penetrabilidad a través de la epicutícula y exoesqueleto de depredadores y su efecto tóxico a bajas concentraciones.

Conclusiones

En las actuales condiciones si es posible desarrollar la quimio-bioprospección de la diversidad biológica de Ecuador como fuente de metabolitos secundarios con *ava*, orientando el proceso, a escala de laboratorio y en dependencia de las capacidades instrumentales analíticas, hacia el aislamiento e identificación de componentes mayoritarios de secreciones defensivas de invertebrados terrestres. La megafauna edáfica de Diplópodos del Ecuador, específicamente, sus secreciones defensivas, se analiza por primera vez (CCD, FTIR, GC-MS y RMN) valorándose su significación como precursora de nuevas entidades moleculares directamente relacionadas con procesos de micro-evolución química. Esta estrategia puede aplicarse en condiciones eco-geográficas típicas para la amazonia ecuatoriana y poblaciones autóctonas de espirobólidos, así como para otros grupos de invertebrados terrestres

Se evidenció la capacidad de biosíntesis y eyección de secreciones repugnatorias-defensivas con marcado olor *fenólico* y coloración café-oscuro y amarillento-parduzco, en poblaciones geográficas de milípedos (Diplópodos) que habitan en las provincias de Sucumbíos, Francisco de Orellana e Imbabura. Se extrajeron y caracterizaron, composicionalmente, las secreciones defensivas en cantidades que oscilaron entre 600-660 microlitros para especímenes espirobólidos-rinocrícidos de la zona oriental (Amazonia) con una biomasa superior a 20 gramos por individuo y entre 50-70 microlitros para rinocrícidos de la zona nor-oriental (Imbabura) con una biomasa inferior a 5 gramos por individuo

Mediante técnicas analíticas de FTIR, RMN y GC-MS se identificaron los metabolitos secundarios y se aislaron los componentes mayoritarios de las secreciones defensivas de milípedos espirobólidos-rinocrícidos que habitan en las zonas eco-geográficas de estudio. Se identificaron 14 metabolitos, 3 componentes mayoritarios y 3 quimio-tipos potenciales. Para

la población de espirobólidos-rinocrícidos de Palmar del Rio se estableció como componente mayoritario una benzoquinona substituida con más de 50 % de presencia molecular en la secreción defensiva. Para la población de Itaya se identificó un dimetoxifenol con más de 65 % y para la población de Cahuasqui un aldehído fenólico con más de 80 % respectivamente.

Se detalló la existencia de variaciones composicionales eco-geográficas y de *potenciales quimiotipos* en las secreciones defensivas de 3 poblaciones de espirobólidos-rinocrícidos de la amazonia ecuatoriana, incluyendo la descripción de 2 metabolitos no descritos previamente como componentes de secreciones defensivas de espirobólidos amazónicos: *2,4-dimetoxi-fenol* y *vainillina*.

El *mapping* (mapeo molecular de metabolitos secundarios en un espacio geográfico específico) de las composiciones mayoritarias para cada secreción defensiva de espirobólidos-rinocrícidos reveló la existencia de una singular heterogeneidad composicional (5-7 componentes de naturaleza aromática, benzoquinónica e hidrocarburos con patrones específicos de sustitución) en la zona oriental y nor-oriental del Ecuador.

Se elaboró una base de datos estructural-cromatográfica que contiene los componentes de las secreciones defensivas y sus vías de fragmentación (GC-MS) para poblaciones geográficas de Milípedos espirobólidos-rinocrícidos que habitan en la amazonia ecuatoriana, así como un protocolo sencillo para la determinación de poli-composición en condiciones de laboratorio vía cromatografía de capa delgada.

Recomendaciones

El estudio, considerando la data presentada y la necesidad de implementar estrategias de conservación aplicada de la biodiversidad desde la *molecularidad* y la prospección química asociada, sugiere algunas recomendaciones metodológicas generales. Debe considerarse la necesidad de desarrollar estudios de “*drive*” genético que permitan correlacionar variaciones composicionales de secreciones defensivas con sistemas enzimáticos a nivel mitocondrial y hemolinfa y sus variaciones geográficas. Debe valorarse, mediante estudios de PCR en tiempo real, la posibilidad de determinar la presencia de *fenoloxidasas* en la hemolinfa de estos milípedos espirobólidos-rinocricidos amazónicos como marcador biomolecular para potenciar estudios de taxonomía y conservación estratégica de la biodiversidad desde la molecularidad.

