



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO DE LOS PRODUCTOS
ANTIALIMENTARIOS CONTRA Spodoptera
frugiperda (J.E. SMITH) DE LAS SEMILLAS DE
Bursera grandifolia (ENGL.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ANAID SALGADO LÓPEZ



DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. BALDOMERO ESQUIVEL
RODRÍGUEZ

MARZO, 2009



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.

Hoja de Datos del Jurado

Formato	Ejemplo
1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Salgado Lopez Anaid 56 67 29 99 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 097563451
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor M en C Baldomero Esquivel Rodriguez
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra Patricia Guevara Fefer
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Dr Raul Contreras Medina
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 M en C Baldomero Esquivel Rodriguez
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 M en C Rosa Zugazagoitia Herranz
7. Datos del sinodal 5 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 5 Q F B Ana Adela Sanchez Mendoza
7. Datos del trabajo escrito. Título Numero de paginas Año	7. Datos del trabajo escrito Aisalmiento de los productos antialimentarios contra Spodoptera frugiperda (J E Smith) de las semillas de Bursera grandifolia (Engl) 71 p 2009

AGRADECIMIENTOS

Al **M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez**, mi tutor, por haberme dado la oportunidad de desarrollar uno de los trabajos más importantes de mi vida, mi proyecto de tesis bajo su asesoría, y por sus consejos brindados durante el desarrollo de la misma.

A la **Q. F. B. Ana Adela Sánchez Mendoza**, por el apoyo durante la realización del trabajo, y por sus valiosos consejos a lo largo de mi carrera como estudiante.

A la **Dra. Patricia Guevara Fefer** por haber confiado en mí, y por haberme brindado de su tiempo, apoyo, y sus valiosísimos consejos y sugerencias para la redacción y estructuración del presente escrito.

Al **Dr. Raúl Contreras Medina**, por sus consejos y comentarios acerca de mi tesis, así como por las enseñanzas recibidas durante mi faceta como estudiante.

A la **Dra. Rosa Zugazagoitia Herranz**, por sus conocimientos y comentarios emitidos en relación al presente trabajo.

Al **Dr. Eduardo Aranda †** y a la **M. en C. Laura Lina García**, por la aportación de las larvas de *Spodoptera frugiperda*, y de la dieta alimentaria de las mismas.

A la **M. en C. Rosalinda Medina** por haberme brindado su valiosa ayuda, al facilitarme material bibliográfico para la realización de la tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado la oportunidad de pertenecer a ella, aprender y crecer personal y profesionalmente, gracias a los conocimientos, vivencias y formación **universal** que me ha creado.

DEDICATORIAS

A Dios:

Dios mío, gracias por llenarme de bendiciones, por mi familia y amigos, y por estar siempre a mi lado. Así como, por las oportunidades que día a día se me presentan, y especialmente este día, te agradezco por permitirme concluir este trabajo, que significa mucho para mí.

A mi Padre:

Por haberme enseñado el valor del esfuerzo y lo que se puede lograr con la perseverancia. Gracias por tus consejos, ánimos y asesorías, en aquellas ocasiones complejas durante mi vida estudiantil. Y por lo más importante, tus cuidados y cariños que me has brindado. No hay como pagar todo esto.

A mi Madre:

Gracias por siempre apoyarme y brindarme tu cariño, y por estar a mi lado cuando más lo necesito. Así como, por desempeñar tu papel de madre como nadie más. Y por encender una luz de esperanza cuando el camino es duro y oscuro, y no encuentro la salida. Mil gracias.

A mi Abuelita (Lucía):

Gracias por una vida de cariño, cuidados, y amor inmenso e incondicional. Eres el pilar de nuestra familia, y la persona que me inculcó valores y una buena actitud frente a la vida. Gracias por todo. Te quiero mucho.

A Nayeli (mi hermana):

Gracias por siempre ver la vida con optimismo y objetividad, y contagiarme de ello. Así como, por tus consejos tan atinados que me hacen sentirme fuerte y segura para enfrentar los episodios que conforman mi vida. Gracias por enseñarme día con día, por ser mi amiga y mi hermana.

A Lalo (mi hermano):

Gracias por inculcarme la sed de triunfo, de crecimiento personal y laboral, y por enseñarme que las barreras no existen, uno se las pone. Asimismo, por ser mi compañero desde la infancia, y por compartir tantos y tantos recuerdos, y nuevas vivencias.

A Raymundo (mi alma gemela):

Tu ayuda para la realización y conclusión de mi tesis fue muy importante, gracias por tu apoyo y amor. Eres un rayito de luz que día a día me reinventa y me reanima. Dios quiera que estemos por siempre, uno para el otro. Amor, mis triunfos son también tuyos, y esta tesis también es para ti.

A Mariana:

Muchas gracias por tu apoyo, el cual fue realmente valioso para que pudiera concretar este proyecto. Así como, por tus alientos para animarme a concluirlo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
INDÍCE DE FIGURAS	3
1.0 INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	8
2.0 ANTECEDENTES	10
2.1. CLASIFICACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	10
2.1.1. FENILPROPANOS.....	11
2.1.2. ACETOGENINAS	11
2.1.3. TERPENOS	12
2.1.4. ESTEROIDES	13
2.1.5. ALCALOIDES	14
2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS COMO INSECTICIDAS Y ANTIALIMENTARIOS DE ORIGEN NATURAL	16
2.3. GÉNERO <i>BURSERA</i>	18
2.3.1 DESCRIPCIÓN	18
2.3.2. SECCIONES DEL GÉNERO <i>BURSERA</i>	19
2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y GENERALIDADES	19
2.3.4. EL GÉNERO <i>BURSERA</i> EN MÉXICO	20
2.3.5. <i>BURSERA GRANDIFOLIA</i>	22
2.3.6. ESTUDIOS QUÍMICOS DEL GÉNERO <i>BURSERA</i> ..	24
2.4. <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	26
2.4.1. INSECTO MODELO	26
2.4.2. DESCRIPCIÓN	27
3.0 MATERIAL Y MÉTODO.....	29
3.1. COLECTA DE MATERIAL.....	30
3.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	30
3.3. TIPOS DE BIOENSAYOS.....	30
3.3.1. ENSAYO DE ELECCIÓN.....	31
3.3.2. CULTIVO Y ELECCIÓN DE LAS LARVAS DE <i>S.</i> <i>FRUGIPERDA</i>	33
3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	34
3.5. SEPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	35
3.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A MASAS.....	35
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36

4.1. EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA ALIMENTACIÓN DE S. FRUGIPERDA.....	36
4.2. SEPARACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO.....	39
4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXANICO.....	40
4.3.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 9-27 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	42
4.3.2. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 28-30 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	44
4.3.3 EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 73-78 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	45
4.3.4. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 90-94 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	46
4.4. EVALUACIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA.....	47
4.4.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIONES 28-30 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	48
4.4.2. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-1 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	49
4.4.3. ELUCIDACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-1 DEL EXTRACTO HEXÁNICO.....	51
4.4.4. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-2 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	57
4.5. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES 31-33 Y 59 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	59
4.5.1. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 31-33 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	60
4.5.2. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 59 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO.....	62
5.0. CONCLUSIONES.....	64
6.0. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIG. 1. Interacciones entre plantas e insectos.....	9
Tabla A. Modos de acción de los principales metabolitos secundarios en las interacciones planta-insecto.....	15
FIG. 2. Distribución en la República Mexicana de especies pertenecientes al género <i>Bursera</i>	21
FIG. 3. Individuos de <i>Bursera grandifolia</i>	23
FIG. 4. Imágenes de Adulto (izquierda) y larva (derecha) pertenecientes a la especie <i>S. frugiperda</i>	28
FIG. 5. Proceso de separación y bioevaluación de los extractos obtenidos.....	29
FIG. 6. Diagrama de la perforación del agar con el sacabocados de 1.1 cm de diámetro.....	32
FIG. 7. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> frente al extracto crudo acetónico.....	36
FIG. 8. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> frente al extracto crudo hexánico.....	37
Tabla B. Consumo foliar e índice antialimentaria de las fracciones del extracto acetónico y hexánico.....	37
FIG. 9. Índices antialimentarios del extracto crudo hexánico.....	38
Tabla C. Sistema de eluyentes utilizados para la separación del extracto hexánico.....	39
Tabla D. Índice antialimentario y porcentaje de consumo foliar de las fracciones del extracto crudo hexánico.....	41
FIG. 10. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> frente a la fracción 9-27 del extracto hexánico.....	42
FIG. 11. Promedio de los porcentajes del Índice antialimentario de la fracción 9-27.....	43
FIG. 12. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la fracción 28-30.....	44
FIG. 13. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> frente a la fracción 73-78.....	45
FIG. 14. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la fracción 90-94.....	46
Tabla E. Subfracciones de la columna flash de la fracción 28-30 del extracto crudo hexánico.....	48
FIG. 15. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la subfracción 28-30-1.....	49

Tabla F. Índice antialimentario y porcentajes del consumo foliar de las subfracciones del extracto crudo hexánico.....	50
FIG. 16. Cromatograma de la subfracción 28-30-1.....	51
Tabla G. Estructuras químicas, tiempos de retención, porcentajes de abundancia y clasificación de los compuestos de la subfracción 28-30-1.....	52
Tabla H. Actividad de compuestos encontrados en la fracción 28-301, obtenidos de la literatura.....	55
Fig. 17. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la subfracción 28-30-2.....	57
Fig. 18. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la subfracción 31-33.....	60
Fig. 19. Consumo foliar de <i>S. frugiperda</i> e Índice Antialimentario frente a la subfracción 59.....	62

RESUMEN

Las alteraciones de los cultivos generadas por animales son denominadas plagas, las cuales constituyen uno de los problemas más importantes para la agricultura. Para combatir este problema de forma más limpia y menos agresiva que la tradicional (uso de insecticidas sintéticos), se ha optado por el uso de insecticidas y antialimentarios de origen natural.

Las plantas del género *Bursera* se caracterizan por su gran diversidad en nuestro país, ya que forman parte de la vegetación dominante y codominante de los bosques tropicales caducifolios de México. Así como, por la presencia de flavonoides, triterpenos y lignanos. En estudios anteriores, se ha reportado la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos en extractos de las hojas de *B. grandifolia*. Asimismo, se ha observado que en el medio natural, esta especie es poco afectada por la herbivoría. Debido a lo anterior, surgió el interés de llevar a cabo un estudio químico biodirigido de los extractos crudos, fracciones, subfracciones y compuestos puros de las semillas de *B. grandifolia*.

Los extractos crudos (hexánico y acetónico), fueron evaluados de forma separada mediante bioensayos de elección, utilizando como insecto modelo a *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz). La concentración a la que se probaron los extractos fue de 1000 ppm. El análisis de datos se realizó mediante la utilización del índice antialimentario (% IA), y mediante el uso de la prueba estadística de t de Student.

Los resultados mostraron que no existe actividad antialimentaria del extracto crudo acetónico sobre el insecto, sin embargo, en el caso del extracto hexánico, los resultados fueron positivos.

Posteriormente, se probaron las fracciones, subfracciones y compuestos puros del extracto hexánico frente a *S. frugiperda*. Los resultados indicaron que existe actividad

antialimentaria por parte de una subfracción del extracto crudo hexánico (conformada por una mezcla de diecisiete compuestos), y por parte de un compuesto puro.

El análisis de los componentes de la mezcla se identificó a través de cromatografía de gases acoplada a masas, donde se observó que la mayoría pertenecían a los grupos de los ácidos carboxílicos y de los aldehídos. De los diecisiete componentes de la subfracción activa, sólo se identificaron catorce de ellos (Hexanal, Nonanal, E-2-Decenal, Ácido octanoico, Ácido decanoico, 3,7,11-Trimetil-1-dodecanol; 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona, Ácido hexadecanoico, E-2-Undecenal, (2E,4E)-2,4-Nonadienal, 4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona, 1-Hexadecanol, acetato, Ácido dodecanoico y Ácido Hexanoico). El compuesto puro que presentó actividad antialimentaria (β -sitosterol), fue determinado mediante la comparación de una muestra de la fracción contra un control, por medio de cromatografía en capa fina en un sistema de eluyentes 80:20 hexano/acetona.

1.0 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen distintos tipos de relaciones ecológicas mediadas por sustancias químicas, entre las cuales podemos mencionar la alelopatía, la comunicación (relaciones planta-planta), la polinización y la herbivoría (interacciones planta-insecto). Las plantas presentan distintos mecanismos de protección frente a los ataques de los herbívoros, como las defensas físicas, los metabolitos secundarios y las barreras nutricionales (Fig. 1). (Anaya, 2003)

La herbivoría se define como la relación antagónica planta-animal fitófago (Rodríguez, 2008), la cual acontece tanto en los ecosistemas como en los sistemas artificiales (sistemas agrícolas), por lo que no sólo genera consecuencias a nivel ecológico y evolutivo, sino también económico.

Las alteraciones de los cultivos generadas por animales se denominan comúnmente plagas (Carrero, 1995), las cuales constituyen uno de los problemas más importantes para la agricultura, debido a que ocasionan inestabilidad en los plantíos, reducción de la productividad y grandes pérdidas económicas (Altieri, Letourneau y Davis, 1983). Sin embargo, con el objetivo de minimizar los daños generados por las plagas, se realizan actividades de control y erradicación de estas poblaciones (Vandermeer, 1981). Existen distintos métodos para el control y la eliminación de las plagas, clasificados en relación al medio o agente utilizado para el desarrollo del proceso. El método más utilizado en la actualidad es el control de tipo químico (insecticidas sintéticos). Sin embargo, el uso de los métodos de control de tipo biológico (toxinas vegetales, parasitoides, bacterias, trampas con feromonas) ha aumentado con el paso del tiempo, al igual que el uso de variedades de plantas resistentes o con antibiosis (Morón, 1988).

En la actualidad se utilizan varios de los métodos ya mencionados para el manejo de las poblaciones de plagas. En el pasado y todavía hoy en día, el método más recurrente ha sido la aplicación de insecticidas de origen sintético, lo que ha generado resistencia de

ciertas poblaciones de insectos ante estas sustancias (Josivan do Nascimento, Diniz, Xavier de Mesquita, Martins de Oliveira y Costa, 2008), por lo cual, se ha recurrido a la implementación de métodos alternativos, en particular, la utilización de insecticidas producidos a partir de extractos de origen vegetal.

Los insecticidas vegetales se producen a partir de los metabolitos secundarios de las plantas. Los metabolitos secundarios son moléculas pequeñas producidas por organismos terrestres o marinos. Pueden obtenerse de individuos completos (planta, animal o microorganismo) o de segmentos de éstos (hojas, flores, órganos de animales, etc.) como compuestos puros o como mezclas de sustancias químicas. Dichos metabolitos secundarios son originados como consecuencia de una nutrición limitada, como mecanismos de defensa o como moléculas reguladoras. Asimismo, algunos actúan como antialimentarios, atrayentes sexuales, antibióticos, y en algunos casos, hasta el momento no se les ha encontrado actividad biológica aparente (Cannell, 1998).

Las sustancias químicas de origen vegetal producen distintos tipos de actividades biológicas sobre los insectos, ya que tienen la capacidad de actuar sobre la conducta y fisiología de los mismos. Los metabolitos secundarios (de acuerdo al tipo y cantidad) pueden alterar el ciclo de vida de los insectos, provocar la pérdida o supresión del apetito (a través de repulsión gustativa, alimento disuasivo o como antialimentario), disminuir el crecimiento de los individuos (Schoonhoven, 1982), y actuar como sustancias tóxicas provocando la muerte de los organismos.

Los extractos crudos de plantas con propiedades insecticidas se han utilizado desde la antigüedad como método para el control de las plagas (Gallo, Nakano, Silveira Neto, Carvalho, Baptista, Zucchi, Alves, Lopes, 2002). Entre los primeros insecticidas de origen vegetal utilizados para el manejo de poblaciones nocivas en los sistemas agrícolas (utilizados durante el período de 1900 a 1940), se encuentran la nicotina, las piretrinas, los rotenoides, las sabadillas y la ryana (Weinzierl, 2000). Los insecticidas vegetales más comerciales (ya que desde hace 150 años se producen para su comercialización) son las

piretrinas y los rotenoides (Isman, 1999), los cuales se utilizan para el control de una amplia variedad de insectos como los mosquitos, orugas, escarabajos, etc.

Los rotenoides, piretroides, alcaloides y terpenoides pueden interferir severamente en el metabolismo de algunos organismos, actuando como antialimentarios, repelentes o disuasivos en la alimentación de los insectos. Asimismo, estas clases de metabolitos secundarios pueden interferir en el proceso de oviposición, provocar esterilidad, bloquear el metabolismo e interferir en el desarrollo de los organismos sin causar necesariamente la muerte, según Medeiros (1990) y Lanher (2000) (Machado, Silva y Oliveira, 2007).

Los estudios acerca de la fitoquímica y de la bioactividad de los metabolitos secundarios de las plantas se han incrementado con el paso del tiempo. Sin embargo, aún queda mucho por investigar ya que hasta el momento se han descrito 100, 000 metabolitos secundarios, y se calcula que faltan miles o millones por descubrir (Anaya, 2003).

