



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE LA TESIS

Estudio fitoquímico y de actividad biológica de  
*Omphalea oleifera* (Hemsl) (Euphorbiaceae) frente a  
*Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

JOSÉ DE JESÚS REGUERA SERRANO

TUTORA

Dra. PATRICIA GUEVARA FEFER

2008



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombres Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Numero de cuenta	1.Datos del alumno Reguera Serrano José de Jesús 57 50 56 52 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 096002483
2.Datos del tutor Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	2.Datos del tutor Dra Patricia Guevara Fefer
3.Datos del sinodal 1 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	3.Datos del sinodal 1 Dra Susana Valencia Ávalos
4.Datos del sinodal 2 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	4.Datos del sinodal 2 Dra Josefina Herrera Santoyo
5.Datos del sinodal 3 Grado Nombres Apellido paterno Apellido materno	5.Datos del sinodal 3 M en C Delfino Álvaro Campos Villanueva
6.Datos del sinodal 4 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno	6.Datos del sinodal 4 M en C Beatriz Zúñiga Ruiz

## **Agradecimientos**

### **Universidad Nacional Autónoma de México**

Por arroparme entre sus filas durante los últimos 13 años de mi vida, brindándome la oportunidad de superarme como persona.

A todos los profesores que durante mi formación académica aportaron algo a mi persona.

Por dirigir el presente trabajo y guiarme a lo largo de mi formación profesional.

**Dra. Patricia Guevara Fefer**

Por el apoyo académico, así como los valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

**Dra. Josefina Herrera Santoyo**

Por los valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

**Dra. Susana Valencia Ávalos**

Por el apoyo técnico brindado para la realización de los ensayos biológicos en el taller de química del edificio de docencia Tlahuizcalpan, así como los valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

**M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz**

Por su valiosa colaboración en la localización y recolecta del material vegetal, así como los valiosos comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

**M. en C. Álvaro Campos Villanueva**

Por el material biológico proporcionado por el Laboratorio de Control Biológico, Centro de Investigaciones en Biotecnología, UAEM para realizar los ensayos biológicos.

**M. en C. Laura Patricia Lina García**

Por la comunicación académica que enriqueció el presente trabajo

**M. en C. Silvia Espinosa Matías**

**Es común que los padres se culpen por los errores de sus hijos,  
en esta ocasión deseo que mis padres se culpen por mis  
aciertos, por tal motivo quiero que se culpen por  
la titulación de la carrera de biología  
de su hijo Pepe**

**Quiero agradecer sinceramente a mis Padres:**

**Por arriesgarse a tener un hijo como yo, espero nunca decepcionarlos por tal decisión**

**Por intentar dar una respuesta a las miles de preguntas de un niño inquieto**

**Por apoyar de manera incondicional todas mis decisiones**

**A mis hermanos por la influencia que fueron  
para que sea la persona que soy**

**A mi Familia que casi no veo, pero que no olvido**

**A mis amigos por los caminos que hemos recorrido y los que nos esperan  
Los Cuatro Fantásticos, El Pueblo, La Banda Perversa,  
La Banda de Biología y la Banda de Universum**

**Paty**, no se si con palabras pueda expresar la gratitud que tengo hacia ti por ser mi amiga antes que mi asesora, por los consejos que me has dado, por tu tiempo que has compartido conmigo, por estar ahí en los momentos en que necesitaba de ti y por tu ausencia en aquellos momentos en que yo debía encontrar solo las respuestas. Gracias por las risas pero sobre todo gracias por los regaños (que siempre dejan algo positivo).

**Josefina**, con tu carácter jovial me has enseñado muchas cosas de manera estricta pero calida, nunca faltaba una sincera sonrisa de tu parte después de evidenciar los errores que había cometido. Me has mostrado que la única forma de descubrir de lo que soy capaz es sacudiéndome el miedo e intentarlo, del mismo modo que al Sr. Samsa se lo enseñó una metamorfosis, pero de manera menos fantástica y mas personal.

**Bety**, cuando nos conocimos te encontrabas en las circunstancias en las que hoy me encuentro yo, de algún mudo recibí tu ayuda en retribución a la ayuda que algún día yo te brinde. Gracias por contar con tu amistad desde el principio hasta el final.

A los compañeros del laboratorio de Fitoquímica, a todos los que estuvieron ahí durante los años que he pasado en el laboratorio, gracias por los momentos en que supieron escuchar y en los que supieron hablar pero sobre todo por los momentos en los que supimos reír juntos. Gracias por la amistad de todos ustedes.

*Mi cabeza es un laberinto oscuro. A veces hay como relámpagos que iluminan algunos corredores. Nunca termino de entender por qué hago ciertas cosas.*

Ernesto Sabato. El túnel

*En el cosmos,  
solitaria en su órbita  
la manzana rueda en el infinito.  
Mordida por la nada  
deja ver su consistencia,  
pero nunca la semilla  
de su origen.*

Patricia Reguera.

# Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>2</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>I Área de estudio.....</b>	<b>16</b>
<b>II Recolecta de material.....</b>	<b>16</b>
<b>III Preparación del material.....</b>	<b>16</b>
<b>IV Extracciones alcaloides.....</b>	<b>17</b>
<b>V extracción de flavonoides.....</b>	<b>18</b>
<b>VI Determinación del porcentaje de lignina y ácidos fenólicos.....</b>	<b>18</b>
<b>VII Análisis de los Extractos.....</b>	<b>19</b>
<b>VIII Ensayos biológicos con <i>Spodoptera. Frugiperda</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>53</b>



## Introducción

Las regiones tropicales del planeta son el ecosistema que concentra la mayor parte de la biodiversidad del planeta, previenen la erosión de los suelos, conservan recursos genéticos y proveen principios activos útiles al hombre (Laurance, 1999). Se estima que las selvas tropicales ocupan cerca de 19% del territorio nacional (SARH, 1994)

México, posee la zona geográfica más al norte de clima tropical en toda América (Dirzo, 1997), en este clima es posible encontrar a una familia botánica muy interesante desde el punto de vista químico por el tipo de compuestos que poseen, la familia Euphorbeaceae (Gilbert, 1994). Dentro de la familia encontramos al género *Omphalea* que cuenta con un representante en nuestro país, *Omphalea oleifera*. Esta especie ha sido objeto de diversos estudios de carácter ecológico como los realizados por Iriarte (1987), Popma y Bongers (1988, 1991), Dirzo (1990), Guevara (1994), Garcia-Guzman (2004) Sanchez coronado (2007), sin embargo, sólo encontramos uno en el campo de la fitoquímica realizado por Del Amo y colaboradores en 1985.

El género *Omphalea* esté integrado por 18 especies de afinidad tropical distribuidas principalmente en las antillas e incluye árboles, arbolillos y lianas. En México el género está representado por *Omphalea oleifera* (Hemsl) (Euphorbiaceae) que crece en la selva alta perennifolia (Miranda y Hernández, 1963) de los estados de Oaxaca y Veracruz. *O. oleifera* es un árbol de 25 a 30 metros de alto que forma parte del dosel y subdosel de la selva (Dirzo 1987; Dirzo y Mota Bravo, 1997).

En la selva alta perennifolia de la estación biológica de Los Tuxtlas Veracruz, *O. oleifera* es defoliada gradualmente por el herbívoro especialista *Urania fulgens* (Lepidoptera Uraniidae) presentando un caso poco frecuente de defoliaciones masivas (Dirzo y Mota-Bravo, 1997). Lo anterior ofrece la posibilidad de estudiar esta especie en el ámbito de la búsqueda de compuestos químicos que pueden estar participando en la disuasión de la alimentación frente a insectos diferentes de *Urania*.

## Antecedentes

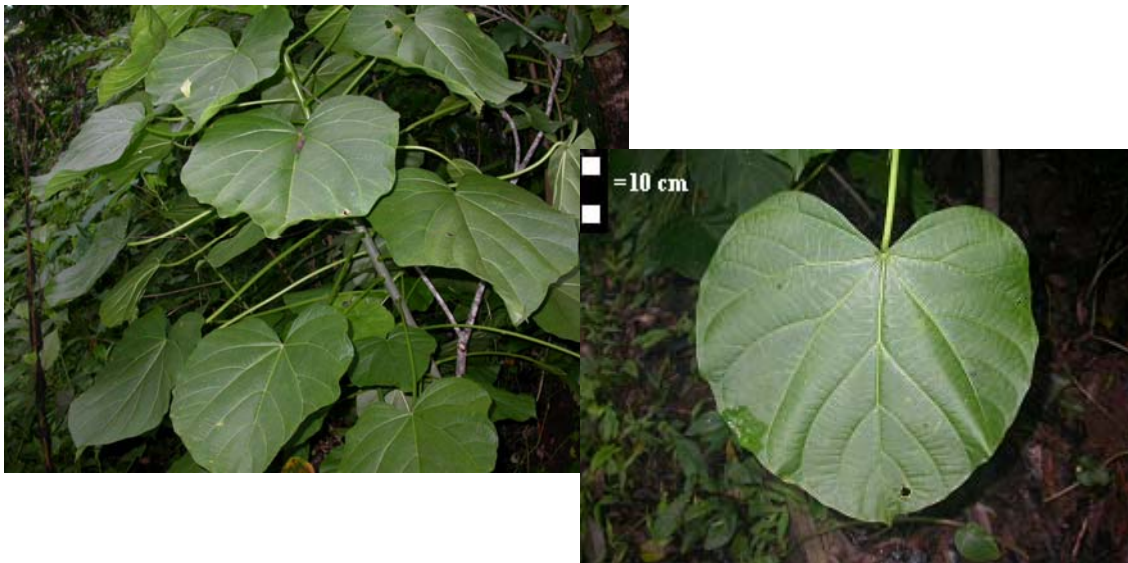
Las plantas desarrollan diferentes mecanismos de respuesta frente a las condiciones adversas en las que se encuentran sometidas, estas son modificaciones morfológicas como el engrosamiento de la pared celular, las espinas, púas o pelos irritantes (Anaya y Col., 2001 y Harborne, 1985), así como los mecanismos que implican la producción de metabolitos secundarios, que poseen importancia ecológica ya que algunos funcionan como sustancias alelopáticas, repelentes de insectos o insecticidas (Azcon, 1993). Entre estos compuestos secundarios se encuentran entre otros los alcaloides, los terpenos y los flavonoides (Granados y López, 1996)

Es frecuente observar que bajo condiciones adversas para la mayoría de las plantas, algunas desarrollan mecanismos para soportar estos cambios drásticos y sobrevivir en ambientes extremos. Entre estos mecanismos que les permiten soportar condiciones desfavorables, las plantas presentan cierta resistencia inherente frente a los herbívoros, estos van desde cambios fenológicos (cambios en los tiempos de floración, maduración de frutos y producción de semillas) hasta la síntesis de complejas moléculas orgánicas. Entre ambas estrategias existen una amplia serie de características morfológicas y químicas de la planta que afectan el comportamiento y los procesos metabólicos del herbívoro al utilizar a la planta como huésped (Lopez, 2005)

Desde el punto de vista del aprovechamiento práctico de la resistencia de las plantas a los insectos se considera que el mayor interés para el hombre existe en torno a características que evitan que el insecto se acerque o consuma a la planta (Maxell, y Col., 1984).

Las defoliaciones en de las que es objeto *O. oleifera* cumplen una temporalidad regida por la migración del lepidóptero responsable, que es su consumidor especialista (Dirzo, 1997). La dependencia alimenticia que presenta *U. fulgens* por especies de *Omphalea* no es un caso aislado, alrededor del mundo es posible encontrar miembros de la familia Uraniidae con dependencia alimenticia hacia ciertas especies de la familia Euporbiaceae (Lee y Smith, 1991).

*O. oleifera* es un árbol de subdosel con alturas máximas de 30 metros, con una distribución agregada. Posee hojas alternas, con verticilos densos en las puntas. Produce un látex transparente tras recibir daño en el pecíolo o la corteza. Las hojas son grandes una vez que completan su desarrollo (500 cm<sup>2</sup>) **Figura 1**, presentan glándulas en el envés que producen un néctar rico en aminoácidos y azúcares, estas glándulas operan como nectarios y son visitados por algunas especies de hormigas (Dirzo, 1997)

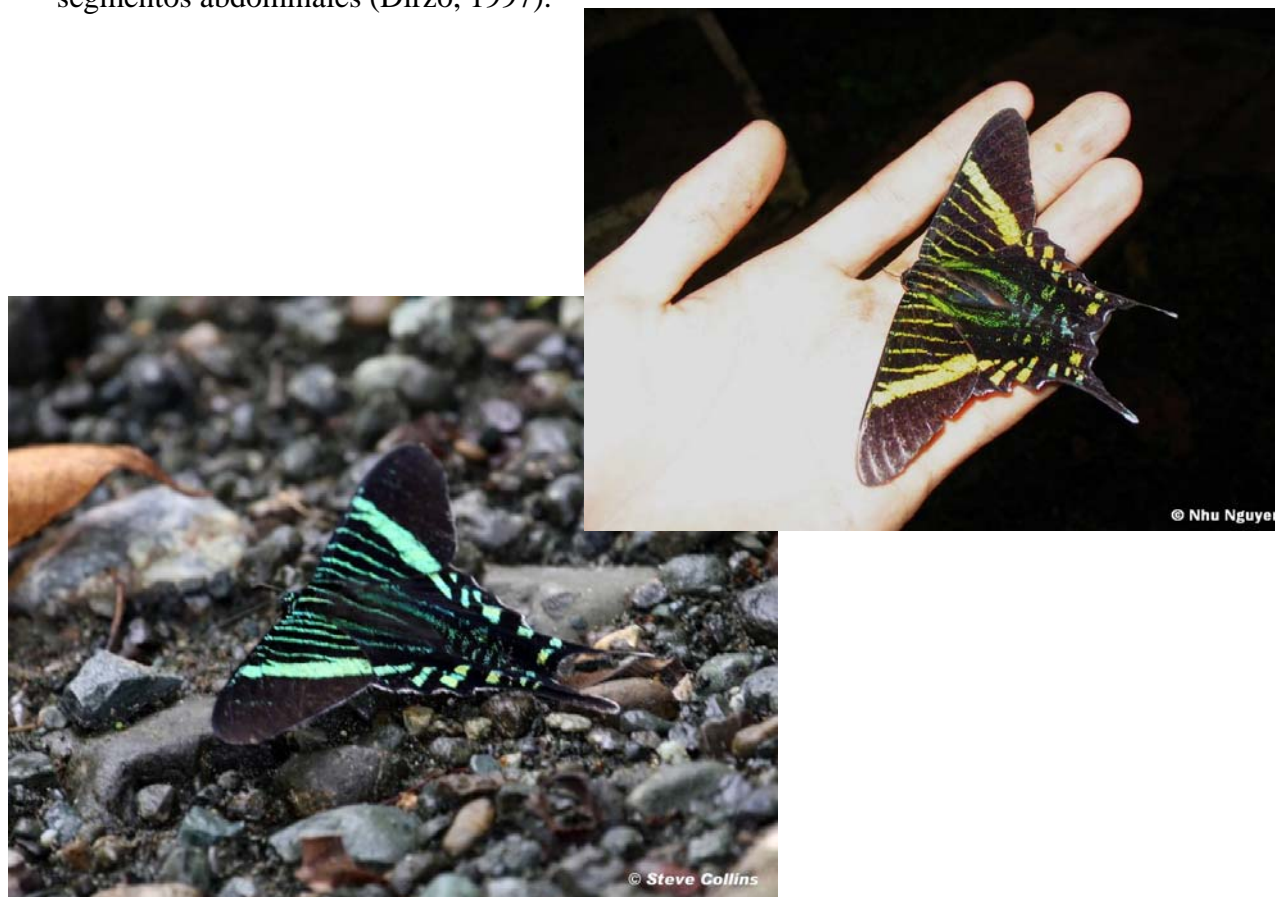


**Figura 1.** Hojas de *Omphalea oleifera*, en campo donde es posible apreciar el tamaño de la hoja.

La química de *O. oleifera* es poco conocida, sin embargo, estudios previos en *Omphalea diandra* indican la presencia de un tipo muy particular de alcaloides inhibidores de la glicosidasa (Kite, 1997, 1991). Este tipo de alcaloides han sido detectados en la especie encontrada en Panamá (*O. diandra*), en cambio para la especie mexicana (*O. oleifera*) los estudios respecto a su química son pocos (Dirzo, 1997).

