



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ALELOPÁTICA DE  
*Cedrela ciliolata* (Meliaceae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A  
EMMA SÁNCHEZ MARTÍNEZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA



MÉXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

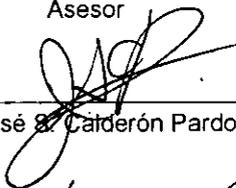
## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. Ofelia Espejo González  
VOCAL: Prof. Yolanda Caballero Arroyo  
SECRETARIO: Prof. José Serafín Calderón Pardo  
PRIMER SUPLENTE: Prof. José Manuel Méndez Stivalet  
SEGUNDO SUPLENTE: Prof. Blas Flores Pérez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 7, Unidad de Investigación de Plantas Medicinales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

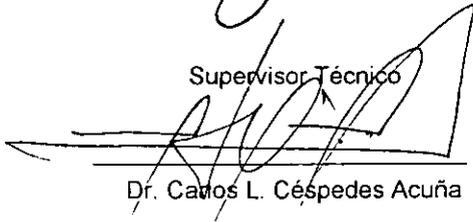
Asesor



---

Dr. José Serafín Calderón Pardo

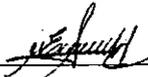
Supervisor Técnico



---

Dr. Carlos L. Céspedes Acuña

Sustentante:



---

Sánchez Martínez Emma

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo recibido a lo largo de mi vida, por sus consejos, desvelos, comprensión, orientación y alegrías compartidas, los quiero mucho.

A mis hermanos Edith, Abraham y Juan Esteban por colaborar con su comprensión y apoyo a lo largo de mis estudios.

A mis queridos amigos Angélica, Michelle, Joaquín, Rocío Muñoz, Rocío Luna, Xóchitl por esos gratos momentos que compartimos juntos, por la amistad que me han brindado en estos años y por ayudarme a cumplir un sueño más. Gracias.

A todos mis amigos en general, Paty Borja, Lucha, Lupita, Nora, Karen Hernández,... por su bella amistad.

A mis abuelitos por todas sus experiencias compartidas y por sus sabios consejos.

Al Dr. Arredondo, Sr. Francisco, a mis primos Gerardo y Francisca, por sus buenos consejos y sus palabras alentadoras.

A mis tíos y primos por su apoyo y por todos los momentos compartidos.

El trabajo de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto CONACyT 27975N.

Al Dr. Eduardo Aranda del Centro de Investigación Biotecnológica de Cuernavaca, Morelos, por proporcionar los insectos e instalaciones para el desarrollo del estudio biológico.

Si te atrae una lucecita, siguela.  
Site conduce al pântano, ya saldrás de él.  
Pero si no la sigues,  
Toda la vida te mortificarás pensando que acaso era tu estrella

**Séneca**

Dame, Señor, agudeza para entender,  
capacidad para retener,  
método y facultad para aprender,  
sutileza para interpretar,  
gracia y abundancia para hablar.

Dame acierto al empezar,  
dirección al progresar  
y perfección al acabar.

**Santo Tomás de Aquino.**

## INDICE

	Página
Índice de Figuras y Cuadros	I
Índice de Tablas	II
Índice de gráficas	III

## CONTENIDO

	Página
<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes etnobotánicos y farmacológicos de la especie <i>Cedrela ciliolata</i> (Meliaceae)	5
1.3 Alelopatía	8
1.3.1 Malezas	11
1.3.2 Germinación	12
1.4 Insectos	13
1.4.1 Insecticidas	14
1.4.2 Conchuela mexicana de frijol <i>Epilachna</i> <i>varivestis</i> Mulsant	16
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivos	24
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>26</b>
3.1 Material vegetal	26

3.2 Preparación de los extractos orgánicos a partir de la madera de <i>Cedrela ciliolata</i>	26
3.3 Pruebas biológicas	28
3.3.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas	28
3.3.2 Método para evaluar actividad sobre el insecto <i>Epilachna varivestis</i>	30
a) Prueba de actividad antialimentaria de no elección	30
b) Prueba de actividad antialimentaria de elección o preferencia	32
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1 Obtención de los extractos a partir de la madera de <i>Cedrela</i> <i>ciliolata</i>	35
4.2 Prueba biológica	36
4.2.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de las semillas	36
4.3 Obtención de las fracciones a partir del extracto diclorometánico de <i>Cedrela ciliolata</i>	49
4.3.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de las semillas	49
4.4 Actividad insecticida	65
4.4.1 Prueba antialimentaria de no elección	66
4.4.2 Prueba antialimentaria de elección o preferencia.	69
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>78</b>

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Estructuras de azadirachtina ( <i>Azadirachta indica</i> ) y toosendanina ( <i>Melia toosedan</i> )	4
Figura 2 <i>Cedrela ciliolata</i> Blake. Rama con inflorescencia, flores, fruto y semillas.	7
Cuadro 1. Ejemplos de algunos compuestos alelopáticos presentes en plantas.	9
Cuadro 2. Clasificación de sustancias antialimentarias basándose en su tipo de estructura	18
Cuadro 3. Resumen de los sistemas de elución empleado y fracciones obtenidas a partir del extracto diclorometánico de la madera de <i>C. ciliolata</i>	29
Cuadro 4. $CI_{50}$ para los extractos y fracciones primarias reunidas en semillas de <i>L. multiflorum</i>	64
Cuadro 5. $CI_{50}$ para los extractos y fracciones primarias reunidas en semillas de <i>P. ixocarpa</i> .	64
Cuadro 6. CMI obtenidas para los extractos diclorometánico y metanólico de <i>C. ciliolata</i>	67

## INDICE DE TABLAS

### Actividad alelopática

#### Extractos

Tabla 1. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> .	40
Tabla 2. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	41
Tabla 3. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	42
Tabla 4. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	43
Tabla 5. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>P. ixocarpa</i> .	44
Tabla 6. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	45
Tabla 7. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	46
Tabla 8. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	47

#### Fracciones

Tabla 9. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> .	53
Tabla 10. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	54
Tabla 11. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	55
Tabla 12. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>L. multiflorum</i> .	56
Tabla 13. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>P. ixocarpa</i> .	57
Tabla 14. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	58
Tabla 15. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	59
Tabla 16. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> .	60

### Actividad insecticida

#### Extractos

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de <i>E. varivestis</i> . Prueba antialimentaria de no elección	68
Tabla 18. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de <i>E. varivestis</i> . Prueba antialimentaria de elección	70

## INDICE DE GRAFICAS

Tabla 1. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de los extractos.	40
Tabla 2. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de los extractos.	41
Tabla 3. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de los extractos.	42
Tabla 4. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de los extractos.	43
Tabla 5. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de los extractos.	44
Tabla 6. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de los extractos.	45
Tabla 7. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de los extractos.	46
Tabla 8. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de los extractos	47
Tabla 9. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de las fracciones.	53
Tabla 10. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>L. multiflorum</i> , a distintas concentraciones de las fracciones	54
Tabla 11. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de las fracciones	55
Tabla 12. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>L. multiflorum</i> a distintas concentraciones de las fracciones	56
Tabla 13. Porcentajes de germinación de las semillas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de las fracciones	57

Tabla 14. Porcentajes de elongación de raíz en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de las fracciones	<b>58</b>
Tabla 15. Porcentajes de elongación de tallo en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de las fracciones	<b>59</b>
Tabla 16. Porcentajes de peso seco en plántulas de <i>P. ixocarpa</i> a distintas concentraciones de las fracciones	<b>60</b>
Tabla 17. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de <i>E. varivestis</i>	<b>68</b>
Tabla 18. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de <i>E. varivestis</i>	<b>70</b>

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Introducción

La diversidad biológica de una región puede ser apreciada por el número de especies endémicas distribuidas en dicha área; por esta razón México ocupa el tercer lugar en biodiversidad después de Brasil y Colombia, en América debido a la gran abundancia de especies biológicas presentes en nuestro país. Entre estas especies biológicas se encuentra su rica flora derivada de la gran variabilidad de zonas climáticas, es decir desde selvas hasta desiertos. (Bye et al., 1995)

La diversidad etnobotánica esta basada en la interacción de la diversidad biológica y cultural. Debido a que esta última ha persistido por milenios un gran número de especies de plantas forman parte de la flora medicinal tradicional, lo que constituye sin lugar a dudas, el recurso terapéutico tradicional más utilizado por la población mexicana. (Bye et al., 1995)

Al examinar el hábitat de algunas plantas se ha podido observar que no son hospederas para los insectos o bien inhiben el crecimiento de maleza a su alrededor. Dichos efectos se asocian a la presencia o ausencia de metabolitos secundarios producidos por las plantas. (Rice, 1984; Klocke, 1987; Duke et al., 1993; Anaya et al., 1995). No es común encontrar una planta rica en una variedad de diferentes clases de metabolitos secundarios, como pueden ser alcaloides, flavonoides, terpenoides o compuestos fenólicos entre otros, debido a que la mayoría de las plantas poseen en mayor proporción alguno de los compuestos mencionados. (Harborne, 1988)

Los estudios alelopáticos han producido un creciente interés en estudiar los metabolitos secundarios derivados de plantas, por su selectividad y por presentar menos impactos negativos al ecosistema que los plaguicidas convencionales, por esta razón son más deseables en el manejo de plagas. (Putman, 1985; Plimmer, 1985; Singh et al., 1997)

Entre los productos naturales más prometedores en aleopatía, que están siendo investigados actualmente, se encuentran los limonoides que son metabolitos secundarios de tipo tetranortriterpenoide presentes en las plantas. Derivan biogénicamente de triterpenoides tetracíclicos, de los tipos eufano o tirucalano. Estos sufren una gran variedad de oxidaciones y transposiciones en su esqueleto para generar los distintos tipos de limonoides. Los limonoides generalmente se acumulan en todos los tejidos (semillas, hojas, corteza y madera) de las plantas que los biosintetizan. (Champagne et al., 1992; Isman et al., 1996).

El término limonoide deriva del nombre de la especie limón (*Citrus limón*) y hoy en día se utiliza para designar de manera general a todos los compuestos relacionados con la limonina, primer compuesto tetranortriterpenoide natural aislado a partir de la corteza del árbol del limón (Bevan et al., 1963).

Los limonoides son metabolitos secundarios característicos particularmente en la familia Meliaceae, Rutaceae y Cneoraceae, todas del orden de los Rurales, siendo particularmente abundantes en la familia Meliaceae, a los limonoides derivados de esta familia también se les conoce como meliacinas. (Champagne et al., 1992)

Desde el punto de vista biológico, los limonoides han demostrado tener una gran variedad de propiedades biológicas como son las actividades antimicrobiana, (Lowery et al., 1997), antifúngica (Govindachari et al., 1999), diurética (Duke, 1991) insecticida (Champagne et al 1989; Arnason et al., 1993; Jain et al, 1993;

Kubo et al., 1993;), antialimentaria (Isman et al., 1996; Mata, 1996; Jiménez et al., 1997; Vietch et al., 1999; Céspedes et al., 2000), propiedades reguladoras del crecimiento vegetal (Segura et al., 1993; Céspedes et al., 1998), efectos farmacológicos en animales y humanos (Mc Kinnon et al., 1997; Matsuda et al., 1998) y bactericida (Tada et al., 1999).

Actualmente se ha desarrollado comercialmente dos limonoides con actividad insecticida: la azadiractina y la toosendanina obtenidas a partir *Azadirachta indica* y *Melia toosedan* respectivamente. (Figura 1) (Rembold et al., 1989).

Dentro de la familia Meliaceae la planta más estudiada es el árbol del "neem" o *Azadirachta indica*, un árbol nativo subtropical de las zonas áridas de Asia y África, del cual se ha podido aislar un limonoide presente en las hojas y frutas, la azadiractina.

La azadiractina fue identificada como inhibidor de la alimentación para el saltamontes del desierto, *Schistocerca gregaria* Forsk y ha sido subsecuentemente reportada con actividad antialimentaria contra cerca de doscientas especies de insectos. En hembras de *Epilachna varivestis* (Coleoptera) provocó esterilidad, además de reducir grandemente la producción de huevos. También se realizaron pruebas con 2 cepas genéticamente diferentes de *Plutella xylostella* (L.) para la azadiractina y un insecticida de origen sintético (deltametrin), con la finalidad de observar si inducían desarrollo de resistencia a estos compuestos. En los resultados obtenidos no se observó desarrollo de resistencia en más de 35 generaciones de aquellas cepas probadas con dicho limonoide; sin embargo las cepas probadas con el insecticida sintético desarrollaron factores de resistencia de 20 en una línea y 35 en otra. (Saxena, 1989) Este limonoide es efectivo como fagoinhibidor, repelente tóxico, esterilizante

y trastornador del crecimiento para insectos a dosis tan bajas como de 0.1 ppm. (Jacobson, 1989)

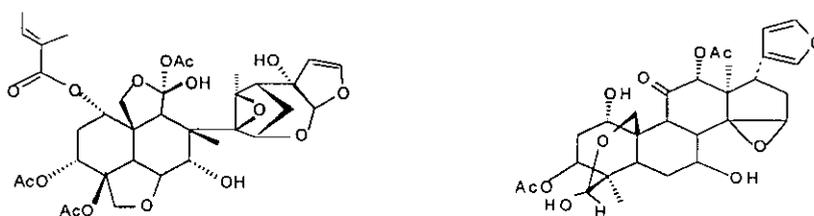


Figura 1 Estructuras de azadirachtina (*Azadirachta indica*) y toosendanina (*Melia toosedan*)

Otros ejemplos estudiados de la familia Meliaceae se describen a continuación.

- *Melia volkensii* Gurke se usa en la medicina tradicional para aliviar el dolor, los extractos de semillas mostraron actividad como antialimentarios contra larvas y adultos de la langosta del desierto *Schistocerca ghanaria* (volkensin) y contra las larvas del gusano *Spodoptera frugiperda*. (Mohammed et al., 1988; Jacobson, 1989)
- El extracto diclorometánico obtenido de *Cedreia salvadorensis*, la mezcla epimérica de fotogedunina y los acetatos de fotogedunina causaron una

inhibición parcial en la germinación, crecimiento radicular en semillas de *Lolium multiflorum* y *Triticum vulgare* ( Lotina et al., 1998).

- Las semillas de *Melia azedarach* contienen varios limonoides comunes a las semillas del neem, por lo que sus extractos poseen actividad insecticida (Jacobson, 1989)
- Los limonoides (trichilinas A-F) extraídos de las raíces y corteza de *Trichillia roka* L son conocidos por su actividad antialimentaria contra las larvas de *Spodoptera eridania* (Cramer) y contra los adultos de *Epilachna varivestis* Mulsant (Conchuela del frijol). El limonoide sendanina aislado de sus frutos es un potente inhibidor del crecimiento contra los gusanos *Heliothis virescens* Fabricius (gusano del tabaco) y *Spodoptera frugiperda* (gusano del maíz.) (Jacobson, 1989).

## **1.2 Antecedentes etnobotánicos y farmacológicos de la Especie *Cedrela ciliolata* (Meliaceae)**

La familia Meliaceae esta representada en México y América Central por 7 géneros y más de 300 especies. El género *Cedrela* posee una compleja taxonomía; en la actualidad se consideran alrededor de 9 especies distribuidas a lo largo de América tropical, desde México hasta Argentina.

La especie *Cedrela ciliolata* fue identificada por Blake, se encuentra distribuida en localidades algo dispersas de Guanajuato, norte de Michoacán y en

los alrededores de las ciudades de Querétaro, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Familia: Meliaceae

Género: Cedrela

Especie: *Cedrela ciliolata*.