Debido a la gran variedad de metabolitos secundarios existentes, y a las distintas actividades biológicas que presentan frente a los insectos, la búsqueda de antialimentarios a partir de extractos vegetales se considera una de las alternativas más viables para el control de las poblaciones de plagas. El género *Bursera* constituye una opción viable para la búsqueda de antialimentarios, debido a que se distribuye ampliamente en México con una gran diversidad de especies, algunas de ellas caracterizadas por la presencia de flavonoides (Souza et al., 1989; Nakanishi et al., 2003), triterpenos (Pernet, 1972; Peraza-Sánchez et al., 1995; Syamasundar y Mallavarapu, 1995), sesquiterpenos (Barreira, et al., 1996) y lignanos (Peraza-Sánchez y Peña-Rodríguez, 1992). Algunas especies de *Bursera* producen resinas muy simples, conformadas por uno o dos monoterpenos; y otras especies pueden sintetizar mezclas complejas de compuestos pertenecientes al grupo de los terpenos. En particular, se ha descrito que la especie *B. grandifolia* presenta monoterpenos y sesquiterpenos (Zuñiga, et al., 2005).

Los terpenos presentan actividades biológicas como fungitóxicos, sedantes, excitantes, repelentes, atrayentes y actúan como factores importantes en la comunicación entre y dentro de las especies, lo cual se deba quizá a su volatilidad y diversidad estructural (Anaya, 2003). Algunas mezclas de distintos terpenos pueden ser almacenadas de forma sólida, la cual constituye la manera más efectiva para actuar como repelente. Asimismo las mezclas terpénicas que presentan actividad sinérgica pueden llegar a dar como resultado compuestos de gran toxicidad o sustancias disuasivas altamente efectivas (Becerra et al., 2001).

En virtud de lo anterior, el presente trabajo tiene los siguientes:

OBJETIVOS

- Obtener los extractos crudos, fracciones y compuestos puros de las semillas de *B. grandifolia*
- Evaluar la actividad biológica de los extractos crudos, fracciones y compuestos puros de las semillas de *B. grandifolia* sobre *S. frugiperda*.
- Contribuir al conocimiento sobre los metabolitos secundarios del género *Bursera*, en particular, de la semillas de *B. grandifolia*.

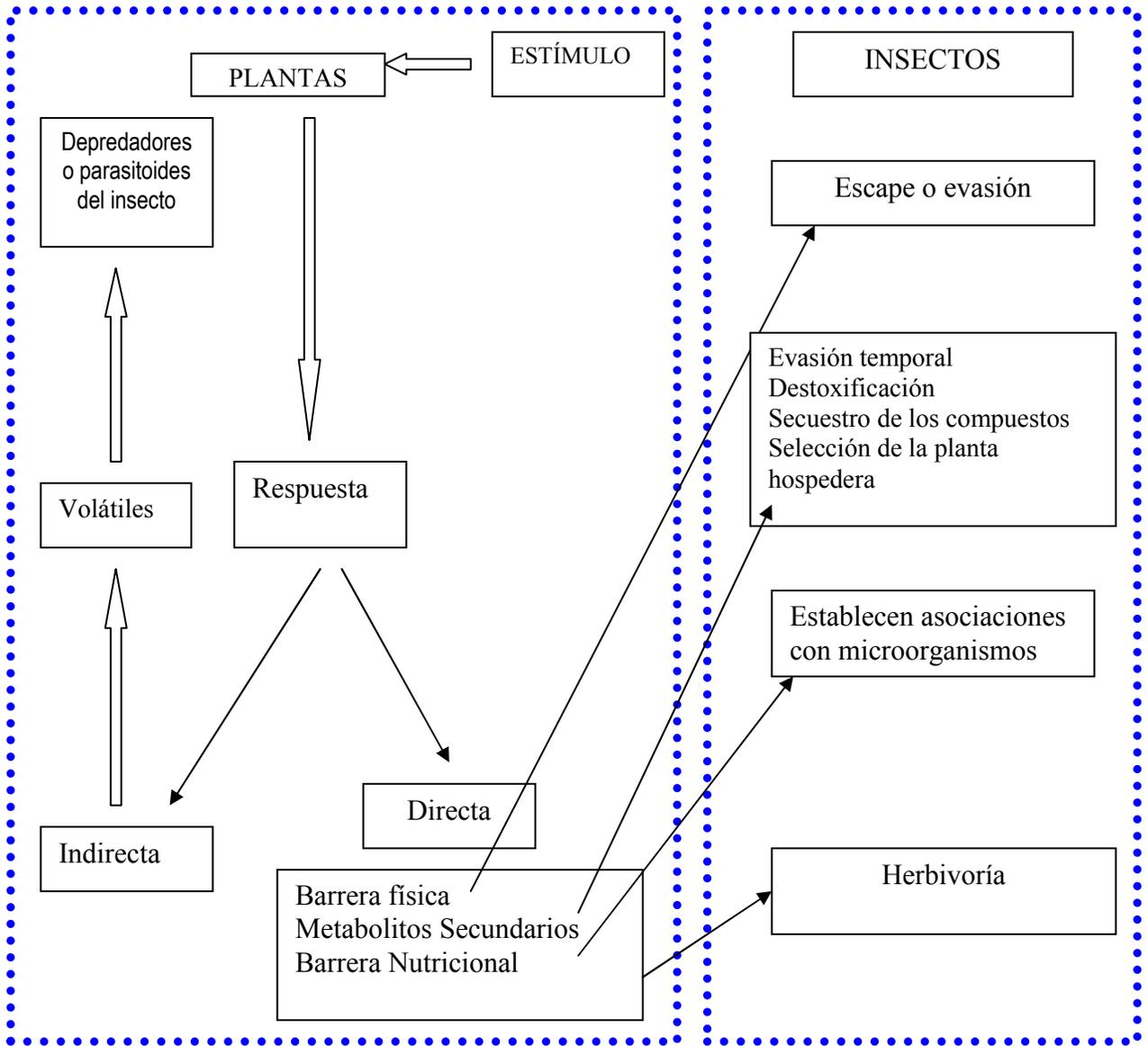


Fig. 1. Interacciones entre plantas e insectos. Tomado de Mello, et al., 2002

2.0 ANTECEDENTES

2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son sustancias de localización restringida ya que se encuentran distribuidos de manera heterogénea en los taxones de las plantas. Asimismo, existe variación de los tipos y concentraciones de metabolitos secundarios distribuidos en los órganos vegetales de una misma planta (hojas, tallos, corteza, semillas, etc.) (Schoonhoven et al., 2005). Algunos metabolitos secundarios se encuentran mayormente distribuidos que otros, ya que se localizan en gran variedad de grupos o especies de plantas (Anaya, 2003), como el alcaloide escopolomina que se ha descrito en el beleño blanco (*Hyoscyamus albus*), la burladora o borrachero (*Datura stramonium* y otras especies), la mandrágora (*Mandragora autumnalis*) y la escopolia (*Scopolia carniolica*); mientras que la distribución del alcaloide brucina se restringe a la nuez vómica (*Strychnos nux-vomica*) y a las habas de San Ignacio (*Strychnos ignatii*).

El metabolismo secundario se considera un aspecto de especialización celular con importancia ecológica para el organismo y no solamente para la célula sintetizadora (Anaya, 2003), ya que los metabolitos secundarios son utilizados por las plantas como mecanismos de defensa contra los insectos fitófagos.

La clasificación de los metabolitos secundarios en relación a sus estructuras moleculares se torna complicada, ya que diariamente se identifican gran cantidad de ellos (Schoonhoven et al., 2005). Debido a lo anterior, las clasificaciones de los metabolitos secundarios se realizan basándose en las rutas biosintéticas que participan en su formación o de acuerdo a las funciones ecológicas que desempeñan en la naturaleza.

Los metabolitos secundarios desde el punto de vista biosintético se clasifican de acuerdo a Whittaker y Fenny (1971) en:

1. Fenilpropanos
2. Acetogeninas
3. Terpenoides
4. Esteroides
5. Alcaloides

2.1.1. FENILPROPANOS

Estos productos naturales son derivados de la fenilalanina, el cual es un aminoácido aromático formado a partir de la vía del ácido shikímico. Los fenilpropanos se producen especialmente en hojas en desarrollo, sin embargo, también se sintetizan en tallos, frutos y hojas maduras. Algunos fenilpropanos como los taninos tienen la capacidad de hidrolizar alcaloides, gelatinas y otras proteínas (Anaya, 2003). Los taninos tienen la capacidad de actuar como repelentes de depredadores o de microorganismos. En los animales actúan como compuestos astringentes al precipitar las proteínas salivales, evitando que los tejidos vegetales sean comestibles; en el caso de los microorganismos, los taninos paralizan a las enzimas extracelulares impidiendo con ello la invasión de los parásitos a los tejidos de la planta (Fraenkel, 1959; Janzen, 1979).

Por su parte, el cinamaldehído (sintetizado en la canela) posee actividad aromática al igual que el eugenol (producido por el clavo), mientras que la capsaicina constituye el factor picante del chile. (Anaya, 2003).

2.1.2. ACETOGENINAS

Se conocen como acetogeninas o poliacétidos. Pueden ser sintetizadas por las plantas y microorganismos, aunque los hongos de vida libre y hongos en simbiosis con algas también producen acetogeninas (tetracétidos). Se biosintetizan principalmente a partir de la Acetil CoA, pero también interviene en la síntesis, la malonil CoA, entre otros precursores. Hasta el momento se han identificado alrededor de 1000 metabolitos que

corresponden a este grupo. Estos metabolitos secundarios poseen gran diversidad debido a que tienen la posibilidad de ciclarse de formas distintas (Anaya, 2003).

Entre los metabolitos secundarios pertenecientes a este grupo podemos mencionar al ácido úsnico, el cual es sintetizado por líquenes y posee actividad antibiótica; la piperina (acetogenina diabética) que constituye el principio picante de la pimienta; la coniina y plumbagina, entre otros. Asimismo, existen gran variedad de poliacétidos modificados que poseen distintas actividades biológicas (Tabla A), como los urushioles (producido por la hiedra venenosa) que son toxinas muy irritantes, el estilbeno (sintetizado en coníferas) que es un hidrocarburo no saturado y tóxico para hongos, peces, insectos y mamíferos pequeños, el girinal (elaborada por escarabajos) que es un antimicrobiano, el iridodial (producidas por hormigas *Iridomyrmex*) que es usado como defensa por las hormigas que lo producen, la griseofulvina (sintetizadas por hongos) que es utilizado como antifúngico (Anaya, 2003).

2.1.3. TERPENOS

Los terpenos o terpenoides son un grupo grande de metabolitos secundarios. Los terpenos presentan gran diversidad química y estructural, y son sintetizados a partir de dos vías; la vía del mevalonato que se desarrolla en el citoplasma (sintetizando sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos) y la vía de la Dexosi-D-Xylosa, la cual se lleva a cabo en los cloroplastos (sintetizando isoprenos, monoterpenos, diterpenos y carotenoides) (Schoonhoven et al., 2005). El esqueleto de los terpenos es sintetizado a partir de dos unidades de cinco carbonos (isómeros), denominados pirofosfato de isopentilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Zhang y Demain, 2005).

Los terpenos se pueden clasificar de acuerdo al número de unidades de isopreno que conforman a la molécula. Los hemiterpenos (una unidad), los monoterpenos (dos unidades), los sesquiterpenos (tres unidades), los diterpenos (cuatro unidades), los sesterpenos (cinco unidades), los triterpenos (seis unidades), los tetraterpenos (ocho unidades) y los politerpenos (más de ocho unidades) (Schoonhoven et al., 2005).

Los terpenos se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos, plantas y animales; presentan actividades biológicas (Tabla A) como fungitóxicos, sedantes, excitantes, repelentes, atrayentes y actúan como factores importantes en la comunicación entre y dentro de las especies, lo cual se deba quizá a su volatilidad y diversidad estructural (Anaya, 2003).

2.1.4. ESTEROIDES

Los esteroides se distribuyen extensamente en la naturaleza. Se biosintetizan a partir del difosfato de isopentilo, por medio de la misma secuencia de reacciones ocurridas durante la biosíntesis de los terpenoides. En este grupo de metabolitos secundarios se encuentran las hormonas sexuales de los mamíferos, el colesterol, esteroides, vitamina D, saponinas, ácidos biliares, etc. (Varro et al., 1979; Anaya, 2003).

Los primeros esteroides que fueron aislados, son los esteroides, nombrados de esta manera debido a su solidez. El esteroide más común es el colesterol, el cual se ha identificado en la membrana de las células animales, así como en helechos, algas, hongos y vegetales superiores. En los hongos, el esteroide principal es el ergosterol (28 carbonos), mientras que en los vegetales, el esteroide más importante es el β -sitosterol (29 carbonos), el cual es un polvo blanco, inodoro, insípido y prácticamente insoluble en agua, que se distribuye ampliamente en el reino Plantae (Varro et al., 1979).

Los esteroides presentan distintas actividades biológicas, actuando durante el desarrollo y control del aparato reproductor del ser humano (estradiol, progesterona, testosterona); como factor importante para la absorción adecuada del calcio y fósforo en los animales, durante la muda de los insectos (ecdisona) y como antibióticos (ácido fusídico), entre otros (Anaya, 2003).

2.1.5. ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico; gran parte de ellos son insolubles o poco solubles en agua y reaccionan con los ácidos para formar sales. La mayoría de ellos son derivados de un grupo concreto de aminoácidos (lisina, triptófano, histidina, ornitina y tirosina). Los alcaloides son sintetizados por microorganismos, plantas y animales. Sin embargo, la elaboración de estos compuestos es restringida a ciertos grupos de plantas (Schoonhoven et al., 2005; Anaya, 2003). Los alcaloides presentan distintos tipos de actividades biológicas (Tabla A), ya que se han reportado como estimulantes, repelentes, antialimentarios o sustancias tóxicas para insectos (Coll, 1988; Harborne, 1993; Anaya, 2003).

En la siguiente tabla podemos observar los modos de acción de algunos metabolitos secundarios:

GRUPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	MODO DE ACCIÓN	REFERENCIAS
Alcaloides	Tóxicos y disuasorios Insecticidas, repelentes y tóxicos Agonista de la acetilcoenzima A Inhibición de enzimas Interferencia con la replicación de DNA	Harborne, (1993) Schoonhoven et al., (2005) (Anaya, 2003) Sultana et al., (2002) Fellows et al., (1986) Wink, (2003)
Terpenos	Inhibición de enzimas digestivas Repelentes y disuasivos Inhibidores de la producción de la quitina y del proceso de muda	Koul, et al., (1996) Ave et al., (1987) Blackwell, (1996)
Monoterpenos Sesquiterpenos Diterpenos Saponinas	Fagoestimulantes y Disuasivos Tóxicos Algunos tóxicos Tóxicos (hemolíticos) Repelentes y disuasorios	Harborne, (1993) Schoonhoven et al., (2005) Soulé et al., (2000)
Acetogeninas Poliacetilenos	Antialimentarios Algunos tóxicos	Anaya, (2003) Harborne, (1993) Schoonhoven et al., (2005)
Fenilpropanos	Precipitación de las proteínas salivales Inmovilización de las enzimas extracelulares	Fraenkel (1959); Janzen, (1979)

Tabla A. Modos de acción de los principales metabolitos secundarios en las interacciones planta-herbívoro. Tomado de Harborne (1993), Anaya (2003) y Zuñiga (2005).

2.2. METABOLITOS SECUNDARIOS COMO INSECTICIDAS Y ANTIALIMENTARIOS DE ORIGEN NATURAL

Los daños generados por las plagas en los sistemas agrícolas son considerados como uno de los problemas más antiguos que afecta a la agricultura, ya que los perjuicios que genera llegan a ser enormes, ocasionando grandes pérdidas en la producción de alimentos y fuertes mermas económicas (Altieri, Letourneau y Davis, 1983).

Los sistemas agrícolas son sistemas frágiles e inestables que se encuentran propensos al ataque de plagas, ya que las interacciones tróficas se reducen al mínimo (Anaya, 2003) con el objetivo de evitar la competencia por recursos entre el cultivo y las especies vecinas. Asimismo, la falta de cobertura vegetal en ciertos estratos (originada por el procedimiento de siembra) promueve la erosión del suelo y las inundaciones, quedando totalmente a expensas del cuidado humano para su sobrevivencia (Altieri, Letourneau y Davis, 1983).

Debido a que los cultivos son sistemas frágiles a expensas del cuidado humano, se llevan a cabo distintos métodos de control de plagas con el objetivo de mantener y mejorar la producción. Los métodos mayormente utilizados son los de tipo químico, los cuales generan grandes daños ambientales, incrementando la contaminación del suelo, agua y aire debido a que son de lenta degradación y de amplio espectro (Coats, 1994). Debido a lo anterior, se han buscado alternativas menos nocivas para el control de las plagas, basándose en las interacciones ocurridas en la naturaleza, en particular la defensa de las plantas contra insectos y otros enemigos naturales mediante el uso de sustancias químicas de origen vegetal (productos naturales o metabolitos secundarios) (Sarker et al., 2006), toda vez que se ha descrito que varias de ellas actúan como mecanismos de defensa, antialimentarios, atrayentes sexuales o antibióticos contra los organismos fitófagos (Cannell, 1998). Un insecticida vegetal es aquella sustancia producida por las plantas como mecanismo de protección contra los insectos; como la nicotina, la anabasina, el piretro, la sabadilla, etc.

Los antialimentarios son sustancias de origen vegetal que alteran la conducta del insecto (actuando directamente en el sentido del gusto), al disuadirlo de continuar alimentándose (Isman et al., 1996). Por su parte, un repelente es una sustancia o mezcla de sustancias que en estado gaseoso produce fallas en la orientación del insecto, con el objetivo de alejarlo de su fuente de alimentación (Alzogaray et al., 2000).