*Urania fulgens*, es un lepidóptero de la familia Uraniidae, sus alas son de color negro con bandas de color verde iridiscente, además cuenta con prolongaciones blancas en las alas posteriores **Figura 2**. Como larvas poseen una cabeza de color negro que se torna roja al tercer estadio, las caracteriza un patrón de rayas verdes o blancas combinadas con rayas

negras, se observan pelos en el segundo y tercer segmento del tórax así como en los segmentos abdominales (Dirzo, 1997).



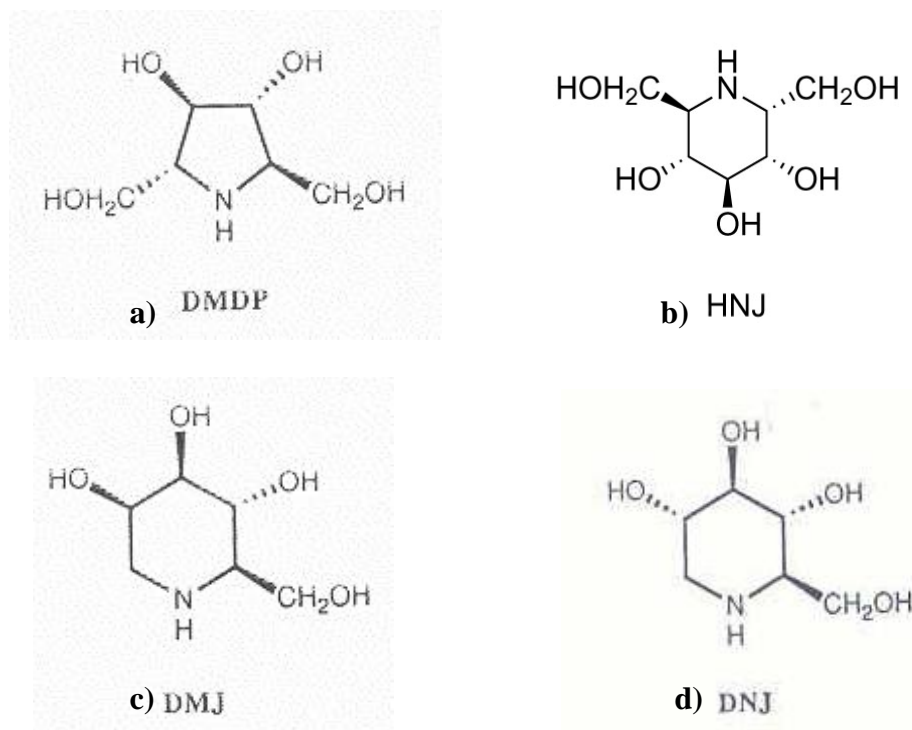
**Figura 2.** Fotos de *Urania fulgens*, donde es posible observar el característico patron de colores del adulto y su tamaño.

La distribución de *Urania. fulgens* no se restringe al estado de Veracruz, su distribución se extiende hasta Panamá (Dirzo, 1997; Smith, 1983), debido a la dependencia alimenticia que presentan las larvas de *U fulgens*, esperaríamos que las poblaciones de *O oleifera* se extendieran hasta países Centroamericanos pero eso no es así, la distribución de *Omphalea* se empalma con la distribución de *U fulgens* con la participación de dos especies de *Omphalea*. En México podemos encontrar a *O. oleifera* en los estado de Veracruz y Oaxaca (Dirzo, 1997), mientras *O. diandra* se encuentra en la parte de Centro y en Sudamérica, ambas especies sufren defoliaciones por parte del lepidóptero (Smith, 1983).

*Urania fulgens* presenta migraciones unidireccionales que suelen combinarse con explosiones demográficas lo que resulta en las defoliaciones masivas esporádicas de las que son objeto tanto *Omphalea oleifera* como *Omphalea diandra* (Dirzo, 1997, Smith 1983). Las defoliaciones incluso de las plántulas y juveniles parecen demasiado agresivas, sin embargo, la información existente indica que éstas no afectan de manera significativa a los individuos reproductivos (Dirzo, 1997).

Estudios fitoquímicos en *O diandra*, demostraron la presencia de un tipo de metabolitos secundarios que actúan como inhibidores enzimáticos, por otro lado estos alcaloides se han detectado en tanto en *O diandra* como en *U fulges*, único insecto que se alimenta regularmente de esta planta. Lo anterior ha motivado las sospechas al respecto de una relación de secuestro de metabolitos (Kite, 1990). Debido a la dependencia alimenticia observada y las evidencias mencionadas Dirzo (1997) sospecha de una interacción con un alto grado de especialización mediada por dichos metabolitos, sin embargo, los inhibidores enzimáticos mencionados, no actúan sobre los depredadores vertebrados de estos insectos (Smith, 2005).

La información referente a la química de *O. oleifera* es muy pobre, sin embargo, la especie sudamericana ha sido estudiada evidenciando la presencia de ciertos alcaloides inhibidores de la glicosidasa (AIG's), estos compuestos mimetizan la estructura de azúcares simples e interrumpen el metabolismo de los azúcares (Fellows *et al.*, 1989). Se han aislado 4 AIG's diferentes de *O. diandra*, 2R, 5R-dihidroximetil-3R, 4R-dihidroxipirrolidina (DMPM) (a), 2,6-dideoxi-2, 6-imino-D-glicero-L-guloheptiol (HNJ) (b), 1,5-dideoxi-1, 5-imino-D-manitol (DMJ) (c), y 1, 5-dideoxi—1, 5-imino-D-glucitol (DNJ) (d) (Kite *et al.*, 1988, 1990). La estructuras de estos alcaloides se presentan en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Estructuras de los cuatro alcaloides encontrados en *Omphalea diandra*, a)DMDP b)HNJ, c)DMJ y d)DNJ.

El tipo de alcaloides presentes en *O diandra* como el DMDP han mostrado actividad antialimentaria en insectos herbívoros (Fellows y Col., 1989), un experimento donde el DMPM fue incorporado a la dieta a una concentración de 0.01 % referido a al peso seco de la dieta, concentración presente en las hojas de *O. diandra*, demostró ser suficiente para inhibir la alimentación en *Locusta migratoria* y *Schistocera gregaria* (Blaney y Col., 1984), así como en larvas de lepidópteros como *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa armigera* (Simmonds *et al.*, 1990). Además este compuesto causa mortalidad en el escarabajo *Callosobruchus maculatus* (Evans y Col., 1985, Kite, 1997).

Todo parece indicar que las *Uranias* alrededor del mundo acumulan los AGI's presentes en su planta hospedera, pues hay evidencias del mismo fenómeno entre otro Uranido y su alimento en las Filipinas (Kite y Col., 1991, 1997). Con este antecedente la acción de los cuatro AIG's presentes en *Omphalea diandra* fueron probados por Kite y Col., (1997)

contra las enzimas digestivas de cuatro herbívoros, dos de ellos especializados en especies de *Omphalea* (*Urania fulgens* y *Alcides metaurus*, ambos en estadios larvales) y dos de ellos sin contacto previo con la especie (*Spodoptera littoralis* en estadio larval y adultos de *Dermestes maculatus*). Los resultados del ensayo mostraron que las enzimas provenientes de herbívoros especializados en especies de *Omphalea* no fueron inhibidas de manera significativa en contraste con las enzimas de los herbívoros generalistas, que si fueron inhibidas de manera significativa (Kite y Col., 1997).

*Urania fulgens* presenta hábitos alimenticios particulares al eclosionar se alimenta de hojas juveniles, una vez alcanzados los estadios finales, las larvas no distinguen entre las hojas pudiendo defoliar la planta entera (Kite, 1997).

La investigación de los pasados 40 años ha demostrado de manera contundente que las plantas y los animales producen sustancias que afectan el crecimiento, desarrollo, comportamiento y distribución de otros organismos, estas sustancias son conocidas como aleloquímicos. Las alomonas, un tipo de aleloquímico, se definen como las sustancias producidas o adquiridas por un organismo que cuando entran en contacto con un individuo de una especie diferente evoca en el receptor una respuesta fisiológica o de comportamiento que es adaptativamente favorable para el emisor pero no para el receptor). Las alomonas son consideradas como el mayor mecanismo por el cual las plantas se protegen de una herbivoría excesiva, dentro de esta categoría de aleloquímicos encontramos a los compuestos antialimentarios. Encontramos, también a las feromonas que son compuestos que otorgan un beneficio, ya sea para el emisor, el receptor o para ambos (Nordlund, 1981 en Koul 2005; Koul, 2005).

Los aleloquímicos forman parte de un grupo de sustancias conocidas como metabolitos secundarios. El carácter de los metabolitos secundarios aún no ha sido bien definido, desde la asignación de su nombre fueron relegados a un segundo plano y durante mucho tiempo fueron considerados meras sustancias de desecho o bien errores metabólicos. Sin embargo, estudios más exhaustivos de los mismos han demostrado que no son originados por errores

ni mucho menos, la síntesis de los mismos es regida por enzimas lo que evidencia una producción específica de los mismos (Kutchan, 2001).

Los metabolitos secundarios se encuentran definidos como aquellos metabolitos a los cuales no se les ha podido asignar ninguna función aparente en los procesos metabólicos primarios de las plantas, como son la fotosíntesis o la respiración (Rosenthal y Janzen, 1979, Fraenkel, 1959, Anaya, 2003). Son sintetizados a partir de metabolitos primarios, pero su distribución suele ser restringida y específica dentro de ciertos grupos taxonómicos como familias, subfamilias o incluso a géneros (Balandrin, *et al*, 1985, Fraenkel, 1959).

Aunque los metabolitos secundarios no aparentan tener una función metabólica fundamental, tienen funciones ecológicas, ya sea como atrayentes de polinizadores (néctar rico en aminoácidos), como adaptaciones contra el estrés (ácido clorogénico), como aleloquímicos (nicotina) o como defensas contra organismos herbívoros y patógenos (quercetina) (Seigler y Price, 1976; Levin, 1976; Balandrin y col., 1985; Fraenkel, 1959). Los metabolitos secundarios son acumulados por las plantas en cantidades muchos menores en comparación con los primarios, además de que éstos son producidos en células muy especializadas (Balandrin, *et al*, 1985), han sido agrupados como glucósidos, saponinas, taninos, alcaloides, aceites esenciales, ácidos orgánicos, entre otros (Fraenkel, 1959).

Desde que en 1962 Pradhan y colaboradores evaluaron el efecto antialimentario de los extractos de *Azadirachta indica* como sustancias que prevenían la alimentación de la langosta del desierto, la investigación en este campo a crecido tanto que hoy en día concentra un registro de cerca de 900 compuestos con actividad antialimentaria (Koul, 2005). Los antialimentarios son compuestos de baja toxicidad para el hombre que se ocupan como repelentes contra insectos herbívoros, este tipo de sustancias producen un cambio en el comportamiento de los mismos, con la finalidad de evitar el consumo de una especie vegetal, ejemplos de estos son la azadiractina y los diterpenos del clerodano (Isman, 2006). Este tipo de productos naturales han cobrado importancia ya sea como modelos de acción para nuevos insecticidas sintéticos o a su uso comercial. Muchos metabolitos secundarios se centran en desalentar la alimentación, la ovoposición o



afectando negativamente el crecimiento larval mas que matando a los insectos (Koul, 2005).

Además de los compuestos químicos que buscan reducir la herbivoría por medio de la intoxicación o la repelencia tenemos sustancias que evitan que el tejido sea atractivo para los herbívoros. Ejemplos de este tipo de compuestos son los taninos, cuyos efectos negativos en la digestión de nutrientes es bien conocida (Price y Butler, 1980) o los ácidos fenólicos y la lignina, cuya relación negativa entre su concentración y la digestibilidad del forraje se ha observado desde décadas atrás (Woodman y Stewart 1932 en Jung y Vogel, 1986; O'Dowd y Lake 1990; Reichardt y Col., 1990; Van Astyne y Paul 1990 en Dudt y Shure 1994).

La lignina es el componente químico frecuentemente asociado con la indigestibilidad de los nutrientes debido a la asociación de esta con los carbohidratos de la pared formando complejos lignina-polisacaridos. La aparente baja digestibilidad y el incremento en el contenido de lignina asociado con la madurez, sirve como base para asumir que la lignificación es uno de los factores responsables del bajo valor alimenticio en forrajes maduros. También se ha comprobado que los monómeros fenólicos y la lignina inhiben el crecimiento microbiano lo que en conjunto con la baja digestión enzimática ya mencionada explicaría el bajo aprovechamiento de la pared celular por parte de los herbívoros (Jung y Fahey, 1983). Adicionalmente a la baja absorción y digestibilidad se ha observado que los niveles de fibra y taninos en hoja varían de manera inversa con los niveles de nitrógeno y agua, siendo el nitrógeno un nutriente importante para los insectos fitófagos, esta relación inversa en la cantidad de nutrientes en conjunto con la baja digestibilidad y absorción, convierte a los tejidos lignificados en una opción poco atractiva para el consumo (Mattson y Scriber 1987; Hochuli 1996, en Peeters 2002; McNeil y Southwood 1978; Mattson 1980; White 1984 en Peeters 2002).

Muchos productos naturales son aislados, caracterizados y publicados en trabajos científicos sin la búsqueda de su actividad biológica (Meyer *et. al*, 1982). Los ensayos biológicos pueden evaluar la actividad frente a diferentes organismos, como pueden ser

bacterias, hongos o insectos entre otros, la elección del modelo a usar depende mucho de la actividad que se busca, ya sea antifúngica, antibacterial o contra insectos. Debido a estos los bioensayos son una herramienta útil en la búsqueda de compuestos biológicamente activos como fármacos, antialimentarios o insecticidas. Se recomienda que los ensayos sean baratos, reproducibles, tener validez estadística, que requieran poca cantidad de compuesto, de corta duración y poseer amplia aplicación (Cole, 1992; Rodríguez, 2003).

La investigación de la actividad biológica de compuestos naturales complementa la búsqueda y aislamiento de nuevos compuestos de origen vegetal, sin embargo, la elección de un bioensayo debe hacerse de manera cuidadosa con base en la información que se desee obtener (Cole, 1992; Rodríguez, 2003). Ya se mencionó la abundancia de los compuestos con actividad de tipo insecticida y antialimentario, en este sentido la valoración del efecto de estos compuestos en la nutrición de los herbívoros es crucial, la cuantificación de esta respuesta es factible por medio de los ensayos biológicos. Los bioensayos con insectos han sido utilizados durante décadas con el objetivo de direccionar la separación, purificación y elucidación compuestos químicos, la mayor utilidad de estos radica en hallar especies vegetales, productos naturales o compuestos puros para el control de insectos plaga (Koul, 2005), entre estos encontramos a los ensayos antialimentarios y los de interrupción del desarrollo. Una metodología a seguir es considerar a insectos modelo para la evaluación alimentaria de extractos vegetales y de ahí partir hacia la purificación de compuestos o grupos de compuesto con actividad antialimentaria o fagoestimulante según sea el caso (Bahena, 2003).

El éxito del diseño para estudiar los compuestos antialimentarios consiste en presentar al insecto un sustrato con la sustancia química a ser probada y posteriormente medir la respuesta del insecto. Se pueden usar tanto sustratos naturales como artificiales, los sustratos naturales puede consistir en plantas enteras, hojas, discos foliares (muy utilizados) e incluso sustratos especiales como ramas, bloques de madera, tablas y discos de toallas de papel. Los sustratos artificiales usualmente incluyen dietas con base de agar, dietas líquidas o incluso unicel (Koul, 2005).