Deben optimizarse los diseños experimentales de selección y estudio de nuevas zonas de colectas eco-geográficas con patrones estructurales diferentes en suelo, en composición botánica, y en parámetros químico-físicos y geológicos: zona costa, zona andina continental-páramos, región amazónica y región insular. Es necesario implementar y desarrollar protocolos para evaluación de la actividad biológica de las secreciones defensivas, específicamente: acción microbicida, insecticida, molusquicida y larvicida, orientando la evaluación hacia estudios de correlación estructura-actividad biológica-proceso de obtención de derivado nuevas estructuras farmacológicamente activas con alto valor agregado. Debe valorarse la posibilidad de Mapeo Molecular (*mapping*) de la composición química de secreciones defensivas (sus componentes mayoritarios) de poblaciones de milípedos ecuatorianos y estudios de correlación estructuras-diferenciación poblacional-tendencia de evolución y sistemas enzimáticos singulares para cada población.

Didáctica y metodológicamente es necesario extender los

estudios de quimio-bioprospección (ecología química aplicada) a otros artrópodos (invertebrados) terrestres de la fauna edáfica endémica ecuatoriana (amazonia ecuatoriana), que permita el aislamiento y extracción de nuevas entidades estructurales y nuevas estructuras farmacológicamente activas (específicamente Arácnidos-Opiliónidos e Insecta-Crisomélida y Coleóptera). Se impone, desde una perspectiva estratégica de quimio-bioprospección, promover una estrategia de conservación fundamentada en la singularidad composicional y molecular de las secreciones defensivas de esta especie autóctona de invertebrado edáfico y su significación como fuente sostenible de nuevas entidades moleculares.

Consideraciones Finales

Los autores declaran que no existe conflictos de intereses.

Uno de los autores, JTM*, agradece el apoyo logístico y financiero del Programa Prometeo durante 2015-2016, SENESCYT, y al Centro de Biología, UCE, Ecuador.