Es un árbol hasta de 12 m de alto, pero por lo general no pasa de 10 m, posee un tronco más o menos tortuoso, la corteza de tronco es grisácea, hasta de 60 cm de diámetro, algunas porciones de la planta poseen ligero olor a ajo, florece de marzo a junio sus flores son de color verde con rojo, se ha colectado su fruto de abril a noviembre; es un árbol habitante de suelos someros y de afloramientos rocosos. (Figura 2)

Los nombres comunes con los que se encuentra registrado en la zona son: cuatal, cuaterani (lengua purepecha), nogal, nogalillo corriente ó nogalillo cimarrón.

Esta especie tiende hacia una rápida desaparición de la mayor parte de su área. Sin embargo, puede reproducirse con facilidad por estacas y por semillas. De esta forma se están repoblando algunos sectores de vegetación deteriorada de los alrededores de la ciudad de Morelia.

En la medicina tradicional en México esta especie se emplea en el tratamiento de cólicos estomacales, diarrea, reumatismo, dolores de muelas. (Argueta et al., 1994; Standley, 1983; Penington, 1981; Calderón et al., 1993)



Figura 2. *Cedrela ciliolata* Blake. A. Rama con inflorescencia; B. flores; C. fruto; D. semillas. (Calderón et al., 1993)

### 1.3 Alelopatía

Las plantas generalmente liberan compuestos químicos que afectan el crecimiento, o distribución de otras plantas a su alrededor (Einhellig, 1995). Estas observaciones se realizaron hace más de 2000 años y en la actualidad la comunidad de científicos sigue tratando de elucidar estas interacciones

El término alelopatía fue sugerido en 1937 por el fisiólogo de plantas Molisch, para describir las interacciones químicas entre las plantas incluyendo microorganismos, actualmente dentro de este concepto se considera tanto el efecto inhibitorio como el efecto estimulador. (Alliata, Rice, 1984; Einhellig, 1995). La alelopatía esta interesada en los efectos que los compuestos químicos de las plantas o microorganismos tienen en el crecimiento, desarrollo y distribución de otras plantas y microorganismos en comunidades naturales o sistemas de agricultura. (Einhellig, 1995).

Los compuestos orgánicos que afectan a la planta receptora se conocen como compuestos aleloquímicos o bien aleloquímicos. (Einghellig, 1995). Dichos compuestos aleloquímicos influyen en comunidades de la flora, sucesión de plantas, preservación de semillas, ciclo del nitrógeno, asociaciones mutualistas, productividad de cultivos y defensas de las plantas. (Einghellig, 1995). Algunos ejemplos de compuestos aleloquímicos se mencionan en la tabla 1.

La transferencia de compuestos aleloquímicos producidas en las hojas, tallos, corteza, raíces de una planta superior a otra en una comunidad terrestre pueden entrar en contacto con otras plantas por varios caminos como por ejemplo, volatilización, lixiviados acuosos de hojas y tallos, exudados de las raíces o bien por descomposición de residuos, alternativamente estos compuestos son absorbidos en partículas del suelo y solubilizadas en el mismo. (Einghellig, 1995)

Es a través de fenómenos de alelopatía que algunas especies de plantas interfieren en el desarrollo de los cultivos. (García, 1991) un ejemplo de esto es el sorgo que inhibe el crecimiento del maíz; o la alfalfa que al ser adicionada al suelo de los cultivos de pepino, tomate, lechuga estimulan su crecimiento. (Einghellig, 1985; Rice, 1987)

Cuadro 1. Ejemplos de algunos compuestos alelopáticos presentes en plantas

Tipo de estructura	Compuestos	Especie	
Compuestos alifáticos	Ácido oxálico	<i>Salvia affinalis</i>	
	Ácido fórmico	<i>Urtica dioica</i>	
Lactonas no saturadas	Psilotina	<i>Psilotum nudum</i>	
Lípidos y ácidos grasos	Ácido linoleico	<i>Carapa guianensis</i>	
Terpenoides	Monoterpenos	1-8 cineol	<i>Salvia reflexa</i>
	Triterpenos	Azadiractina	<i>Azadirachta indica</i>
	Sesquiterpenos	Cacalol	<i>Psacalium decompositum</i>
Ácido benzoico y derivados	Ácido hidroxibenzoico y vainillico	<i>Avena sativa</i>	
Ácido cinámico y derivados	Ácido cinámico	<i>Parthenium argentatum</i>	
Quinonas y derivados	Juglona y sorgoleno	<i>Juglans nigra</i>	
Flavonoides	Floridzina	<i>Malus spp</i>	
Taninos	Ácido gálico	<i>Eucaliptus globulus</i>	
Alcaloides	Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i>	
Glicósido cianogénicos	Durrina	<i>Sorghum vulgare</i>	
Cumarinas	Escopoletina	<i>Avena spp</i>	

Además de su actividad alelopática algunos compuestos aleloquímicos tienen funciones estructurales o fisiológicas dentro de las plantas productoras como por ejemplo el ácido p-cumárico y otros fenilpropanoides, comúnmente

identificados en el fenómeno de alelopatía, son intermediarios en la lignificación. (Einghellig, 1995)

Los bioensayos empleados en el laboratorio para el estudio de alelopatía se basan en los efectos sobre la germinación de semillas, elongación radicular, crecimiento de la planta y otros procesos fisiológicos. (Anaya et al., 1995; Putman, 1985; Einghellig, 1995)

La mayoría de los pesticidas sintéticos son dañinos al medio ambiente debido a su larga persistencia, toxicidad inespecífica, contaminación, actividad carcinogénica y mutagénica. Debido a estos problemas mucha de la atención esta siendo enfocada en caminos alternativos para el control, de malezas. Por lo tanto la alelopatía puede ofrecer ayuda en la investigación de modelos de herbicidas naturales, más específicos y menos perjudiciales que aquellos sintéticos usados actualmente en la agricultura. (Jacobson, 1989; Macias, 1995; Duke et al., 1995)

Como los métodos tradicionales para el descubrimiento de nuevos herbicidas se vuelven más difíciles y caros, el interés en productos naturales como fuentes de nuevos herbicidas químicos aumenta. Los productos naturales son una fuente potencial atractiva para la obtención de nuevos herbicidas naturales, no sólo por la diversidad e innovación de estructuras químicas producidas por organismos vivos, sino también por la especificidad, potencial de acciones biológicas y la gran posibilidad de reducción en la bioacumulación perjudicial y/o residuos en el suelo y agua.(Macias et al., 1999 & 2000)

Como se mencionó anteriormente, el término alelopatía involucra tanto el efecto negativo como positivo de una planta sobre otra por lo cual es importante definir el término de sustancia reguladora del crecimiento. El término de sustancias reguladoras del crecimiento se refiere a aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta o bien alguna sustancia sintetizada en el

laboratorio que se trasladan a otro lugar, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo vegetal. (<http://www.perso.wanadoo>)

### 1.3.1 Malezas

Las malezas son un problema importante en la agricultura, pueden definirse como una planta que crece siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resultan no deseables por él en un lugar y momento determinado (García, 1991).

La presencia de maleza en campos cultivados causan un efecto perjudicial sobre la producción y calidad de la cosecha debido a la competencia por la luz, agua, nutrientes y espacio del suelo e interferencia con las operaciones de cosecha; con lo cual se contamina la producción obtenida y se aumentan los costos de operación. De esta forma, la presencia de malezas en áreas cultivables reduce la eficiencia de la fertilización y la irrigación, facilita el aumento de otras plagas y al final los rendimientos agrícolas y su calidad decrecen severamente. Algunas veces pueden servir como hospedadores de insectos y patógenos dañinos a las plantas cultivables. Además muchas especies de malezas liberan una variedad de compuestos alelopáticos de hojas, tallo y raíces que resultan ser tóxicos a las plantas cultivables. (Macías et al., 1999).

Las malezas más comunes en los cultivos pertenecen a las familias Amarantaceae, Ambrosiaceae, Compositae, Euphorbiaceae, Graminae, dentro de esta última se encuentran las especies *Echinochloa crus-galli* y *Lolium multiflorum*, por lo cual ésta se convierte en una de las familias más importantes de ser combatida. (García, 1996; Labrado et al., 1996)

Una de las formas de control de malezas son los herbicidas. Entendemos por herbicida todo compuesto químico que inhibe total o parcialmente el crecimiento de las plantas. Los herbicidas son compuestos, en su mayor parte orgánicos, que interfieren de algún modo con el funcionamiento de las plantas, deteniendo su crecimiento y producción y en muchos casos provocando su muerte. (García, 1991; Macias et al., 2000; Bach, 1992)

El mecanismo de acción de la mayoría de los herbicidas sintéticos consiste preferentemente en la interrupción de alguno de los procesos fisiológicos siguientes: a) fotosíntesis y reacción de Hill; b) respiración y transporte electrónico en las mitocondrias; y c) metabolismo de los ácidos nucleicos y de la síntesis de proteínas. (García, 1991)

### **1.3.2 Germinación**

La germinación empieza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario, llamado radícula. Esto incluye numerosos eventos, por ejemplo, la hidratación de las proteínas, cambios a nivel estructural, en la respiración, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular, ninguno de estos eventos por sí solo constituye la germinación, pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado con un metabolismo lento y casi indetectable en un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento. La germinación en su sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina. Los procesos que ocurren en la plántula naciente, tal como la movilización de las principales reservas de almacenamiento, no son parte de la germinación, son eventos postgerminativos (Black et al, 1994)

Los medios por los cuales se puede determinar que la germinación ha progresado es la medición de la toma de agua o la respiración. Estas medidas dan solo una indicación aproximada del estado de germinación alcanzado.

La emergencia del eje (la radícula) nos permite reconocer cuando la germinación ha sido completada. El grado de avance de la germinación en una población de semillas se expresa en el porcentaje de la germinación alcanzada en función del tiempo. (Black et al., 1994)

Las semillas se clasifican en monocotiledóneas y dicotiledóneas las cuales presentan las características descritas a continuación.

- Monocotiledóneas. Se caracterizan porque sus plántulas poseen un solo cotiledón. Sus hojas son con frecuencia largas, estrechas y con nervaduras paralelas, su raíz es fibrosa. Un ejemplo de ellas es *Lolium multiflorum* (Semillas de pasto).
- Dicotiledóneas. Se caracterizan porque sus plántulas poseen dos cotiledones o falsas hojas que, frecuentemente se desarrollan al salir a la superficie. Las hojas verdaderas suelen ser anchas y con nervaduras con un eje central, su raíz es típica, por ejemplo *Physalis ixocarpa* (semillas de Tomate) (Black et al., 1994; Mauseth, 1988)

#### **1.4 Insectos**

Su incidencia sobre la actividad humana es muy importante, se pueden clasificar a los insectos en benéficos y perjudiciales. Los primeros reportan materias primas (miel, seda) e intervienen decisivamente en la polinización de muchas plantas. Asimismo es importante su contribución al mantenimiento de los sistemas ecológicos, ya que constituyen el alimento de muchos animales

superiores, colaboran activamente en la descomposición de la materia orgánica y, además controlan de forma natural a muchos insectos potencialmente dañinos.

También son importantes los perjuicios que causan a la especie humana. En primer lugar, son causantes directos de parasitismo y molestias sobre el hombre y animales domésticos, además de ser transmisores de peligrosas enfermedades como el paludismo, que ha ocasionado millones de víctimas, en el mundo. Los efectos negativos de los insectos sobre plantas cultivadas y productos almacenados, son muy importantes y en este sentido han constituido uno de los azotes de la humanidad. De la importancia de su incidencia como plagas agrícolas, da idea el hecho de que más del 90% de consumo de insecticidas va destinado al combate de insectos perjudiciales a la agricultura y a productos almacenados. (Camps, 1988)

#### **1.4.1 Insecticidas**

Existen muchos métodos de lucha contra los insectos, que se pueden dividir en dos grupos: según se usen o no productos químicos. Entre los métodos que no requieren de productos químicos se encuentran, métodos de destrucción física, esterilización de machos o uso de depredadores naturales.

Otros métodos alternos empleados son el adelanto o retraso de la siembra (para disminuir la incidencia de una plaga determinada), la alternancia de cultivos (para evitar excesiva proliferación de algún insecto), o inundaciones del terreno (para destruir larvas de insectos del suelo), destrucción de los restos de cosechas, etc. (Coll, 1988)

El método más elemental que el hombre utilizó, consistió en la recolección y destrucción manual de insectos. Una variante de los métodos de destrucción física es la atracción de los insectos a diversos sistemas de trampas en donde son destruidos. El sistema de atracción más sofisticado es la utilización de feromonas sexuales. (Coll, 1988)

El control de plagas con productos químicos implica el uso de insecticidas, a los cuales podemos definir como sustancias o mezcla de sustancias que al ser ingeridas, inhaladas o depositadas sobre los insectos, provocan su muerte; estas sustancias pueden ser de origen natural o sintético (Vives, 1988; Coulson, 1990)

Diversos extractos de plantas se han utilizado como insecticidas, como el extracto del piretro obtenido de las flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Asimismo existe ya referencia en el año 1690 de la utilización como insecticida de hojas pulverizadas o extractos acuosos de la planta de tabaco. Actualmente se conoce que el principio activo, la nicotina es tóxica a los insectos por contacto. (Coll, 1988; Vives, 1988)

Los compuestos que pueden actuar como inhibidores de la alimentación constituyen un grupo de sustancias que han despertado un enorme interés en los últimos diez años, como posible alternativa de los insecticidas de acción directa (organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc) y junto a los reguladores el desarrollo de los insectos (inhibidores de oviposición, hormonas de muda y juveniles y sus antagonistas), feromonas atrayentes y repelentes, se han descrito como insecticidas de acción indirecta. En cualquier caso, pueden constituir una base firme para los programas de control integrado de plagas de insectos. (Coll, 1988; Nakatani et al., 1994)

La inhibición de la alimentación se ha definido con los términos de antialimentario. En el proceso de alimentación se han diferenciado cuatro etapas:

1) localización de la planta y reconocimiento de la misma como sustrato; 2) inicio de la alimentación; 3) alimentación propiamente dicha, con ingestión de los nutrientes y 4) término de la alimentación.

Definiremos por tanto como inhibidor alimentario, en sentido estricto, a la sustancia que tras provocar en el insecto una respuesta de interrupción del proceso de alimentación en su etapa tercera (tras un consumo inicial) conduce a su muerte por inanición, que sobreviene en la proximidad de la planta tratada, cerca de la cual permanece hasta el desenlace final, el modo de acción de un antialimentario es a través de la ingestión. (Coll, 1988; González 1997; Escoubas, 1995)

Frente a los antialimentarios sintéticos (carbamatos, entre otros), empleados desde hace ya algún tiempo en agricultura y que presentan inconvenientes similares de los insecticidas clásicos, los productos naturales aparecen como una alternativa más prometedora para prevenir los problemas de persistencia y toxicidad inespecífica. (Ley, 1990; Klocke, 1987; Hedin, 1991)

Se puede establecer una clasificación de las sustancias antialimentarias basándose en el tipo de estructura (Tabla 1), los grupos principales considerados son: terpenos, compuestos heterocíclicos (cumarinas, flavonoides, lignanos, taninos), compuestos aromáticos (fenoles, quinonas, ácidos fenólicos) alcaloides, esteroides y otros. (Coll, 1988)

#### **1.4.2 Conchuela mexicana de frijol *Epilachna varivestis* Mulsant**

El insecto conocido comúnmente como: catarina de frijol, conchuela mexicana de frijol, tiene como nombre científico *Epilachna varivestis* Mulsant perteneciente al orden Coleoptera y a la familia Coccinellidae.