Los ensayos de compuesto incorporado a la dieta permiten la evaluación de compuestos o fracciones de difícil disolución o de material vegetal seco y molido. Este tipo de ensayos requieren que el modelo biológico cumpla su ciclo, alimentándose con dieta que usualmente consume en condiciones de crianza, pero a dicha dieta se le ha agregado un compuesto vegetal o bien material vegetal molido. Mediante revisiones periódicas se registra cualquier anomalía física o de carácter temporal que se observe en el desarrollo del organismo. Este tipo de ensayo es útil para evidenciar si un compuesto actúa como disruptor del desarrollo alterándolo, ya sea de manera fisiológica, o bien demorando los tiempos del mismo (Cole, 1992).

Al realizar ensayos biológicos con insectos es necesario elegir cuidadosamente el insecto modelo pues las características y las respuestas de los mismos cambian mucho de uno a otro (Kubo, 1993). Ciertos insectos son monófagos, por lo que sólo consumen un tipo de planta en particular, razón por la que no siempre resultan una buena elección aunque estos sean normalmente los más sensibles a los compuestos. Los insectos olífagos consumen una serie de plantas normalmente relacionadas entre sí taxonomicamente. Finalmente los insectos polífagos son capaces de consumir una enorme cantidad de plantas prácticamente sin discriminar entre éstas, aunque son los menos sensibles (Cole, 1992).

Los modelos biológicos nos sirven para poder estudiar el efecto de diversos fenómenos sobre poblaciones específicas de organismos, como pueden ser insectos, mamíferos, plantas, entre otros. Los fenómenos a estudiar pueden ser de naturaleza variable, como por ejemplo exposiciones a sustancias variadas (fármacos, venenos o toxinas por mencionar algunos), condiciones ambientales adversas (frío o calor extremo, alteración de periodos luz-oscuridad, entre otros) e incluso se pueden provocar enfermedades para poder estudiarlas en organismos y extrapolar los estudios al ser humano.

Como modelo biológico los organismos deben cumplir ciertos requisitos para ser funcionales. Deben tener una alta tasa de reproducción y un ciclo de vida corto. En caso de tener que evaluar los efectos a largo plazo en el desarrollo del organismo el hecho de ocupar un modelo con un ciclo de vida corto resulta muy benéfico al poder observar el ciclo

vital de manera completa. Otra característica importante que debe poseer un modelo biológico es que el mantenimiento de los organismos sea de bajo costo y preferentemente que sea de pocas necesidades ya que esto reduce los costos y optimiza la disponibilidad de individuos de prueba. Otra característica con que se debe contar es que su ciclo de vida esté bien documentado con el fin de poder discriminar entre los efectos de los fenómenos ensayados y las condiciones que el ciclo de vida posea naturalmente (Meyer, 1982).

Una metodología seguir es considerar a los insectos modelos, como *Spodoptera frugiperda* para la evaluación de la actividad biológica de extractos vegetales a fin de aislar compuestos de utilidad para el ser humano. *Spodoptera frugiperda* es un lepidóptero que pertenece a la familia Noctuidae. Es un herbívoro generalista que se alimenta principalmente de gramíneas, pero es capaz de alimentarse de 87 especies distintas (Brown y Dewhurst 1975, Morón y Terrón 1988). Debido a que en el país hay un cultivo importante de maíz, se le puede encontrar en prácticamente cualquier región donde se cultive éste (Morón 1988). *Spodoptera frugiperda* es capaz de adaptarse al consumo de una variada cantidad de partes vegetales e incluso a la alimentación por medio de una dieta artificial, esto permite la adición de sustancias de prueba para ensayos toxicológicos sin provocar estrés excesivo en los organismos.

## Justificación

A partir de las observaciones de campo en las cuales:

- *Urania fulgens* defolia gradualmente las poblaciones de *Omphalea oleifera*
- Escasos registros de otros herbívoros que consuman a esta especie
- Informes acerca de la presencia de compuestos alcaloideos en *O. diandra*,

Se planteo un estudio fitoquímico inicial de *O. oleifera* considerando la variabilidad de los metabolitos secundarios, su concentración en función de la edad de la planta, los diferentes órganos de la misma así como los cambios estacionales a fin de determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios.

## Objetivos

### Objetivo general

En este trabajo se realizó un estudio químico inicial a fin de determinar la presencia o ausencia de grupos de metabolitos secundarios así como del efecto de estos en el desarrollo de un insecto generalista como *Spodoptera frugiperda*. Por otro lado considerando la evidente dureza de la hoja se realiza un estudio sobre la concentración de lignina y de algunos ácidos fenólicos involucrados en la síntesis de la misma.

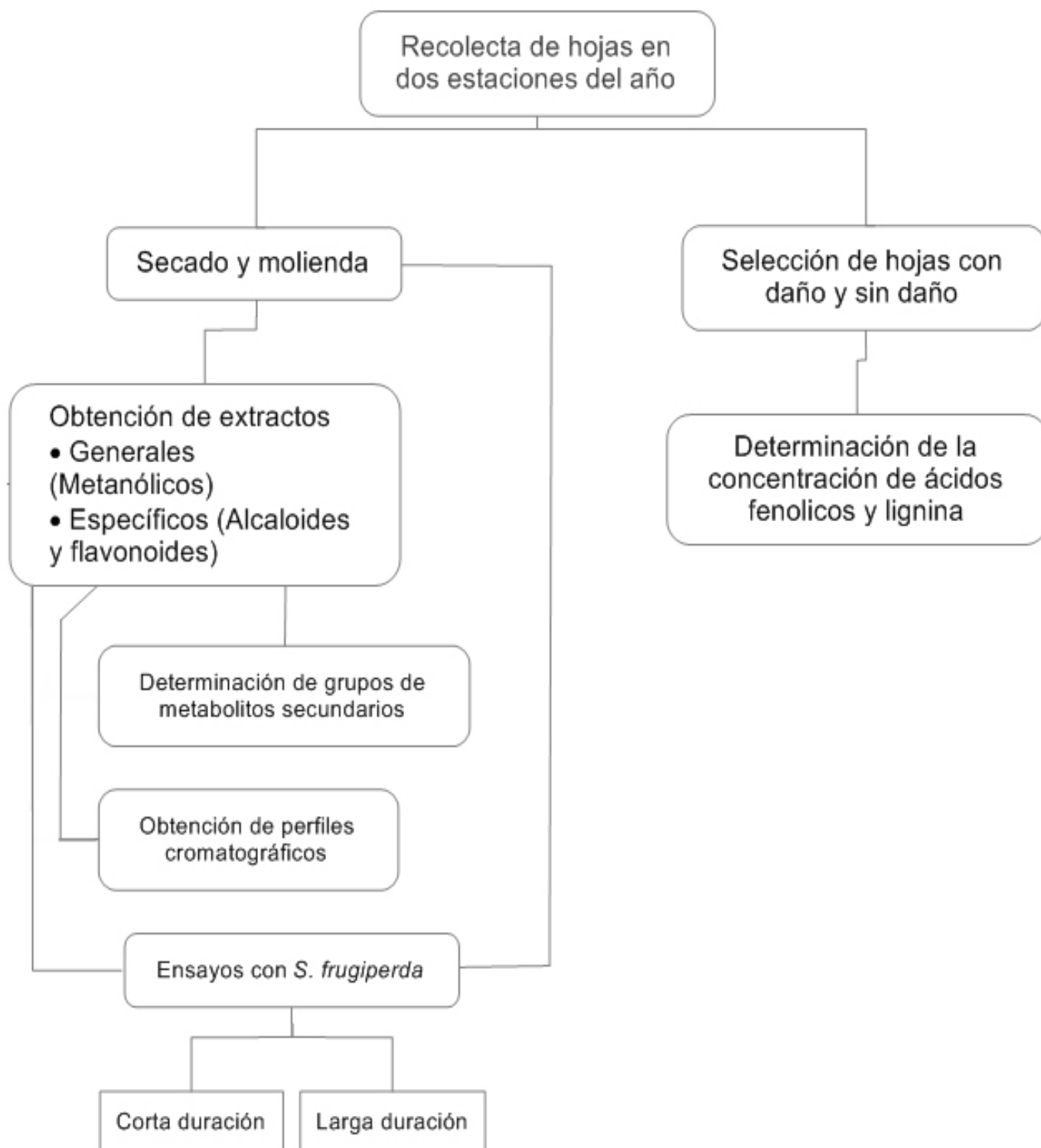
Considerando que una de las respuestas de las plantas frente a la herbivoría es la producción de compuestos de origen fenolico se evaluó la concentración de estos compuestos (ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido cinámico) y la concentración de lignina bajo dos condiciones de herbivoría.

### Objetivos particulares

- Obtener el perfil de grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos metanólicos de *O. oleifera* en dos etapas del año.
- Análisis cromatográfico de extractos de *Omphalea oleifera*.
- Evaluar mediante ensayos biológicos la actividad antialimentaria de las hojas de *O. oleifera* en un insecto generalista (*Spodoptera frugiperda*).

## Material y Métodos

### Diagrama metodológico



## **I.- Área de estudio**

El material vegetal fue recolectado en la Selva Alta Perennifolia cercana a la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, dicha estación se encuentra ubicada entre los 95°8´y 95°48´ de longitud y los 18°20´y 18°40´ de latitud norte con un área total de 700 ha (Lot, 1976), la zona presenta una altitud que va de los de 150 a los 700 msnm (Ibarra y Sinaca, 1995).

La zona posee un clima cálido-húmedo con precipitación promedio anual de 4725 mm concentrando la mayor precipitación durante la época de verano, la temperatura media anual es de 24.3 °C (Ibarra y Sinaca, 1987). El suelo de la zona presenta una gran acumulación de materia orgánica, el suelo presenta un pH ligeramente ácido y se encuentra clasificado en tres ordenes: mollisol, entisol e inceptisol (Chizon, 1984; Bongers y Col. 1988). El tipo de vegetación predominante en la zona es la selva alta perennifolia con algunas variantes de composición y estructura que depende de los cambios topográficos y de la perturbación vegetal (Miranda y Hernández-X.1963; Lot, 1976).

## **II.- Recolecta del material**

Se realizaron dos recolectas de hojas, la primera durante el mes de octubre del año 2006 y la segunda recolecta durante el mes de Mayo del año 2007. Durante la recolecta realizada en el mes de octubre se obtuvieron hojas con daño y sin daño las cuales fueron seleccionadas de manera azarosa para una posterior determinación de la concentración de lignina. El material fue secado en las cámaras de la Estación Biológica de Los Tuxtlas, y transportado al laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, UNAM, para su posterior análisis.

## **III.- Preparación del material**



Las hojas fueron seleccionadas y posteriormente secadas en una estufa a una temperatura constante de 40° C durante tres días, las hojas fueron molidas en un molino eléctrico, SM 2000 de la marca Retsch, hasta obtener un polvo fino y homogéneo.

Se realizó una extracción con metanol a las dos muestras con objeto de obtener la mayor cantidad de compuestos. La hoja seca y molida fue sometida a una extracción en frío (maceración) con metanol durante 72 h, tres veces, cumplidos estos periodos se procedió a concentrar el extracto por destilación a presión reducida. El extracto obtenido fue trasvasado y colocado en una cámara de vacío para eliminar por completo el disolvente y se calcularon rendimientos.

#### **IV.- Extracciones Alcaloideas**

Debido a la información mencionada sobre la presencia de alcaloides en la planta hermana, *O. diandra*, se realizaron tres distintas extracciones para alcaloides con la finalidad de detectar su presencia en hojas de *O. oleifera*, éstas son presentadas a continuación:

Extracción ácida con hoja seca

- Se tomó 1 g de hoja seca y molida
- La muestra de planta se desengrasó con 10 mL hexano en frío (tres veces)
- Una vez desengrasada la muestra, ésta se dejó secar a temperatura ambiente.
- La muestra fue acidificada con 10 mL de solución de ácido acético al 2%, macerándola durante una hora en agitación constante.
- La solución ácida fue filtrada sobre un embudo de separación y posteriormente se extrajo con 5 mL de éter etílico (tres veces).
- La fase etérea fue secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para posteriormente concentrarla a temperatura ambiente

Extracción básica con hoja seca

- Se tomó 1 g de hoja seca y molida.
- La muestra de planta se desengrasó con 10 mL hexano en frío (tres veces).

- La muestra se dejó secar a temperatura ambiente sobre una caja Petri.
- Ya seca la muestra, ésta fue humedecida con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 2 %, dejando que seicara durante 24 h.
- La muestra fue extraída en un matraz Erlenmeyer con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$  9:1 durante 1 hora (realizando este procedimiento por triplicado).
- Posteriormente se eliminó el disolvente a temperatura ambiente para obtener el crudo alcaloideo.

#### Extracción ácida a partir de extracto

- Partiendo de 0.165 g de extracto metanólico se realizaron 6 extracciones de 2 mL con HCL (1N).
- La solución ácida obtenida de las extracciones fue filtrada y lavada con hexano.
- La fase acuosa fue basificada con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2 %) hasta obtener un pH con valor de 9.
- La fase acuosa fue extraída con cloroformo, conservando la fase orgánica.
- La muestra se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, para ser filtrada.
- Se evaporó el cloroformo para obtener el crudo alcaloideo.

#### **V.- Extracción de flavonoides**

Se realizaron extracciones específicas para flavonoides a partir de 1 g de hoja seca finamente molida, con 10 mL de metanol acuoso al 80%, durante 12 h. Los extractos fueron cromatografiados, los cromatogramas obtenidos fueron tratados con un revelador específico para flavonoides RPN (2-Aminoetil difenilborato).

#### **VI.- Determinación del porcentaje de lignina y ácidos fenólicos.**

La determinación del porcentaje de lignina se realizó conforme el método de Van Soest (1994), sobre las muestras tanto de hoja dañada como de hoja sin daño, se procesó un total de 5 muestras por cada condición.

Con la idea de complementar los datos de la cuantificación de lignina se realizó un estudio cualitativo de los siguientes ácidos fenólicos: clorogénico, cumárico ferúlico y cinámico. Se realizó una extracción con 0.5 g de hoja seca en 10 mL de metanol por 30 minutos a 35°C, los extractos fueron concentrados por destilación a presión reducida. Las muestras y los estándares se colocaron en un aplicador CAMAG automatic TLC Sampler 4, sobre placas cromatográficas de gel sílice de la casa comercial Merck, aplicando 10µl en bandas de 5mm de ancho. La comparación contra estándares de referencia Sigma Aldrich (10 mg en 2 mL) se realizó mediante la comparación de los RF y se realizó una comparación visual de las manchas a fin de determinar las diferencias en la intensidad de las mismas.

## **VII.- Análisis de los extractos**

### **Pruebas de detección de grupos metabolitos secundarios**

Obtenidos los extractos se procedió a efectuar las pruebas para la detección de los grupos de metabolitos secundarios (Dominguez.1973) Para la realización de las pruebas, se preparó una solución madre con una concentración de 5mg/mL.

Se realizaron las siguientes pruebas:

- *Alcaloides: reactivo de Dragendorff y Ácido. Silicotúngstico*

*Alcaloides: reactivo Dragendorff*

Los extractos metanólicos fueron disueltos en metanol. A las muestras se adicionó una gota de ácido clorhídrico concentrado y dos gotas del reactivo de Dragendorff, la prueba se consideró positiva si se presentaba un precipitado de color anaranjado-marrón.

*Alcaloides: reactivo Ácido Silicotúngstico*

Las muestras se prepararon con la misma metodología usada en la prueba de Dragendorff, posteriormente se agregaron dos gotas de ácido silicotungstico, si se observa un precipitado de color amarillo paja la prueba se considera positiva.

- *Glucósidos: reactivo de Molish*

Las muestras fueron disueltas en metanol, se les agregaron dos gotas de una solución alcohólica al 5% de  $\alpha$ -naftol, posteriormente se agregó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, dejando que éste se deslice por las paredes del tubo de ensaye formando así dos fases. Se toma lectura de la coloración del anillo formado en la interfase, considerando la prueba como positiva si se observa un color violeta.