Los insecticidas y antialimentarios de origen vegetal poseen características ventajosas respecto a los insecticidas sintéticos, ya que se degradan rápidamente, no dejan residuos tóxicos permanentes en el ambiente, son de baja peligrosidad para los organismos aledaños al sitio de aplicación, y presentan actividad ante algunas plagas resistentes a ciertos insecticidas sintéticos (Weinzierl, 2000). Por lo anterior, los insecticidas y antialimentarios de origen vegetal constituyen una alternativa interesante para el control de las plagas (Jain y Tripathi, 1993).

Debido a la gran variedad de los metabolitos secundarios (Anaya, 2003), así como al aumento del uso de bioinsecticidas comerciales en los últimos 10 años (10 al 15 % anual), (Menn y Hall, 1999), el número de investigaciones en torno a la búsqueda de nuevas sustancias vegetales con actividad insecticida o antialimentaria ha crecido.

Hasta el momento se han descrito 900 compuestos con actividad antialimentaria de un estimado de 100, 000 metabolitos secundarios (Koul, 2005), de los cuales aproximadamente 6, 000 corresponden al grupo de los alcaloides y 10, 000 son de origen terpénico (Dixon, 2001). La mayoría de los compuestos antialimentarios descritos hasta el momento pertenecen al grupo de los triterpenos, y otros tantos se han reportado dentro del grupo de los alcaloides, flavonoides y mezclas de aceites esenciales (Jain y Tripathi, 1993).

2.3. GÉNERO BURSERA

2.3.1. DESCRIPCIÓN

El género *Bursera* pertenece a la familia Burseraceae, la cual se distribuye en regiones subtropicales a tropicales de África y América (Egglí y Hartmann, 2002). Esta familia se encuentra representada en el territorio mexicano por 20 géneros y más de 600 especies (Rzedowski et al., 1992). Son árboles o arbustos perennes, algunos dioicos, la mayoría intensamente aromáticos, con corteza exfoliante y conductos resinosos (Domínguez et al., 1972).

El género *Bursera* se compone por más de un ciento de especies de plantas leñosas, arbustos altos caducifolios, o en su mayoría árboles bajos o altos resinosos-aromáticos, ya sean dioicos, polígamo-dioicos o rara vez monoicos (Egglí y Hartmann, 2002). La corteza del tronco regularmente es roja o amarillenta, y exfoliante; sin embargo, otras veces es grisácea, lisa y no exfoliante (Toledo, 1982).

Sus ramillas habitualmente son abreviadas (llamadas braquiblastos) sobre las cuales crecen las hojas generalmente en forma de rosetas; no presentan estípulas. La mayoría de las especies presentan hojas imparipinadas con folíolos opuestos, a veces bipinnadas o parcialmente bipinnadas, trifoliadas o unifoliadas (simples), glabras o pubescentes, raquis con o sin alas y margen de los folíolos entero o aserrado.

Las inflorescencias se encuentran comúnmente arregladas en racimos tirsoides, de pocas o muchas flores pequeñas (2 a 8 mm de diámetro). Flores femeninas (trímeras o tetrámeras y a veces pentámeras) y masculinas (tetrámeras o pentámeras, y pocas veces trímeras o hexámeras).

El gineceo es sincárpico con un ovario bilocular o trilocular. Sus frutos son drupas dehiscentes y tardíamente dehiscentes, de ovoides a esféricas, biconvexas, o más o menos

asimétricas, bivalvadas o trivalvadas, endocarpo con pseudoarilo carnoso, coloreado de color rojo, anaranjado o amarillento, y a veces de color gris o blanquecino; abrigado enteramente o únicamente la parte inferior, habitualmente hay una semilla por cada fruto (Toledo, 1982).

2.3.2. SECCIONES DEL GÉNERO *BURSERIA*

El género *Bursera* puede ser dividido en dos secciones *Bursera* y *Bullockia*; los primeros poseen corteza exfoliante, llamados comúnmente cuajotes, y los segundos no, nombrados comúnmente copales (Toledo, 1982). Sin embargo, el carácter fuerte y diferencial entre estos grupos, es el número de lóbulos en el ovario, y las valvas en el fruto. Las especies de *Bullockia* tienen ovarios biloculares y frutos bivalvados, mientras que las del grupo *Bursera* presentan ovario trilocular y fruto trivalvado (Toledo, 1982; Egli y Hartmann, 2002).

Sin embargo, no todas las especies pertenecientes a estos dos grupos cumplen con estas características, ya que entre la sección *Bullockia* (copales) hay especies que poseen corteza exfoliante (*B. mirandae*, *B. sarcopoda*, *B. aff diversifolia*) y en la sección *Bursera* (cuajotes) se ha encontrado una especie con corteza lisa *B. paradoxa*. El tipo de exfoliación de las especies pertenecientes a cada sección es distinta, ya que los cuajotes (sección *Bursera*) presentan exfoliación en capas delgadas, como papel; mientras que los copales (sección *Bullockia*) desprenden capas gruesas y duras, como si fuera cartón, casi siempre dispuestas verticalmente (Toledo, 1982).

2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y GENERALIDADES

El género presenta una distribución restringida al continente americano, desde los extremos del suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y Brasil, incluyendo las Antillas, Galápagos y Revillagigedo (Toledo, 1982; Rzedowski et al., 2004).

La mayor parte de las especies de dicho género habitan en regiones cálidas con temperaturas no por debajo de los 0° centígrados, así también en sitios subhúmedos y semisecos con precipitaciones anuales de 600 mm a 1000 mm, donde ordinariamente se presenta una época de sequía duradera. Sin embargo, algunas habitan en regiones templadas, cálido-húmedas o áridas. El clima más frecuente es cálido subhúmedo con lluvias de verano (AW) según Köeppen, modificado por García (1963).

Durante los meses de mayo y junio (finales de época de secas y principios de época de lluvias) la mayoría de las especies pertenecientes al género *Bursera* presentan su época de floración, y de julio a noviembre surgen los frutos (Toledo, 1982).

2.3.4. EL GÉNERO *BURSERA* EN MÉXICO

Las especies de *Bursera* son flora característica y usualmente dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México (Fig. 2). Se encuentran generalmente entre 0 y 1800 m de altitud; algunas llegan a habitar a los 2400 m s.n.m., y algunas otras habitan sitios más secos como los matorrales xerófilos. Sólo *B. simaruba* se ha encontrado en ambientes más húmedos, en bosques tropicales subcaducifolios y perennifolios (Rzewdoski, et al, 2004).

Hasta el año 2004 se identificaron un total de 80 especies bien definidas pertenecientes al género *Bursera*, las cuales se distribuyen en la República Mexicana, principalmente en la Región del Balsas (incluidos en esta región los estados de Michoacán y Guerrero) (Toledo, 1982; Rzedowski et al., 2004, 2005).



Fig. 2.- Distribución en la República Mexicana de especies pertenecientes al género *Bursera*.

2.3.5. *Bursera grandifolia* (Schl.) Engl.

Son árboles que llegan a medir 15 m y tener un diámetro de 70 cm (Fig. 9), su tronco se encuentra retorcido, y desde elevaciones bajas presenta divisiones en sus ramas. La corteza tiene un espesor total de 17 mm, la corteza interna es roja con secreciones poco copiosas, sin color, adherentes, con fluidez lenta; mientras que la corteza externa es de tonalidad verde oscuro, y al exfoliarse produce capas papiráceas rojas.

Las hojas son imparipinnadas, acomodadas en espiral, y conformadas por 5 a 7 folíolos opuestos de color verde fuerte en el haz y verde claro en el envés, uno y otros revestidos por pelos, pero sobre todo el envés. Los folíolos tienen forma elíptica-ovada a obovados (los cuales miden entre 6 x 3 cm y 11 x 6 cm), presentan margen entero, son de base obtusa y acuminados.

Las flores son completas y pequeñas, se encuentran en conjuntos que llegan a medir hasta 12 cm de largo. Las flores presentan 5 sépalos, 5 pétalos y 10 estambres. El gineceo es sincárpico con tres carpelos y placentación basal. Sus frutos miden 12 mm de largo, son trivalvados y se agrupan en racimos de tres a cinco frutos. Comúnmente se le conoce como “palo mulato” (Guizar y Sánchez, 1991).



Fig. 3.- Individuos de *Bursera grandifolia*.

2.3.6. ESTUDIOS QUÍMICOS DEL GÉNERO BURSERIA

Bursera es uno de los géneros más representativos de la familia Burseraceae en el Continente Americano y particularmente en México. Los árboles pertenecientes a este género producen resinas y exudados que son utilizados como sustancias antibacterianas y antiinflamatorias de uso tópico. La infusión de la corteza de *Bursera microphylla* es utilizada para combatir enfermedades venéreas; mientras que el extracto de *B. simaruba* se utiliza como diurético en los tratamientos para la diarrea, disentería e infecciones intestinales en distintos sitios de la República Mexicana. Los árboles de la especie *Bursera glabrifolia* comúnmente denominados “copales”, se incineran (desde la antigüedad) para ser utilizados durante las ceremonias religiosas. El perfil químico de este género incluye a los flavonoides, triterpenos, sesquiterpenos y lignanos. Algunos lignanos aislados de *Bursera* han mostrado actividad antitumoral (Zuñiga et al., 2005). En su mayoría se encuentran terpenos, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, así como diterpenos y triterpenos en menor proporción. Algunas especies de *Bursera* pueden producir resinas muy simples que consisten en uno o dos monoterpenos; y algunas otras especies pueden sintetizar mezclas complejas de compuestos pertenecientes al grupo de los terpenos. Algunas mezclas de distintos terpenos pueden ser almacenadas de forma sólida, la cual constituye la manera más efectiva para actuar como repelente. Asimismo las mezclas terpénicas que presentan actividad sinérgica pueden llegar a dar como resultado compuestos de gran toxicidad o sustancias disuasivas altamente efectivas (Becerra et al., 2001).

A continuación se mencionan algunos estudios de los metabolitos secundarios de las especies del género *Bursera*:

Wickramaratne et al. (1995) aislaron de tallos de *B. permollis*: éter metílico β -peltatin, éter metílico prico- β -peltatin, éter metílico dehidro β -peltatin y desoxipodofilotoxina (lignanos tóxicos). Peraza-Sánchez (1995) aislaron de la resina de *B. simaruba* monoterpenos, sesquiterpenos y un triterpeno de tipo lupano.

Por su parte, Evans et al. (2000) describieron la presencia de una mezcla de monoterpenos, principalmente β -felandreno y limoneno en las heces y regurgitaciones de los escarabajos del género *Blepharida* alimentados a partir de *B. schlechtendalii*; mientras que en el caso de los escarabajos consumidores de *B. biflora* se describe que sus heces y regurgitaciones contienen una mezcla más compleja y menos volátil que la de *B. schlechtendalii*, conformada por α -pineno, cuatro sesquiterpenos, fitol, ácido palmítico y varios compuestos no identificados debido a su complejidad. Los metabolitos secundarios de las heces y regurgitaciones son utilizados por los escarabajos como medio de protección, ya que se cubren con ellas el dorso con el objetivo de ahuyentar a los depredadores.

Hernández y col., (2003) aislaron de *B. kerberi* terpenos de tipo verticiliano. Zuñiga (2005) aisló dos terpenos del mismo tipo a partir de *B. multifolia*.

Por otro lado, Zuñiga (2005) describió la presencia de aceites esenciales en nueve especies del género *Bursera* (*B. aleoxyllon*, *B. lancifolia*, *B. longipes*, *B. áptera*, *B. glabrifolia*, *B. velutina*, *B. submoniliformis*, *B. morelensis* y *B. grandifolia*). Los resultados indican la presencia de monoterpenos como el α -terpinol, β -terpinol, limoneno, linalol, entre otros; sesquiterpenos como β -cubebeno, β - eudesmol, elemanol; diterpenos; hidrocarburos de cadena larga (hectadecano, tetracosano) y compuestos. Asimismo, la autora señala que las especies evaluadas presentan actividad antialimentaria frente a *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), ya que los metabolitos secundarios de las hojas actúan como agente disuasivo de la alimentación; de igual manera, los aceites esenciales (de las nueve especies) de los tallos afectaron el desarrollo de las larvas provocando una disminución en el peso de las mismas.

En 2005 Robles et al. aislaron en *Bursera graveolens*, tres triterpenos tetracíclicos los cuales fueron identificados como ácido β -elemónico, ácido α -elemónico y ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-oico. Así mismo describieron que el extracto etanólico de *Bursera graveolens* presenta efecto inhibitorio frente *Spodoptera aureus* al igual que la fracción de Acetato de etilo de la corteza de *B. graveolens*.

2.4. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

2.4.1. INSECTO MODELO

La elección de insectos modelo para la realización de bioensayos deberá realizarse tomando en consideración los hábitos alimenticios de éstos, así como la vulnerabilidad de los insectos frente a las sustancias químicas y la factibilidad de su manejo y crianza en el laboratorio.

Para la elección de un insecto modelo es importante tener en cuenta las diferencias entre los insectos especialistas y los generalistas. Los insectos especialistas tienen una dieta limitada (sólo se alimentan de una especie o de un grupo específico de plantas) y muchos de ellos no son capaces de consumir alimentos diferentes a su dieta habitual, asimismo son más vulnerables que los insectos generalistas a los aleloquímicos producidos por la planta hospedera a diferencia de los insectos generalistas que tienen la capacidad de adaptarse a un mayor número de compuestos de diferentes especies de plantas. Debido a lo anterior, el trabajar con insectos generalistas facilita el suministro de las sustancias químicas a evaluar (administradas en las dietas artificiales o en hojas de especies de plantas utilizadas en la realización de los bioensayos) (Schoonhoven, 1982). Asimismo, hay que considerar que algunos insectos no consumen el alimento si éste no contiene las sustancias fagoestimulantes necesarias para incentivar su apetito.

De acuerdo a lo anterior, para la realización de los bioensayos del presente trabajo se utilizaron larvas de *Spodoptera frugiperda*, ya que es un insecto generalista de fácil manejo y crianza en el laboratorio, capaz de adaptarse a una gran variedad de compuestos provenientes de diferentes especies de plantas y a dietas artificiales; además de representar un problema para la agricultura, ya que es una plaga importante a nivel económico.

2.4.2. DESCRIPCIÓN

Spodoptera frugiperda es un insecto generalista que pertenece al orden Lepidoptera; familia Noctuidae. Se le denomina comúnmente “gusano cogollero del maíz” (Fig. 10), ya que es plaga de los cultivos de maíz, frijol, alfalfa, sorgo, pastos, etc. (Villa y Castoreña, 2004). Se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales del mundo, y casi en la totalidad de la República Mexicana. Sus larvas son de tipo erusciforme con una longitud de 3 a 3.8 cm, tonalidad de pardas-amarillentas a pardas-oscuras; la cabeza es parda clara con reticulación y bordes oscuros, el tegumento posee granulaciones pequeñas, uniformes y planas (Morón, 1988).

Los adultos (Fig. 10) de la especie son palomillas de tonalidad gris oscura con una longitud de 20 a 25 mm, viven entre seis y diecisiete días; poseen una mancha conspicua en el extremo de las alas traseras (Morón, 1988; Figueroa, 2002). Las hembras depositan los huevos durante la noche tanto en el haz como en el envés de las hojas. Los huevecillos son acomodados en grupos de 10 a 300 huevos por puesta, cubiertos por segregaciones del aparato bucal y escamas del abdomen de la hembra. El período de incubación tiene una duración de tres a cinco días, la cual se lleva a cabo exitosamente cuando la temperatura es de 25° C o un poco mayor, donde el porcentaje de eclosión es entre el 90 % y 91 % (Morón, 1988).

Al nacer se alimentan raspando la epidermis foliar y posteriormente se trasladan hacia las hojas tiernas donde comen desmesuradamente, o a otras partes de la planta, o a plantas vecinas; habitualmente sólo hay una larva por verticilio, de esta forma se evita la competencia por alimento y el canibalismo. Las larvas (Fig. 10) presentan 6 o 7 estadios, siendo los 2 primeros cruciales para su supervivencia. El periodo promedio de vida de una larva es de 14 a 28 días dependiendo de las condiciones del medio. El primer estadio de la larva tiene una duración promedio de 2.6 días donde la cabeza es negra totalmente; el segundo dura 2.6 días y la tonalidad de la cabeza es café clara; el tercero dura 2.8 días;

el cuarto 3.7 días; el quinto 3.8 días y el sexto 6.6 días, en este último las larvas son de tonalidad caoba; en ocasiones se exhibe un séptimo estadio (Morón, 1988). Las larvas se alimentan de la base de la planta, cortando el tallo tierno, o también si las condiciones lo favorecen, completan su estado larvario en espigas, elotes o en los mismos cogollos (Ortega, 1987).

El periodo de prepupa tiene una duración de 1.5 días y cuando las condiciones son cálidas y secas caen al suelo e inicia la etapa de pupa en una cavidad de la tierra a unos cuantos centímetros de la superficie, tiempo después emerge el adulto (Ortega, 1987; Morón, 1988).