Esta familia es muy importante económicamente, debido a que se encuentran algunos insectos benéficos para el hombre, sin embargo, también algunos son una seria plaga: el escarabajo de calabaza *Epilachna borealis* Fabricus y el escarabajo mexicano del frijol *Epilachna varivestis* Mulsant. Diferentes a la mayoría de los Coccinellidae los cuales son carnívoros y se alimentan de pulgones y otros pequeños insectos, estas especies atacan a las plantas.

El frijol es el anfitrión preferido para la catarina del frijol e incluye muchas variedades de frijol y habas, *Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus lumatus* L., respectivamente. También puede vivir en la soya, alfalfa y trébol. En algunas áreas es una seria plaga para los cultivos de frijoles, habas y soya, durante años de alta infestación la total defoliación de estas plantas es muy común. La conchuela mexicana se cree que es nativa del altiplano del sureste de México. Sin embargo, la verdadera área habitada se encuentra desde Canadá hasta Centroamérica.

Este insecto tiene una metamorfosis completa con sus distintos estados de huevos, larvas, pupas y adultos antes de llegar a ser un insecto adulto viable. Los huevos son de color amarillo pálido a amarillo naranja. Se encuentran regularmente en grupos de 40 a 75 en la cara inferior de las hojas de frijol. Las larvas recién emergidas del cascaron son de color amarillo. Durante su tiempo de desarrollo la larva pasa por cuatro estadios larvales. Al madurar se une por sí misma a la parte posterior del cuerpo de las hojas, tallo o ramas de las plantas de los frijoles y a veces a partes de plantas cercanas; en esta posición, la larva se transforma a pupa. La pupa es de color amarillo, sin espinas y aproximadamente del mismo tamaño (6-7 mm) y forma que el adulto. Los adultos son de color café oscuro con manchas negras y los machos son ligeramente más pequeños que las hembras.

Cuadro 2. Clasificación de las sustancias antialimentarios basándose en su tipo de estructura.

Tipo de estructura	Compuesto	Familia	Insecto que afecta
<b>Terpenos</b>  Monoterpenos   Sesquiterpenos   Diterpenos  Triterpenos	Xilomollina	<i>Xylocarpus molluscensis</i> (Meliaceae)	<i>Spodoptera exempta</i>
	Ipolamida	<i>Stachyrapheta mutabilis</i> (verbenaceae)	<i>Spodoptera littoralis</i>
	Scorpiodina	<i>Vernonia scorpioides</i> (compositae)	<i>Locusta</i>
	Warburganal	<i>Warburgia ugadensis</i> (Canellaceae)	<i>Spodoptera littoralis</i>
	Nagilactona C y D	<i>Podocarpus Gracilior</i> (Podocarpaceae)	<i>Spodoptera frugiperda</i>
	Azadirachtina	<i>Azadirachta indica</i> (meliaceae)	<i>Schistocerca gregaria</i> y <i>Spodoptera eridania</i>
	Harrisonina	<i>Harrisonia abyssinica</i> (Simarubaceae)	<i>Spodoptera exempta</i>
	Trichilina	<i>Trichilia roka</i> (Meliaceae)	<i>Spodoptera eridania</i> y <i>Epilachna varivestis</i>
<b>Compuestos heterociclicos</b>  Tipo Cumarina  Tipo Lignano  Tipo Flavonoide	isopempinellina	<i>Orixa japonica</i> (Rutaceae)	<i>Spodoptera exempta</i>
	Piperenona	<i>Piper futokatzura</i> (Piperaceae)	<i>Spodoptera litura</i>
	Quercetina	<i>Quercus macrocraipa</i> (Fagaceae)	<i>Scolytus multistriatus</i>

Cuadro 2. Clasificación de las sustancias antialimentarios basándose en su tipo de estructura. (continuación)

Tipo de estructura	Compuesto	Familia	Insecto que afecta
<b>Derivados aromáticos</b>	Juglona	<i>Carya ovata</i> (piperaceae)	<i>Scolytus multistriatus</i>
Quinonas	Isoasarona	<i>Piper futokatzura</i> (Piperaceae)	<i>Spodoptera litura</i>
Derivados fenólicos	Solanina	<i>Solanum tuberosum</i> (Solanaceae)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<b>Alcaloides</b>	Chaconina	<i>Solanum chacoense</i> (Solanaceae)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<b>Esteroides</b>	Nicandrenona	<i>Nicandra physaloides</i> (Solanaceae)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<b>Otras sustancias</b>	Miricosido	<i>Clerodendron myricoides</i> (Verbenacea)	<i>Spodoptera exempta</i>

Las catarinas adultas salen de hibernación, de donde han estado durante los meses de invierno bajo las acumulaciones de maleza u hojas, tan pronto como el clima es cálido. A mediados de Mayo los adultos se dirigen a buscar plantaciones de frijoles o habas pero en Junio empiezan a depositarse en las hojas de los frijoles. Después de comer las plantas de frijol tiernas por unas dos semanas, las hembras depositan sus huevos, de 500 a 600 en promedio, en lotes de 40 a 75 en la parte posterior del follaje de las hojas de frijol. Los huevos son cuidadosamente adheridos al final así que todos quedan en posición vertical.

Estos eclosionan en una semana en un clima cálido pero requieren de al menos dos semanas bajo condiciones menos favorables. Las larvas se alimentan vorazmente de dos a cinco semanas, dependiendo de la temperatura. Cuando los primeros huevos eclosionan, todos ellos se alimentan juntos, pero si la hoja está algo seca, la primera larva que eclosiona puede devorar a los huevos que aún no han eclosionado. El estado pupal dura de cinco a diez días, pero podría alargarse más en un clima frío o en el otoño. Los adultos son fuertes voladores por lo cual viajan largas distancias buscando nuevas cosechas de frijoles.

El insecto tanto en su estado larvario como adulto se alimenta de las hojas, flores y vainas en crecimiento de la planta del frijol, pero el daño más grande se hace en las hojas. Las catarinas adultas no ocasionan grandes daños comparadas con los que ocasionan las larvas. Generalmente se alimentan adhiriéndose a la superficie inferior de las hojas y comen secciones irregulares de dicha superficie. La parte superior de las hojas rápidamente se seca después de que la parte inferior es dañada, dando una apariencia de encaje, es decir una apariencia esquelética. Ocasionalmente las flores y en muchos casos las vainas pequeñas pueden ser totalmente destruidas o dañadas hasta provocar su caída de la planta. El daño más severo se presenta durante los meses de Julio a Agosto. (Bautista et al., 1994; [http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/bean/mexican\\_bean\\_beetle.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/bean/mexican_bean_beetle.htm); <http://www.ces.ncsu.edu/depts/ent/notes/vegetables/veg26.html> ).

Para proveer protección al cultivo en situaciones de inmigraciones de la conchuela de frijol, se usan insecticidas con una alta eficacia contra las larvas y catarinas adultas, con actividad residual suficiente para suprimir cualquier migración de los adultos.

La regulación de esta plaga se ha realizado a través de controles físicos y biológicos. El control físico consiste en la destrucción de lugares de hibernación y plantaciones después del cultivo, el adelanto o retraso de la siembra (para

disminuir la incidencia de una plaga determinada), la alternancia de cultivos (para evitar excesiva proliferación de algún insecto), labores culturales o inundaciones del terreno (para destruir larvas de insectos del suelo), etc. El control biológico incluye al menos diecisiete especies de predadores, entre los que se encuentran la mariposa *Pradexodes epilachna* y la avispa *Pediobrius foveolatus*. Todos ellos se alimentan de los huevos, larvas y pupas de la conchuela de frijol. Sin embargo, las catarinas están protegidas por sus alas duras que las cubren y por un líquido amarillo de olor ofensivo el cual es secretado en pequeñas gotas en la unión de las patas cuando los insectos son molestados. (Coll, 1988; [http://ipmwww.ncesu.edu/soybeans/insects/insects\\_soybeans.html](http://ipmwww.ncesu.edu/soybeans/insects/insects_soybeans.html))

## II. JUSTIFICACIÓN

Desde tiempos remotos las plagas constituyen riesgos naturales dentro de los intereses y actividades del hombre debido a que causan pérdidas sustanciales en la producción agrícola. (Vives, 1998; Labrado, 1996; García, 1991)

El uso de pesticidas sintéticos ha sido de gran ayuda para el hombre, sin embargo su uso indiscriminado también ha provocado grandes daños al ambiente, debido a su extrema persistencia, toxicidad, bioacumulación y tendencia a causar daño a los seres vivos, además de inducir resistencia a plantas e insectos. Por estas razones su uso ha tenido que ser severamente restringido o en algunos casos prohibido. Actualmente se ha iniciado una búsqueda de compuestos sintéticos "seguros" entre los cuales se encuentran los pesticidas botánicos. (Jacobson, 1989; Macias, 1995; Singh et al., 1997)

Las investigaciones recientes han puesto mucho énfasis en los compuestos de origen natural para su empleo en el control biológico de malas hierbas, insectos nocivos y otras plagas. Por lo cual están siendo explorados los extractos derivados de plantas y los compuestos fitoquímicos como productos con grandes posibilidades de ser empleados para el combate a las plagas o bien como posibles modelos para nuevas clases de plaguicidas.

Los plaguicidas de origen natural son selectivamente tóxicos, no se bioacumulan, por consiguiente exhiben persistencia corta en el ambiente, son fácilmente biodegradables, es decir poseen menos impactos negativos al ecosistema que los plaguicidas convencionales por lo cual no contaminan aire, agua ni suelo. (Singh et al., 1997; Duke et al., 1995)

La rotenona, piretro y nicotina son algunos ejemplos de metabolitos de origen vegetal que presentan propiedades herbicidas. Actualmente la rotenona es usada solo en un número limitado de cultivos debido a su alta toxicidad a los peces, el piretro natural de las flores de crisantemo es empleado principalmente como un agente letal para los insectos voladores y reptadores; la nicotina es usada en algunos cultivos debido a que es nociva a los insectos por contacto. (Coll, 1988; Vives, 1988)

Las familias botánicas más prometedoras para el uso en el presente y en el futuro son las especies de las familias Meliaceae, Ruteaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiateae y Canallacea debido a que son menos tóxicas al hombre y a los mamíferos. (Jacobson, 1989; Champagne et al., 1992)

Los efectos fisiológicos de los compuestos con actividad fitotóxica (compuestos alelopáticos) varían ampliamente. La mayoría de esos compuestos actúan con especificidad sobre grupos diferentes de organismos; esta característica les representa atractivos en la investigación de nuevos compuestos bioactivos. (Rembold, 1989)

Debido a que los compuestos alelopáticos pueden afectar diferentes niveles organizacionales de vida comunidades, organismos, tejidos, células, organelos y procesos metabólicos- los extractos de plantas y los compuestos aislados actualmente han sido evaluados usando semillas, hongos fitopatogénicos e insectos. Las primeras pruebas determinadas dependiendo del material biológico utilizado en los bioensayos son: la germinación, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la sobrevivencia, seguidos de la evaluación de los modos posibles de acción de los compuestos probados en procesos como respiración, división celular, actividad enzimática y arreglos estructurales de tejidos y células. (Putman 1985; Anaya et al., 1995; Eিংhellig, 1995)

Actualmente se están realizando estudios de diferentes especies de plantas mexicanas con importancia ecológica o medicinal. Dentro de las plantas medicinales de la flora mexicana se encuentra la planta *Cedrela ciliolata*, que además de tener propiedades farmacológicas, de acuerdo a la información descrita bibliográficamente, puede suponerse la existencia de metabolitos biológicamente activos, presentes en dicha planta, con posible actividad alelopática e insecticida, ya que en su hábitat natural se ha podido observar el efecto alelopático con las malezas que crecen a su alrededor y su actividad frente a los insectos.

Por estas razones se decidió estudiar los extractos y fracciones de la planta *Cedrela ciliolata*, además de que será útil como una contribución al desarrollo de nuevos herbicidas, reguladores del crecimiento y/o insecticidas.

## **2.1 Objetivos**

Con base en lo descrito anteriormente el objetivo principal de este trabajo es investigar la actividad alelopática e insecticida de los extractos diclorometánico y metanólico de la planta *Cedrela ciliolata* con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes alelopáticos e insecticidas.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de los extractos diclorometánico y metanólico a partir de la madera de *Cedrela ciliolata*.
2. Estudiar la actividad alelopática de dichos extractos mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación, elongación del crecimiento radicular y del tallo

y peso seco de dos especies de semillas *Lolium multiflorum* (semilla monocotiledónea) y *Phisalis ixocarpa* (semilla dicotiledónea), utilizando la evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas en la caja Petri.

3. Determinar la actividad insecticida de los extractos en larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant a través del método de actividad antialimentaria de elección y n o elección en la caja Petri.en la caja Petri.
4. Obtener las fracciones parciales del extracto activo mediante cromatografía en columna abierta.
5. Estudiar la actividad alelopática de las fracciones obtenidas mediante el bioensayo indicado en el inciso 2.
6. Describir la actividad mostrada por los diferentes extractos y fracciones en las especies de prueba.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal

El material vegetal (madera) fue recolectado en Morelia estado de Michoacán en el mes de septiembre de 1999. Este material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y fue fragmentado en pequeñas piezas.

#### PROCEDIMIENTOS GENERALES

#### 3.2 Preparación de los extractos orgánicos a partir de la madera de *Cedrela ciliolata*.

La madera de *Cedrela ciliolata* (1.10 Kg), previamente seca y fragmentada, se sometió a maceración 2 veces con dos disolventes distintos a temperatura ambiente, los solventes utilizados fueron diclorometano (volumen total 20 Litros) y posteriormente metanol (volumen total 20 Litros).

Los extractos resultantes se concentraron por destilación a presión reducida; obteniéndose 19.44 g de extracto diclorometánico y 35.48 g de extracto metanólico.

Se realizó un estudio fitoquímico biodirigido por lo que se evaluaron los extractos a través de las pruebas biológicas correspondientes con la finalidad de seleccionar y fraccionar solo el extracto más activo.

El extracto diclorometánico de la madera de *Cedrela ciliolata* fue el extracto más activo en el bioensayo de la evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas en la caja Petri. Dicho extracto (16.24 g) se adsorbió en silica gel 70/230 (Merck) y se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna abierta empacada con silica gel 70/230 (Merck). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetato de etilo en distintas proporciones, acetato de etilo 100% diclorometano- metanol en distintas proporciones y metanol 100%.

Se recolectaron 238 fracciones de 250 mL cada una, cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina con placas de aluminio de un espesor de 0.25 mm de espesor de silica gel. Se reunieron todas aquellas fracciones que resultaron cromatograficamente similares. Posteriormente algunas de las fracciones reunidas presentaron una fase líquida y una sólida por lo que se procedió a su separación por decantación. Este proceso generó un total de 17 fracciones primarias reunidas. El cuadro 1 resume los sistemas de elución empleados y las fracciones reunidas. Cada una de las fracciones resultantes se evaluaron mediante el bioensayo de evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas en la caja Petri.

Los extractos diclorometánico y metanólico de la madera de *Cedrela ciliolata* fueron evaluados a través del método de actividad antialimentaria y de preferencia en la caja Petri contra las larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant.