- *Terpenos y esteroides: reactivo Liebermann-Burchard*

Los extractos se llevaron a sequedad y fueron redisueltos en cloroformo, se agregó 1 mL de reactivo Liebermann-Burchard (anexo 1: reactivos) a cada muestra. Se considera positiva la prueba si se observa un cambio de coloración al azul-verdoso, rosa, rojo o violeta.

- *Flavonoides: reactivo de Shinoda*

Los extractos fueron disueltos en metanol, a estos se les agregó un trozo de magnesio y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado, si observamos un cambio de coloración hacia el anaranjado, roja-azulosa, violeta o azul la prueba se considera positiva.

- *Fenoles: Cloruro férrico*

Se agregaron 2 gotas de una solución de cloruro férrico, esperando que la solución presentara un cambio de coloración a un color azul o verde.

### **Cromatografía en capa fina**

A fin de obtener el análisis cromatográfico de la planta se realizaron cromatografías en capa fina de los extractos metanólicos, para alcaloides y flavonoides con la siguiente metodología:

- Los extractos fueron redissueltos a una concentración de 5mg/1mL (con excepción de los extractos alcaloideos, donde se ocupó el total de extracto disuelto en 2 mL)
- Con la ayuda de un aplicador automático (TLC sampler, CAMAG) se aplicó un volumen de 10 µL en bandas de 5 mm,
- Todos los extractos se aplicaron en placas con base gel de sílice G-25 en soporte de vidrio (Merck) con indicador fluorescente para luz UV de 254 nm en placas de 10 cm de frente por 4 cm de ancho.
- Las placas se desarrollaron en una cámara cromatográfica vertical marca Sigma Aldrich (6.5 cm × 10.5 cm).
- Fueron observadas en un gabinete de luz ultravioleta, tanto en onda larga (365 nm) como en onda corta (254 nm).
- Se revelaron con sulfato cérico (revelador general), con excepción de las placas correspondientes a los extractos alcaloideos y de flavonoides.

Para flavonoides se usó revelador de productos naturales RPN (2-aminoetil difenilborato). Adicionalmente las placas fueron reveladas con reveladores específicos para terpenos, Lieberman-Burchard y anisaldehído. Las placas correspondientes a los extractos alcaloideos fueron reveladas con reactivo de Dragendorff y reactivo de Van-Urk.

### **VIII.- Ensayos biológicos con *Spodoptera. frugiperda***

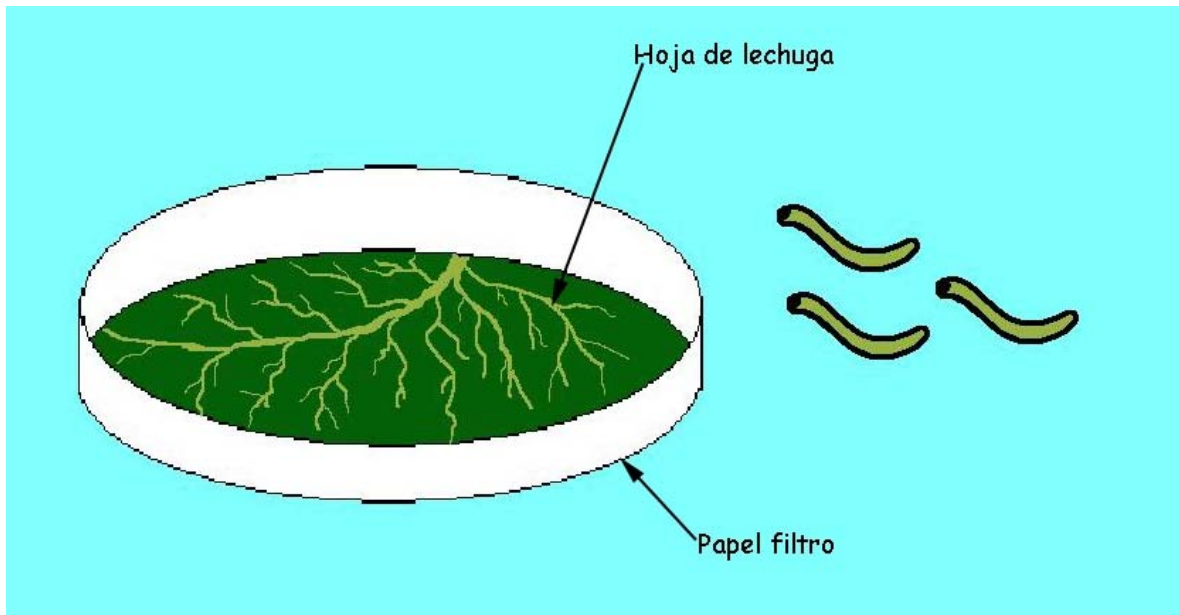
Como ya se ha mencionado, los ensayos biológicos nos permiten evaluar las respuestas que un insecto modelo presenta por la exposición o consumo a una muestra, ésta puede administrarse en distintas formas (planta fresca, planta seca, extractos) dependiendo del ensayo que se realice. El implementar distintos ensayos, permite recabar una mayor información sobre la respuesta del insecto modelo a la muestra en cuestión. La búsqueda de actividad biológica permite complementar la investigación fitoquímica y hoy en día se presenta como una herramienta útil para la búsqueda de nuevos fármacos, insecticidas, antialimentarios o disuasores de la alimentación.

## Ensayo de corta duración

Los ensayos de corta duración permiten evaluar la respuesta de un insecto modelo frente a una muestra vegetal, a corto plazo por parte de una planta posterior a su consumo. Con este antecedente se montó un ensayo de no preferencia, siguiendo la metodología general de los ensayos de no selección descrita por Kubo (1991) donde se probó la aceptabilidad de hojas frescas de *Omphalea oleifera* en comparación a un control montado con las hojas de una planta de carácter neutral, considerando como neutral a aquella planta que ha perdido su capacidad inherente de protegerse de la herbivoría durante la domesticación (Carlini y Grossi de Sá 2001), en este caso lechuga (*Latuca sativa*) para observar diferencias de consumo entre las dos muestras.

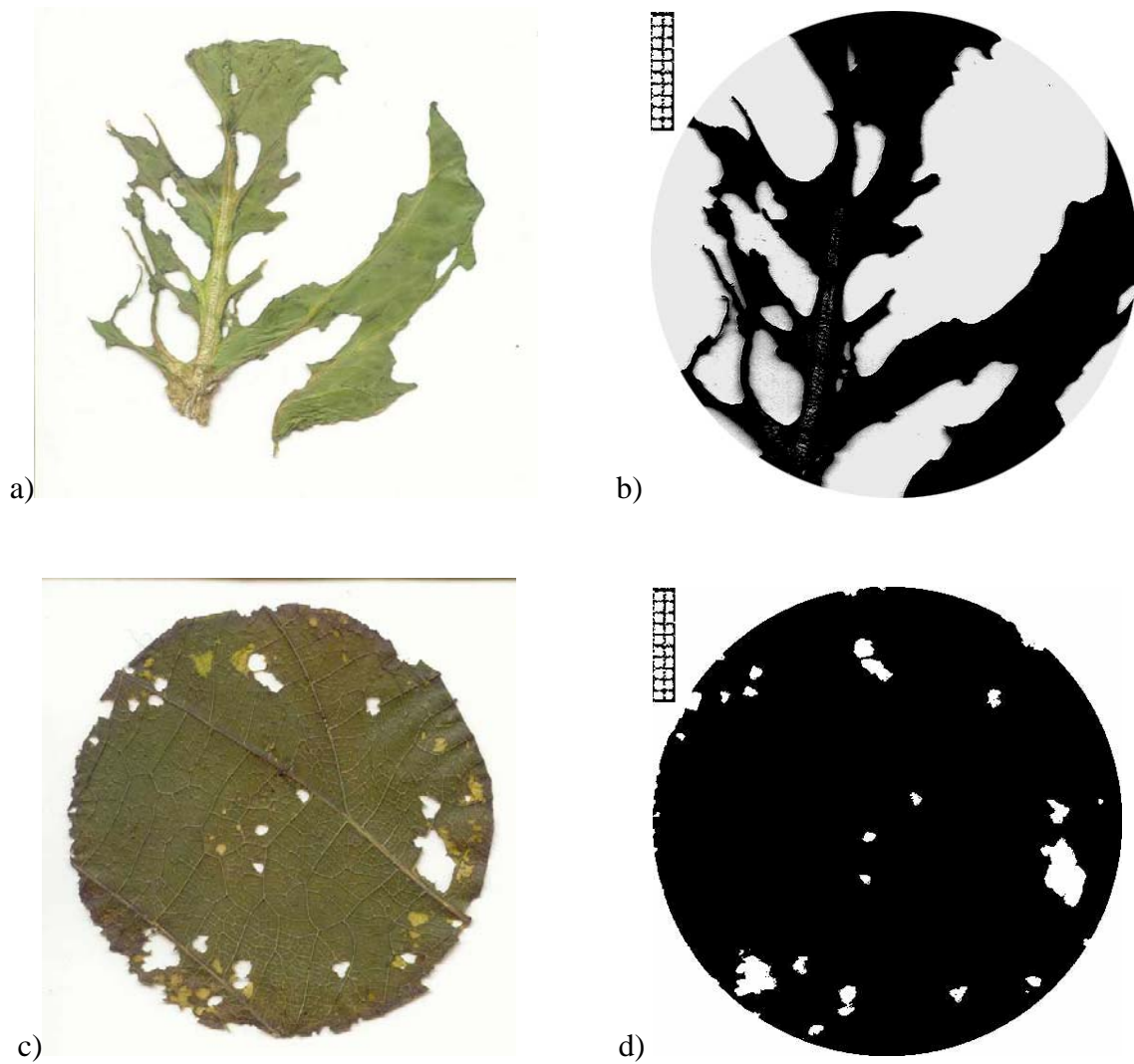
Las hojas control y de tratamiento se recortaron de modo que los discos de hoja cubrieran completamente la superficie de una caja de Petri de tamaño estándar, 9.3 cm de diámetro. Las cajas se prepararon previamente colocando papel filtro húmedo cortado a la medida de la caja de Petri, que funcionó como fuente de humedad para evitar que las hojas se deshidrataran durante el ensayo (**Figura 4**).

Los ensayos fueron montados con larvas pertenecientes al tercer estadio de desarrollo seleccionadas de un tamaño homogéneo. Para asegurar la alimentación de las larvas durante el transcurso del ensayo, éstas se sometieron a un ayuno de 5 h. Al iniciar el ensayo se colocaron tres larvas por cada caja, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  con un nivel de humedad de 60 %, y un periodo de 16/8 h luz-oscuridad. El ensayo comienza al poner las tres larvas en una caja de Petri y se coloca en al cámara de manera azarosa, transcurridas 12 h el ensayo se da por terminado.



**Figura 4.** Dibujo esquemático del bioensayo de corta duración.

Finalizado el ensayo se procedió a cuantificar el área foliar consumida en los lotes control y tratamiento, para poder comparar el consumo en ambos casos y ver las diferencias entre el consumo de los diferentes lotes. Los resultados de los ensayos de corta duración se cuantificaron mediante el uso de una técnica similar a la descrita por Escoubas y Col. (1992) ayudándonos con un programa digital de medición de áreas. En este caso se usó un scanner (hp® scanjet® 3670) para digitalizar los discos de hoja que fueron mantenidos bajo ensayo, donde fue posible apreciar las zonas consumidas. Las imágenes se procesaron mediante un programa de tratamiento de imágenes (Adobe® Photoshop® CS2), para obtener imágenes en blanco y negro en formato TIFF sin compresión como podemos ver en la **Figura 5**. Con el uso del programa Scion Image se obtuvieron las áreas correspondientes a las secciones de hoja consumidas durante el ensayo, con dichos datos se calcularon los porcentajes de hojas consumidas y sin consumir para hojas de tratamiento y de control.



**Figura 5.** Muestras de la toma y preparación de imágenes para la cuantificación de área, digitalización directa de las hojas control (a) y las hojas tratamiento (c) y el posterior procesamiento de imagen tanto para las hojas control (b) como para las hojas tratamiento (d)

Los datos de porcentaje de hoja consumida durante el ensayo, se analizaron mediante el índice antialimentario descrito por Alkofahi y Col. citado por Escoubas y Col. (1993), este índice se calculó mediante la **Formula 1**.

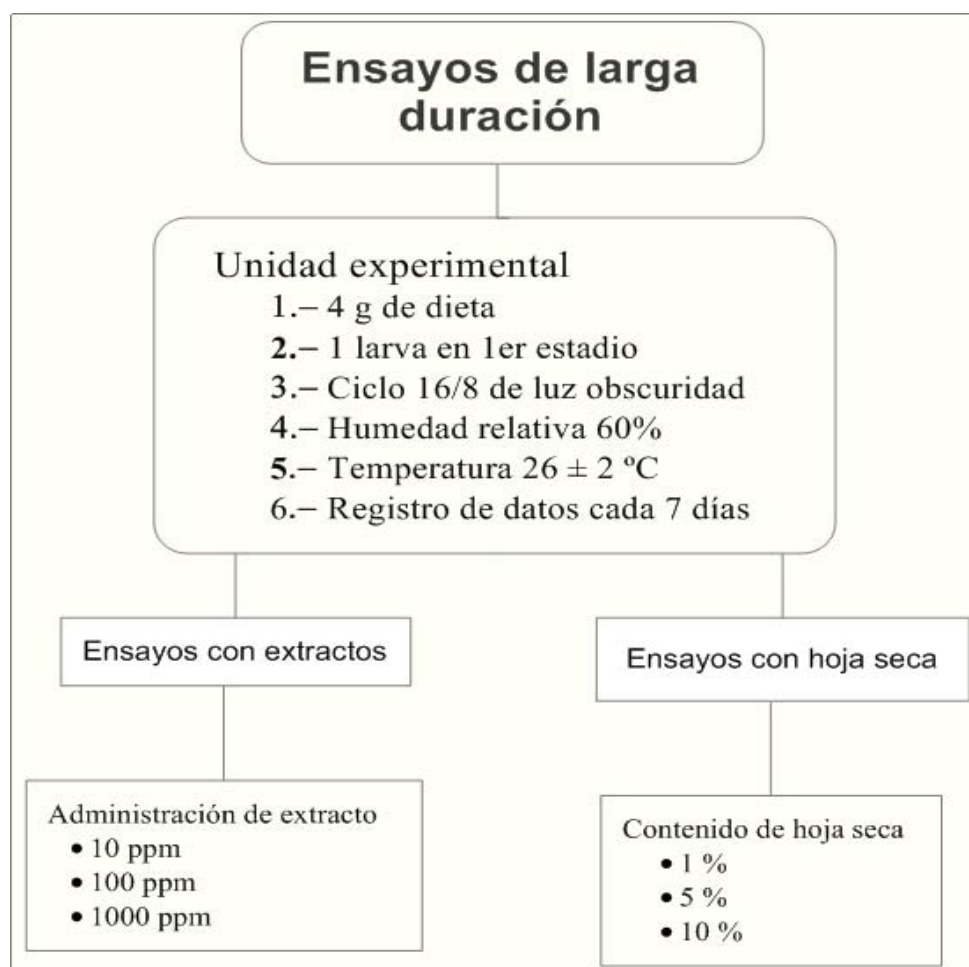


$$\text{Índice antialimentario} = \frac{\% \text{ de discos tratados consumidos}}{\% \text{ de discos tratados consumidos} + \% \text{ de discos control consumidos}} \times 100$$

**Formula 1.** Índice de Alkofahi (1989)

### Ensayos de larga duración

Los ensayos de larga duración con dieta artificial consistieron en dos tipos, los ensayos con hoja seca y con extracto, las metodologías utilizadas se muestran resumidas en la **Figura 6** y son detalladas posteriormente.