Fig. 4.- Adulto (izquierda) y larva (derecha) pertenecientes a la especie *Spodoptera frugiperda*

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS

*Activo
***Purificación de 3 fracciones con %IA positivos (1 por arriba del 25 % y 2 con % IA por debajo de éste)

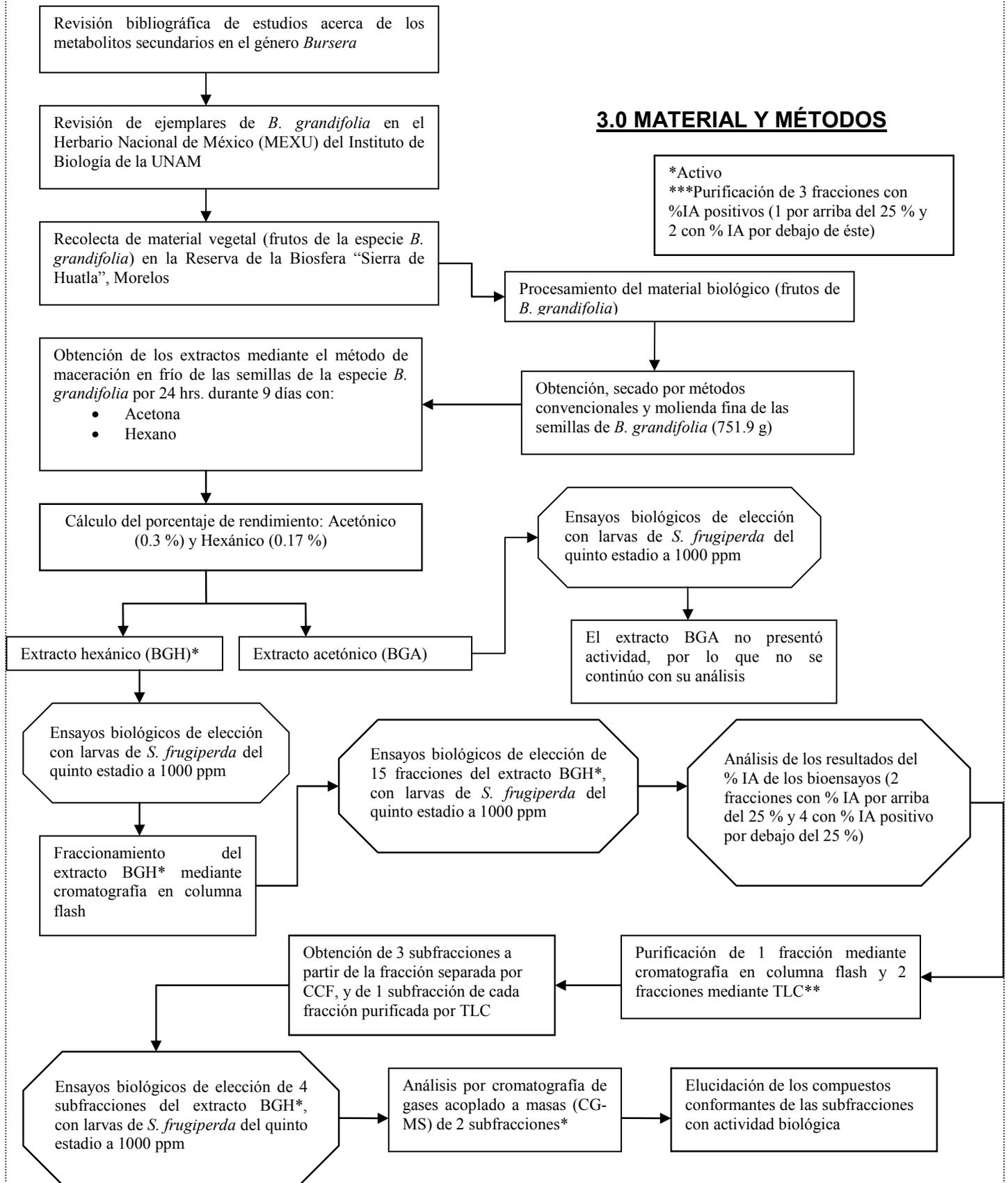


Fig. 5. Proceso de separación y bioevaluación de los extractos obtenidos

3.1. COLECTA DE MATERIAL

La colecta del material vegetal de *Bursera grandifolia* (frutos) se realizó en la Reserva de la Biosfera “Sierra de Huatla”, Morelos con coordenadas extremas: 18° 20'10'' y 18° 34'20'' N, 98° 51'20'' y 99° 08'15'' W según la Comisión Estatal del Agua y Medio Ambiente (CEAMA) del estado de Morelos; la localidad de recolecta se encuentra en los alrededores de Quilamula en el municipio de Tlaquiltenango, donde se recogieron frutos de los individuos de la localidad. Se prensaron 2 ejemplares para su posterior determinación taxonómica.

3.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los frutos fueron liberados de la testa y las semillas obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente. Por su parte, las testas se almacenaron a - 4° C (para conservarlas en óptimo estado) para su posterior utilización en la determinación taxonómica de los ejemplares. Una vez que las semillas estuvieron totalmente secas se procedió a registrar su peso (751.9 g), y posteriormente se trituraron (lo más finamente posible) mediante el uso de un molino manual. El polvo obtenido de la trituración de las semillas fue macerado en frío con disolventes orgánicos de diferente polaridad (primero hexano y posteriormente acetona), dejándolo reposar 9 días. Posteriormente se procedió a la evaporación del disolvente a presión reducida (mediante el uso del rotavapor), obteniéndose 1.3 g de extracto crudo hexánico (BGH) y 2.3 g de extracto crudo acetónico (BGA).

3.3. TIPOS DE BIOENSAYOS

Para determinar la actividad antialimentaria de los extractos se pueden llevar a cabo ensayos de elección (utilizados en el presente trabajo) y/o ensayos de no elección. Ambos ensayos son de corta duración. Los ensayos de elección como su nombre lo indica son aquellos donde el insecto tiene la posibilidad de elegir entre consumir de los discos foliares tratados o de los controles; en estos ensayos se evalúa el porcentaje del índice

antialimentario arrojado durante el experimento. Por su parte, los ensayos de no elección son evaluaciones donde las larvas no tienen la posibilidad de elegir entre consumir del tratamiento o control, ya que sólo se evalúa el potencial disuasivo de los extractos, fracciones o sustancias probadas frente al insecto.

En el caso de las pruebas de no elección de larga duración, la sustancia o sustancias a probar se colocan directamente en la dieta del insecto, no quedando la posibilidad de elegir entre consumir del control o tratamiento; por lo cual, las variables que se valoran durante este tipo de ensayos son el porcentaje de mortalidad de las larvas, tasa de sobrevivencia, peso, cambios fenotípicos y porcentaje de larvas que alcanzan el estado de pupa.

3.3.1. ENSAYO DE ELECCIÓN

Mediante la realización de ensayos de elección (González-Coloma, et al., 1995; Valencia et al., 2000) se determinó la actividad antialimentaria de cada uno de los extractos obtenidos (BGH y BGA) frente a *Spodoptera frugiperda*. En este ensayo la unidad experimental consistió de cajas de Petri de 15 mm x 90 mm las cuales contenían 20 mL de agar al 3%, de tal forma que el agar sirviese como soporte y al mismo tiempo para mantener la humedad en los discos foliares a utilizar. Posteriormente, se realizaron cuatro perforaciones circulares a cada una de las cajas de Petri (Fig. 6) mediante el uso de un sacabocados de 1.1 cm de diámetro; este mismo sacabocados fue utilizado para cortar las hojas de espinaca (*Spinacea oleraceae*) y obtener los discos foliares de prueba (de esta forma el área de los discos foliares quedó estandarizado), mismos que se colocaron de forma alterna (un tratado y un control) en los orificios hechos en el agar. A continuación, se añadió de manera uniforme 10 µL de solución del extracto hexánico a 1000 ppm (preparada a partir de 1 mg de compuesto disuelto en 1 mL de disolvente) a los discos foliares denominados tratamiento, y en el caso de los discos control se les suministro 10 µl de hexano para evitar resultados falsos-positivos. Después, se dejaron secar los discos foliares por un período de cinco minutos y a continuación se colocaron dos larvas de *Spodoptera frugiperda* del quinto estadio (sin haberseles alimentado un día antes) por cada caja de Petri. El procedimiento se repite para la evaluación del extracto

crudo acetónico, fracciones o compuestos a probar (1000 ppm), teniendo en cuenta que los discos foliares control deberán ser humedecidos con el disolvente utilizado para la obtención de estas sustancias. El ensayo se da por terminado cuando las larvas han consumido el 100 % del tratamiento o el 75 % del control (González-Coloma, et al., 1995; Valencia et al., 2000). Por cada evaluación del extracto, fracción o sustancia a probar, se realizaron tres bioensayos con cinco repeticiones (un bioensayo por día).

Para la evaluación de los extractos crudos frente al insecto modelo, se eligió la concentración a 1000 ppm, ya que en el extracto crudo existen gran cantidad de metabolitos secundarios combinados, donde algunas sustancias pueden enmascarar o disminuir la actividad biológica de otras. La evaluación de los metabolitos secundarios en una mezcla de menor número de componentes, o de forma pura, nos permite realizar bioensayos a concentraciones menores, ya que entre menos mezclados se encuentren estos compuestos, la actividad biológica de ellos será más directa sobre el insecto. Sin embargo, para el presente trabajo se realizó la prueba de actividad de las subfracciones y compuestos puros, a la misma concentración (1000 ppm) que la del extracto crudo, ya que se considera como una prueba preliminar para la realización de futuros bioensayos, a concentraciones diferentes.

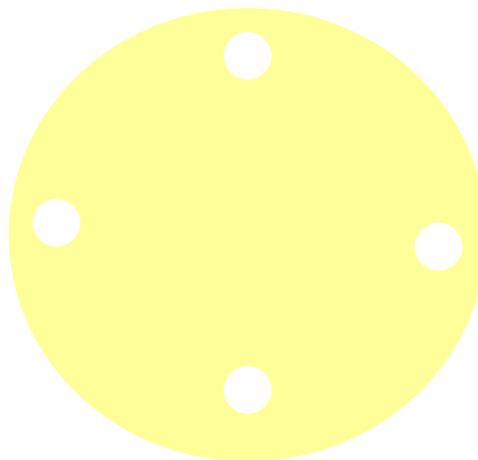


Fig. 6. Diagrama de perforación del agar con el sacabocados de 1.1 cm de diámetro.

3.3.2. CULTIVO Y ELECCIÓN DE LAS LARVAS DE *S. frugiperda*

Las larvas utilizadas para el desarrollo de los bioensayos fueron criadas en el laboratorio con fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25° centígrados \pm 1.5° C y 60 % de humedad relativa. La selección del estadio larval más adecuado para el desarrollo de los bioensayos se seleccionó tomando en cuenta que en la naturaleza se distribuyen individuos de *S. frugiperda* de distintos estadios, y que durante todas sus etapas larvales estos insectos son herbívoros (Sparks, 1979; Capinera, 1999), por lo que la sustancia antialimentaria o insecticida deberá controlar a la población en general y no sólo a una parte de ésta. Asimismo, se consideró la susceptibilidad a un mayor número de sustancias de los individuos pertenecientes a los estadios larvales tempranos (Gaugler y Mohillo, 1981; Navarro, 2009) respecto a los de los estadios larvales tardíos. De igual manera, se consideró que el mayor tamaño de las larvas de los últimos estadios, facilita el manejo de los individuos en los bioensayos (Lechuga et al., 2004) y la estandarización de los organismos utilizados en las pruebas biológicas de acuerdo a sus características físicas (el ancho de la cápsula encefálica, talla y peso de las larvas), con el objeto de evitar las posibles variaciones en los resultados a consecuencia de ello. Derivado de lo anterior, se seleccionaron larvas del quinto estadio para el desarrollo del presente trabajo, debido a su menor susceptibilidad frente a ciertos grupos de compuestos (ya que buscamos sustancias que ataquen en la medida de lo posible a la mayor parte de la población) al manejo práctico de estos individuos en el laboratorio, y a la facilidad de la estandarización de los organismos utilizados en los bioensayos. Asimismo, el utilizar larvas del quinto estadio permite la comparación de los resultados del presente trabajo con la mayoría de los estudios de esta clase, ya que generalmente se utilizan larvas del cuarto y/o quinto estadio para el desarrollo de dichas evaluaciones (Pérez, et al., 1992).

3.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

(ÍNDICE ANTIALIMENTARIO

Y PRUEBA ESTADÍSTICA)

Los resultados arrojados por las pruebas biológicas fueron evaluados mediante un índice antialimentario, donde $\%FI = (1 - (T/C)) \times 100$. Mientras mayor sea el porcentaje del índice antialimentario, mayor será la actividad del compuesto o sustancia probada; y si $\%FI = 100$ se considera que hay una total inhibición (Bentley et al., 1984; González-Coloma et al., 1996; Valencia et al, 2000).

Para calcular el índice antialimentario se procedió a determinar el área foliar consumida de cada una de las condiciones (control y tratamiento) probadas en las unidades experimentales. Por tal motivo, las piezas o fracciones de los discos foliares no consumidos fueron fijados en una hoja en blanco y escaneados, para después calcular el área foliar no consumida mediante el uso del programa “Scion image”. Posteriormente, se calculó el área foliar consumida de cada una de las condiciones probadas, restando el área foliar no consumida del área total foliar.

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de una prueba de t para datos dependientes, con el programa: Statistica V. 6.0. Con un nivel de significancia del 5%.

3.5. SEPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La separación de los componentes químicos de los extractos y fracciones que presentaron actividad biológica ante *S. frugiperda* se realizó por medio de una cromatografía en columna flash, donde se buscó el sistema de eluyentes más eficiente mediante placas cromatográficas de gel de sílice (ALUGRAM®, SIL G/UV₂₅₄), reveladas con una lámpara de luz ultravioleta (ENF-260C) y una solución de 1 % de sulfato de cério en ácido sulfúrico 2N, con el objetivo de conseguir una buena separación de los compuestos. El sistema de eluyentes inicial de la columna flash fue hexano al 100 %, incrementando la polaridad del sistema de acuerdo a las necesidades requeridas en la separación. La fase estacionaria fue sílice gel 60, Mesh 230 - 400, 60 Å, Merck.

3.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES, ACOPLADO A MASAS (CG-MS)

Los espectros de masas se obtuvieron mediante la utilización del aparato JEOL AX505HA, a 70 eV. La identificación de los compuestos se realizó a través del análisis y la comparación de los espectros obtenidos con los espectros de Publica NIST 1997, del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (librería interna), así como también con los espectros de la librería Wyley/NBS.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS EN LA ALIMENTACIÓN DE *S. frugiperda*

La actividad antialimentaria de los extractos crudos BGA y BGH frente a *S. frugiperda* fue evaluada mediante pruebas de elección. Los resultados arrojados (Fig. 7 y Fig. 8, respectivamente) por los bioensayos muestran el consumo foliar promedio de tres experimentos con cinco repeticiones (15 duplicaciones por cada extracto) realizados de forma independiente, donde se observa que la media del consumo foliar tratado con el extracto crudo hexánico (BGH) es menor que la media del consumo del control (Fig. 8), mientras que en el caso del extracto crudo acetónico (BGA) se observa una mayor cantidad de consumo del tratamiento que del control (Fig. 7). Probablemente, la preferencia por consumir más del control que del tratamiento del extracto crudo acetónico, se deba a que existan ciertas sustancias estimulantes de la alimentación para el insecto utilizado.

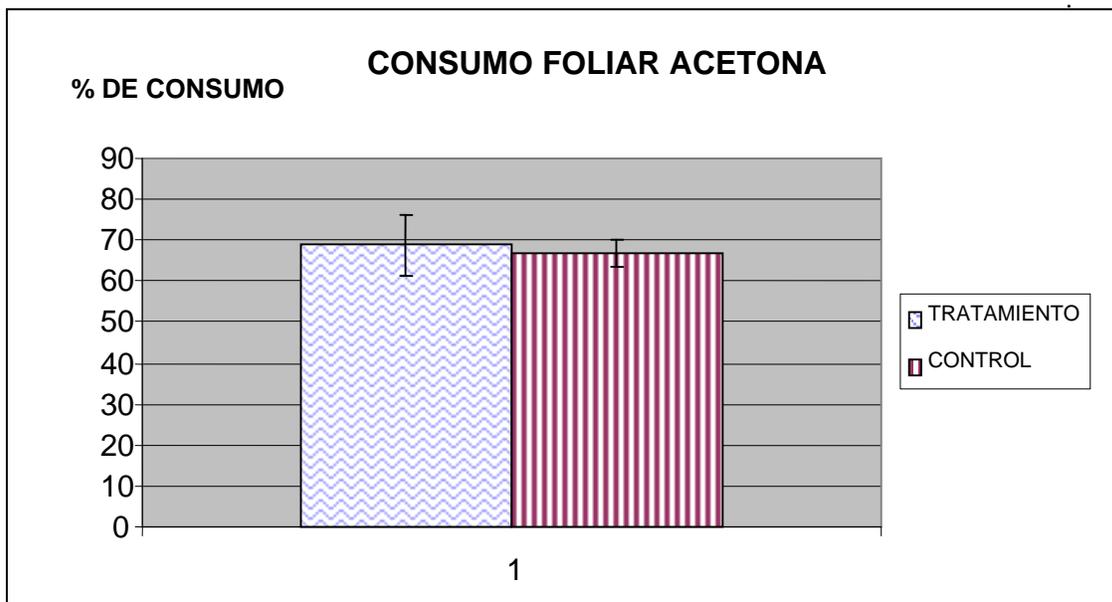


Fig.7.Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.4) y tratamiento (E.S.± 7.4) del extracto crudo acetónico de *B. grandifolia*. Con una $p= 0.05$ y $t= 0.21$.