### 3.3 Pruebas biológicas

#### 3.3.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas.

Se prepararon soluciones de 2,10,50,100,500 y 1000 ppm para cada una de las muestras a probar (extractos y fracciones), con diferentes disolventes, dependiendo de su solubilidad.

Se contaron 25 semillas de *Lolium multiflorum* (Poaceae) y 25 semillas de *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) para cada una de las pruebas a realizar, el ensayo se realizó por triplicado. Las semillas fueron seleccionadas previamente considerando uniformidad de tamaño y se descartaron las semillas dañadas. Estas semillas se desinfectaron con una solución de cloro al 10% la cual se dejó actuar por 15 minutos, pasado este tiempo se enjuagaron con agua estéril y se secaron a presión reducida.

Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro interno provistas de un disco de papel filtro, las cuales se esterilizaron en autoclave (15 minutos a 15 lbf).

Las muestras se adsorbieron sobre el papel filtro contenido en la caja. Se dejó evaporar el disolvente, se colocaron las semillas sobre el papel filtro dispersándolas en la región en donde se encontraba adsorbida la muestra; se adicionaron 5 mL de agua estéril. Posteriormente las cajas se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 28°C durante cinco días en condición de obscuridad.

Siguiendo el mismo procedimiento se realizó un control negativo que contenía agua estéril con el disolvente utilizado para la disolución de cada muestra y un control positivo utilizando ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Cuadro 3. Resumen de los sistemas de elución empleados y fracciones obtenidas a partir del extracto diclorometánico de la madera de *C. ciliolata*

Eluyente	Proporción del eluyente (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Peso de fracción (g)
Hexano	100	1-12	1-6	1.2121
Hexano-AcOEt	95:5	13-23	7-14	0.0135
	90:10	24-36	15-23	1.6745
	80:20	37-47	24-38 sólido	0.8590
	70:30	48-63	24-38 líquido	0.4896
	60:40	64-75	39-63 sólido	0.9391
	50:50	76-93	39-63 líquido	1.4629
	40:60	94-103	64-83	1.3519
	30:70	104-113	84-106	0.6311
	20:80	114-125	107-144 sólido	0.5761
10:90	126-133	107-144 líquido	2.0503	
AcOEt	100	134-144		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	145-156	145-162 sólido	1.2458
	85:15	157-166	145-162 líquido	1.0210
	80:20	167-180	163-216 sólido	0.2613
	70:30	181-189	163-216 líquido	0.9248
	60:40	190-198		
	50:50	199-207		
	20:80	208-216		
MeOH	100	217-238	217-238 sólido	0.0889
			217-238 líquido	0.8508

Se contó el número de semillas germinadas a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra. (Macias F. 1995, 1999 & 2000; Anaya .et al., 1987 & 1990; Fischer 1988; Castañeda 1992; Li et al., 1992)

Lo anterior se realizó dentro de una campana de flujo laminar para evitar contaminación microbiana.

Transcurrido el periodo de incubación se eliminó el agua de cada una de las cajas y se midió la longitud tanto de la raíz como del tallo. Posteriormente las plántulas se secaron en una estufa a 50°C por espacio de 48 horas para obtener el peso seco.

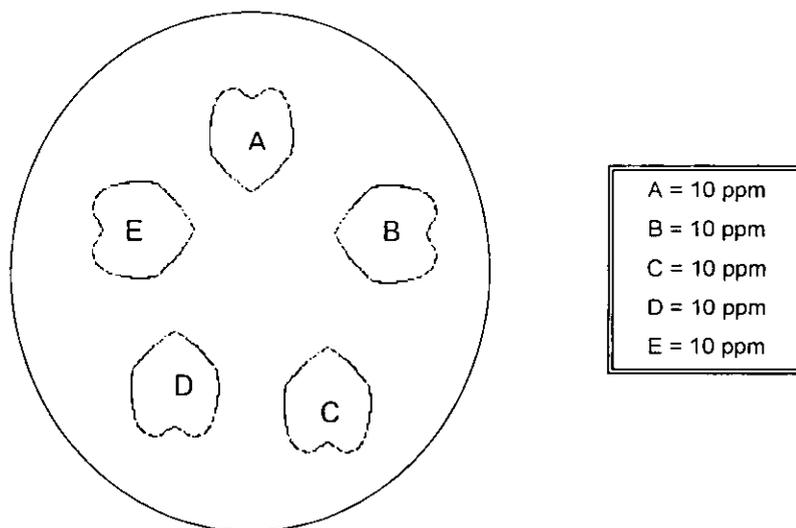
### **3.3.2 Método para evaluar actividad antialimentaria sobre el insecto *Epilachna varivestis* Mulsant**

#### **a) Prueba de actividad antialimentaria de no elección**

A partir de los extractos a probar se prepararon soluciones de 10, 20, 50, 100 y 200 ppm utilizando como medio de disolución metanol:agua (1:4). A estas soluciones se les adicionó 2 µl de Tween 20 al 2% (Tween 20, HYCEL DE MEXICO, Cat. No. 64590). Se seleccionaron hojas de planta de frijol *Phaseolus vulgaris*, (Leguminosae) que no presentaran daño alguno y que fueran del mismo tamaño y forma, cultivadas en el Centro de Investigación Biotecnológica, Cuernavaca, Morelos.

En cada una de las soluciones anteriores se sumergieron 5 hojas de frijol por 20 segundos y se dejaron secar sobre papel absorbente; una vez evaporada la solución de estas hojas, se colocaron en una caja Petri de 15 cm de diámetro

provista de 6 mL de agar a una concentración de 15 g/L ( Agar-agar HYCEL DE MEXICO, Cat. No. 855) , un disco de papel filtro de 15 cm de diámetro y 1 mL de agua destilada, de acuerdo al siguiente esquema 1.



Esquema 1. Prueba de actividad antialimentaria de no elección con larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant.

Se colocaron 5 larvas (segundo estado larvario) sobre cada una de las hojas de frijol; las cajas Petri se sellaron con papel parafilm. Se incubaron a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa  $65 \pm 5\%$  y un fotoperiodo de 12:12 horas ( Bautista et al., 1994; Valladares, 1997; Kubo. et al., 1985); durante 4 días en una estufa bacteriológica ECF-150 Especial

Se realizaron controles positivos químico (malatión) y biológico (*Annona muricata*); y un control negativo (metanol:agua, 1:4), siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

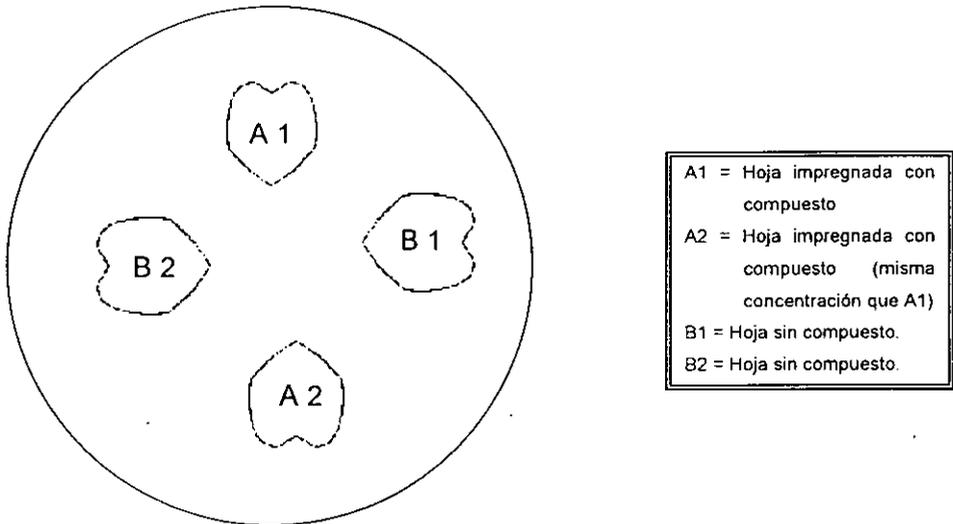
Finalmente pasado el periodo de incubación se midió el área dañada de las hojas y se calculó el porcentaje de disminución de alimentación. (Ley, 1990; Bell et al., 1996; Faini et al 1997; Duke et al., 1999; Simmond, 2001; Frag et al., 2001; Wheeler et al 2001)

#### **b) Prueba de actividad antialimentaria de elección o preferencia.**

A partir de los extractos a probar se prepararon soluciones de 10, 50, y 200 ppm utilizando como medio de disolución metanol:agua (1:4). A estas soluciones se les adicionó 2 µl de Tween 20 al 2% ( Tween 20, HYCEL DE MEXICO, Cat. No. 64590). Se seleccionaron hojas de planta de frijol *Phaseolus vulgaris*, que no presentaran daño alguno y que fueran del mismo tamaño y forma, cultivadas en el Centro de Investigación Biotecnológica, Cuernavaca, Morelos.

En cada una de las soluciones anteriores se sumergieron 2 hojas de frijol por 20 segundos y se dejaron secar sobre papel absorbente; una vez evaporada la solución de las hojas de frijol tratadas, se colocaron en una caja Petri de 15 cm de diámetro provista de 6 mL de agar a una concentración de 15 g/L (Agar-agar HYCEL DE MEXICO, Cat. No. 855) , un disco de papel filtro de 15 cm de diámetro y 1 mL de agua; en la misma caja Petri se colocaron 2 hojas recién cortadas de *P. vulgaris* con las mismas indicaciones descritas anteriormente, de acuerdo al siguiente esquema 2.

Se colocaron 10 larvas (segundo estado larvario) en el centro de la caja Petri; las cajas Petri fueron selladas con papel parafilm. Se incubaron a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa  $65 \pm 5\%$  y un fotoperiodo de 12:12 horas ( Bautista et al., 1994; Valladares, 1997; Kubo. et al., 1985); durante 4 días en una estufa bacteriológica ECF-150 Especial.



Esquema 2. Prueba de actividad antialimentaria de elección o preferencia con larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant.

Se realizaron controles positivos químico (malation) y biológico (*Annona muricata*); y un control negativo (metanol:agua, 1:4), siguiendo el mismo procedimiento.

Finalmente pasado el periodo de incubación se midió el área dañada en las hojas y se calculó el porcentaje de área dañada en las mismas. (Ley, 1990; Bell et al., 1996; Faini et al 1997; Duke et al., 1999; Simmond, 2001; Fraga et al., 2001; Wheeler et al 2001)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que las plantas constituyen una fuente valiosa para el descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Ghisalberti 1993) y que México es un país rico en una gran variedad de especies de plantas, se selecciono a la especie *Cedrela ciliolata* (nativa del estado de Michoacán) tomando como base los criterios quimiotaxonómicos y etnomédicos. Durante la realización de los bioensayos preliminares del extracto total de la madera de *Cedrela ciliolata*, se puede observar que existen metabolitos que son capaces de modificar la germinación de semillas y el crecimiento de las raíces y tallo de las plántulas.

### 4.1 Obtención de los extractos a partir de la madera de *Cedrela ciliolata*

Se realizó la extracción de la madera de *C. ciliolata* por maceración con dos disolventes: diclorometano y metanol. Se obtuvo 19.44 g del extracto diclorometánico, de color café claro y olor característico y 35.48 g del extracto metanólico de color café rojizo, muy viscoso y olor característico.

Posteriormente se realizó la prueba biológica "Evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas" a estos extractos y se eligió el extracto que presentó mayor actividad para proceder a su fraccionamiento; en este caso el extracto diclorometánico se sometió a fraccionamiento y las fracciones primarias reunidas resultantes de este proceso, se sometieron a esta misma prueba en la caja Petri. Posteriormente los extractos se sometieron a la prueba biológica antialimentaria con las larvas del insecto *Epilachna varivestis* Mulsant.

## 4.2 Prueba biológica

### 4.2.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas.

El estudio fue centrado en 3 parámetros macroscópicos principales: germinación y elongación de raíz y tallo. Estos parámetros son aceptados como medidas indirectas de otros procesos fisiológicos afectados por los compuestos aleloquímicos probados. (Putman, 1985; Anaya et al., 1995; Eingham 1995).

Se realizaron ensayos de germinación, elongación de raíz, tallo y determinación de peso seco con semillas monocotiledóneas (*L. multiflorum*) y dicotiledóneas (*P. ixocarpa*). Los resultados reportados son los promedios de las replicas realizadas para cada bioensayo y se encuentran reportadas en porcentajes de crecimiento con respecto al control, es decir un porcentaje de cero significa una inhibición total del crecimiento mientras que valores mayores a 100 representan un aumento en el crecimiento. El error estandar se encuentra reportado en las tablas correspondientes con  $P < 0.05$  calculado en el programa Origin versión 4.1.

- Germinación (Extractos)

En el bioensayo de germinación podemos observar que las semillas de *L. multiflorum* al estar expuestas al extracto diclorometánico a la concentración de 50 ppm muestran un aumento en la germinación, en cambio a concentraciones más altas se observa una notable inhibición de la germinación (0 % de germinación 1000 ppm). Similarmente, el extracto metanólico muestra una tendencia parecida, a bajas concentraciones (10 ppm) muestra un incremento en la germinación de las semillas pero al aumentar la concentración del extracto se aprecia una inhibición

en la germinación (0% de germinación a 1000 ppm). Como puede observarse en la tabla y gráfica 1.

En cambio frente a semillas de *P. ixocarpa* podemos observar que los extractos diclorometánico y metanólico también presentan actividad reguladora pero no tan marcada como en las semillas de *L. multiflorum*, ya que ambos extractos aumentan la germinación a bajas concentraciones (menor a 100 ppm). En semillas de *P. ixocarpa*, el extracto diclorometánico presenta un efecto regulatorio a 100 ppm, ya que aumenta el crecimiento sobre un 25 % más que el control; además de inhibir la germinación en un 59% a una concentración de 1000 ppm. En cambio el extracto metanólico aumenta el crecimiento en un 10 % más que el control a 100 ppm e inhibe el crecimiento de las semillas conforme aumenta la concentración hasta un 88% de crecimiento a 1000 ppm (Tabla y gráfica 5).

- Elongación de raíz (Extractos)

El crecimiento de la raíz en las plántulas de *L. multiflorum* se ve incrementado a bajas concentraciones (10 ppm) para ambos extractos, sin embargo al aumentar la concentración de los extractos diclorometánico y metanólico, se observa una inhibición gradual del crecimiento hasta 0% de crecimiento radicular a 1000 ppm. (Tabla y gráfica 2)

En cambio en las plántulas de *P. ixocarpa* para el extracto diclorometánico se observa un aumento en el crecimiento de la raíz a 50 ppm hasta 148%, pero conforme aumenta la concentración se observa una disminución del crecimiento, aunque no tan marcada como lo muestra el mismo extracto en plántulas de *L. multiflorum* (inhibe al 89% el crecimiento radicular). El extracto metanólico a bajas concentraciones (10 ppm) aumenta el crecimiento radicular de las plántulas de *P.*

*ixocarpa* hasta un 27% más que el control y a altas concentraciones inhibe el crecimiento solo hasta un 73%. (Tabla y gráfica 6)

- Elongación de tallo (Extractos)

Ambos extractos poseen actividad sobre la elongación del tallo; en las plántulas de *L. multiflorum* el extracto diclorometánico presenta inhibición en el desarrollo del tallo de forma gradual hasta 1000 ppm, en la cual el desarrollo del tallo es nulo. En cambio el extracto metanólico a 10 ppm presenta aumento en el crecimiento de tallo hasta un 136% pero al incrementarse la concentración hasta 1000 ppm la elongación de tallo disminuye hasta llegar a 0% de crecimiento. Estos efectos pueden observarse en la tabla y gráfica 3.