**Figura 6.** Resumen metodológico de los ensayos de larga duración

Para el montaje de este tipo de ensayo se siguió el método de Cole (1992) usando la dieta artificial para la crianza de *Spodoptera frugiperda* (ver anexo 2). Los ensayos fueron montados con larvas de 1<sup>er</sup> estadio de desarrollo (con 5 días desde su eclosión), tiempo durante el cual fueron alimentadas con dieta artificial. Se colocaron individualmente en un recipiente que contenía 4 g de dieta artificial (cantidad óptima de dieta para que la larva cumpla su ciclo vital calculada mediante ensayos previos) tratada según el ensayo, manejando un total de 20 réplicas por cada tratamiento (**Figura 7**).

Las unidades experimentales se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  con una humedad del  $60 \pm 10 \%$  y un ciclo de luz oscuridad de 16/8 h. Estas condiciones se mantuvieron constantes durante el desarrollo de cada experimento.

La lectura de todos los ensayos se tomó cada 7 días, registrando sobrevivencia y estadio de desarrollo de la larva en cada réplica.



**Figura 7.** Ejemplos de las unidades experimentales utilizadas durante el desarrollo de los ensayos de larga duración.

#### *Ensayos con hoja seca suministrada en la dieta*

Para este ensayo se calculó la cantidad necesaria de hoja seca y molida para que ésta representara un porcentaje del total de dieta ofrecida en cada ensayo, estos porcentajes correspondieron al 1, 5 y 10 %. Las distintas cantidades de hoja seca finamente molida, fueron incorporadas a la dieta artificial encontrándose aun líquida para asegurar la

homogeneidad de la hoja en la dieta. En cada réplica se colocó una larva de primer estadio, con el objetivo de que cumpliera su ciclo de vida consumiendo únicamente la dieta mezclada con la hoja seca.

#### *Ensayos con extractos incorporados en la dieta*

En este ensayo se incorporaron a la dieta cantidades conocidas de extracto obteniendo concentraciones finales de 10, 100 y 1000 ppm. La cantidad de dieta requerida para cada tratamiento fue pesada por separado e impregnada con la cantidad de extracto correspondiente, homogenizando la dieta con el extracto. Posteriormente los 4 g de dieta tratada fueron colocados en los respectivos recipientes donde se colocó una larva. Para los lotes de control la dieta fue tratada únicamente con el disolvente en que fue disuelto el extracto.

Los datos obtenidos de los ensayos de larga duración se procesaron aplicando el índice de crecimiento implementado por Zhang (1993) **Formula 2** que estima las diferencias entre las poblaciones control y de los tratamientos por medio de la obtención de un valor que nos permite comparar las diferencias entre las distintas concentraciones. Los tratamientos se monitorearon cada 7 días hasta observar que el porcentaje de pupación en el control representó el 95% del total de individuos que lo conforman, al ocurrir esto tanto en las larvas control como en las larvas bajo tratamiento fueron clasificadas según el estadio larval en el que se encontraron. En este caso en particular se consideraron 7 estadios, considerando la pupación como el 7° estadio y de la 1ª-6ª etapa como estadios larvales.

El Índice de Crecimiento (IC) representa de manera matemática la tasa de crecimiento en el insecto modelo al considerar que si estos no están mudando, para pasar de un estadio a otro, no estarían creciendo, razón por la cual los estadios larvales son usados como un parámetro para estimar el desarrollo de un insecto bajo ensayo. El IC se define como la suma de los estadios observados en los individuos bajo tratamiento entre la suma de los estadios totales que podía alcanzar toda la población bajo tratamiento. El índice se expresa matemáticamente mediante la **Fórmula 2**.

$$\mathbf{IC} = \frac{\sum_{i=1}^{i_{\max}} [n_{(i)} \times i] + \sum_{i=1}^{i_{\max}} [n'_{(i)} \times (i - 1)]}{N \times i_{\max}}$$

**Fórmula 2.** Representación matemática de la formula usada para obtener el Índice de Crecimiento (IC)

Donde:

$i$  = es el número de estadio

$n_{(i)}$  = número de larvas vivas en el estadio  $i$

$n'_{(i)}$  = número de larvas muertas en el estadio  $i$

$i_{\max}$  = estadio máximo que puede alcanzar el modelo usado

$N$  = número total de individuos que conforman el ensayo

El Índice de Crecimiento Relativo (ICR por sus siglas en ingles) fue obtenido mediante la comparación de los GI de los tratamientos contra los GI de poblaciones control, como se muestra en la **Fórmula 3**.

$$\mathbf{ICR} = \frac{\mathbf{IC \ del \ grupo \ tratado}}{\mathbf{IC \ del \ grupo \ control}}$$

**Fórmula 3.** Representación matemática de la formula utilizada para obtener el Índice de Crecimiento Relativo (ICR)

El valor del índice de crecimiento relativo (ICR) utilizando solo datos de controles siempre deberá ser muy cercano o igual a 1, las diferencias se verán reflejadas en función de que tan alejado esté el valor del tratamiento respecto al valor de 1 en control, es decir que entre más se aleje este valor, mayor será la diferencia existente entre el control y el tratamiento.

## Resultados y Discusión

Los rendimientos de la extracción metanólica para cada una de las recolectas se presentan en el **Cuadro 1**.

Recolecta	Rendimiento %
1.- Octubre del año 2006	7.7
2.- Mayo del año 2007	9.4

**Cuadro 1.** Rendimiento de los extractos metanólicos totales de las recolectas.

Aunque existe una diferencia entre los rendimientos observados para ambas recolectas con un mayor rendimiento para la segunda (1.7%), la diferencia entre los rendimientos de ambas no se considera significativa. Esto se debe a que los metabolitos secundarios presentan variaciones debido a múltiples factores que no fueron controlados.

### Análisis de los extractos

#### Pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios

Los resultados de las pruebas de detección a las que fueron sometidos los extractos metanólicos (**Cuadro 3**), muestran la presencia de terpenos y esteroides, flavonoides, alcaloides, glucósidos y fenoles.

	Terpenos y esteroides	Flavonoides	Alcaloides Dragendorff	Alcaloides Silicotungstico	Glucósidos	Fenoles
<b>Recolecta 1</b>	+++ Verde	++ Anaranjado	Lig. Positivo	Lig. Positivo	++ Positivo	Positivo
<b>Recolecta 2</b>	++++ Verde pardoso	++ Verde	Lig. Positivo	Lig. Positivo	+ Positivo	Positivo

Nota: Los signos + indican la intensidad de la reacción, representado del siguiente modo: + el 25%, ++ 50%, +++ 75% y ++++ 100%

**Cuadro 3.** Resultados de las pruebas generales para detección de metabolitos

Las pruebas de detección de grupos de metabolitos secundarios muestran la presencia de alcaloides, flavonoides, glucósidos y terpenos para los extractos de la primera recolecta. Resultados similares fueron observados para la segunda recolecta, con la diferencia de una disminución en la detección de glucósidos y un aumento en la presencia de terpenos y esteroides.

Aunque la especie pierde las hojas de enero a marzo, presenta floración entre enero y mayo, misma que es precedida por la producción de hojas verde pálido (Ibarra, 1985), adicionalmente se han reportado comportamientos erráticos a este respecto (Dirzo y Mota-Bravo 1997). Del mismo modo debemos considerar que la producción de hojas nuevas, periodo durante el que se ubica la segunda recolecta, también debe influir sobre la producción de metabolitos secundarios, debido a los requerimientos energéticos de la planta. Esta característica podría ser la responsable del mayor rendimiento en la segunda recolecta, así como la variación observada en las pruebas para la detección de terpenos, esteroides y flavonoides.

Estos cambios en conjunto podrían sugerir una producción de terpenos en una estación específica en conjunto con una disminución de glucósidos. La presencia de una mayor concentración de terpenos y esteroides durante la temporada de secas puede atribuirse al papel de los terpenos para evitar una herbivoría excesiva sobre la planta. Sin embargo dada la poca variación entre ambos perfiles observada en estas pruebas para ambas temporadas, es importante un análisis más exhaustivo ya que la no detección de compuestos mediante estas pruebas no implica la ausencia de los mismos.

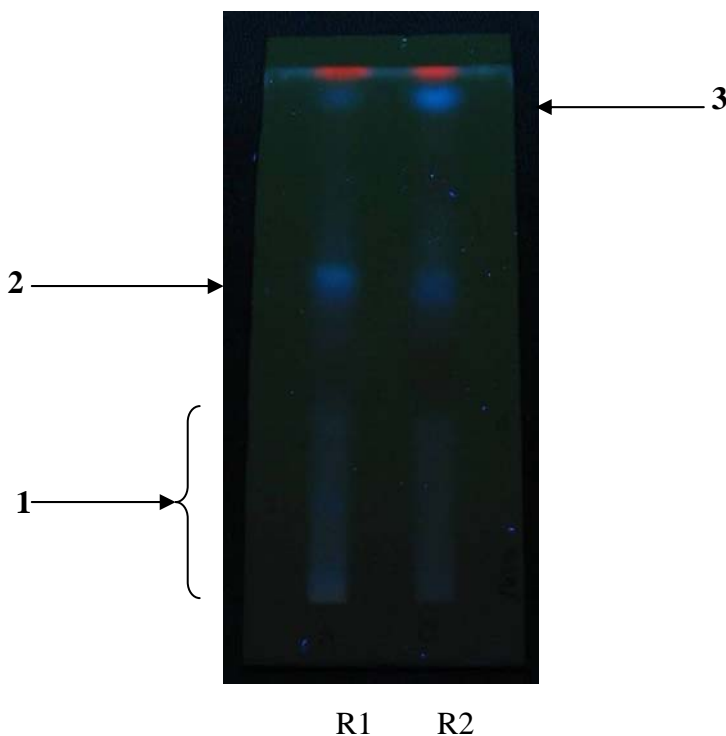
Las pruebas de Dragendorff y ácido silicotungstico mostraron un ligero positivo para alcaloides, sin embargo, ambas pueden dar falsos positivos por interferencias de otros compuestos nitrogenados y existen datos sobre el contenido de nitrógeno (25mg/g) en las hojas (Dirzo, 1997). La falta de un resultado contundente en las pruebas para la detección de alcaloides apoya la implementación de las extracciones alcaloideas a fin de determinar de manera precisa la presencia o ausencia de alcaloides.

## Perfiles cromatográficos

### Extractos Metanólicos

#### Muestras vista bajo luz UV

La placa cromatográfica correspondiente a los extractos metanólicos de ambas recolectas observada bajo luz ultravioleta de 365 nm, presentan una gran similitud entre los perfiles obtenidos con ligeras diferencias de intensidad en las bandas, ejemplo de esto lo encontramos en la zona de mayor polaridad de la placa, donde observamos una mayor intensidad, lo que implicaría una mayor concentración, en R1 (1), esto se repite para la zona de media polaridad de la placa (2). Finalmente podemos observar que para la zona de menor polaridad observamos una mayor intensidad en R2 respecto a R1 (3) **Figura 8**.



**Figura 8.** Placa de las muestras de los extractos metanólicos observada bajo luz UV onda larga ( $\lambda=365$  nm)

**Muestra:**

R1 Extracto metanólico Recolecta 1

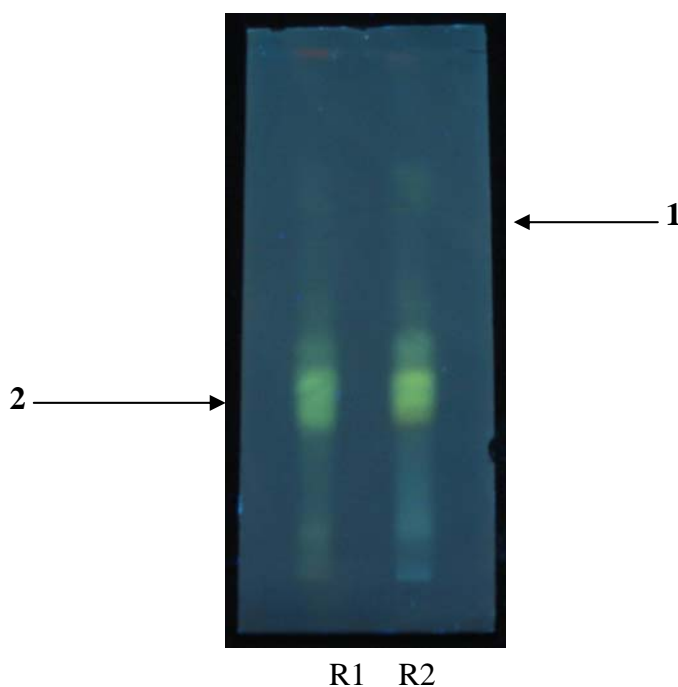
R2 Extracto metanólico Recolecta 2

**Sistema de elusión:** Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua 68:8:8:14

**Revelador:** Sin revelador

### Placa revelada con RPN

Una vez que la placa de extractos metanólicos fue revelada con RPN, ésta continúa mostrando una gran similitud en el número de componentes **Figura 9**. En la zona de mediana polaridad observamos las mismas bandas con una mayor intensidad en R2 (1), sin embargo este patrón se invierte para las manchas rojas correspondientes a clorofilas que observamos en la zona menos polar de la placa, en este aspecto cabe resaltar que esta mayor abundancia se corresponde con la época de lluvias (2) donde es posible asociarla con el crecimiento de la planta, donde la fotosíntesis es mayor que en etapas tardías del crecimiento.



**Figura 9.** Placa de extractos metanólicos revelada con RPN

#### **Muestra:**

R1 Extracto metanólico Recolecta 1

R2 Extracto metanólico Recolecta 2

**Sistema de elusión:** Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua 68:8:8:14

**Revelador:** RPN (2-aminoetil difenilborato)

#### **Detección de terpenos y esteroides**

Debido a la presencia de terpenos y esteroides detectados en las pruebas generales se realizó un perfil cromatográfico de los extractos mismos que se revelaron con reveladores específicos para terpenos y esteroides.



El revelado específico para la detección de terpenos por medio de dos reveladores, confirmó la presencia de terpenos en la muestra. En ambos revelados es posible identificar una mayor intensidad para el extracto obtenido en la recolecta dos **Figuras 10 y 11**.



R1 R2

**Figura 10.** Placa de extracciones metanólicas revelada con reactivo de Lieberman-Burchard

**Muestra:**

R1 Extracto metanólico Recolecta 1

R2 Extracto metanólico Recolecta 2

**Sistema de elusión:** Hexano: Acetato de Etilo 7:3

**Revelador:** Lieberman-Burchard



R1 R2

**Figura 11.** Placa de extracciones metanólicas revelada con Anisaldehído

**Muestra:**

R1 Extracto metanólico Recolecta 1

R2 Extracto metanólico Recolecta 2

**Sistema de elusión:** Hexano: Acetato de Etilo 7:3**Revelador:** Anisaldehído**Extracción específica para alcaloides.**

Los perfiles cromatográficos de los extractos para la detección de alcaloides obtenidos por medio de tres diferentes métodos, muestra una mayor abundancia de compuestos con la extracción básica a partir de hoja, sin embargo, no se observó la presencia típica de alcaloides con ninguno de los reveladores empleados **Figuras 12 y 13**.