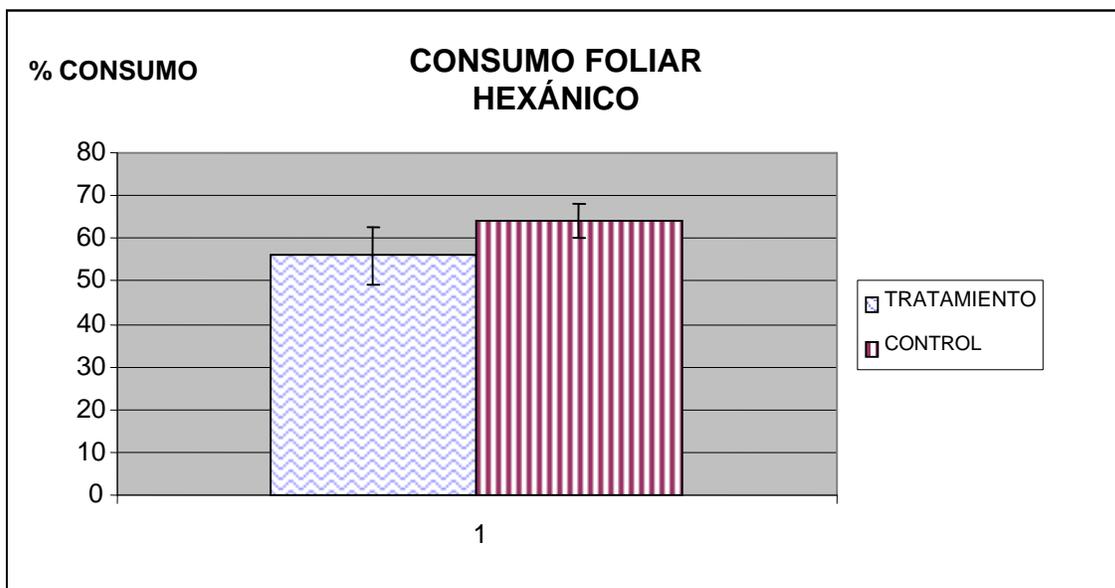


Fig. 8. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.8) y tratamiento (E.S.± 6.6) del extracto crudo hexánico de *B. grandifolia*. Con una $p= 0.05$ y $t= 0.96$.

De igual forma, al comparar el promedio de los índices antialimentarios de los dos extractos (Tabla B), se observó que el índice antialimentario del extracto hexánico a pesar de ser bajo (5.06 %) presenta valor positivo a diferencia del extracto acetónico (-12.41 %). No obstante, el valor del índice antialimentario del extracto BGH es muy pequeño, lo cual indica que posee baja actividad antialimentaria frente a *S. frugiperda* (González-Coloma et al., 1995; Valencia et al., 2000).

FRACCIÓN	% DE CONSUMO DE LOS DISCOS FOLIARES		% ANTIALIMENTARIO
	CONTROL	TRATAMIENTO	
BGA	66.90	68.80	-12.41
BGH	64.04	55.94	5.06

Tabla B. Consumo foliar e índice antialimentario de las fracciones del extracto acetónico y hexánico.

Por su parte, los índices antialimentarios de las repeticiones del extracto hexánico presentaron valores altos (Fig. 7) como 95 %, 77.28 % y 42.86 %; y algunos valores medios altos como 35 %, 33.33 %, 28.57 % y 28 %.

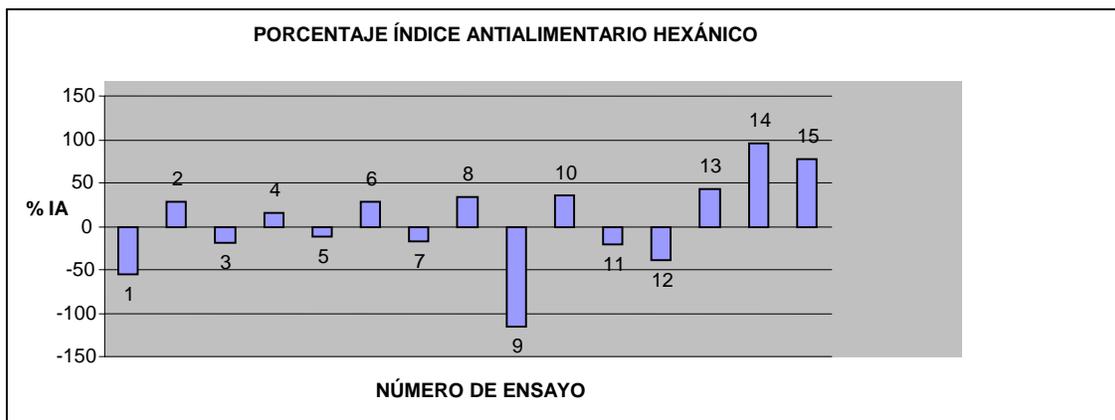


Fig. 9.- Índices antialimentarios del extracto crudo hexánico

Sin embargo, el estadístico de t de Student señala que no hay diferencias significativas entre las medias del control y tratamiento de ambos extractos, y por lo tanto, que no existe actividad antialimentaria de ninguno de los dos extractos probados frente a *S. frugiperda*.

Tomando en consideración los resultados anteriores, se procedió a realizar la partición y evaluación de la actividad antialimentaria de las fracciones del extracto crudo hexánico, teniendo en cuenta que el índice antialimentario de dicho extracto resultó ser positivo, aunque muy bajo, lo cual podría deberse a que la actividad de los metabolitos secundarios de carácter antialimentario podría estar disfrazada o disminuida al combinarse con otras sustancias de carácter fagoestimulante.

4.2. SEPARACIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO

A partir de la separación cromatográfica del extracto crudo hexánico se obtuvieron 168 fracciones (iniciando con las de menor polaridad) como se puede observar en la Tabla C. Las fracciones que presentaron r_f similares fueron reunidas, quedando finalmente un total de veintidós fracciones. De las veintidós fracciones totales sólo se evaluó la actividad antialimentaria de dieciséis (correspondientes al 72.72 % del total), ya que las cinco fracciones sin evaluar (1-8; 60; 110-112; 148-167 y 168) no contenían la cantidad suficiente de materia para llevar a cabo los bioensayos requeridos y para ser sometidas a técnicas espectroscópicas para su elucidación química.

En la siguiente tabla podemos observar el sistema de eluyentes que se utilizó para la separación y obtención de cada una de las fracciones del extracto crudo hexánico:

No. de fracción	Sistema de eluyentes
1-24	100 % hexano
25-59	95 % hexano/ 5 % acetona
60-83	90 % hexano/ 10 % acetona
84-112	80 % hexano/ 20 % acetona
113-121	70 % hexano/ 30 % acetona
122-146	50 % hexano/ 50 % acetona
147-167	25 % hexano/ 75 % acetona
168	1 L de acetona

Tabla C. Sistema de eluyentes utilizados para la separación del extracto hexánico.

**4.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIALIMENTARIA DE LAS FRACCIONES
DEL EXTRACTO HEXÁNICO**

La mayoría de las fracciones sometidas a evaluación del efecto antialimentario (Tabla D) frente a *S. frugiperda* presentaron datos negativos, lo cual nos indica que son sustancias que no poseen actividad antialimentaria frente al insecto. Probablemente, este valor podría indicar que son sustancias de carácter fagoestimulante para el insecto modelo. Sin embargo, no todas las fracciones se comportaron de esta manera, ya que las fracciones 9-27; 28-30; 73-78 y 90-94 presentaron porcentajes antialimentarios positivos (Fig. 11, 12, 13 y 14, respectivamente), y en algunos casos valores positivos muy altos (fracciones 9-27 y 90-94), como se puede observar en la siguiente tabla:

FRACCIÓN	% DE CONSUMO DE LOS DISCOS FOLIARES		% ANTIALIMENTARIO
	CONTROL	TRATAMIENTO	
9-27	81.93	36.94	53.78
28-30	62.77	56.94	4.45
34-36	64.99	68.60	!!!
37-42	64.41	69.99	!!!
43-58	42.77	49.72	!!!
61-67	71.60	68.33	!!!
68-72	66.94	58.05	!!!
73-78	71.38	68.33	5.42
79-83	54.90	80.14	!!!
84-87	68.88	59.16	!!!

88-89	72.77	63.88	!!!
90-94	84.96	62.77	23.34
95-109	53.33	49.94	!!!
113-147	64.72	76.38	!!!

Tabla D. Índice antialimentario de las fracciones del extracto crudo hexánico; y comparación del porcentaje de consumo foliar en el tratamiento y control de las fracciones del extracto hexánico; !!! Valor ≤ 0 %.

4.3.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 9-27 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

El consumo foliar en la fracción 9-27 muestra gran variación entre el porcentaje de consumo del control respecto al tratamiento, ya que, como se puede observar en la figura 10, el insecto modelo consumió mayormente las hojas control que las experimentales. Asimismo, en la mayoría de las pruebas de actividad biológica realizadas los índices antialimentarios fueron altos (Fig. 11), ya que solamente uno de los tres bioensayos reveló números por debajo, pero muy cercanos al 50 % (47.54). La media del índice antialimentario se encontró por arriba del 50 % (53.78), lo cual indicó que la fracción 9-27 actúa como buen antialimentario frente a *S. frugiperda* (Rodríguez, 2008). De igual forma, la prueba de t de Student indicó que existen diferencias significativas entre las medias de consumo del control y tratamiento, lo cual indicó que la fracción 9-27 actúa como antialimentario frente a *S. frugiperda*.

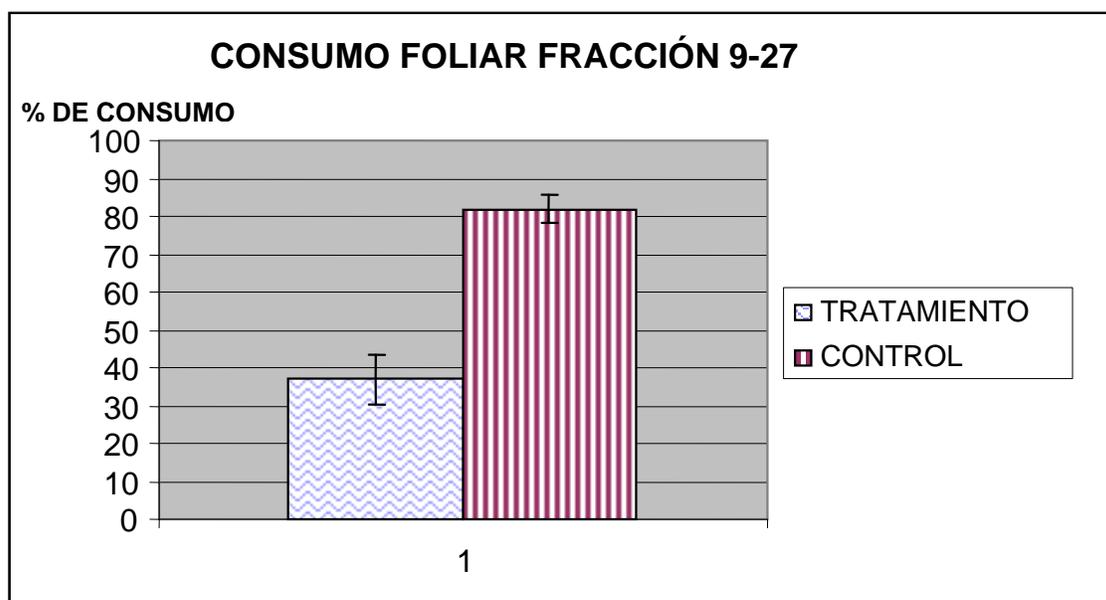


Fig. 10. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.4) y tratamiento (E.S.± 7.4) del extracto crudo hexánico de *B. grandifolia*. Con una $p= 0.05$ y $t= 5.93$.

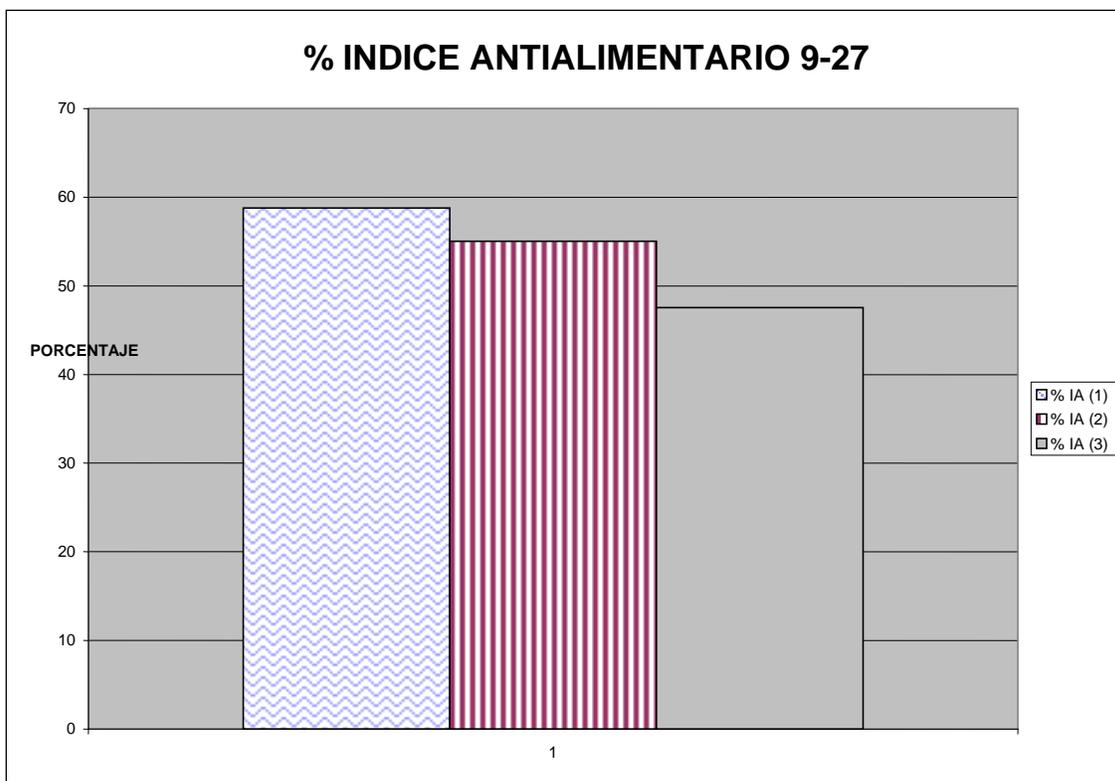


Fig. 11. Promedio de los porcentajes del índice antialimentario de la fracción 9-27, obtenidos durante tres bioensayos.

Sin embargo, no se pudo determinar si la actividad antialimentaria se debe a un compuesto en específico o a la acción sinérgica de una mezcla de componentes, ya que no se logró realizar la separación y evaluación de cada uno de los componentes de esta fracción, debido a que no se contaba con la cantidad de materia suficiente.

4.3.2. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 28-30 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

La fracción 28-30 no presentó grandes diferencias entre los consumos foliares, ya que se observó una media de 56.9 para el control y una de 62.7 para el tratamiento. Asimismo, el promedio del índice antialimentario fue muy bajo (4.4), y de acuerdo al estadístico t de Student ($t= 0.60$) no existen diferencias significativas entre los consumos foliares del control y tratamiento de la fracción en evaluación. A pesar de lo anterior, algunas repeticiones experimentales mostraron índices antialimentarios altos como 84.9, 100 y 76.4 (Ver Fig. 12), por lo que se procedió a separar y evaluar cada uno de las subfracciones de ésta, ya que la actividad antialimentaria de las sustancias podría verse decrementada al combinarse con otro tipo de compuestos. Los resultados de la separación de la fracción 28-30 y las pruebas de actividad antialimentaria de las subfracciones obtenidas, se presentan más adelante.

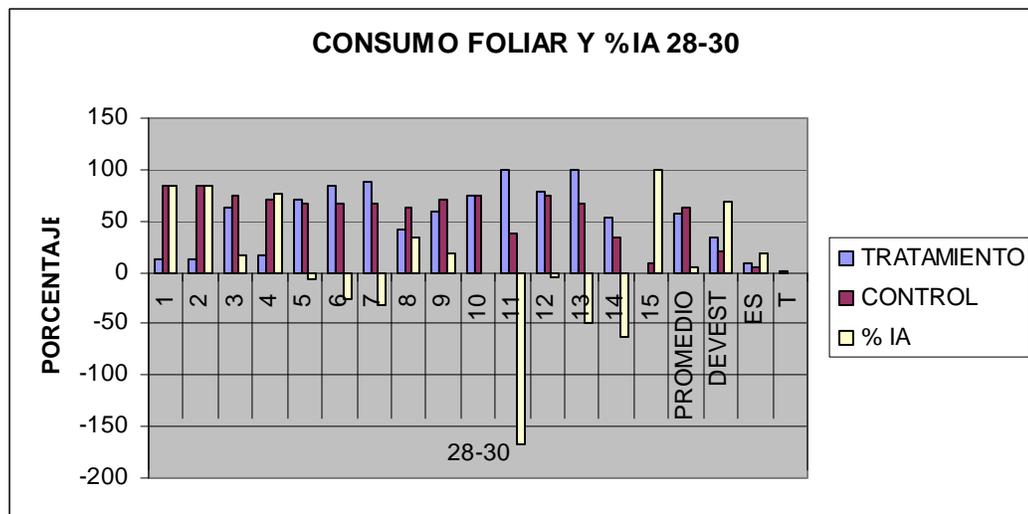


Fig. 12. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S. \pm 3.0) y tratamiento (E.S. \pm 7.2) del extracto crudo hexánico de *B. grandifolia*, con una $p= 0.05$ y $t= 0.60$ y porcentaje de índice antialimentario.