Sin embargo, en las plántulas de *P. ixocarpa* podemos observar que el extracto diclorometánico aumenta la elongación de tallo a 100 ppm hasta 140%, pero al aumentar la concentración se observa una inhibición en la elongación del tallo hasta un 50% de crecimiento a 1000 ppm. En cambio, el extracto metanólico a 10 ppm presenta un ligero aumento de crecimiento, mientras que a altas concentraciones (1000 ppm) inhibe a 84% el crecimiento del tallo de estas plántulas (Tabla y gráfica 7)

- Peso seco (Extractos)

Las plántulas de *L. multiflorum* probadas con el extracto diclorometánico no muestran una gran variación de biomasa en las concentraciones de 10 ppm hasta 500 ppm con respecto al control, excepto para la concentración de 1000 ppm porque al inhibir a 0% la germinación de dichas semillas, no se obtuvieron

plántulas para evaluar este parámetro. En cambio el extracto metanólico aumenta la biomasa a bajas concentraciones (a 10 ppm aumenta un 36 % con respecto al control) y a altas concentraciones la inhibe a un 0% por la misma razón que el extracto diclorometánico. (Tabla y gráfica 4)

En cambio en los ensayos con plántulas de *P. ixocarpa* se puede observar un ligero incremento de biomasa al utilizar el extracto diclorometánico y una ligera disminución de la biomasa con el extracto metanólico. (Tabla y gráfica 8)

Al analizar los resultados obtenidos de los bioensayos realizados para los extractos obtenidos a partir de la madera de *C. ciliolata* (extracto diclorometánico y metanólico) podemos observar que las semillas y plántulas de *L. multiflorum* son más sensibles a estos extractos que las semillas y plántulas de *P. ixocarpa*.

Comparando los resultados de estos bioensayos realizados; al analizar la actividad inhibitoria de los mismos se puede apreciar que el extracto diclorometánico en semillas de *L. multiflorum* presenta mayor actividad inhibitoria, en un rango aproximado de 100 a 1000 ppm, que el extracto metanólico en este mismo rango de concentraciones. El extracto metanólico en estas mismas semillas y plántulas muestra una actividad inhibitoria en un rango de concentraciones de 50 a 1000 ppm. Asimismo, en semillas de *P. ixocarpa* el extracto diclorometánico muestra una actividad inhibitoria en la germinación y crecimiento de plántulas en un rango de 100 a 1000 ppm, sin embargo, el extracto metanólico en estas mismas semillas y plántulas inhibió su desarrollo en un rango de concentraciones de 100 a 1000 ppm.

Del mismo modo, al analizar la actividad reguladora de crecimiento de los extractos se puede apreciar que el extracto diclorometánico en semillas de *L. multiflorum* muestra una actividad reguladora del crecimiento en un rango de

Tabla 1. Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de germinación de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	111.11	±5.6	127.78	±6.4
50	122.27	±6.1	88.32	±4.4
100	73.96	±3.7	81.85	±4.1
300	46.23	±2.3	77.33	±3.9
500	22.51	±1.1	73.64	±3.7
1000	0	±0.0	0	±0.0

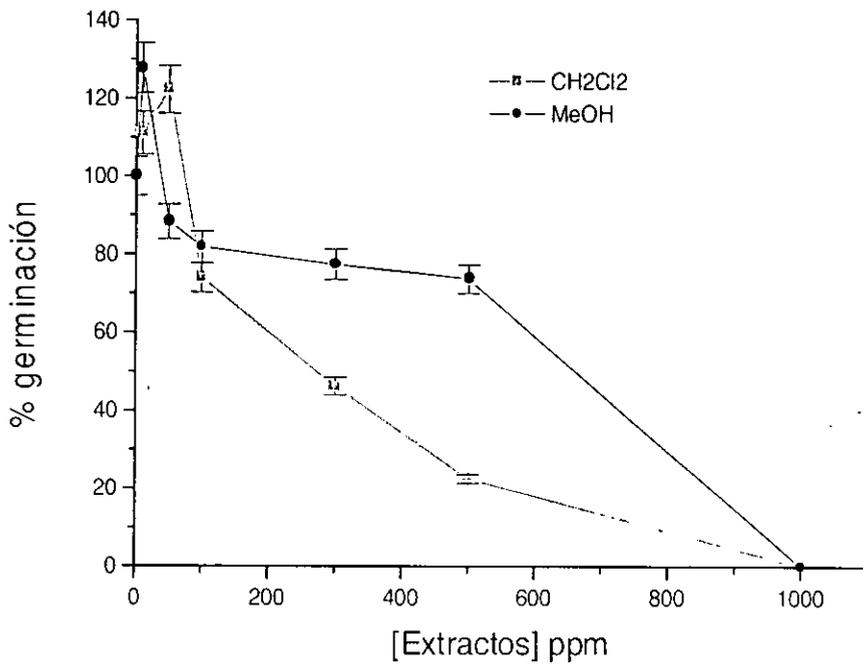
Gráfica 1. Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 2. Porcentaje de elongación de raíz en plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de elongación de raíz para los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	126.72	±6.3	142.58	±7.1
50	99.39	±5.0	96.67	±4.8
100	87.76	±4.4	91.01	±4.6
300	64.54	±3.2	97.86	±4.9
500	40.68	±2.0	91.55	±4.6
1000	0	±0.0	0	±0.0

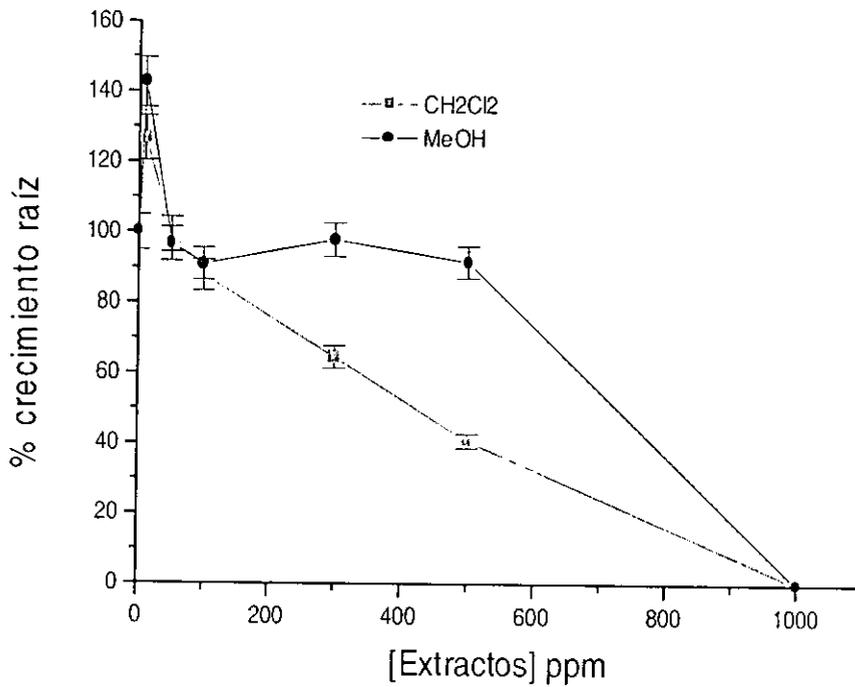
Gráfica 2. Porcentaje de elongación de raíz en plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 3. Porcentaje de elongación de tallo en plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de elongación de tallo para los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	99.04	±5.0	136.41	±7.8
50	90.92	±4.5	116.66	±5.8
100	78.32	±3.9	110.72	±5.5
300	51.57	±2.6	106.89	±5.3
500	26.83	±1.3	85.65	±4.8
1000	0	±0.0	0	±0.0

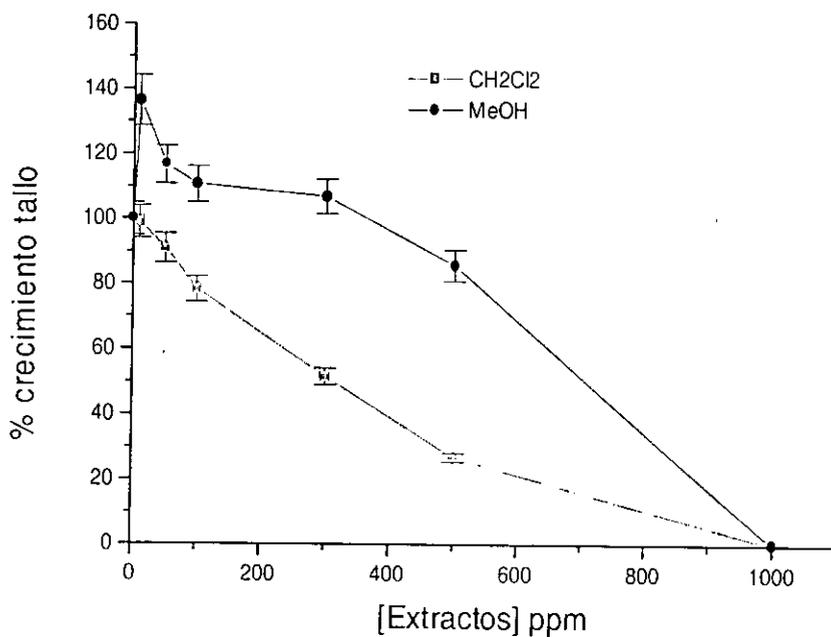
Gráfica 3. Porcentaje de elongación de tallo en plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 4. Porcentaje de peso seco en plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de peso seco para los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	98.56	±4.9	135.87	±7.8
50	100.41	±5.0	116.62	±5.8
100	101.89	±5.1	110.72	±5.5
300	98.65	±4.9	106.27	±5.3
500	94.98	±4.8	96.65	±4.8
1000	0	±0.0	0	±0.0

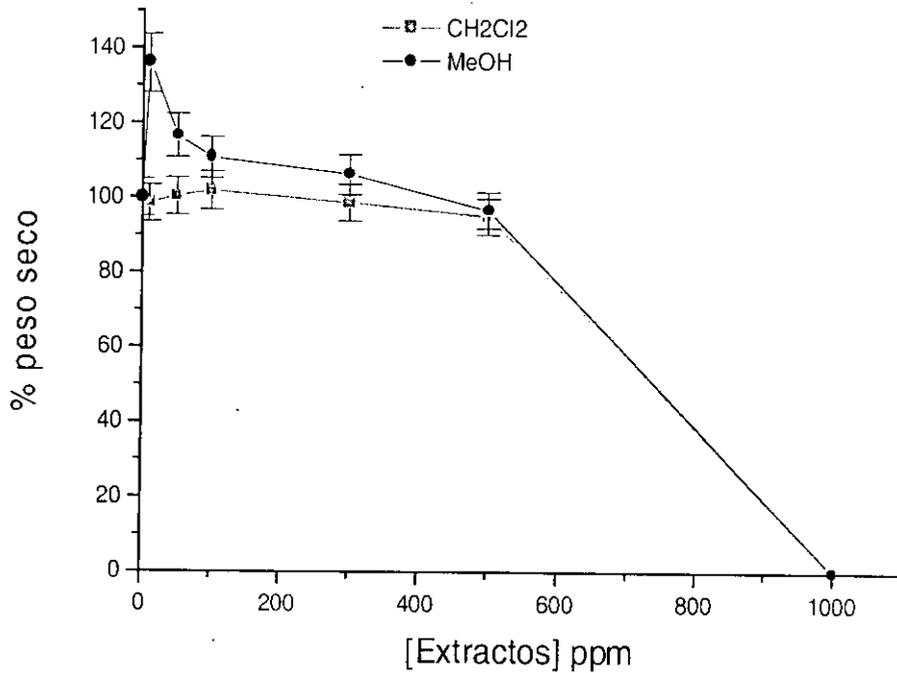
Gráfica 4. Porcentaje de peso seco en plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 5. Porcentaje de germinación de las semillas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de germinación de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	$\pm 3.0$	100	$\pm 3.0$
10	107.12	$\pm 3.2$	101.77	$\pm 3.1$
50	112.36	$\pm 3.4$	107.12	$\pm 3.2$
100	125.79	$\pm 3.8$	110.65	$\pm 3.3$
300	112.48	$\pm 3.4$	101.57	$\pm 3.0$
500	87.41	$\pm 2.6$	92.46	$\pm 2.8$
1000	58.92	$\pm 1.8$	88.15	$\pm 2.6$

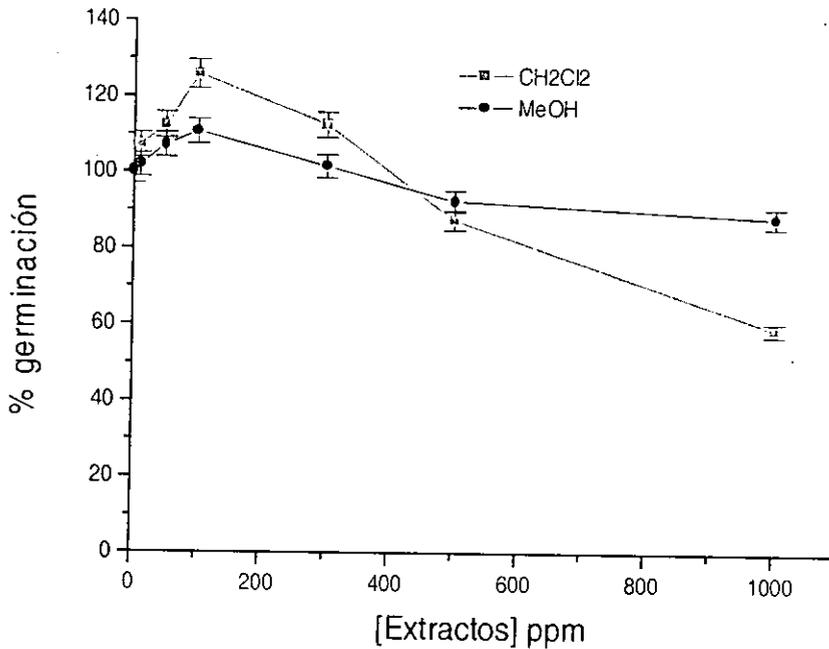
Gráfica 5. Porcentaje de germinación de las semillas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 6. Porcentaje de elongación de raíz de las plántulas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de elongación de raíz de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	118.82	±5.9	126.64	±6.8
50	148.67	±7.6	100.11	±5.0
100	133.96	±9.6	93.28	±4.7
300	125.69	±8.5	86.35	±4.3
500	116.87	±7.9	80.26	±4.0
1000	89.16	±4.0	72.53	±3.9