1 2 3

**Figura 12.** Placa cromatográfica de las extracciones alcaloideas reveladas con reactivo de Dragendorff

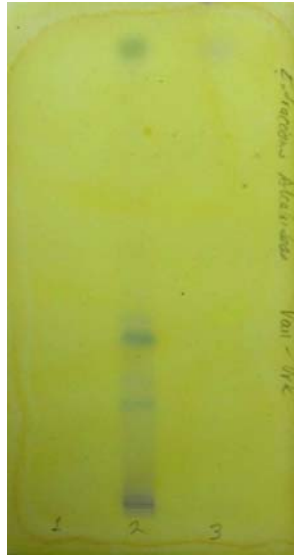
**Muestra:**

1 extracción ácida con hoja seca

2 extracción básica con hoja seca

3 extracción ácida con extracto

**Sistema de elusión:** Cloroformo: Metanol 9:1**Revelador:** Dragendorff



1 2 3

**Figura 13.** Placa cromatográfica de las extracciones alcaloideas reveladas con reactivo de Van-Urk

**Muestra:**

- 1 extracción ácida con hoja seca
- 2 extracción básica con hoja seca
- 3 extracción ácida con extracto

**Sistema de elusión:** Cloroformo: Metanol 9:1

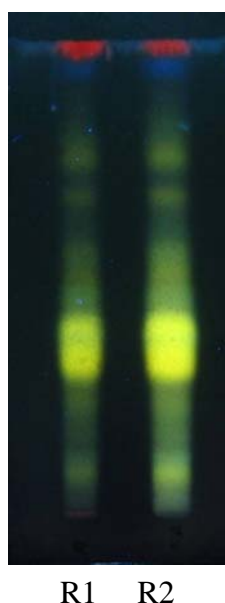
**Reelador:** Van-Urk

**Extracción de Flavonoides**

Placa de los extractos obtenidos mediante la extracción específica para flavonoides usando metanol al 80%. En la **Figura 14** se muestra el perfil cromatográfico obtenido para ambas recolectas revelados con RPN y observados bajo luz UV de onda larga ( $\lambda=356\text{nm}$ ).

Para la detección de flavonoides en cromatografía en capa fina los dos extractos muestran una similitud importante, aunque es posible observar una mayor concentración de los mismos en R2. En este sentido es importante considerar la actividad de estos compuestos con base en su participación como protectores frente a la incidencia de rayos UV (López, 2005). El clima influye sobre las plantas y su producción de compuestos, esta influencia podría ser el causante de esta diferencia en la concentración que se infiere por la placa presentada.

En la extracción específica para flavonoides, es posible observar una mayor concentración para la segunda recolecta, la coincide con la temporada de lluvias durante la cual la planta conserva sus hojas. El papel de los flavonoides como protectores de las hojas, no se limita a la protección contra la luz UV, ya que también pueden ser importantes disuasores de insecto herbívoros cuando se encuentran como glicósidos de flavonas y flavonoles (Barceló, 1992)



**Figura 14.** Placa cromatográfica de las extracciones de flavonoides revelada con RPN

**Muestra:**

R1 extracción con metanol al 80% realizada con planta seca de la recolecta 1

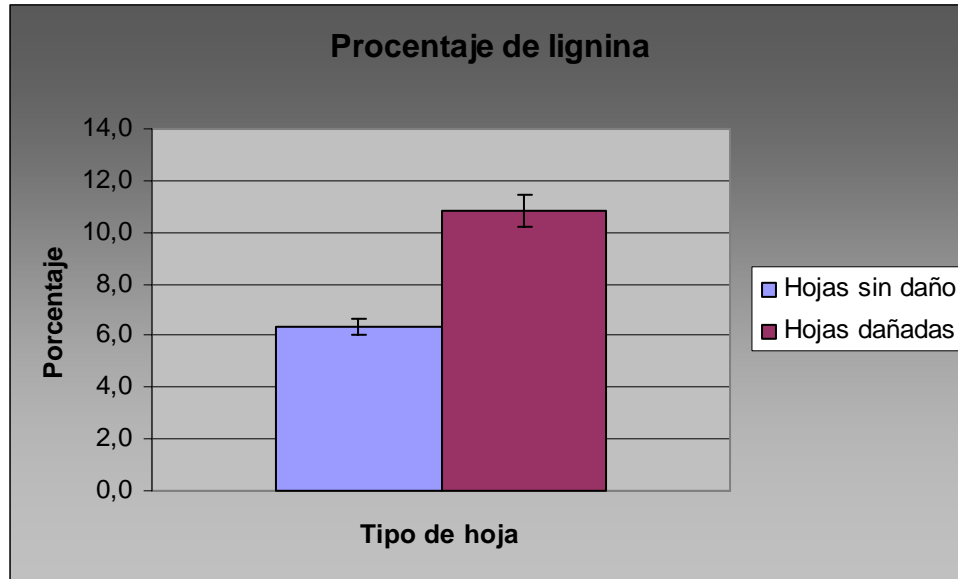
R2 extracción con metanol al 80% realizada con planta seca de la recolecta 2

**Sistema de elusión:** Acetato de Etilo: Ácido Acético: Ácido Fórmico: Agua 68:8:8:14

**Revelador:** RPN (2-aminoetil difenilborato)

**Lignina y ácidos fenólicos.**

Los resultados respecto la concentración de ácidos fenólicos y lignina muestran un mayor porcentaje de lignina para las hojas de *Oomphalea oleifera* que presentaban daño evidente causado por herbívoros, las medias de porcentaje de lignina para ambas muestras son presentadas en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Comparación gráfica de los promedios de los valores de lignina para las muestras de los dos distintos tipos de hoja.

Los ácidos fenólicos se encuentran presentes en la mayoría de las plantas debido a que se transforman en derivados combinados con proteínas como fitoalexinas, diversos flavonoides (antocianinas) y lignina, esta última además de desempeñar la función de sostén, proporciona protección frente a organismos patógenos y al consumo por herbívoros (Swain 1979, Salsbury 1994).

En los diferentes estudios del desarrollo de la planta la concentración de compuestos fenólicos puede aumentar como respuesta al ataque por algún depredador (Morse y Col.. 1991). Los resultados obtenidos son consistentes con lo mencionado por Coley (1988) y Morse y Col.. (1991) ya que se observó un aumento en la concentración de lignina y compuestos fenólicos evaluados en el tejido foliar dañado en comparación con el no dañado.

Los resultados cualitativos obtenidos para los ácidos fenólicos clorogénico, cumárico ferúlico y cinámico, muestran una mayor intensidad en las manchas correspondientes a las hojas dañadas, en comparación con las manchas correspondientes a las

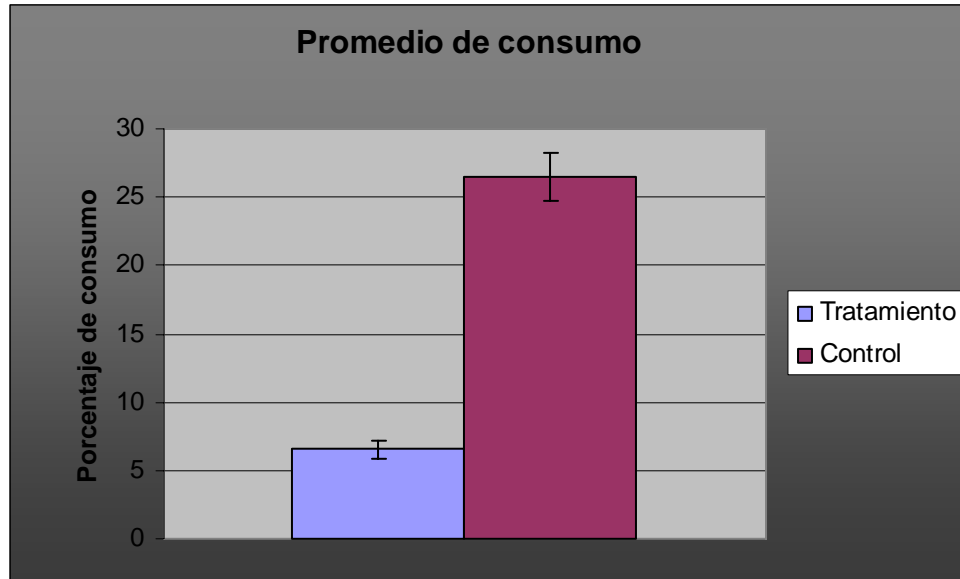
hojas sin daño. Lo anterior sugiere un aumento en la concentración de estos ácidos fenólicos para *O. oleifera*.

El aumento en la presencia de lignina en las hojas dañadas fue corroborada con un estudio histoquímico, en donde la mayor concentración se presenta en hojas (Com. Pers. Espinosa Matías Silvia). La asociación de lignina con los carbohidratos de la pared celular disminuye la digestibilidad, los monómeros fenólicos y la lignina inhiben el crecimiento microbiano y la digestión enzimática. (Price and Butler, 1980) De la proporción de lignina que tenga la pared celular dependerá su digestibilidad y la reducción de ésta se refleja en el bajo consumo por parte del herbívoro (Parsi J. y Col. 2001).

## **Ensayos Biológicos**

### **Ensayo de corta duración**

Este tipo de ensayos permite evaluar de manera relativamente rápida la actividad antialimentaria de un compuesto, por medio de la cuantificación del área consumida y la posterior comparación con datos de consumo de una planta neutral. Con los datos obtenidos mediante la medición de las áreas consumidas tanto en la muestra de hoja fresca de *Omphalea oleifera*, como en el control de hoja de lechuga se calcularon los porcentajes de hoja que se consumió durante el ensayo, mismos que fueron presentados en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Promedios de porcentaje de consumo obtenidos durante el ensayo de corta duración.

Los valores obtenidos fueron:

Porcentaje de discos tratados consumidos = 6.5

Porcentaje de discos control consumidos = 26.5

Aplicando el índice antialimentario de Alkofahi (**Fórmula 1**) a los datos anteriores de la muestra de hoja fresca de *Omphalea oleifera*, se obtuvo el siguiente resultado:

Índice Antialimentario = 19.8

El valor de dicho índice se interpreta con base en los estándares usados por Escoubas y Col. (1993) donde encontramos que cuando el valor del índice sea menor a 20, el tratamiento se considerará como supresor de la alimentación. Si el índice tiene un valor superior a 20 el tratamiento se considerará como inactivo. En cambio si el valor fuera cercano a 50 esto significaría que el tratamiento no presenta diferencias significativas en comparación con el control. En dado caso de que el tratamiento presente valores cercanos a 80 el tratamiento se consideraría como estimulante de la alimentación.

El valor del índice antialimentario obtenido para las hojas de *Omphalea oleifera* fue de 19.8, este valor se encuentra en el límite planteado para considerar al tratamiento como antialimentario. Sin embargo, no es posible decir que las hojas de *O. oleifera* posean esta actividad debido que el índice es muy cercano al límite que determina si el tratamiento es antialimentario o inactivo, aunque matemáticamente hablando se sugiere una ligera actividad antialimentaria que habría que corroborar con otros estudios. Esto motivo la realización de otro tipo de ensayos a fin de determinar la presencia o ausencia de actividad por parte de la planta.

### **Ensayo de larga duración**

Este ensayo permite evaluar de forma preliminar los efectos a largo plazo que provoca la administración de planta seca o extracto, en el desarrollo de larvas de *Spodoptera frugiperda*, de igual forma se puede evaluar la tasa de emergencia y la proporción de hembras-machos de las poblaciones bajo tratamiento, estos datos fueron comparados con los obtenidos para las poblaciones control.

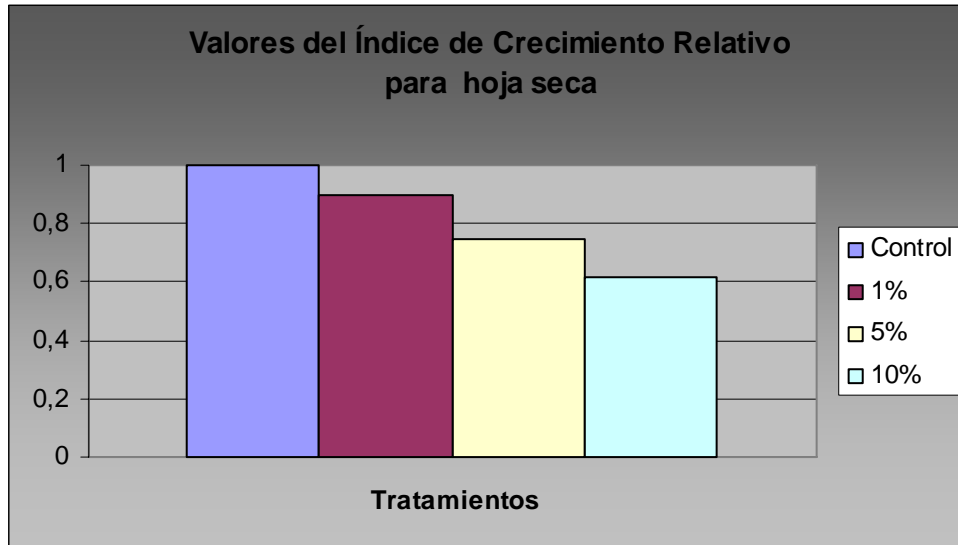
### **Ensayos con hoja seca**

Los datos de los ensayos realizados con hoja seca se utilizaron para calcular los valores de Índice de Crecimiento Relativo (ICR) son presentados en el **Cuadro 3**, los mismos valores son representados en la **Figura 17**.

<b>Hoja seca</b>	<b>1%</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>
<b>ICR</b>	0,90	0,75	0,61

**Cuadro 3.** Valores correspondientes a los Índices de Crecimiento Relativo para las diferentes concentraciones de hoja seca.



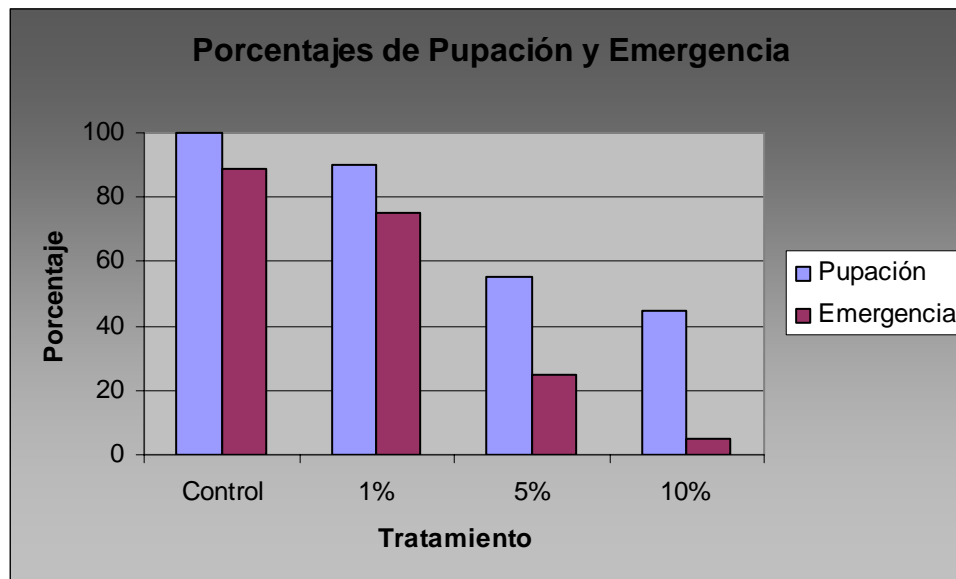


**Figura 17.** Comparación de los valores de los Índices de Crecimiento Relativo (ICR) obtenidos para las diferentes concentraciones de hoja seca y el control.

Los valores correspondientes a los porcentajes de pupación obtenidos durante el ensayo realizado con hoja seca así como los porcentajes de emergencia de individuos, son presentados en el **Cuadro 4** y en la **Figura 18**.