4.3.3. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 73-78 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

Por su parte, la fracción 73-78 no presentó diferencias grandes en los consumos foliares del control respecto al tratamiento, lo cual se puede observar en la figura 13, y es respaldado mediante los resultados arrojados por el estadístico t (0.73), que señaló que no hay diferencias significativas entre las medias. Asimismo, el promedio de los índices antialimentarios presentó valor positivo (5.42) muy bajo (González-Coloma, 1995 y Valencia et al., 2000), lo cual indica que la actividad antialimentaria de esta fracción frente a *S. frugiperda* es muy pequeña.

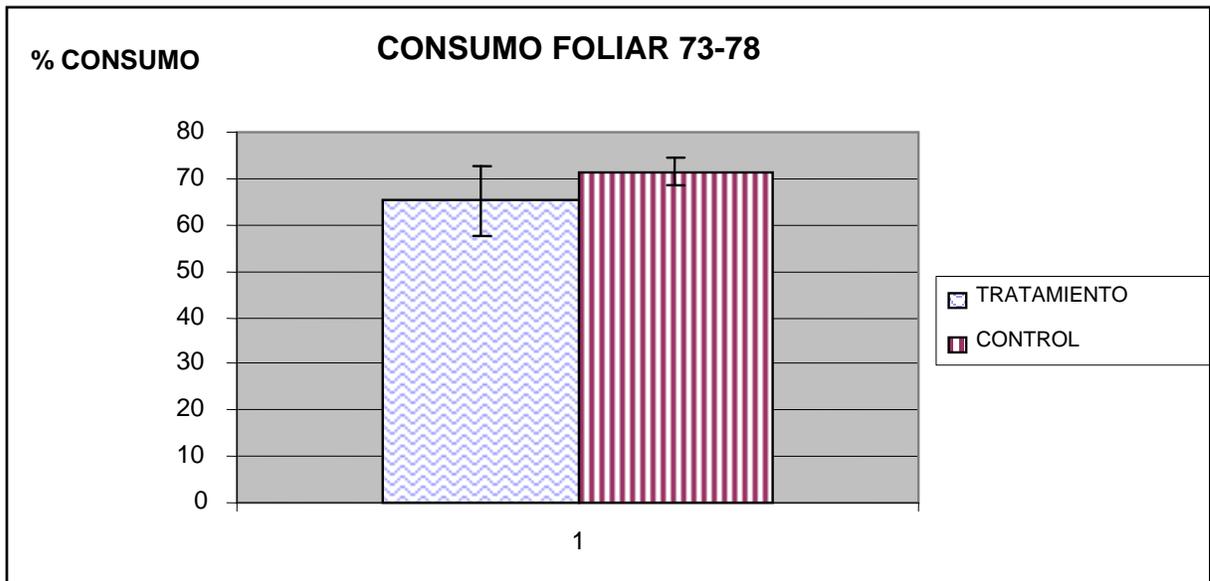


Fig. 13. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.0) y tratamiento (E.S.± 7.6) del extracto crudo hexánico de *B. grandifolia*. Con una $p= 0.05$ y $t= 0.73$.

4.3.4. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN 90-94 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

En el caso de la fracción 90-94 (Fig. 14), se observó que existen diferencias entre los consumos foliares del control (84.9) y tratamiento (62.7), lo cual se ve reflejado en el promedio del porcentaje antialimentario (23.34) (González-Coloma, 1995 y Valencia et al., 2000) y en la prueba de t de Student ($t= 2.54$) que sugiere que existen diferencias significativas entre las medias del consumo foliar del control y tratamiento.

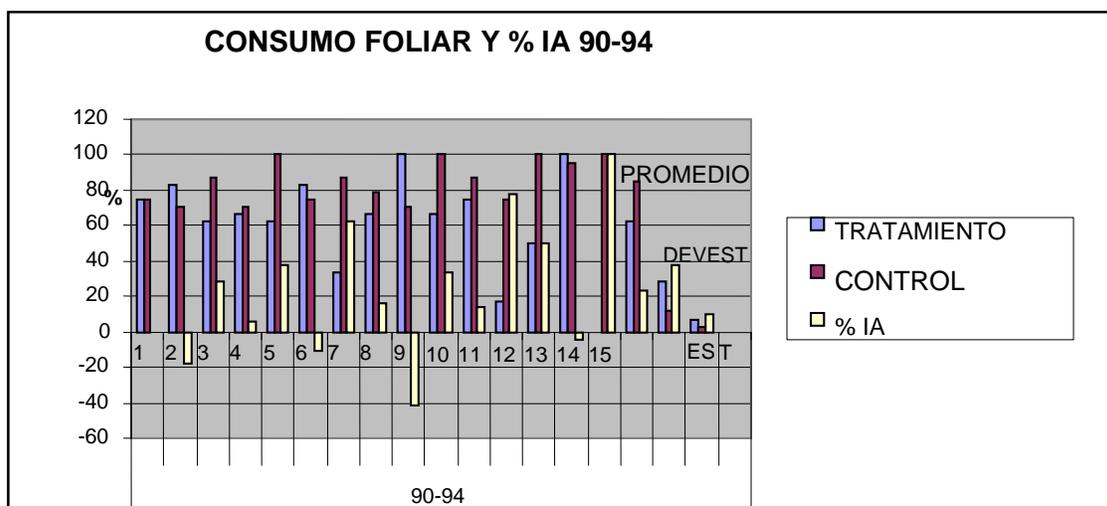


Fig.14. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.0) y tratamiento (E.S.± 7.2) del extracto crudo hexánico de *B. grandifolia*, con una $p= 0.05$ y $t= 2.54$ y porcentaje de índice antialimentario.

4.4. EVALUACIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA

Las fracciones que presentaron porcentajes antialimentarios bajos fueron las 28-30 y 73-78; mientras que la fracción 90-94 mostró un índice antialimentario medio bajo a diferencia de la fracción 9-27 que fue la única que exhibió un valor alto (Tabla D); por lo anterior, podemos observar que estas fracciones poseen carácter antialimentario frente a *S. frugiperda* cada una con un nivel de actividad diferente (González-Coloma, 1995 y Valencia, 2000).

4.4.1. SEPARACIÓN
DE LA FRACCIÓN 28-30
DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

Debido a que la fracción 28-30 presentó índices antialimentarios altos en algunas de sus repeticiones, y a que se obtuvieron 350 mg de muestra (de los cuales 300 mg se utilizaron para la separación), se procedió a la separación de la fracción mediante el uso de una columna flash, de donde se obtuvieron las siguientes subfracciones:

Subfracción Número	Sistema de eluyentes
1-42	95 % hexano 5 % acetona
43-63	90 % hexano 10 % acetona
64-85	80 % hexano 20 % acetona
86-102	70 % hexano 30 % acetona
103-121	60 % hexano 40 % acetona

Tabla E. Subfracciones de la columna flash de la fracción 28-30 del extracto crudo hexánico.

De dicha separación se reunieron las fracciones con r_f similares y finalmente se obtuvieron tres subfracciones mayoritarias con un peso de 14 mg, 13 mg y 0.49 mg. Las tres subfracciones fueron nombradas como 28-30-1, 28-30-2, 28-30-3. Sólo dos subfracciones fueron evaluadas (28-30-1, 28-30-2) debido a la cantidad de materia obtenida de cada una de estas.

4.4.2. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-1 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

Los resultados arrojados por las evaluaciones y pruebas aplicadas a los datos obtenidos de la subfracción 28-30-1, revelaron que existe mayor consumo foliar del control respecto al tratamiento, lo cual podemos observar en la siguiente gráfica y en la Tabla F, donde se indica que la media del consumo del control (81.5) es mayor que la del tratamiento (39.8). Asimismo, el índice antialimentario (50.9) indicó que los componentes de la fracción 28-30-1 poseen carácter antialimentario frente a *S. frugiperda*, ya que el porcentaje del índice antialimentario es alto, por arriba del 50 % (Fig. 14). Los resultados anteriores se respaldan con los obtenidos a partir de la prueba de t (4.41), ya que este estadístico señala que hay diferencias significativas entre las medias del control y tratamiento, lo cual significa que los componentes de la subfracción 28-30-1 presentan actividad antialimentaria frente a *S. frugiperda*.

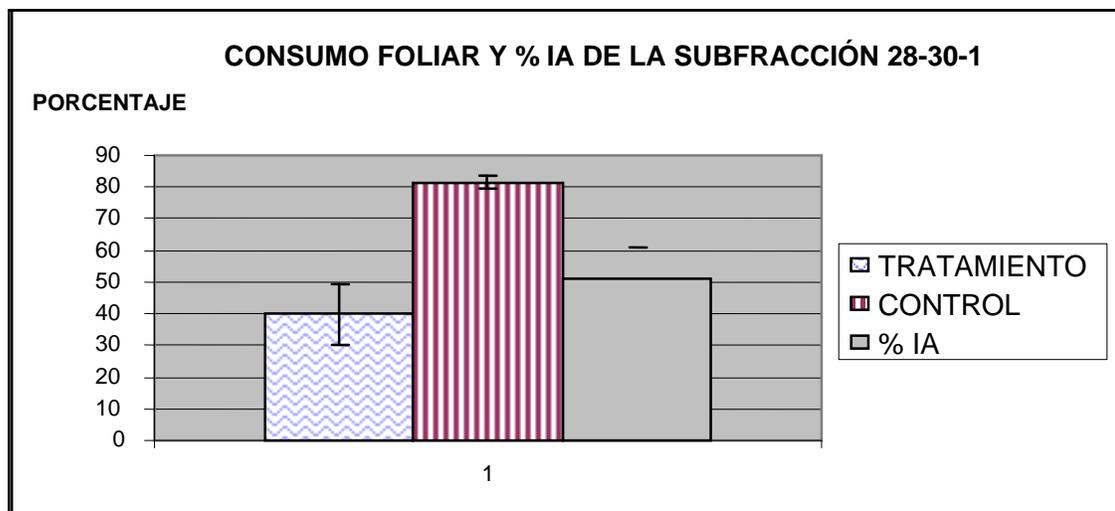


Fig. 15. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.9) y tratamiento (E.S.±6.7) ; así como índice antialimentario de la subfracción con $p= 0.05$ y $t= 4.41$

*SUBFRACCIÓN	% DE CONSUMO DE LOS DISCOS FOLIARES		% ANTIALIMENTARIO
	CONTROL	TRATAMIENTO	
28-30-1	39.87	81.5	50.9
28-30-2	60.71	78.27	16.44
31-33	51.78	74.10	28.48
59	68.48	60.41	11.03

Tabla F. Índice antialimentario de las subfracciones del extracto crudo hexánico; y comparación del porcentaje de consumo foliar en el tratamiento y control de las subfracciones del extracto hexánico.

4.4.3 ELUCIDACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-1 DEL EXTRACTO HEXÁNICO

La subfracción 28-30-1 es la subfracción más abundante de la fracción 28-30; correspondiente al 0.0019 % del total de la muestra respecto al peso seco de las semillas; así como al 1.07 % del total del peso del extracto crudo hexánico, y al 4.66 % del total del peso de la fracción 28-30. Los componentes de la subfracción fueron identificados mediante el análisis de una muestra (4 mg) por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS). El análisis CG-MS señaló que la subfracción 28-30-1 se encuentra constituida por diecisiete sustancias (Fig. 15) como se observa a continuación:

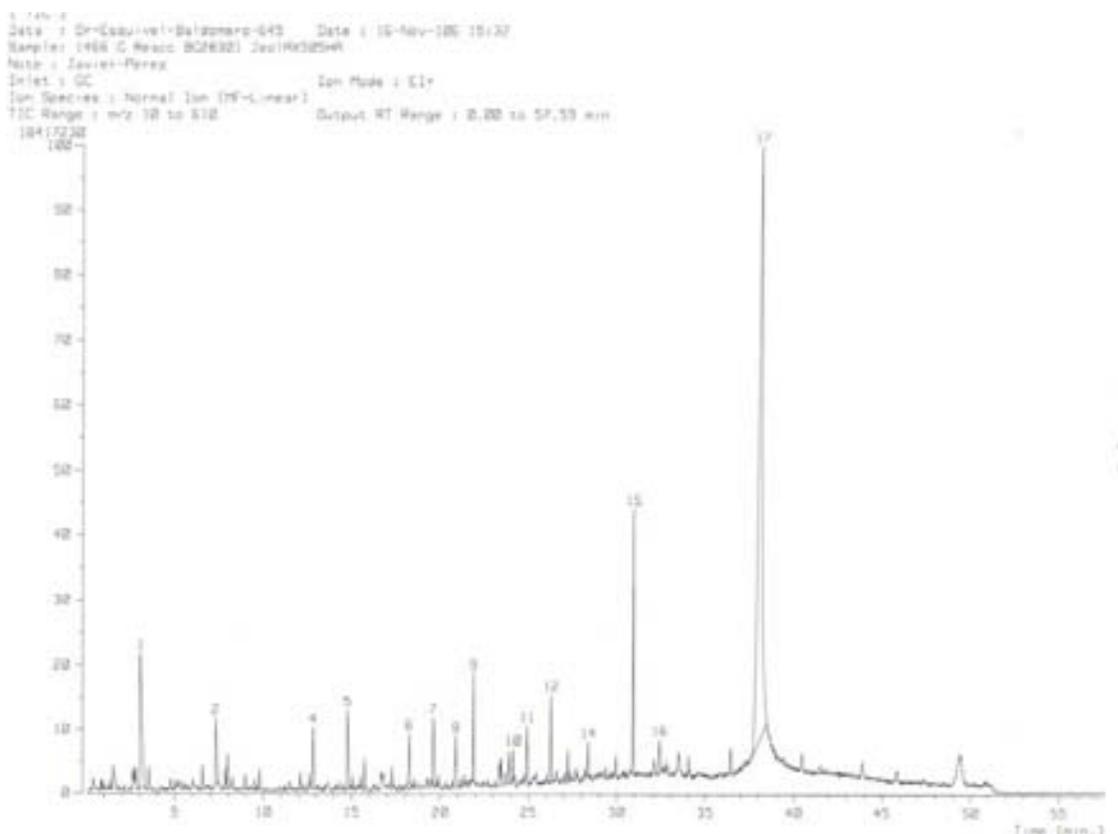
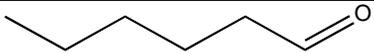
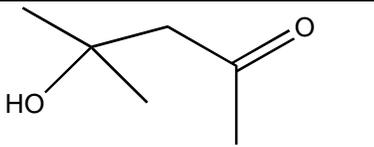
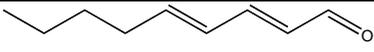
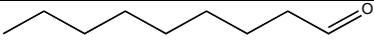
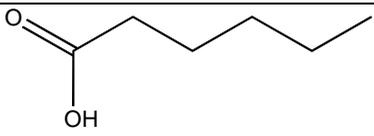
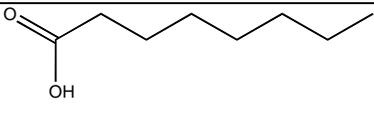
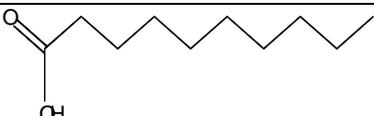
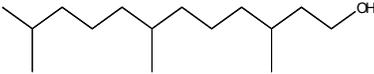
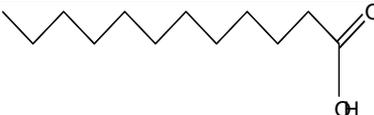


Fig. 16. Cromatograma de la subfracción 28-30-1, en el cual se muestra los picos de los diecisiete compuestos que la conforman.

De los diecisiete compuestos se identificaron solamente catorce de ellos (correspondientes al 82.35 % del total de sustancias), mismos que se señalan en la siguiente tabla:

SUSTANCIA	ESTRUCTURA QUÍMICA	ABUNDANCIA (% ÁREA)	RT (MIN)	CLASE DE COMPUESTO
Hexanal		7.47	3.03	Aldehído
4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona		2.52	7.30	Cetona
(2E,4E)-2,4-Nonadienal		1.02	7.98	Aldehído insaturado
Nonanal		1.88	12.83	Aldehído
Ácido Hexanoico		2.91	14.77	Ácido carboxílico de cadena media
E-2-Decenal		2.38	18.25	Aldehído α , β -insaturado
Ácido octanoico		2.09	19.62	Ácido carboxílico de cadena media
E-2-Undecenal		1.79	20.90	Aldehído α , β -insaturado
Ácido decanoico (ácido cáprico)		2.83	21.89	Ácido carboxílico de cadena media
3,7,11-Trimetil-1-dodecanol		0.80	27.23	Alcohol primario
Ácido dodecanoico (ácido láurico)		0.94	28.38	Ácido carboxílico de cadena larga

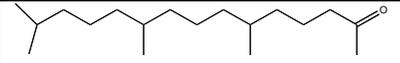
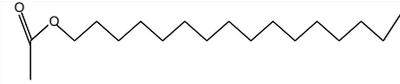
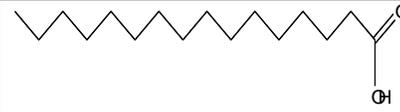
SUSTANCIA	ESTRUCTURA QUÍMICA	ABUNDANCIA (% ÁREA)	RT (MIN)	CLASE DE COMPUESTO
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona		6.04	30.93	Cetona
1-Hexadecanol, acetato		1.32	32.40	Cetona
Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)		62.12	38.15	Ácido carboxílico de cadena larga

Tabla G. Estructuras químicas, tiempos de retención (RT), % de abundancia y clasificación de los compuestos de la subfracción 28-30-1.