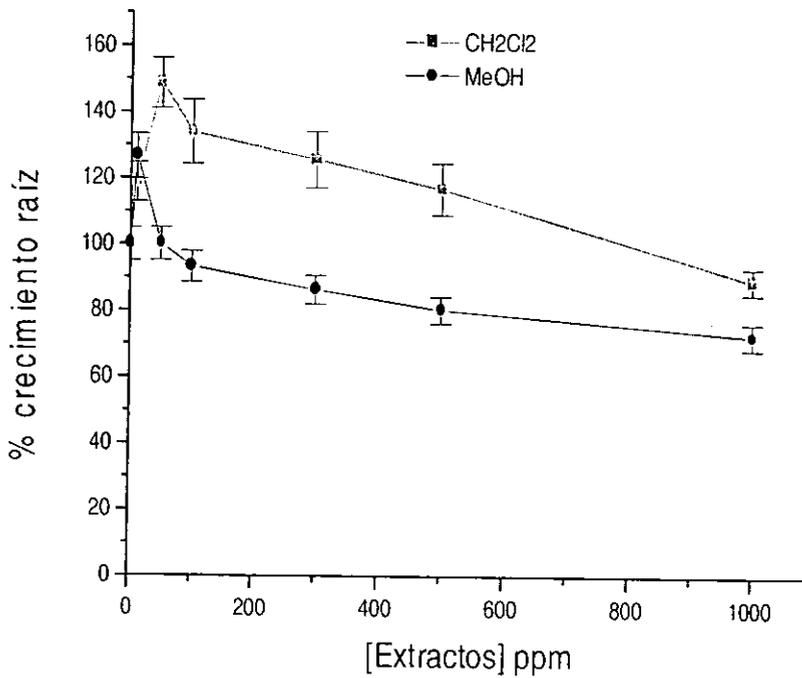
Gráfica 6. Porcentaje de elongación de raíz de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 7. Porcentaje de elongación de tallo de las plántulas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de elongación de tallo de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±5.0	100	±5.0
10	102.26	±5.1	111.24	±5.6
50	126.32	±6.3	103.35	±5.2
100	139.68	±7.1	97.78	±4.9
300	103.15	±5.2	94.33	±4.7
500	83.51	±4.2	88.47	±4.4
1000	50.37	±2.5	84.38	±4.2

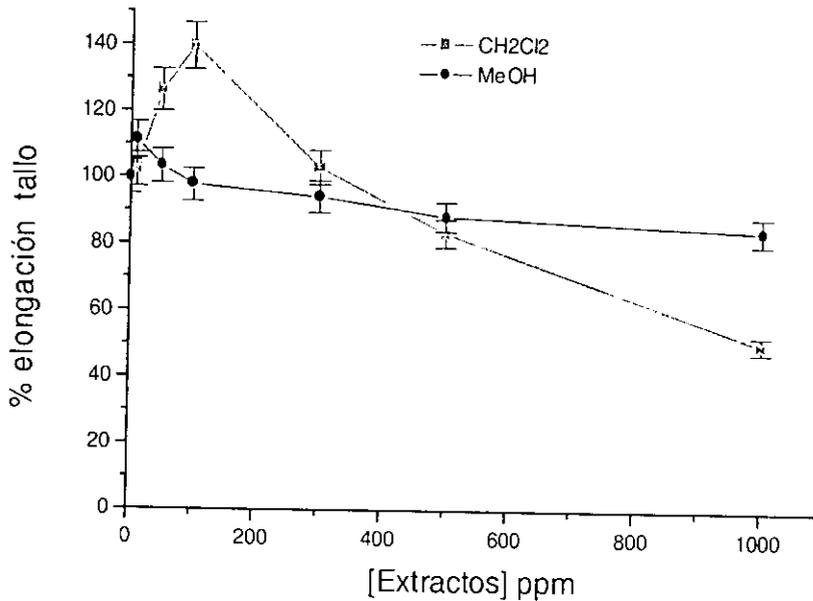
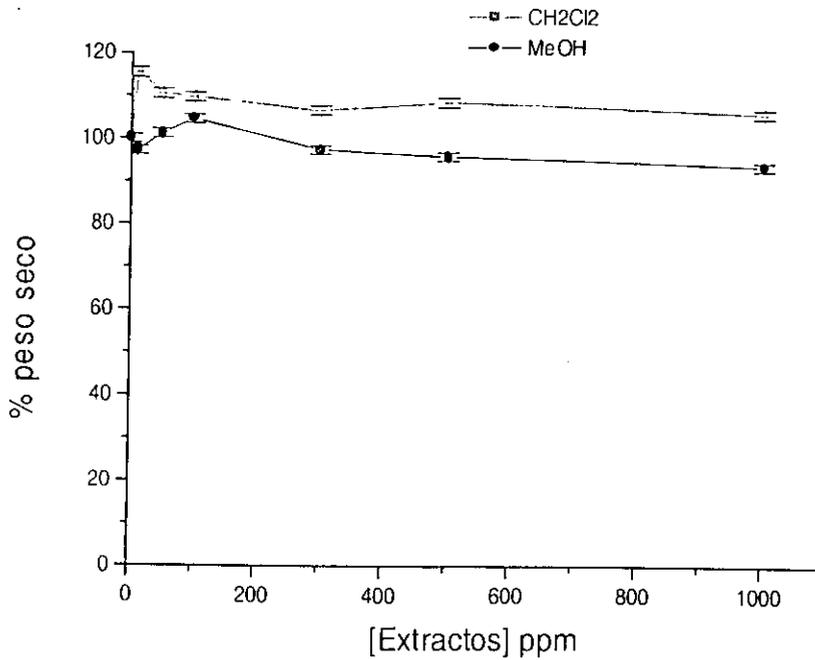
Gráfica 7. Porcentaje de elongación de tallo de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de los extractos.

Tabla 8. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentajes de peso seco de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	100	±1.0	100	±1.0
10	115.42	±1.2	97.22	±1.0
50	110.58	±1.1	101.28	±1.0
100	109.77	±1.1	104.64	±1.0
300	106.79	±1.1	97.49	±1.0
500	108.64	±1.1	95.96	±1.0
1000	105.96	±1.1	93.65	±1.0

Gráfica 8. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de los extractos.

concentraciones de 10 a 50 ppm en promedio, para todos los parámetros observados, excepto en la elongación de tallo. El extracto metanólico en estas mismas semillas presenta un efecto regulatorio a 10 ppm en todos los bioensayos realizados. Sin embargo, en semillas y plántulas de *P. ixocarpa* el extracto diclorometánico presenta un ligero incremento en la germinación y elongación de raíz y tallo para estas plántulas, (el peso seco lo incremento ligeramente de 10 a 1000 ppm), es decir se comporta como regulador del crecimiento de 10 a 100 ppm en promedio. En cambio el extracto metanólico en estas mismas semillas y plántulas presenta actividad regulatoria a 10 ppm excepto para la germinación de las semillas que es de 10-100 ppm.

Con base en los resultados descritos anteriormente se eligió el extracto diclorometánico para realizar el fraccionamiento primario, debido a que en los parámetros evaluados en los bioensayos anteriores, dicho extracto presenta mayor actividad inhibitoria del crecimiento sobre las semillas y plántulas de *L. multiflorum* y una mayor actividad estimuladora del crecimiento en semillas y plántulas *P. ixocarpa* tanto en germinación, elongación de raíz y tallo y peso seco que el extracto metanólico como puede observarse en las gráficas correspondientes.

Además al analizar las  $CI_{50}$  (concentración a la cual inhibe el 50 % de crecimiento de la germinación y elongación de raíz y tallo de las semillas probadas) calculada para cada uno de los extractos (Cuadro 4 y 5), podemos notar que el extracto diclorometánico muestra las menores  $CI_{50}$  en los distintos parámetros evaluados, es decir actúa a menores concentraciones que el extracto metanólico presentando mayor actividad inhibitoria en semillas de *L. multiflorum* aunque en semillas de *P. ixocarpa* solo muestra actividad inhibitoria en la elongación de tallo de las plántulas a 1000 ppm. Sin embargo al analizar la

actividad estimuladora del crecimiento en las gráficas correspondientes, puede observarse que el extracto diclorometánico aumenta un poco más el crecimiento que el extracto metanólico.

Por todas las razones descritas anteriormente resultó interesante realizar el fraccionamiento primario del extracto diclorometánico.

### **4.3 Obtención de las fracciones a partir del extracto diclorometánico de *Cedrela ciliolata*.**

Se realizó el fraccionamiento primario del extracto diclorometánico de *Cedrela ciliolata*, siguiendo un proceso de elución de hexano, hexano-acetato de etilo en distintas proporciones, acetato de etilo 100%, diclorometano-metanol en distintas proporciones y metanol 100% obteniéndose 238 fracciones primarias, el proceso de elución fue monitoreado por cromatografía en placa fina, consecutivamente se reunieron aquellas fracciones que presentaron características homogéneas obteniéndose un total de 11 fracciones primarias reunidas, sin embargo algunas de estas presentaron una parte sólida y una parte líquida que al separarlas se obtuvieron 17 fracciones primarias reunidas. (El cuadro 3 del capítulo 3 Parte experimental resume los sistemas de elución empleados, el peso obtenido y las características de las fracciones reunidas).

#### **4.3.1 Evaluación del efecto sobre el desarrollo de semillas.**

Las fracciones primarias reunidas obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto diclorometánico, se evaluaron con los mismos ensayos

biológicos utilizados para los extractos (germinación, elongación de raíz y tallo y variación de peso seco). Solo se realizó el ensayo para 16 fracciones primarias reunidas debido a que la fracción 7-15 no presentó suficiente muestra para realizar los ensayos correspondientes. Por lo cual después de realizar un análisis exhaustivo de las fracciones analizadas se seleccionaron 6 fracciones que poseían ciertos caracteres significativos de actividad inhibitoria y/o reguladora del crecimiento sobre las semillas monocotiledóneas y dicotiledóneas probadas.

A continuación se describirá de forma independiente cada bioensayo para todas las fracciones seleccionadas y probadas en las semillas monocotiledóneas (*L. multiflorum*) y dicotiledóneas (*P. ixocarpa*).

- Germinación (Fracciones)

En las semillas de *L. multiflorum* podemos observar que las fracciones 24-38 líquido, 107-144 líquido y 217-238 líquido inhiben su germinación, pero únicamente esta última fracción presenta una mayor inhibición (43% con respecto al control a 500 ppm). En cambio la fracción 163-216 sólido estimula la germinación de las semillas hasta un 140% a 500 ppm. Las fracciones 39-63 sólido y 64-83 a bajas concentraciones estimulan la germinación y a elevadas concentraciones inhiben la misma. Sin embargo la fracción 64-83 aumenta la germinación hasta un 133% pero a altas concentraciones inhibe el crecimiento hasta un 40% con respecto al control. (Tabla y gráfica 9)

Por otro lado en las semillas de *P. ixocarpa* las fracciones 24-38 líquido, 39-63 sólido, 64-83, 107-144 líquido y 163-216 sólido inhiben la germinación pero es mayor la actividad inhibitoria que presenta la fracción 64-83. En cambio la fracción 217-238 líquido produjo un aumento en la germinación de un 37% mayor que el control. (Tabla y gráfica 13)

- Elongación de raíz (Fracciones)

En las semillas de *L. multiflorum* las fracciones 24-38 líquido, 64-83, 217-238 líquido inhiben el crecimiento radicular siendo mayor el efecto de la fracción 217-238 líquido de hasta un 56% a 500 ppm. En cambio la fracción 163-216 sólido solo produjo aumento en el crecimiento radicular de hasta un 23% más que el control a 500 ppm. Sin embargo las fracciones 39-63 sólido y 107-144 líquido a bajas concentraciones aumentan un poco el crecimiento 10% pero conforme aumenta la concentración de las fracciones el crecimiento radicular presenta inhibición siendo mayor para la fracción 39-63 sólido 51% de crecimiento a 500 ppm. (Tabla y gráfica 10)

En semillas de *P. ixocarpa* las fracciones 24-38 líquido, 163-216 sólido inhiben el crecimiento radicular siendo mayor la actividad de la fracción 163-216 sólido 55% de crecimiento a 500 ppm. En cambio las fracciones 39-63 sólido y 217-238 líquido aumentan el crecimiento radicular de dichas semillas hasta un 21% de crecimiento a 500 ppm para esta última fracción. Sin embargo las fracciones 64-83 y 107-144 líquido a bajas concentraciones 10 ppm aumentaron el crecimiento radicular a 113% y 114% respectivamente, y a bajas concentraciones inhibieron el crecimiento radicular a 68% y 83% de crecimiento a 500 ppm respectivamente. (Tabla y gráfica 13)

- Elongación de Tallo (Fracciones)

Para las semillas de *L. multiflorum* las fracciones 24-38 líquido, 64-83, 107-144 líquido y 217-238 líquido inhibieron la elongación del tallo siendo mayor el efecto en la fracción 64-83 presentando un 58% de crecimiento a 500 ppm. En cambio la fracción 163-216 sólido aumentó la elongación de tallo hasta un 132% a 500 ppm y la fracción 39-63 sólido a 50 ppm aumenta un 124% el crecimiento y a

bajas concentraciones 500 ppm presenta un crecimiento de 89% de tallo. (Tabla y gráfica 11)

En las semillas de *P. ixocarpa* las fracciones 24-38 líquido, 64-83, 163-216 sólido inhiben la elongación de tallo siendo mayor para la fracción 64-83 presentando un 60% de crecimiento a 500 ppm. En cambio las fracciones 39-63 sólido y 217-238 líquido aumentaron la elongación de tallo siendo mayor la de esta última fracción de hasta un 33% más que el control a 500 ppm y la fracción 107-144 líquido aumentó el crecimiento a 10 ppm en un 19% más que el control pero al incrementarse la concentración de esta fracción inhibió el crecimiento del tallo (71% de crecimiento a 500 ppm). Ver Tabla y gráfica 15

- Peso seco (Fracciones)

La variación de peso seco no fue tan notable como en los otros bioensayos. Para las semillas de *L. multiflorum* tratadas con las fracciones 24-38 líquido y 217-238 líquido disminuyeron el peso seco aunque el efecto mayor lo presentó esta última fracción (90.6% de crecimiento a 500 ppm). La fracción 107-144 líquido aumenta ligeramente la biomasa de 10 a 500 ppm, mientras que las fracciones 64-83 y 163-216 líquido a bajas concentraciones 10 ppm, disminuyen ligeramente el peso seco (97% y 98% de crecimiento respectivamente), sin embargo al incrementarse la concentración aumenta ligeramente el peso seco (103% y 106% de crecimiento a 500 ppm, respectivamente). La fracción 39-63 sólido a bajas concentraciones aumenta el peso seco y a altas concentraciones lo inhibe ligeramente. (Tabla y gráfica 12)

En las semillas de *P. ixocarpa* la fracción 24-38 líquido presenta una ligera disminución de 95% de biomasa a 500 ppm. La fracción 64-83 inhibe el peso seco hasta un 92% de crecimiento al igual que la fracción 163-216 sólido que

Tabla 9. Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	90.53 ±4.5	114.4 ±5.7	132.68 ±6.6	105.13 ±5.3	115.63 ±5.8	82.65 ±4.1
50	80.85 ±4.0	150.32 ±7.5	105.43 ±5.3	80.52 ±4.0	125.46 ±6.3	71.16 ±3.6
100	76.61 ±3.8	121.76 ±6.1	70.17 ±3.5	68.86 ±3.4	133.22 ±6.7	62.55 ±3.1
300	73.69 ±3.7	105.23 ±5.3	46.23 ±2.3	56.77 ±2.8	137.56 ±6.9	46.22 ±2.3
500	72.34 ±3.6	94.15 ±4.7	40.28 ±2.0	55.12 ±2.8	139.25 ±7.0	43.19 ±2.2