	Control	1%	5%	10%
<b>Pupación</b>	100	90	55	45
<b>Emergencia</b>	88,9	75	25	5

**Cuadro 4.** Valores de porcentaje correspondientes a la pupación, la emergencia de adultos.

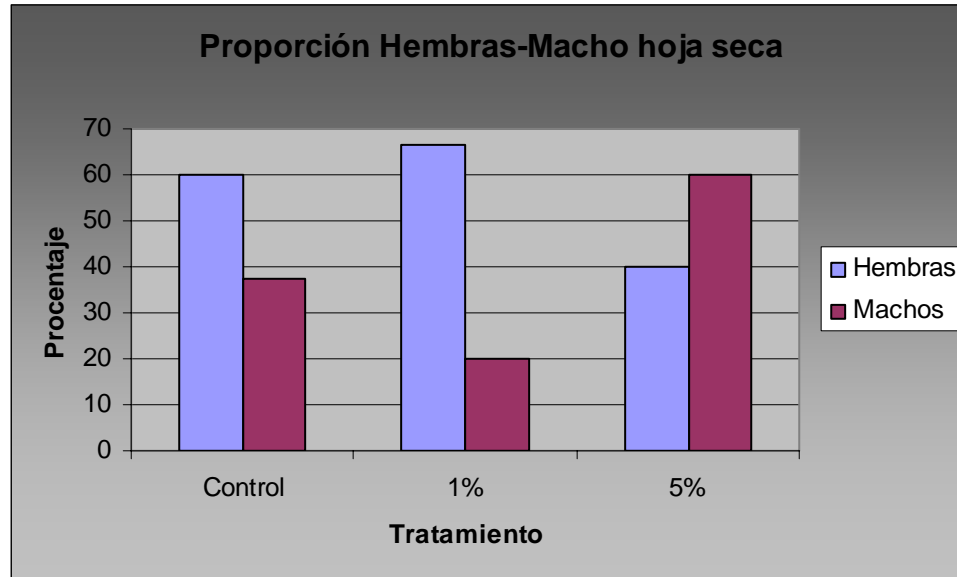


**Figura 18.** Comparación gráfica de los porcentajes de pupación y emergencia para el ensayo de hoja seca.

Los datos correspondientes a la proporción de sexos obtenida durante el ensayo con hoja seca se presentan en el **Cuadro 5** y la **Figura 19**. Los datos para la concentración de 10% no son presentados debido a que no fue posible obtener una identificación de sexos para los individuos que emergieron en dicho tratamiento.

	Control	1%	5%
<b>Hembras</b>	60	66,7	40
<b>Machos</b>	37,5	20	60

**Cuadro 5.** Valores correspondientes a la proporción de sexos obtenida para el ensayo con hoja seca.



**Figura 19.** Comparación de la proporción de sexos observada para el ensayo con hoja seca.

Uno de los ensayos realizados con la finalidad de determinar la posible actividad *de O. oleífera* consistió en el ensayo de larga duración en el que se incorporó hoja seca y molida a la dieta del insecto modelo. Los ICR obtenidos para este ensayo (**Figura 17**) muestran que entre el control y la concentración de 1% de hoja seca no se presentó una diferencia importante en el desarrollo, la concentración de 5% presentó una respuesta de retraso en el desarrollo en el tiempo respecto al control, mientras que la concentración de 10% presenta un retraso de cerca del 50%. Podemos observar que en el porcentaje de pupación y emergencia de adultos se percibe un efecto importante en los tratamientos a 5 y 10%, donde la pupación se encuentra alrededor del 50 % para ambos tratamientos, mientras que la emergencia se encuentra en el 25% del total de la población bajo ensayo a una concentración del 5%, mientras que para el tratamiento del 10% representa un 5% de emergencia para la población total bajo ensayo valor que es considerablemente bajo. Lo anterior indica un efecto a largo plazo por parte del tratamiento en el desarrollo del insecto modelo.

Además de un menor porcentaje de emergencia observamos que a partir de la concentración de 5% se presenta una inversión en la proporción normal de sexos, 1:1

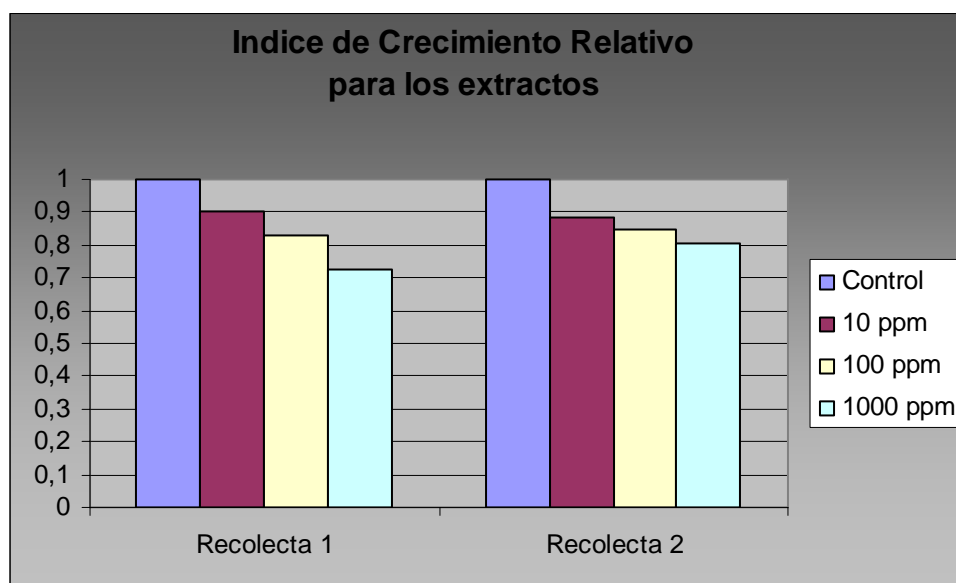
hembras machos (Owen y Col., 1973 en Llorente y Soberon, 1977). La concentración de 10% no se encuentra en la gráfica de sexos, debido a que los adultos que emergieron de esta concentración no presentaban las condiciones necesarias (coloración de alas, forma del abdomen) para determinar de manera confiable el sexo de los mismos.

### Ensayos con extracto

El valor de los Índices de Crecimiento Relativo (ICR) para los 2 extractos a las 3 concentraciones usadas, se presentan en el **Cuadro 6**, los mismos valores se muestran en la **Figura 20**, de tal modo que es posible observar una comparación entre las concentraciones y los tratamientos.

	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
<b>Recolecta 1</b>	0,9	0,8	0,7
<b>Recolecta 2</b>	0,9	0,9	0,8

**Cuadro 6.** Resultados de los ICR obtenidos para los diferentes extractos.

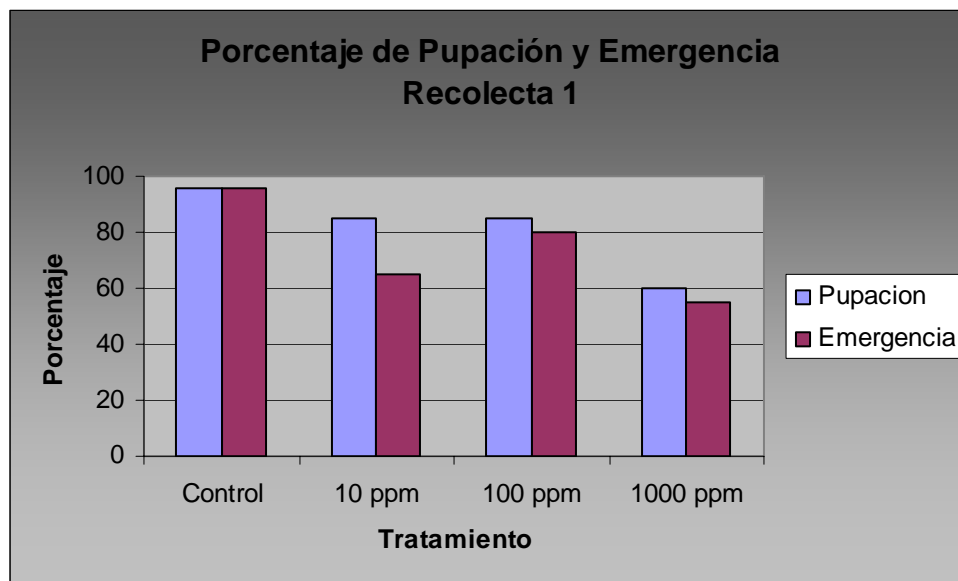


**Figura 20.** Valores de los Índices de Crecimiento Relativo obtenidos para las distintas concentraciones de cada recolecta.

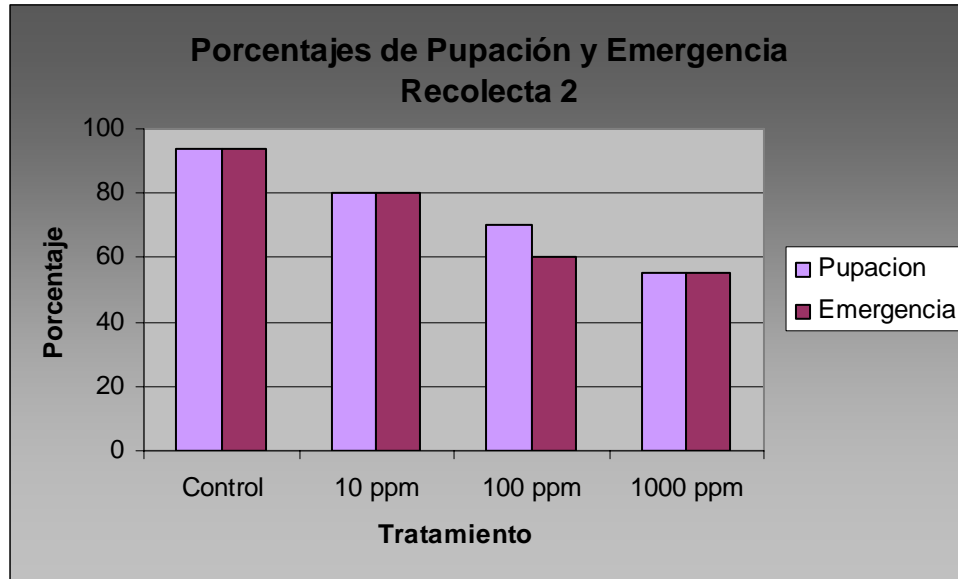
Los valores correspondientes a los porcentajes de pupación y emergencia obtenidos durante los ensayos realizados con extractos de ambas recolectas, son presentados en el **Cuadro 7**, mismos que son presentados en las **Figura 21 y 22**.

<b>Recolecta 1</b>	<b>Control</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
Pupacion (%)	96	85	85	60
Emergencia (%)	96	65	80	55
<b>Recolecta 2</b>	<b>Control</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
Pupacion (%)	94	80	70	55
Emergencia (%)	94	80	60	55

**Cuadro 7.** Valores de porcentaje correspondiente a la pupación, la emergencia de adultos.



**Figura 21.** Valores de los porcentajes de pupación y de emergencia de adultos para los ensayos realizados con los extractos correspondientes a la Recolecta 1.

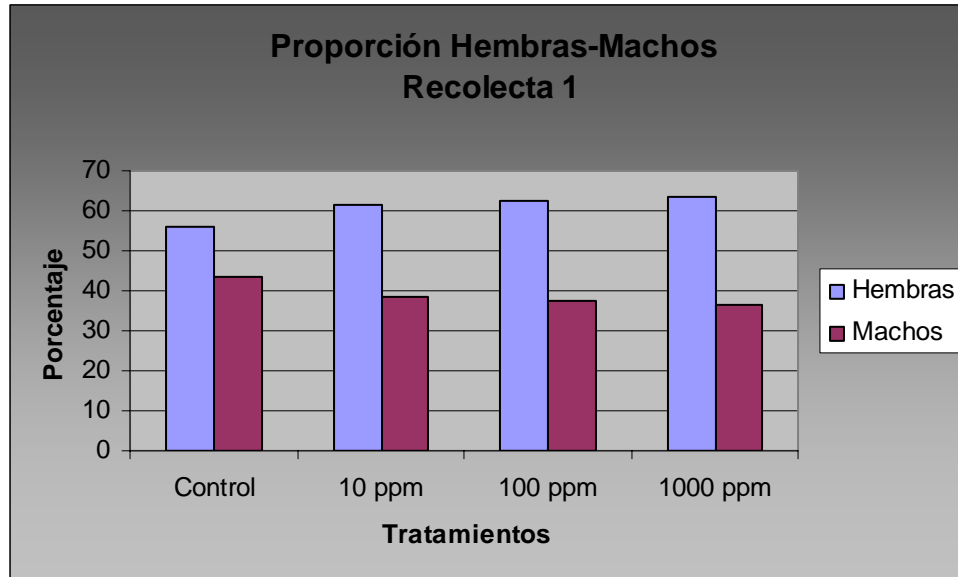


**Figura 22.** Valores de los porcentajes de pupación y de emergencia de adultos para los ensayos realizados con los extractos correspondientes a la Recolecta 2.

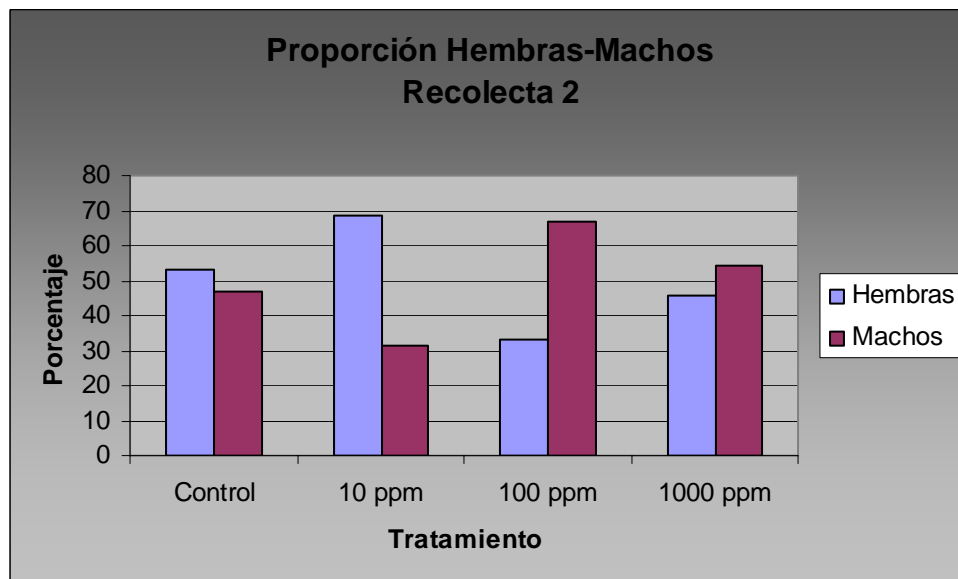
Una vez que emergieron las pupas se obtuvieron los valores de la proporción de hembras y machos para los tratamientos de ambas recolectas. Los datos de dicha proporción se representan en el **Cuadro 8**, mostrando los mismos en las **Figura 23 y 24**.

<b>Recolecta 1</b>	<b>Control</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
Hembras (%)	56	62	63	64
Machos (%)	44	38	38	36
<b>Recolecta 2</b>	<b>Control</b>	<b>10 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>1000 ppm</b>
Hembras (%)	53	69	33	45
Machos (%)	47	31	67	55

**Cuadro 8.** Valores correspondientes a la proporción de sexos encontrada en los ensayos realizados con el extracto metanólico de ambas recolectas.



**Figura 23.** Comparación de los valores correspondientes a los porcentajes hembra-macho para el ensayo realizado con el extracto de la Recolecta 1.



**Figura 24.** Comparación de los valores correspondientes a los porcentajes hembra-macho para el ensayo realizado con el extracto de la Recolecta 2.

Respecto a los ensayos de larga duración con extracto incorporado a la dieta observamos que las diferencias de los ICR son mínimos para ambas recolectas, aunque mas bajas para ambas recolectas en las concentraciones de 100 y 1000 ppm (**Figura 20**). Respecto al porcentaje de pupación observado para ambas recolectas nuevamente presenta una gran

similitud, siendo en este caso mas baja para la recolecta dos (**Figuras 21 y 22**). Para el porcentaje de emergencia se observa un comportamiento anormal para la recolecta uno en la concentración de 10 ppm pues con un porcentaje de pupación idéntico al de 100 ppm, observamos un porcentaje de emergencia mas bajo para al concentración de 10 ppm (**Figura 21**). Para la recolecta dos los porcentajes de emergencia se mantiene muy cercanos a los porcentajes de pupación, salvo para la concentración de 100 ppm (**Figura 22**). Respecto a la proporción de hembras machos observamos una proporción invertida para las concentraciones de 100 y 1000 ppm en la segunda recolecta siendo más marcado para la concentración de 100 ppm (**Figura 24**). Las variaciones en la proporción sexual de la población bajo ensayo se alejan bastante de la proporción normal de 1:1 hembras machos (Owen y Col., 1973 en Llorente y Soberon, 1977), las variaciones en estas proporciones influyen de manera negativa en la población.