Referencias

- Ando, T. y Yamakawaa, R. (julio, 2015). Chiral methyl-branched pheromones. *Natural Product Report*, 32(7), 1007-1041. Recuperado de <https://goo.gl/bnStBK>
- Arab, A., Zacarin, G., Fontanetti, C., Camargo-Mathias, M., Dos Santos, M. y Cabrera, A. (agosto, 2003). Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, 18(2), 79-82. Recuperado de <https://goo.gl/G8SFWH>
- Barnes, R. (1982). *Invertebrate Zoology*. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International Editors.
- Capinera, J. (ed.). (2008). *Encyclopedia of Entomology* (2ª ed.). New York, USA: Springer Netherlands.
- Cupul-Magaña, F., Valencia-Vargas, M., Bueno, J. y Shelley, R. (diciembre, 2014). Notas sobre los miriápodos (Arthropoda: Myriapoda) de Jalisco, México: Distribución y nuevos registros. *Dugesiana*, 21(2), 83-97. Recuperado de <https://goo.gl/m3uo6p>
- De Bernardi M, Mellerio, G., Vidari, G., Vita, P., Demange, J. y Pavan, M. (1982). Quinones in the defensive secretions of African millipedes. *Naturwissenschaften*, 69(12), 601-602. Recuperado de <https://goo.gl/cmNqAB>
- Demange, J. (1993). Les armes chimiques des milli-pattes. *Millepattia* 2, 29-61.
- Demi, R. y Huth, A. (febrero, 2000). Benzoquinones and Hydroquinones in Defensive Secretions of Tropical Millipedes. *Naturwissenschaften*, 87(2), 80-82.
- Dossey, A. (enero, 2010). Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery. *Natural Product Reports*, 27(12), 1737-1757. doi: [10.1039/c005319h](https://doi.org/10.1039/c005319h)
- Eisner, T., Alsop, D. y Meinwald, J. (1978) (vol. 48). Secretions of opilionids, whip scorpions, and pseudoscorpions. En S. Bettini (ed.), *Arthropod Venoms, Handbook of Experimental Pharmacology / Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, (pp. 87-99). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-45501-8_5
- Eisner, T., Attygalle, A., Conner, W., Eisner, M., MacLeod, E. y Meinwald, J. (abril, 1996). Chemical egg defense in a green lacewing (*Ceraeochrysa smithi*). *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 93(8), 3280-3283. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3280>
- Eisner, T., Eisner, M., Attygalle, A., Deyrup, M. y Meinwald, J. (3 de febrero de 1998). Rendering the inedible edible: circumvention of a millipede's chemical defense by a predaceous beetle larva (Phengodidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1108-1113. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1108>
- Eisner, T., Eisner, M. y Siegler, M. (2005). *Secret weapons: defenses of insects, spiders, scorpions, and other many-legged creatures*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press.
- Eisner, T., Rossini, C., González, A. y Eisner, M. (2004). Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *The Journal of Experimental Biology*, 207, 1313-1321. Recuperado de <http://jeb.biologists.org/content/207/8/1313>
- Golovatch, S. y Kime, D. (2009). Millipede (Diplopoda) distributions: a review. *Soil Organisms*, 81(3), 565-597. Recuperado de <https://googl/3JHMnm>
- Hoffman, R., Golovatch, S., Adis, J. y De Morais, J. (enero, 1996). Practical keys to the orders and families of millipedes of the Neotropical region (Myriapoda: Diplopoda). *Amazonia*, 14, 1-35.
- Hopkin, S. y Read, H. (1992). *The Biology of Millipedes*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Huth, A. (enero, 2000). Defensive secretion of millipedes: more than just a product of melting point decrease? *Fragmenta Faunistica (Warsawa)*. Suppl. 42, 24-27.
- Kuwahara Y., Omura H. y Tanabe T. (2002). 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretion. *Naturwissenschaften*, 89, 308-10.
- Lewis, J. (2008). *The Biology of Centipedes*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Marek, P., Shear, W. y Bond, J. (noviembre, 2012). A redescription of the leggiest animal, the millipede *Illacme plenipes*, with notes on its natural history and biogeography (Diplopoda, Siphonophorida, Siphonorhinidae). *ZooKeys*, 241(241), 77-112. doi: 10.3897/zookeys.241.3831
- Mesa, J., Tacoronte, J., Montes, R., Tobellas, J. y Garrido, R. (2009). Primer reporte de 3,4-dimetoxifenol, en secreciones defensivas de milípedos endémicos cubanos (*Spirobolida*, *Rhinocricidae*, *Rhinocricus*). Caso de estudio *Rhinocricus duvernoyi* Karch 1881, población de La

- Palma. *Revista CNIC Ciencias Químicas*, 40(1), 26-29. Recuperado de <https://goo.gl/ts4WP3>
- Minelli, A. y Golovatch, S. (2001). Myriapods. En A. Levin (ed.), *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 291-303). San Diego, USA: Academic Press.
- Shelley, R. y Golovatch, S. (18 de marzo de 2011). Atlas of myriapod biogeography. I. Indigenous Ordinal and Supra-Ordinal Distributions in the Diplopoda: Perspectives on Taxon Origins and Ages, and a Hypothesis on the Origin and Early Evolution of the Class. *Insecta Mundi*, 158, 1-134. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/14519666.pdf>
- Sierwald, P. y Bond, J. (7 de enero de 2007). Current Status of the Myriapod Class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic Diversity and Phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 52, 401-420. Recuperado de <https://goo.gl/ANb71q>
- Valderrama, X., Robinson, J., Attygale, A. y Eisner, T. (2000). Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insect? *Journal of Chemical Ecology*, 26(12), 2781-2790. Recuperado de <https://goo.gl/zFt3At>
- Williams, L., Singh, P. y Caleb-Williams, L. (abril, 1997). Biology and Biological Action of the Defensive Secretions from a Jamaican Millipede. *Naturwissenschaften*, 84(4), 143-144.
- Wood, W., Hanke, F., Kubo, I., Carrol, J. y Crews, P. (abril, 2000). Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of millipede *Buzonium crassipes*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(4), 305-312. doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00068-X)
- Zhang, Z. (agosto, 2013). Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. En Z. Zhang (ed.). *Animal Biodiversity: An outline of higher -level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013)* (pp. 17-26). Recuperado de <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.3>

Código QR del capítulo