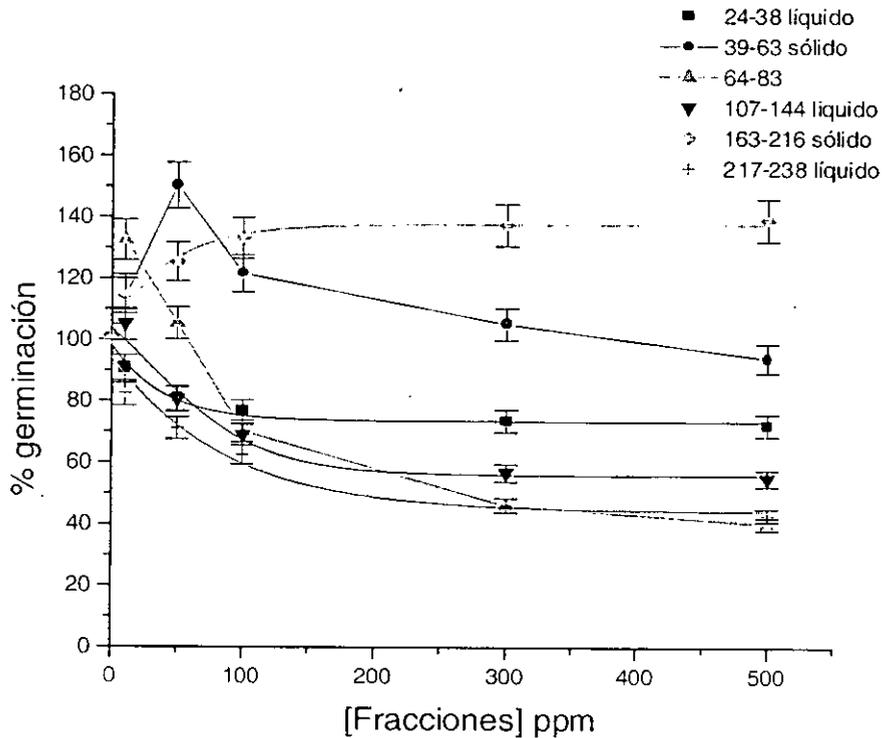
Gráfica 9. Porcentaje de germinación de las semillas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 10. Porcentaje de elongación de raíz de las plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de raíz de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	96.83 ±4.8	108.64 ±5.4	95.23 ±4.8	110.57 ±5.5	99.56 ±5.0	86.22 ±4.3
50	92.78 ±4.6	112.54 ±5.6	89.76 ±4.5	96.17 ±4.8	109.23 ±5.5	75.59 ±3.8
100	92.56 ±4.6	89.59 ±4.5	80.97 ±4.0	83.45 ±4.2	116.54 ±5.8	71.38 ±3.6
300	88.52 ±4.4	62.57 ±3.1	67.42 ±3.4	78.95 ±3.9	121.29 ±6.1	62.93 ±3.1
500	89.11 ±4.5	51.45 ±2.6	61.64 ±3.1	78.32 ±3.9	123.48 ±6.2	55.88 ±2.8

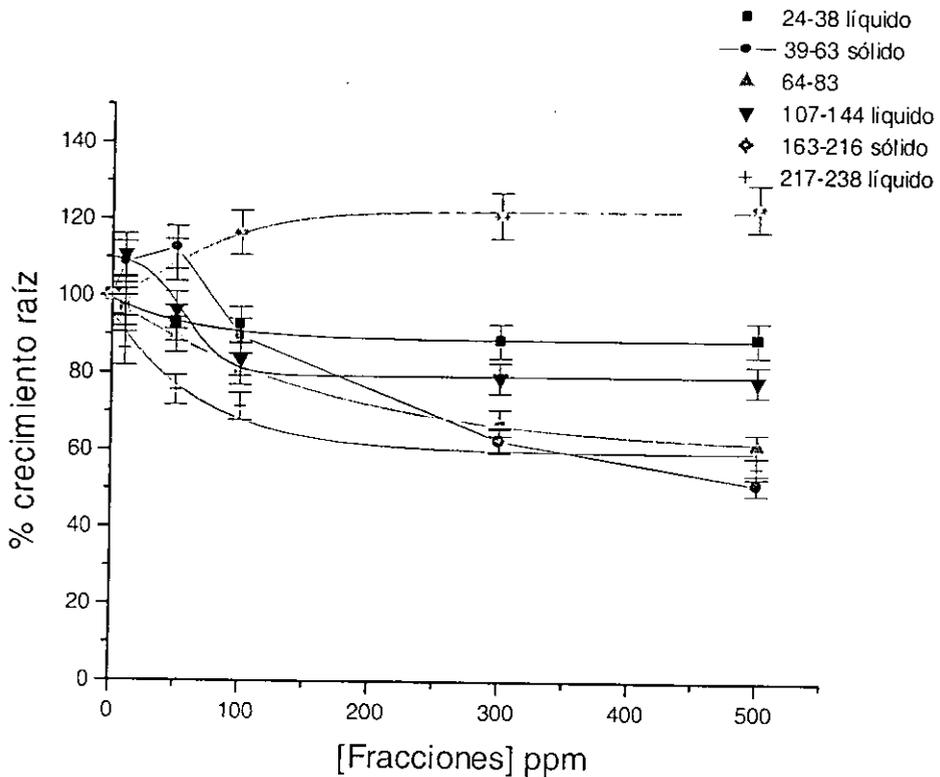
Gráfica 10. Porcentaje de elongación de raíz de las plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 11. Porcentaje de elongación de tallo de plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de tallo de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	96.82 ±4.8	104.53 ±5.2	103.01 ±5.2	99.57 ±5.0	113.24 ±5.7	86.88 ±4.3
50	89.61 ±4.5	124.19 ±7.7	95.91 ±4.3	89.76 ±4.5	120.32 ±6	78.52 ±3.9
100	84.81 ±4.2	109.76 ±5.5	82.75 ±3.6	78.93 ±3.9	124.69 ±6.2	74.31 ±3.7
300	81.35 ±4.1	97.12 ±3.6	64.73 ±2.7	65.85 ±3.3	129.56 ±6.5	68.96 ±3.4
500	80.79 ±4.0	88.66 ±3.2	58.39 ±2.4	60.38 ±3.3	131.87 ±6.6	67.44 ±3.4

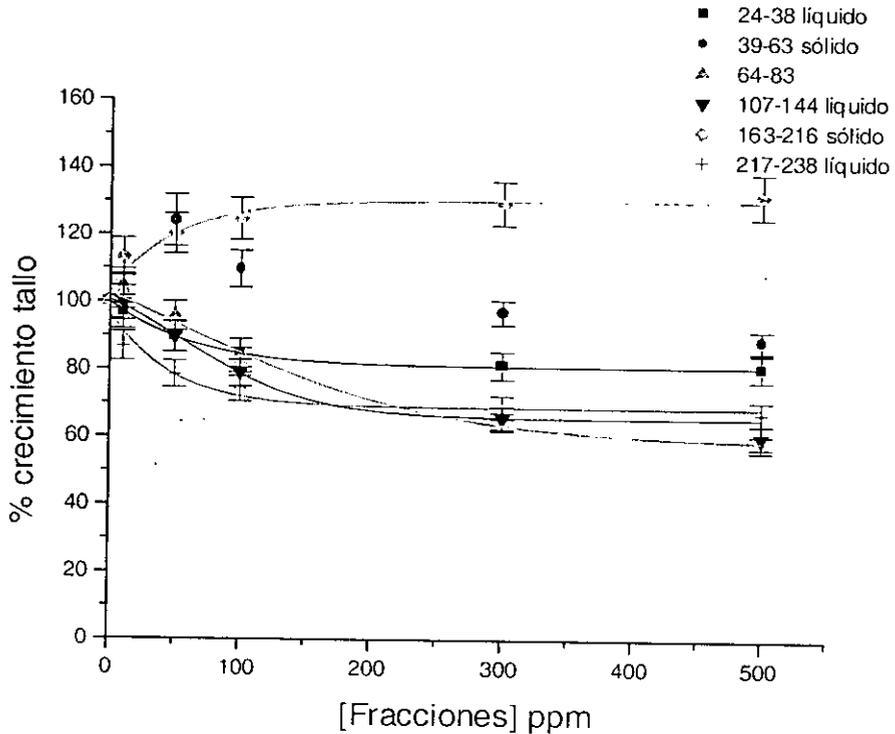
Gráfica 11. Porcentaje de elongación de las plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 12. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *L. multiflorum*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de peso seco de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0
10	99.43 ±1.0	104.35 ±1.0	96.64 ±1.0	100.66 ±1.0	98.2 ±1.0	97.09 ±1.0
50	98.57 ±1.0	106.45 ±1.1	102.02 ±1.0	101.48 ±1.0	103.9 ±1.0	94.36 ±0.9
100	97.81 ±1.0	102.12 ±1.0	103.72 ±1.0	102.56 ±1.0	104.97 ±1.0	92.61 ±0.9
300	96.36 ±1.0	101.52 ±1.0	104.65 ±1.0	103.92 ±1.0	105.75 ±1.1	90.93 ±0.9
500	95.84 ±1.0	99.66 ±1.0	102.69 ±1.0	104.16 ±1.0	105.87 ±1.1	90.64 ±0.9

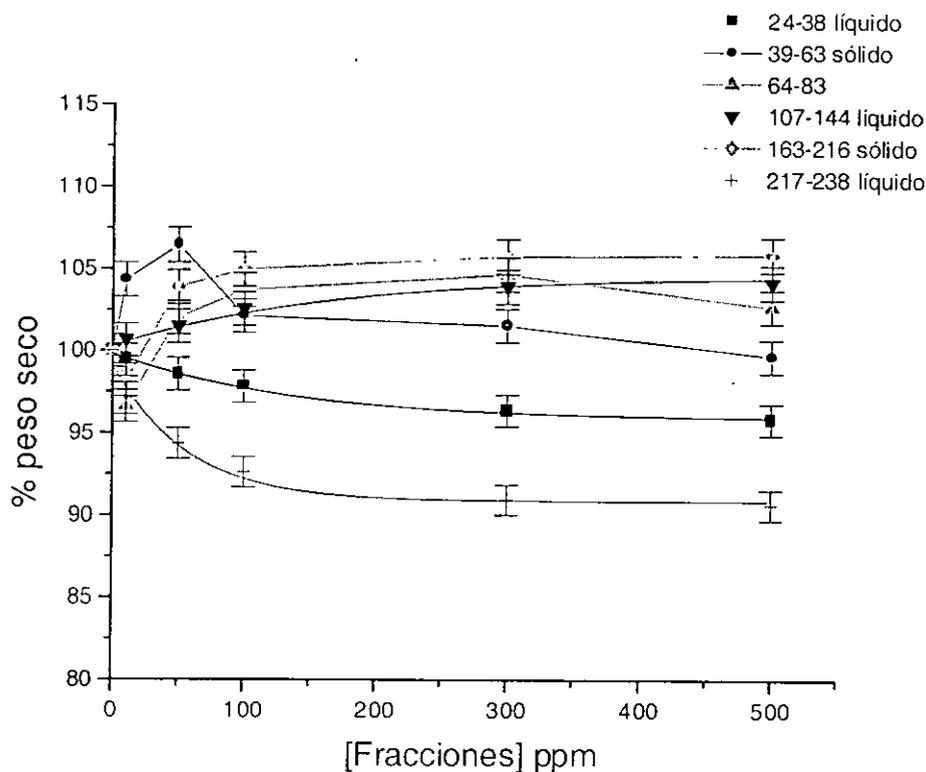
Gráfica 12. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *L. multiflorum* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 13. Porcentaje de germinación de las semillas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de germinación de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	89.36 ±4.5	97.87 ±4.9	81.97 ±4.1	102.14 ±5.1	91.41 ±4.6	110.76 ±5.5
50	80.85 ±4.0	96.23 ±4.8	70.62 ±3.5	80.85 ±4.0	74.23 ±3.7	120.22 ±6.0
100	74.61 ±3.7	90.95 ±4.5	62.83 ±3.1	68.83 ±3.4	61.15 ±3.1	129.65 ±6.5
300	71.77 ±3.6	89.36 ±4.5	53.39 ±2.7	61.16 ±3.1	53.27 ±2.7	133.98 ±6.7
500	69.74 ±3.5	85.54 ±4.3	48.56 ±2.4	56.91 ±2.8	47.75 ±2.4	136.96 ±6.8

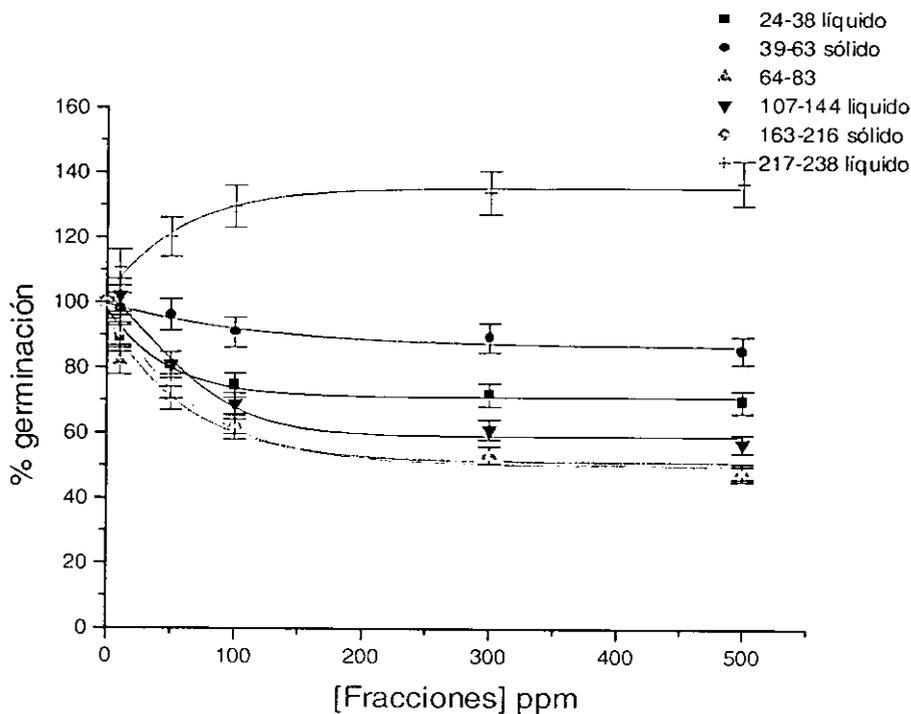
Gráfica 13 Porcentaje de germinación de las semillas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de los fracciones.