Dado que la determinación sexual en lepidópteros obedece aun mecanismo genético (Traut y Marec 1997) las variaciones en la proporción de sexos estarían indicando una sensibilidad diferencial por parte de las larvas de *Spodoptera fugiperda* frente a los compuestos presentes en el extracto metanólico correspondiente ala segunda recolecta, Sin embargo, este fenómenos solo podría corroborarse con un análisis específico de la toxicidad de estos compuestos y efecto sobre la proporción de sexos.



## Conclusiones

Con base en el presente estudio se concluye que las hojas de *Omphalea oleifera* recolectadas en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, no presentan los alcaloides glicosidados presentes en *Omphalea diandra*. Sin embargo, la presencia de otros grupos de metabolitos (Terpenos, Esteroides, Flavonoides, Glucosidos, Lignina y Ácidos Fenólicos) sugiere un análisis exhaustivo de estos en otros órganos y etapas del desarrollo de la planta. La investigación más exhaustiva de la planta ayudara a entender el papel que esta juega en la interacción con su consumidor especialista.

Es sabido que un número importante de especies vegetales responden a la depredación por insectos por medio de la producción de lignina y otros compuestos asociados a la pared celular. Al realizar una comparación cuantitativa de la concentración de lignina en hoja para los dos tipos de muestras (con daño y sin daño por herbívoros) se evidencia una diferencias significativas a este respecto, por tal motivo se concluye que una respuesta por parte de la planta frente a la herbivoría por insectos es el aumento en la concentración de lignina en hoja lo cual puede ser considerado como un modo de reparación del daño ya que en el estudio histoquímica la concentración de lignina se observa alrededor del daño causado por el herbívoro (Espinosa S. datos no publicados)

Mediante el ensayo antialimentario realizado con hoja fresca, no fue posible determinar esta actividad en la planta, sin embargo, el ensayo realizado con hoja seca incorporada en la dieta mostró que las larvas de *Spodoptera frugiperda* se veían afectadas mediante un retraso en el tiempo de desarrollo respecto al control además de mostrar una alta mortandad durante el periodo de pupación lo que repercutió de manera significativa en el número de adultos obtenidos para las poblaciones bajo estudio.

Los ensayos de larga duración con extracto incorporado a la dieta mostraron una respuesta similar al ensayo realizado con hoja seca, es decir un retraso en el tiempo de desarrollo respecto al control y un aumento en la mortandad de las pupas. Cabe señalar que las respuestas observadas en estos ensayos no presentan diferencias significativas al comparar

entre los extractos de distintas temporadas del año. Resultados que concuerdan con los obtenidos de las pruebas generales de detección de grupos de metabolitos secundarios, donde la diferencia entre extractos es mínima. Se observó un aumento de tiempo en el desarrollo y una mayor mortandad durante la pupación para el ensayo realizado con hoja seca en comparación con los ensayos realizados con extractos metanólicos y los controles por lo que el retraso es atribuido a la alta concentración de lignina encontrada en la hoja y las consecuencias que tiene el consumo de lignina en los insectos herbívoros.

De este modo es posible concluir que en este caso en particular la lignina juega un papel importante en la reducción de herbivoría por parte de los insectos pues es posible observar un bajo consumo y un retraso en el crecimiento en los ensayos donde se administra hoja completa, esta respuesta ya no se presenta con la misma contundencia para los ensayos donde se administro únicamente extracto

## **Anexos**

### **Anexo 1**

#### **Preparación de la dieta artificial para *Spodoptera frugiperda***

##### Ingredientes

- Ácido sórbico
- Agua destilada
- Dieta para *Diatraea grandiosea* (Product N° F0635 Southwestern Corn Borer, Bio-Serv, Canada)
- Espiga de maíz esterilizada
- Formaldehído
- Levadura de cerveza
- Maíz molido
- Metil paraben
- Sulfato de neomicin
- Vitaminas (vitamin mix fortification lepidoptera Bio-Serv, Canada)

Para preparar 1 kg de dieta artificial se usa la siguiente receta:

Se mezclan de manera uniforme 60 g de dieta para *Diatraea grandiosea*, 100 g de maíz molido, 20 g de espiga de maíz esterilizada, 40 g de levadura de cerveza, 10 g de vitaminas, 0.6 g de sulfato de neomicina y 1.7 g de metil paraben. Esta mezcla de ingredientes secos se mezclan con 200 mL de agua destilada.

Se disuelven 10 gr de agar en 450 mL de agua destilada a punto de ebullición, una vez que el agar se haya disuelto completamente se agregan 150 mL de agua destilada para bajar la temperatura del agar.

Se disuelven 1.7 g de ácido sórbico en 17 mL de etanol caliente.

Todos los ingredientes mencionados se licuan juntos y se agregan 2.5 mL de formaldehído durante este proceso, después de 5 minutos de licuar de manera continua se deja enfriar la mezcla.

## **Anexo 2**

### **Pruebas para grupos de metabolitos**

#### Preparación de los reactivos

##### Reactivo de Liebermann-Burchard

Mezclar volúmenes iguales de anhídrido acético y cloroformo, se enfría la mezcla con ayuda de una cama de hielo, una vez enfriada la mezcla se agrega el mismo número de gotas de ácido sulfúrico concentrado como mL de cloroformo se hayan usado

##### Reactivo de Dragendorff

###### Solución A

Se disuelven 8 g de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 20 mL de  $\text{HNO}_3$  al 3%

###### Solución B

Se disuelven 27.2 g de KI en 100 mL de agua.

Una vez que se han preparado ambas soluciones, estas se mezclan.

##### Reactivo de ácido silicotúngstico

Se disuelven 5 g de ácido silicotúngstico en ácido sulfúrico 6 N y se afora a 100 mL

## **Bibliografía**

- Addor, R. W., 1994. Insecticides. In: A., G. C. R. (Ed.), *Agrochemical From Natural Products*. CRC Press, New York, p. 424.
- Akerele, O., 1993. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum* 1993, vol. 14, pp. 390-395.
- Bahena, F., 2003. Manejo agroecológico de plagas para una agricultura sostenible. In: Tornero, C. M., López-Olguín, J. F., Aragon, A. (Eds.), *Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Barceló, C., Nicolás, G., 1992. *Fisiología Vegetal*. Piramide S. A., Madrid, España.
- Blandrin, M., Klocke, J., Wurtele, E., Hugh, W., 1985. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science* 228, 1154-1160.
- Bongers, F., Pompa, J., Meave del Castillo, J., Carabias, J., 1988. Structure and floristic composition of the Lowland rain forest of Los Tuxtlas, México. *Plant Ecology* 74, 55-80.
- Carlini, C., Grossa de Sá, M., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.
- Chizón, S., 1984. Relación suelo-vegetación en la Estación de Biología Tropical, Los Tuxtlas Ver. (Un análisis de la distribución de los diferentes tipos de suelo en relación con la cubierta vegetal que soportan). *Escuela Nacional de Estudios Superiores (Zaragoza)*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Cole, M. D., 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect Assays-a critical review. *Biochemical systematics and ecology* 22, 837-856.
- Coley, P., 1988. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* 74, 531-536.
- CONABIO, 2000. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. In: *Biodiversidad*, C. N. p. e. C. y. U. d. I. (Ed.). CONABIO.
- Del Amo, S., Ramirez, J., Espejo, O., 1985. Variation of some secondary metabolites in juvenile stages of three plant species from tropical rain forest. *Journal of Chemical Ecology* 12, 2021-2038.
- Dirzo, R., Gonzales, E., Vogt, R. (Eds.), 1997. *Historia natural de los Tuxtlas*. UNAM, México D.F.

- Dirzo, R., Miranda, A., 2005. Contemporary Neotropical Defaunation and Forest Structure, Function, and Diversity—A Sequel to John Terborgh. *Conservation Biology* 4, 444-447.
- Dominguez, X., 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa, México.
- Dudt, J., Shure, D., 1994. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. *Ecology* 75, 86-98.
- Escoubas, P., Fukushi, Y., Lajide, L., Mizutani, J., 1992. A new method for fast isolation of insect antifeedant compounds from complex mixtures. *Journal of chemical ecology* 18, 1819-1832.
- Escoubas, P., L, L., J., M., 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomology experimental Appl.* 66, 99-107.
- Finch, S., 1986. assessing host-plant finding by insects. In: Miller, J., Miller, A. (Eds.), *Insect-plant interactions*. Springer-Verlag, New York, p. 342.
- Flores, J., Canto-Aviles, O., Flores-Serrano, A., 2001. Plantas de la flora yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano. *Rev Biomed* 12.
- Fraenkel, G. S., 1959. The raison d'Étre of secondary Plant Substances. *Science* 129 1466-1470.
- Garcia-Guzman, G., Dirzo, R., 2004. Incidence of leaf pathogens in the canopy of a Mexican tropical wet forest. *Plant Ecology* 172, 41-50.
- Gilbert, G., 1994. The relationships of Euphorbiae (Euphorbiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81, 283-288.
- Guevara, S., Meave, J., Moreno Casasola, P., Laborde, J., Castillo, S., 1994. Vegetación y flora de potreros en la sierra de Los Tuxtlas, México. *Acta Botánica Mexicana* 028, 1-27.
- Guevara, S. M., J. Moreno Casasola, P., 1994. Vegetación y flora en la sierra de los Tuxtlas, México. *Acta Botánica Mexicana* 28, 1-27.
- Hamburguer, M., Hostettmann, K., 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30, 3864-3874. .
- Ibarra, M., Sinaca, S., 1987. Listados florísticos de México VII. Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ibarra, M., Sinaca, S., 1995. Lista florística comentada de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical* 43, 75-115.

- Iriarte Vivar Balderrama, M., 1987. Analisis de crecimiento y plasticidad fenotipica de planudas de tres especies arboreas de una selva alta perenifolia. Facultad de Química. Universidad Nacional Autonoma de México, México, D. F.
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol* 51, 45-66.
- Jung, H., Fahey, G., 1983. Nutritional implicatiосn of phenolic monomers and lignin: A Review. *Journal of animal science* 57.
- Jung, H., Vogel, K., 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *Journal of animal science* 62, 1703-1712.
- Kite, G., Fellows, L., Lees, D., Kitchen, D., : Monteith, G., 1991. Alkaloidal glycosidase inhibitors in nocturnal and diurnal uraniine moths and their respective foodplant genera, *Endospermum* and *Omphalea*. *Biochem-Syst-Ecol* 19, 441-445.
- Kite, G. H., J. Romeo, J. Fellows, L. Lees, D. Scofield, A. Smith, N. :. 1990. Alphahomonojirymicinand 2,5-dihidroxymethyl-3, 4-dihidroxypyrrolidine: Alkaloidal glycosidase inhibitors in the moth *Urania fulgens*. *Phytochemistry* 29, 103-105.
- Kite, G., Scofield, A., Lees, D., 1997. Alkaloidal glycosidase inhibitors and digestive glycosidase inhibition in specialist and generalist herbivories of *Omphalea diandra*. *Journal of Chemical Ecology* 23.
- Kubo, I., 1991. Screening techniques for plant-insect interactions. In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds.), *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, pp. 179-193.
- Kubo, I., 1993. Insect control agents from tropical plants. In: Downum, K. R., al., e. (Eds.), *Phytochemical potential of tropical plants*. Plenum Press, New York, pp. 133-154.
- Kutchan, T., 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary Metabolism. *Plant Physiology* 125, 58-60.
- Laurance, W., 1999. Reflección on the tropical deforestation crisis. *Biological Conservation* 91, 109-117.
- Less, D., Smith, N., 1991. Food plant associations of the Uranninae (uraniidae) and their systematic, evolutionary, and ecological significance. *Journal of the Lepidopterists` Society* 45, 296-347.
- Levin, D., 1976. The Chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. . *Annual Reviews in ecology and systematics* 7, 121-159.

- Llorente, J., Soberon, J., 1977. Dimorfismo sexual, razón sexual y parasitismo en *Automeris leucane* (Séller) 1837 (Lepidoptera :Saturnidae). *Revista de la Sociedad Mexicana de Lepidopteros* 3, 29-31.
- Lopez Gasca, N., 2005. Determinación de la concentración de flavonoides y lignina en hojas de dos líneas de maíz con respuesta diferencial frente al ataque por *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Facultad de Estudios Superiores (Iztacala). Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala.
- Lot, A., 1976. La estación de biología tropical Los Tuxtlas: pasado, presente y futuro. In: Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Del Olmo, S., Butanda, A. (Eds.), *Investigaciones sobre la regeneración de las selvas en Veracruz*. Compañía Editorial Continental, México.
- Maxwell, F., Jennings, P., 1984. *Mejoramiento de plantas resistentes a insectos*. Limusa, México.
- Meinwald, J., 2003. *Speaking Out: The case for natural products research*. Chemical & Engineering News.
- Meyer, B., Ferrignol, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J., 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant research* 45, 31-34.
- Morse, S., Wratten, S., Edwards, J., Niemeyer, M., 1991. The effect of maize leaf damage on the survival and growth rate of *Rhopalosiphum padi*. *Annals of applied biology* 119, 251-256.
- O'Neal, M., Landis, D., Isaacs, R., 2002. An inexpensive method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *Journal of economic entomology* 95, 1190-1194.
- Opendor, K., 2005. *Insect antifeedants*. CRC Press, New York.
- Parsi, J., Godio, L., Miazzi, R., Echevarria, A., Provencal, P., 2001. *Curso de introducción a la producción animal 1*. FAV UNRC.
- Peeters, P., 2002. Correlations between leaf constituents levels and the densities of herbivorous insect guilds in an Australian forest. *Austral Ecology* 27, 658-671.
- Pezzuto, J., 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53, 121-133.



- Popma, J., Bongers, F., 1988. The effect of canopy gaps on growth and morphology of seedlings of rain forest species. *Oecologia* 75, 625-632.
- Rodríguez, C., 2003. Cuantificación de la inhibición de crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. In: Tornero, C. M., López-Olguín, J. F., Aragon, A. (Eds.), *Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable*. Bénemerita Universidad Autonoma de Puebla, Puebla, México.
- Rondón, J., 2002. Guía descriptiva de los barbascos de Venezuela. *Revista de la facultad de farmacia* 43.
- Rosenthal, G. A., Janzen, D. H. (Eds.), 1979. *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York.
- Salisbury, F., Cleon, R., 1994. *Fisiología Vegetal*. Iberoamericana, Mexico.
- Sánchez-Coronado, M., Coates, R., Castro-Colina, L., Gamboa de Buen, A., Paez-Valencia, J., Barradas, V., Huante, P., Orozco-Segovia, A., 2007. Improving seed germination and seedling growth of *Omphalea oleifera* (Euphorbiaceae) for restoration projects in tropical rain forests. *Forest Ecology and Management* Volume 243, 144-155
- SARH, 1994. *Inventario Nacional Forestal periodico 1992-1994*. In: SARH (Ed.), México.
- Seigler, D., Price, P., 1976. Secondary compounds in plants: primary functions. *The American naturalist* 110, 101-106.
- Seigler, D. S., 1994. Phytochemistry and sistematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81, 380-401.
- Smith, N. G., 1983. Host plant toxicicty and migration in the dayflying moth urania. *Florida Entomologist* 66.
- Swain, T., 1979. tannins and lignins. In: Rosenthal, G. A., Janzen, D. H. (Eds.), *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites 1: The chemical participants*, vol. 1. Academic Press, San Diego.
- Traut, W., Marec, F., 1997. Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research* 5, 283-291.
- Vit, P., 2004. *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 10 Flor de Navidad. *Revista de la facultad de farmacia* 46.

Zhang, N., Chaudhuri, S., Kubo, I., 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *Journal of Chemical Ecology* 19, 1109-1118.