De los compuestos identificados en la subfracción 28-30-1, el 40 % de éstos, pertenecen al grupo de los ácidos carboxílicos (seis de los quince compuestos descritos). El segundo grupo más copioso fue el de los aldehídos, ya que de este grupo se identificaron cinco compuestos (29.41 %), mientras que del grupo de las cetonas se observaron tres compuestos (17.64 %), y de los alcoholes, sólo se localizó un compuesto (6.6 %).

Sin embargo, al hablar de los porcentajes de abundancia de cada uno de los grupos (Tabla G), podemos observar que nuevamente el grupo con mayor abundancia en la subfracción es el de los ácidos carboxílicos de cadena larga (63.06 %), mientras que el segundo corresponde a los aldehídos que presentaron una abundancia de 12.66 %. Por su parte, las cetonas mostraron un porcentaje de abundancia de 9.88 %. El compuesto más abundante de la subfracción es un ácido carboxílico de cadena larga (16 carbonos), denominado ácido hexadecanoico o también nombrado ácido palmítico.

La mayoría de los compuestos que se lograron identificar de la fracción 28-301 ya habían sido identificados y descritos con distintas actividades biológicas como alelopatía, insecticida, antiinflamatoria, antitumoral, atrayente, interruptora del crecimiento de ciertos organismos, entre otros (como se muestra en la Tabla H). La mayoría de los compuestos descritos con actividad biológica en la Tabla H fueron evaluados como

constituyentes de una mezcla activa. De igual forma, la subfracción 28-30-1 fue evaluada como una mezcla y no de forma individual, sin embargo, se presume que dicha subfracción posee actividad antialimentaria debido a la acción conjunta de los compuestos que la conforman, ya que la cantidad de cada uno de ellos en la mezcla es muy pequeña. Sin embargo, para tener certeza de ello, se tendrían que evaluar cada uno de los compuestos puros que conforman la mezcla, en las mismas concentraciones en las que se encuentran en las semillas de la planta.

Los componentes extraídos de las semillas de *B. grandifolia* (ácidos grasos de cadena media y larga, alcoholes y aldehídos) difieren de los compuestos aislados de las hojas de esta planta. Los metabolitos obtenidos de los extractos de hojas pertenecen al grupo de los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos). Sin embargo, en otras especies pertenecientes al mismo género (*B. subminiliformis* y *B. morelensis*), se han descrito ácidos grasos (Zuñiga, 2005).

TABLA H.- ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ENCONTRADOS EN LA FRACCIÓN 28-301, OBTENIDOS DE LA LITERATURA

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	COMPUESTOS	REFERENCIA
Antimicrobiano de hojas de <i>Anthemis aciphylla</i> contra <i>Staphylococcus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aureguinosa</i> . 2	Hexanal, Nonanal, 2-decenal, (E), Ácido octanoico, Ácido decanoico, 3,7,11-Trimetil-1-dodecanol; 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona y Ácido hexadecanoico.	Hüsnü et al. (2006)
Actividad antiinflamatoria del conjunto de ácidos grasos provenientes de <i>Prunas Mahaleb L. Kernels</i> . 2	Ácido hexanoico, Ácido decanoico, Ácido hexadecanoico y Ácido octanoico.	Shams et al. (2007)
Aceites esenciales de Hojas de <i>Populus nigra</i> , atrayentes de <i>Helicoverpa armigera</i> . 2	Hexanal y Ácido hexanoico.	Li et al. (2005)
Decremento en el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por actividad de los aceites de <i>Citrus Essences</i> . 2	E-2-Decenal.	Belleti et al. (2004)

Actividad moderada antimicrobial contra Gram + y Gram -, de los aceites esenciales de <i>Minuartia meyeri</i> . 2	E-2-Decenal.	Nurettin, et al. (2006)
Aceites esenciales de <i>Oenanthe crocata</i> L. con actividad antibacterial moderada (<i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Bacillus lentus</i> .) 2	Hexanal	Bonsignore, et al. (2005)
Efecto alelopático de los metabolitos de exudados de raíces del arroz, contra <i>Echinochloa crusgalli</i> (cola de caballo). 2	3,7,11-Trimetil-1-dodecanol	He et al. (2006)
Insecticida contra Aphidos, a partir de Aceites esenciales de <i>Rhus Typhina</i> . 2	Ácido dodecanoico, 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	Bestmann et al. (1988)
Aceites esenciales de <i>Achillea biebersteinii</i> , con actividad Antimicrobiano (8 compuestos), Anticandidial y Antifúngico (14 compuestos). 2	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	Baris et al. (2006)
Antibacterial contra <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogene</i> y <i>L. monocytogenes</i> ; obtenido a partir de <i>Olea europea</i> . 1	Nonanal, E-2-Decenal.	Bisignano et al. (2001)
Antimicrobiano de Aceites esenciales de <i>Scutellaria barbata</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Methicillin-resistant</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus heamolyticus</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klcsbiella pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonel paratyphi</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicales</i> . 2	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	Jianqing , et al. (2004)
Aceites esenciales de <i>Foeniculum vulgare</i> que muestran de buena a moderada inhibición de hongos. 2	4-hidroxí-4-metil-2-pentanona	Singh et al. (2006)
Decremento de la tasa de crecimiento de <i>Blepharida flavocostata</i> , por la acción de los aceites esenciales de <i>Bursera biflora</i> . 2	Ácido octanoico, Ácido decanoico y ácido hexadecanoico	Evans et al. (2000)

1---- ACTIVIDAD DESCRITA AL PROBAR LA SUSTANCIA PURA.

2---- ACTIVIDAD DESCRITA AL PROBAR LA SUSTANCIA MEZCLADA CON OTROS COMPUESTOS.

La mezcla de la fracción 28-30-1 resulta ser un antialimentario fuerte contra *S. frugiperda*, ya que presenta una media del porcentaje antialimentario alta (50.15), por lo

cual podemos suponer dicha mezcla podría generar efectos dañinos o tóxicos contra *S. frugiperda* (actividad insecticida), lo cual no lo tendremos cierto hasta realizarle pruebas de no elección, durante las cuales se evalúan las variables de peso y sobrevivencia contra compuesto o mezcla de sustancias suministradas en la dieta, durante el desarrollo del insecto. Esta mezcla presenta potencial alto para convertirse en un antialimentario comercial en la condición probada, debido a su eficacia, bajo costo y a que no involucra los problemas que los insecticidas actualmente usados conllevan, ya que a pesar de que son muy efectivos, son tóxicos, y provocan daños a las poblaciones de plantas o animales aledaños al sitio de aplicación del químico (Weinzierl, 2000), causando un impacto no puntual, sino de una amplitud mayor, alterando poblaciones hacia las cuales no va dirigido el ataque y manteniéndose en el suelo durante un largo período de tiempo, generando un gran costo económico, ambiental y de salud.

4.4.4. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 28-30-2 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

La subfracción 28-30-2 presentó diferencias en los consumos foliares del control respecto al tratamiento, lo cual se puede observar en la Figura 16, y es respaldado mediante los resultados arrojados por el estadístico t (1.94), que señaló que hay diferencias significativas entre las medias. Asimismo, el promedio del índice antialimentario reflejó que existe actividad antialimentaria de los compuestos de la fracción frente a *S. frugiperda*, ya que mostró un valor de 16.44. Sin embargo, dado que la eficacia antialimentaria de la fracción resultó ser medianamente baja, ya que se encuentra muy por debajo del 100 %, que indica inhibición total alimentaría (González-Coloma, 1995 y Valencia et al., 2000), no se procedió a la separación de los componentes de la mezcla para su posterior evaluación y elucidación química.

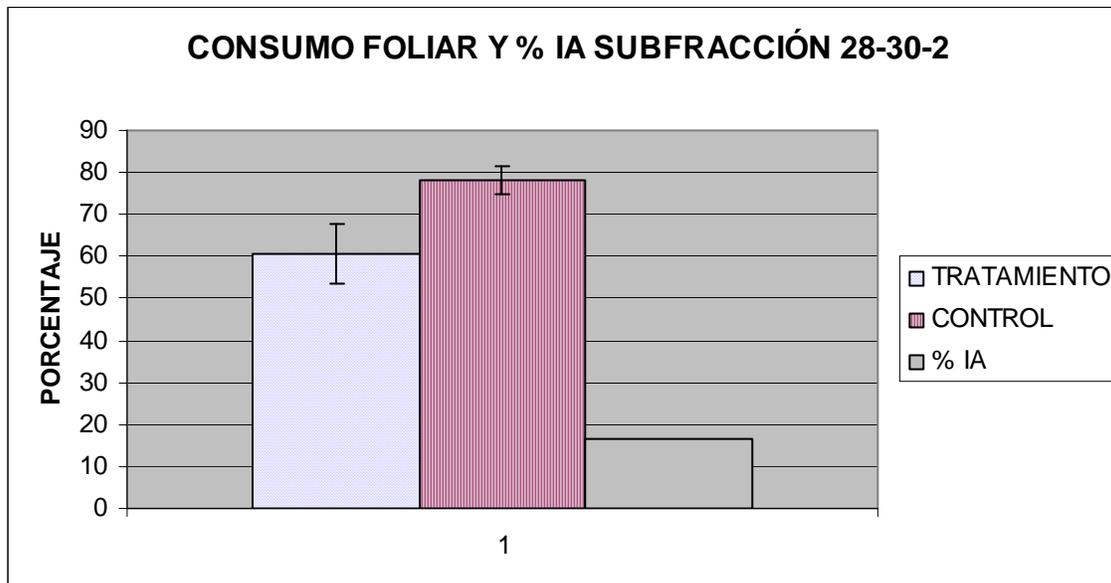


Fig.17. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.9) y tratamiento (E.S.±6.7); así como índice antialimentario de la fracción con $p= 0.05$ y $t= 1.94$.

Las fracciones por separado presentaron mayor actividad antialimentaria frente a *S. frugiperda* que la mezcla de sustancias denominada 28-30, lo cual probablemente se deba a que la actividad antialimentaria de algunas sustancias se ve disminuida o enmascarada al estar combinadas con metabolitos secundarios de carácter fagoestimulante, o al encontrarse en cantidades muy pequeñas en una mezcla de varias sustancias.

4.5. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES 31-33 Y 59

De acuerdo a las características de cada una de las fracciones se eligió el método de separación a realizar. Tanto las fracciones 31-33 y 59 formaron cristales. Los cristales de la primera fracción fueron de tamaño grande, en forma de agujas y color amarillento; mientras que los cristales de la fracción 59 fueron pequeños y de color blanco.

La fracción 31-33 constituida por cuatro compuestos (según lo observado en la cromatografía en capa fina), se pensaba que se encontraba conformada por β - sitosterol mayormente, y por algunas otras sustancias debido a las características físicas de los cristales (color, tamaño y forma). Por lo cual, se comparó una muestra de la fracción contra un control (β - sitosterol puro) mediante cromatografía en capa fina en un sistema de eluyentes 80:20 hexano/acetona. Derivado de lo anterior, se observó que la sustancia en mayor proporción de la fracción 31-33, efectivamente corresponde al β - sitosterol. Posteriormente, se procedió a la separación del componente mayoritario a través de la cromatografía en capa fina.

La fracción 59 fue purificada antes de ser evaluada, ya que según lo observado en las placas cromatográficas se encontraba conformada por muy pocos compuestos. En la cromatografía en capa fina con sistema de eluyentes 80:20 hexano/acetona se observó que esta fracción se encuentra conformada por tres componentes, uno de ellos localizado en mayor proporción que los otros dos (localizados en proporciones mínimas). Para la purificación de los cristales de la fracción, se procedió a la filtración al vacío del material, con la finalidad de obtener los cristales puros de esta fracción para su posterior evaluación e identificación. Una vez obtenidos los cristales puros fueron comparados con muestra de la fracción 59 (no filtrada), donde se observó que los cristales presentaron un coeficiente de retención similar al del compuesto mayoritario de la fracción, por lo cual se determinó que el componente mayoritario de la fracción había sido purificado.

4.5.1. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 31-33 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

Los resultados arrojados por las evaluaciones y pruebas aplicadas a los datos obtenidos de la subfracción 31-33, revelaron que existe mayor consumo foliar del control que del tratamiento (Figura 17), ya que de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la prueba de t (2.56) y al índice antialimentario (28.4) se deduce que existen diferencias significativas entre las medias del control (74.1) y tratamiento (51.7), lo cual indica que el sitosterol posee actividad antialimentaria frente a *S. frugiperda*.

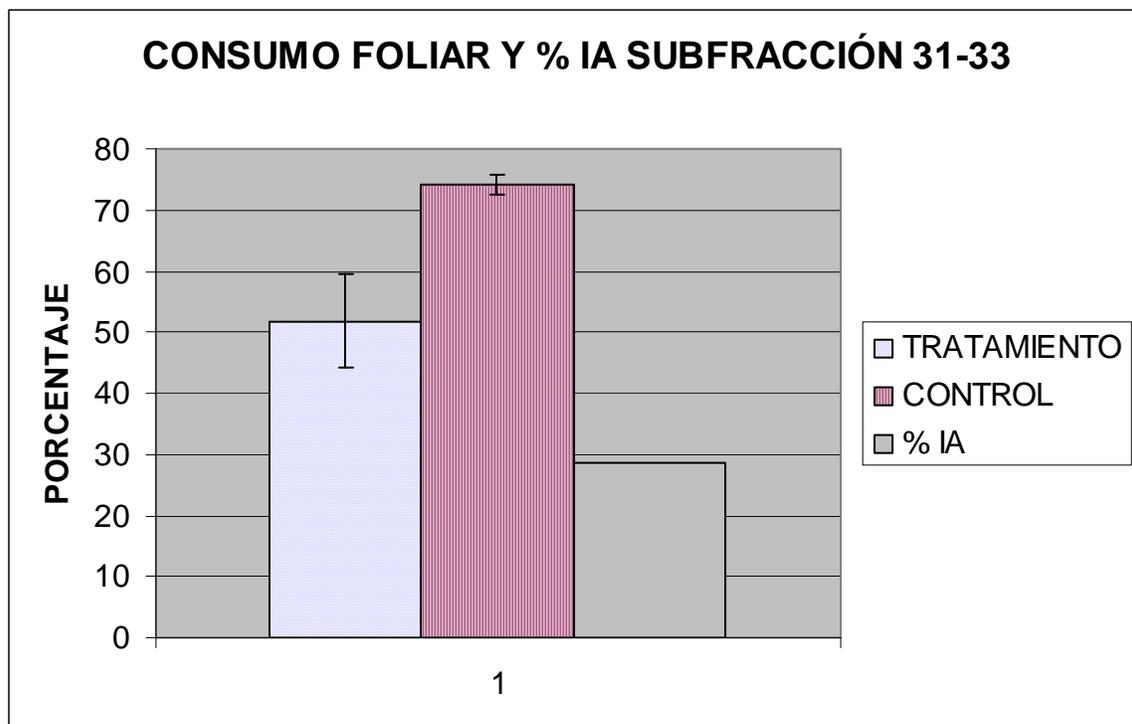


Fig. 18. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 1.7) y tratamiento (E.S.± 7.7); así como índice antialimentario de la fracción con $p= 0.05$ y $t= 2.56$

La subfracción 31-33 que fue identificada como sitosterol constituye el metabolito secundario activo más abundante en toda la planta. Cabe mencionar, que se han realizado pocos estudios acerca de la actividad biológica del sitosterol (puro). Entre estas actividades descritas podemos mencionar actividad antiinflamatoria en ratones, al estar el sitosterol en combinación con un grupo de ácidos grasos provenientes de la planta *Prunas*

Mahaleb L. Kernels (Shams, 2007). Probablemente, la poca investigación de la actividad biológica del sitosterol se debe a que no ha recibido la atención correspondiente, debido a que posee una estructura química de menor complejidad que otras sustancias y a que es producido por la totalidad de las plantas, lo cual no corresponde a las características esenciales de un metabolito secundario, ya que son producidos de forma restringida con la finalidad de evitar los ataques de herbivoría de insectos especialistas de la especie y no de una gran gama de herbívoros.

Por lo que, el hecho de que el sitosterol resulte un antialimentario contra el gusano cogollero del maíz, abre muchas posibilidades e implica una gran contribución referente a la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad biológica, ya que su producción a nivel comercial se facilitaría toda vez que se puede obtener de cualquier planta, y generalmente es el compuesto más abundante en éstas. Además, al ser un producto elaborado por todas las plantas no produciría efectos alelopáticos o tóxicos en las plantas pertenecientes a los cultivos, ni a los consumidores finales (el ser humano).

4.5.2. EVALUACIÓN DE LA SUBFRACCIÓN 59 DEL EXTRACTO CRUDO HEXÁNICO

Se evaluó la actividad antialimentaria del compuesto mayoritario de la fracción 59 (Fig. 18), ya que se obtuvo cantidad suficiente de muestra (5.2 mg) para realizar los ensayos biológicos. Los resultados mostraron un índice antialimentario de 11.03, el cual señaló que la subfracción evaluada posee actividad antialimentaria baja frente a *S. frugiperda*. Por su parte, el estadístico de t (1.53) señaló que no existen diferencias significativas entre las medias de consumo foliar del control y tratamiento. Así, la fracción 59 no fue considerada como sustancia antialimentaria ante el insecto modelo, por lo cual no fue sometida a pruebas espectroscópicas.

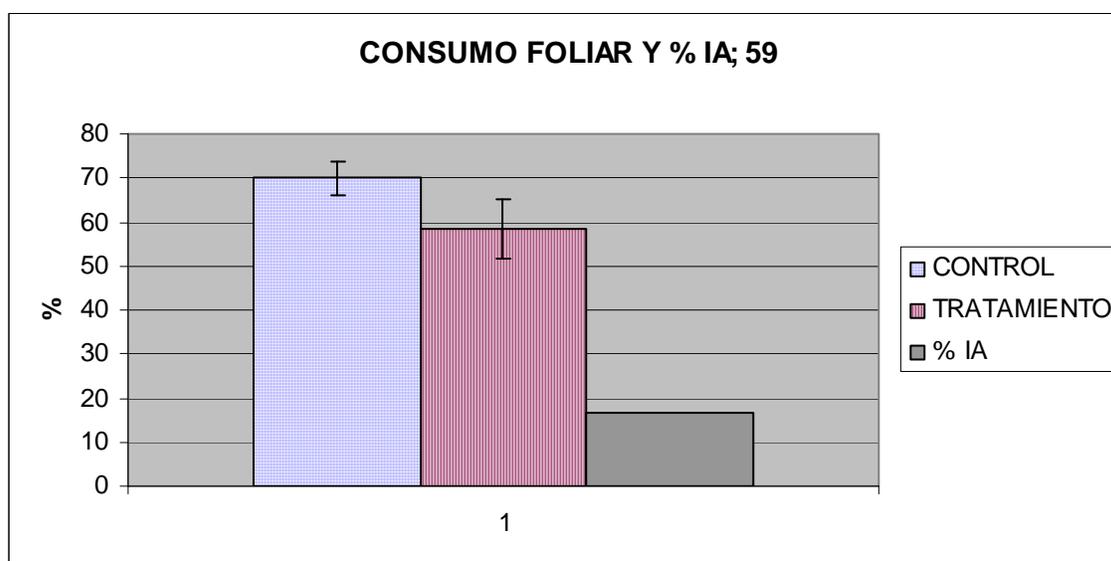


Fig. 19. Comparación del consumo foliar de *S. frugiperda* frente al control (E.S.± 3.9) y tratamiento (E.S.±6.7) ; así como índice antialimentario de la fracción con $p= 0.05$ y $t= 1.53$.

5.0. CONCLUSIONES

- Las fracción y subfracción que mostró efecto significativo inhibitorio de la alimentación de *S. frugiperda* fue la fracción 9-27 y la subfracción 28-30-1, ya que presentaron índices antialimentarios altos por arriba del 50 %.
- La composición química de las subfracciones que resultaron activas se conforman de ácidos grasos de cadena media y larga, esteroides, alcoholes y aldehídos. Los compuestos mayoritarios de las subfracciones activas son el ácido hexadecanóico, el ácido dodecanóico y la 6,10,14-Trimetil-2- pentadecanona, los cuales podrían ser los responsables de la actividad antialimentaria frente a *S. frugiperda*.
- Las fracción 9-27 que presentó un índice antialimentario por arriba del 50 % podría ser un buen prospecto para la búsqueda de antialimentarios, por lo cual se sugiere la separación y evaluación de cada uno de los compuestos que constituyen a esta fracción.
- La subfracción 31-33 sitosterol, a pesar de no ser un antialimentario de gran potencia, es un metabolito secundario de gran distribución y abundancia en las plantas que podría ser utilizado en mezcla con otros metabolitos para su comercial, debido a sus ventajas económicas.
- Con la presente investigación se contribuyó al estudio y conocimiento del perfil químico del género *Bursera*, en particular de *B. grandifolia*.
- Los compuestos aislados de las semillas de *B. grandifolia*, difieren a los descritos en los extractos de las hojas. Sin embargo, componentes de este tipo se han aislado de extractos de otras plantas pertenecientes al género.

6.0.BIBLIOGRAFÍA

1. Altieri, A. M., Letouneau D. K., y Davis J.R. (1983). Developing sustainable agrosistemas. *Bioscience* **33 (1):45-49**.
2. Alzogaray, R., Fontan, A., y Zerba E. (2000). Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol. (Oxford)* **14:6-10**.
3. Anaya, L. A. L (2003). Ecología química. Instituto de ecología UNAM y Plaza Valdés, S.A. de C.V., México, D.F. 349 pp.
4. Avé, D. A., Gregory, P. y Tingey, W. M. (1987). Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultti* and *S. tuberosum*. *Entomol. Expl. Appl.* **44:131-138**.
5. Baris, Ö., et al. (2006) Biological Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turk J. Biol* (30): **65-73**.
6. Barreira E.S., Queiroz-Monte, F. J., Braz-Filho, R.A.(1996). A new furanosesquiterpene from *Bursera leptophloeos*. *Nat. Prod. Lett.* **8:285-289**.
7. Becerra J. X. (2001). Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *Amer Zool.* (41): **865-876**.
8. Belletti, N., et al. (2004). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* (52): **6932-6938**.
9. Bentley, M.D., Stoddard W.F. y Zalkow, L.H. (1984). Pyrrolizidine Alkaloids as Larval Feeding Deterrents for Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann.Entomol.Soc.Am.* **77(4): 393-397**.
10. Bestmann, H., et al., (1988). Steam volatile constituents from leaves of *Rhus typhina*. *Phytochemistry*, **27 (1): 85-90**.
11. Bisignano, G., et al. (2001). In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters* (198): **9-13**.
12. Bonsignore, L., et al. (2004). Analysis of the Essential Oil of *Oenanthe crocata* L. and Its Biological Activity. *Journal of Essential Oil Research: JEOR*; **16 (3) ProQuest Agriculture Journals: 266-269**.
13. Cannell, J. P. R. (1998). Methods in Biotechnology. Vol. 4. Natural Products Isolation. Humana Press, 1-51 pp.

14. Capinera, J.L., (1999). Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Florida cooperative extension service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida Publication No EENY-98 9 pp.
15. Carrero, J. M. (1995). Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. Edit. Mundi-Prensa, Madrid, España, 13-14 pp.
16. Coats, J. R. (1994). Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*. **39:489-515**.
17. Coll, J. (1988). Inhibidores de la alimentación de los insectos. Capítulo 14. Insecticidas Biorracionales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, 355-377 pp.
18. Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*. **411:843-847**.
19. Domínguez, A. X., Rzedowski, J., Gutierrez, M., y Gómez, M. E. (1972). A Phytochemical Survey of 21 species of the Genus *Bursera* (Burseraceae) natives of México.
20. Egli U. y Hartmann H. E. K. (2002). Illustrated Handbook of succulent plants Dicotyledons. Springer, New York, 56-61 pp.
21. Evans, P. H., Becerra, J. X., Venable, D. L. and Bowers, W.S. (2000). Chemical Analysis of Squirt-undefense in *Bursera* and counterdefense by Chrysomelid beetles. *J. Chem. Ecol.* **26 (3) 745-754**.
22. Fellows, L. E., Evans, S. V., Nash, R. J. and Bell, E. A. (1986). Polyhydroxy plant alkaloids as glycosidase inhibitors and their possible ecological role. 72-78 pp. En: Natural Resistance of plants to pest. Gree, M. B. and Hedin, P. A. (Eds.). American Chem Soc., Washington.
23. Figueroa, B. R. (2002). Evaluación de Extractos vegetales contra el Gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. Tesis de Maestría, UNAM, 19-20 pp.
24. Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances. *Science*. **129:1466-1470**.
25. Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L., Baptista, G.C. Berti-Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A.; Alves, S. B. Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S., Omoto, C. (2002). Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920p.

26. Guizar, N. E. y Sánchez, V. A. (1991). Guía para reconocimiento de los principales árboles del Alto Balsas, Universidad Autónoma de Chapingo, México, 135 pp.
27. González-Coloma, A. et al. (1996). Antifeedant Ryanodane diterpenes from *Persea indica*. *J. Agric. Food Chem.* (44): 296-300.
28. Harborne, J. B. (1993). Biochemistry of plant pollination. Introduction to Ecological Biochemistry. (4th ed.). Academic Press, London, 36–70 pp.
29. He, H., B., et al. (2006). Analysis of metabolites in root exudates from allelopathic and non allelopathic rice seedlings. *Allelopathy Journal* 18 (2): 247-254.
30. Hernández, J. D., Herrero, N., López, P. Y., Román, U. L., Cerda-García-Rojas, C. M. y Joseph-Nathan, P. (2003). Rev. Soc. Quim. Méx. 47 (Núm. Especial 105).
31. Hüsnü Can Baser, H., et al. (2006). The Essential Oil Constituents and Antimicrobial Activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2): 222—225.
32. Isman, M. B., Matsusuura, H., Mackinnon, S., Durst, T., Towers, G. H. N. y Arnason, J. T. (1996). Phytochemistry of the Meliaceae: so many terpenoids, so few insecticides. *Recent Advances in Phytochemistry.* 30:155-178.
33. Isman, M. B. (1999). Pesticides based on plant essential oils. *Pestic. Outlook.* 68-72.
34. Jain, D. C. y Tripathi, A. K. (1993). Potential of natural products as insect antifeedants. *Phytoteraphy Research.* 7:327-334.
35. Janzen, D. H. (1979). New horizons in the biology of plant defenses. En: G. A. Rosenthal y D. H. Janzen (ed.). *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites.* Academic Press, Orlando, 331-350 pp.
36. Jianqing, Y., Jiachuan, L., Huaidong, Y., Xuan, C. y Guolin, Z. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry* (65): 881–884.
37. Josivan do Nascimento, Diniz, Xavier de Mesquita, Martin de Oliveira y Costa (2008). Extractos vegetales em el control de plagas. *Revista verde de Agroecología e desenvolvimento sustentável grupo verde de agricultura alternativa (GVAA).* 3 (3): 1-5.
38. Koul, O., Shankar, S. y Kapil, R. S. (1996). The effect of neem alelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* 79:43-50.
39. Koul, O. (2005). Insect antifeedants. CRC, Boca Ratón, 1005 pp.

40. Lechuga, A., El-Sayed Hatem, A., Ramos, J.M. y Vargas Osuna (2004). Comparación de la susceptibilidad de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) y *Helicoverpa armigera* (Hübner) al Spinosad, un insecticida de origen natural. *Bol. San Veg. Plagas.* **30:573-580.**
41. Li, W. Z., et al. (2005). Active compounds in *Populus nigra* L. wilted leaves responsible for attracting *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) and new agropectin formulation. *J. Appl. Entomol.* **129 (9/10): 557-562.**
42. Machado, L. A., Silva, V. B. E. y Oliveira, M. M. (2007). Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. *Biológico, Campinas, SP, Brasil.* **69(2)103-106.**
43. McLafferty, F. W. y Stauffer, D. B. (1988). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. New York: Jhon Wiley.
44. Mello, M. O. and Silva-Filho, M. C. (2002). Plant insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* **14 (2): 71-78.**
45. Menn, J. J. y Hall, F. R. (1999). Biopesticides use and delivery. Humana Press, Totowa, New Jersey.
46. Morón, M.A.; Terrón, R. A. (1988). Entomología Práctica. Instituto de Ecología, A.C. México, 502 p.
47. Nakanishi, T., Inatomi, Y., Satomi, A., Yamada, T., Fukatsu, H., Murata, H., et al. (2003). New luteolin 3-o-acylated rhamnosides from leaves of *Bursera graveolens*. *Heterocycles.* **60:2077-2083.**
48. Nurettin, Y., Canan, G., Osman Ü., Ahmet Y., Sedar Ü., Kamil C. y Salih T. (2006). Composition and Antimicrobial Activities of Volatile Components of *Minuartia meyeri*. *Turk. J. Chem.* **(30):71- 76.**
49. Ortega, C. A. (1987). Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. México. D.F., CIMMYT, 106 pp.
50. Peraza-Sánchez, S. R., Peña-Rodríguez, L. M. (1992). Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* **55:1768-1771.**
51. Peraza-Sánchez, S. R., Salazar-Aguilar, N. E. y Peña-Rodríguez, L. M. (1995). A new triterpene from the resino of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* **58:271-274.**

52. Pérez, M. A., Ocete, R. y Lara, M. (1992). Ensayos sobre la actividad antialimentaria de un extracto etanólico de hojas de *Daphne gnidium* L. frente a cuatro especies de insectos. *Bol. San. Veg.* **18 (2): 435-440.**
53. Pernet, R. (1972). Phytochimie des Burseracees. *Lloydia.* **35:280-287.**
54. Robles, J., Torrenegra, R., Gray A. I., Piñeros, C., Ortiz, L., Sierra, M. (2005). Triterpenos aislados de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista brasileira de Farmacognosia.* **15 (4):283-286.**
55. Rodríguez, A. S. (2008). Aislamiento y Caracterización Estructural de Metabolitos Secundarios de *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae). Evaluación de su Actividad Insecticida e Implicaciones Ecológicas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, F.C., 83 pp.
56. Rzedowski, J. y Guevara-Fefer, F. (1992). Flora del Bajío y de regiones Adyacentes. Fascículo 3. Familia Burseraceae. Instituto de Ecología A.C. Jalapa, Veracruz, México, 36-44 pp.
57. Rzedowski, J., et al. (2004). Las especies de *Bursera* de la Cuenca del Río Papaloapan. *Acta Botánica Mexicana.* **66: 23-151.**
58. Rzedowski, J., Lemos, M. R., y Rzedowski, C.G. (2005). Inventario del conocimiento Taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana.* **70: 85-11.**
59. Sarker, D. S., Latif, Z. y Gray, A. (2004). Natural production Isolation (2a ed.) Humana Press, Totowa, N.J. 1-5 pp.
60. Schoonhoven, L. M. (1982). Biological aspects of antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* **31:57-69.**
61. Schoonhoven, L. M., Van Loon J. J. A. y Dicke, M. (2005). Insect-plant biology Oxford University Press, Great Britain, 51-55 pp.
62. Shams, K., A., et al. (2007). Lipid fraction constituents and evaluation of anti-anaphylactic activity of *Prunus Mahaleb* L. Kernels. *Afr. J. Trad. CAM* **4(2): 289-293.**
63. Singh G., et al. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* **(17): 745-752.**
64. Soulé, S., Guéntner, C., Vázquez, A., Argandona, V., Moyna, P. y Ferreira, F. et al (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochem.* **55:217-222.**

65. Souza, M. P., Machado, M. I. L. y Braz Filho, R. (1989). Six flavonoids from *Bursera leptophloeos*. *Phytochemistry*. **28:2467-2470**.
66. Sparks, A. N., (1979). A review of the biology of the fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae). *Florida Entomologist*.**62:82-87**.
67. Sultana, I., Hosokawa, C., Nishimura, K., Ikeda, I. y Ozoe, Y. (2002). Benzylidene anabaseines act as high-affinity agonist for insect nicotinic Acetylcholine receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32:637-643**.
68. Syamasundar, K. V., Mallavarapu, G. R. (1995). Two triterpenoid lactones from the resino of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*. **40:337-339**.
69. Toledo, C. (1982). El género *Bursera* (Burseraceae) en el estado de Guerrero, México. Tesis de Licenciatura, UNAM, F.C., 29-61 pp.
70. Valencia, E. et al. (2000). Estudio fitoquímico y Actividad Antialimentaria de *Senna stipulaceae*. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 45 (2)
71. Vandermeer, J. (1981). The interference production principle. *Bioscience*. **31:361-364**.
72. Varro, T., Brady, L. R. y Robberts, J. E. (1979). Farmacognosia. El Ateneo, Buenos Aires.
73. Villa, C. M. M. y Catalán V. E. A. (2004). Dterminación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.* **43(3):307-312**.
74. Weinzierl, R. A. (2000). Biological and biotechnological control of insects pests. Capítulo 4. Botanical insecticides, soaps, and oils. CRC Press, LLC
75. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. **64:3-19**.
76. Wickramaratne, D. B. M. Mar, W., Chai, H., Castillo, J. J. Farnsworth, N. R. Soejarto, D. D. et al., (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Med.* **61:80-81**.
77. Zhang, L. y Demain, A. L. (2005) Terpenoids as Therapeutics Drugs and Pharmaceutical Agents. In Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Editado por Humana Press, Inc., Totowa, N.J. 197-213 pp.

78. Zúñiga, B. (2005). Actividad biológica de especies del género *Bursera*, frente al desarrollo de *Spodoptera frugiperda* J.E.Smith (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, F.C. 90 pp.
79. Zuñiga, B., Guevara-Fefer, P., Herrera, J., Contreras, J. L., Velasco, L., Pérez, F. J., Esquivel, B. (2005). Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of the Volatile Fractions from Bark of Eight Mexican *Bursera* Species. *Planta Medica*. **71:825-828**.