Tabla 14. Porcentaje de elongación de raíz de las semillas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de raíz de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	96.83 ±4.8	105.86 ±5.3	113.04 ±5.7	114.28 ±5.7	98.59 ±4.9	110.54 ±5.5
50	92.78 ±4.6	108.69 ±5.4	101.56 ±5.1	101.26 ±5.1	79.77 ±4.0	117.76 ±5.9
100	92.52 ±4.6	110.52 ±5.5	88.53 ±4.4	93.26 ±4.7	66.11 ±3.3	118.94 ±5.9
300	88.35 ±4.4	109.95 ±5.5	72.16 ±3.6	84.95 ±4.2	61.35 ±3.1	118.38 ±5.9
500	89.19 ±4.5	110.39 ±5.5	68.48 ±3.4	83.17 ±4.2	55.46 ±2.8	121.04 ±6.1

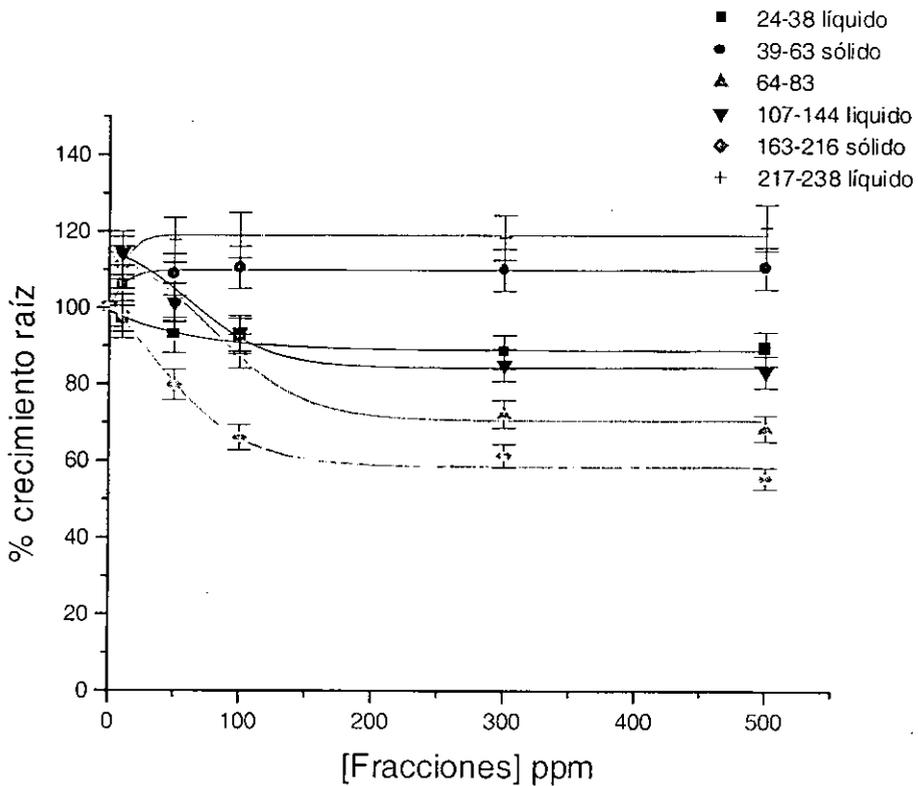
Gráfica 14. Porcentaje de elongación de raíz de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 15. Porcentaje de tallo de las plántulas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de elongación de tallo de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0	100 ±5.0
10	96.83 ±4.8	111.52 ±5.6	107.76 ±5.4	119.57 ±6.0	100.86 ±5.0	114.19 ±5.7
50	88.54 ±4.4	115.14 ±5.8	87.35 ±4.4	95.66 ±4.8	83.15 ±4.2	124.46 ±6.2
100	86.74 ±4.3	119.26 ±6.0	78.31 ±3.9	85.57 ±4.3	72.23 ±3.6	129.61 ±6.5
300	81.31 ±4.1	120.11 ±6.0	64.62 ±3.2	75.42 ±3.8	67.65 ±3.4	130.83 ±6.5
500	80.75 ±4.0	123.12 ±6.2	60.43 ±3.0	71.21 ±3.6	63.47 ±3.2	132.71 ±6.6

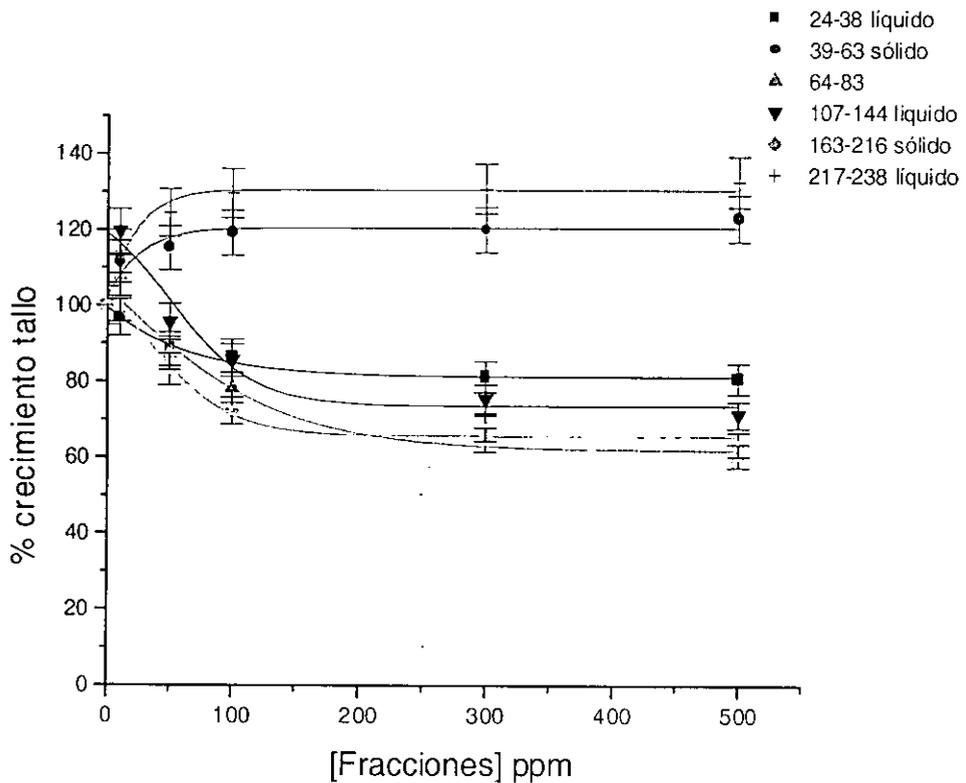
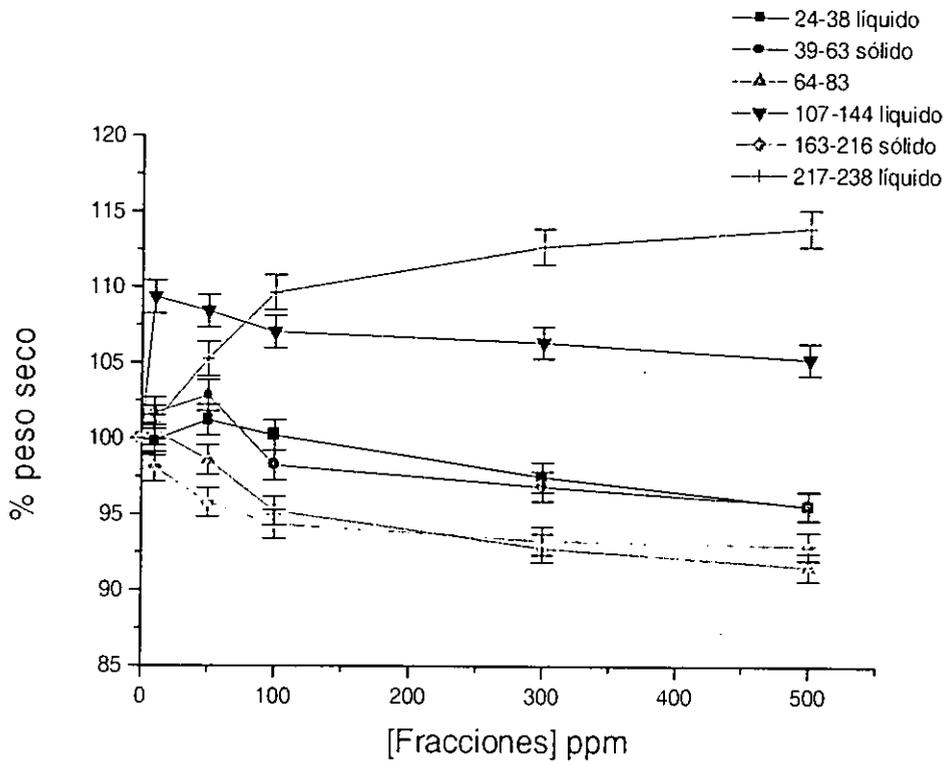
Gráfica 15. Porcentaje de elongación de tallo de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de las fracciones.

Tabla 16. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *P. ixocarpa*.

Concentración (ppm)	Porcentaje de peso seco de las fracciones primarias reunidas:					
	24-38 líquido	39-63 sólido	64-83	107-144 líquido	163-216 sólido	217-238 líquido
0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0	100 ±1.0
10	99.87 ±1.0	101.66 ±1.0	100.53 ±1.0	109.33 ±1.1	98.11 ±1.1	101.05 ±1.1
50	101.23 ±1.0	102.83 ±1.0	98.58 ±1.0	108.41 ±1.1	95.79 ±1.1	105.23 ±1.1
100	100.21 ±1.0	98.24 ±1.0	95.23 ±1.0	107.02 ±1.1	94.35 ±1.1	109.63 ±1.2
300	97.46 ±1.0	96.85 ±1.0	92.78 ±0.9	106.32 ±1.1	93.26 ±1.1	112.68 ±1.2
500	95.56 ±1.0	95.63 ±1.0	91.56 ±0.9	105.24 ±1.1	92.93 ±1.1	113.91 ±1.2

Gráfica 16. Porcentaje de peso seco de las plántulas de *P. ixocarpa* a distintas concentraciones de las fracciones.

presento un 93% a 500 ppm. La fracción 39-63 sólido a bajas concentraciones (50 ppm) aumenta el peso seco 2% más que el control mientras que a altas concentraciones 500 ppm inhibe a 96% de crecimiento. Las fracciones 107-144 líquido y 217-238 líquido aumentaron el peso seco siendo mayor el efecto en esta última fracción 14% más que el control a 500 ppm. (Tabla y gráfica 16).

Con base en los resultados y gráficas anteriores resulta interesante analizar las fracciones 163-216 sólido, la fracción 64-83 y 217-238 líquido las cuales se describen a continuación.

La fracción 163-216 sólido actúa de manera selectiva ya que en semillas monocotiledóneas (*L. multiflorum*) se comporta como regulador del crecimiento; en cambio en las semillas dicotiledóneas (*P. ixocarpa*) se comporta como herbicida debido a que disminuye la germinación y el crecimiento de estas plántulas. En estudios posteriores podrían realizarse más pruebas con otras semillas mono y dicotiledóneas con esta fracción, de tal forma que pueda asegurarse que actúa de manera selectiva. Esta propiedad, de comprobarse en varias especies blanco, en un futuro podría ser de gran utilidad para inhibir el crecimiento originados por las malezas dicotiledóneas de manera selectiva, por ejemplo el tomate o trébol que en algunos casos son considerados como malezas, y quizás ayudar a obtener una mejor producción de los cultivos de origen monocotiledóneos como es el maíz. Considerando únicamente los bioensayos realizados en esta tesis esta fracción es interesante para poder ser utilizada como un herbicida de preemergencia ya que en la germinación de las semillas se observa una inhibición de la germinación (no tan notable como en los extractos), o bien como herbicida postemergente debido a que inhibe la elongación de raíz y tallo y por lo tanto su biomasa.

La fracción 64-83 tiene un comportamiento no selectivo ya que actúa como inhibidor del crecimiento en semillas de *L. multiflorum* al igual que en semillas de *P. ixocarpa*, solo que a bajas concentraciones 10 ppm en promedio actúa como regulador de crecimiento en ambas semillas y altas concentraciones mayor a 10 ppm y hasta 500 ppm en promedio, actúa inhibiendo la germinación y crecimiento de las plántulas de ambas semillas. Por lo cual debe tenerse en cuenta el rango de concentración en el cual se desea utilizar ya que de esto dependerá su efecto estimulador o bien inhibitorio, es decir su efecto es dependiente de la concentración. Debido a su comportamiento en concentraciones de 10 a 500 ppm de actuar como inhibidor de crecimiento podría considerarse su uso como herbicida preemergente debido a que inhibe la germinación de ambas semillas y como herbicida postemergente teniendo cuidado con el rango de concentración para inhibir el desarrollo de las plántulas, o bien si se desea aumentar el crecimiento de algún cultivo podría utilizarse esta fracción a una concentración baja para tener el efecto esperado.

En cambio la fracción 217-238 líquido se comporta como regulador de crecimiento (10- 500 ppm) de forma significativa para las semillas y plántulas de *P. ixocarpa* pero actúa como inhibidor del crecimiento (10- 500 ppm) en las semillas y plántulas de *L. multiflorum*. Como puede notarse esta fracción a medida que aumenta su concentración aumenta el efecto estimulador o inhibitorio, dependiendo de la especie blanco, es decir también es dependiente de la concentración. Esta fracción resulta interesante para seguir siendo estudiada en otras especies de semillas pertenecientes a las semillas mono y dicotiledóneas con el fin de encontrar reguladores de crecimiento y/o herbicidas de origen vegetal para ser usados en la agricultura.

Se decidió utilizar este rango de concentraciones para los extractos debido a que se encuentra reportado que los compuestos alelopáticos, con utilidad para

ser empleados en los cultivos por su actividad inhibitoria, se encuentran en un rango de 0.1 a 1000 ppm en promedio, aunque se ha encontrado que algunos triterpenos han actuado de 0.1 a 100 ppm. (Macias, 1995). Por esta razón los extractos fueron analizados en concentraciones de 10 a 1000 ppm para observar su posible actividad inhibitoria o estimuladora del crecimiento sobre las semillas y plántulas de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*. Posteriormente al observarse que los extractos presentaron actividad se procedió al fraccionamiento primario del extracto más activo reduciendo el rango de concentración en la prueba (10-500 ppm) para observar su comportamiento, debido a que al fraccionar el extracto concentramos a los compuestos responsables de la actividad.

Con base en la descripción realizada anteriormente podemos observar que el diferente modo de acción mostrado por los extractos y las fracciones dependen de cuales sean las especies blanco, es decir si son semillas monocotiledóneas (*L. multiflorum*) o dicotiledóneas (*P. ixocarpa*), lo cual podría indicarnos cierto grado de selectividad por parte de los extractos y fracciones a las especies blanco que van dirigidas.

Al comparar el comportamiento de los extractos obtenidos con las fracciones probadas en este bioensayo podemos observar que la actividad inhibitoria que presenta el extracto diclorometánico parece tener un efecto sinergista, debido a que dicho extracto inhibe en mayor proporción la germinación y crecimiento de las plántulas de *L. multiflorum* que las fracciones primarias reunidas, aunque este mismo comportamiento no se observa con las semillas y plántulas de *P. ixocarpa* debido a que algunas de las fracciones primarias reunidas presentan mayor actividad que el extracto. Este comportamiento se puede corroborar al observar el cuadro 4 y 5 en donde se especifican las  $CI_{50}$  de los extractos y fracciones primarias reunidas en las dos especies de semillas

Cuadro 4.  $Cl_{50}$  para los extractos y fracciones primarias reunidas en semillas de *Lolium multiflorum*.

BIOENSAYO	$Cl_{50}$ (ppm)	
	Extractos	
	Diclorometano	Metanol
Germinación	258.77	647.39
Elongación raíz	423.22	726.54
Elongación tallo	512.79	705.68
Peso seco	736.97	739.81

BIOENSAYO	$Cl_{50}$ (ppm) Fracciones primarias reunidas	
	64-83	217-238 LIQUIDO
	Germinación	266.67
Elongación raíz	ND	ND
Elongación tallo	ND	ND
Peso seco	ND	ND

ND: No determinada

Cuadro 5.  $Cl_{50}$  para los extractos y fracciones primarias reunidas en semillas de *Physalis ixocarpa*.

BIOENSAYO	$Cl_{50}$ (ppm)	
	Extractos	
	Diclorometano	Metanol
Germinación	ND	ND
Elongación raíz	ND	ND
Elongación tallo	1000	ND
Peso seco	ND	ND

ND: No determinada

BIOENSAYO	$Cl_{50}$ (ppm) Fracciones primarias reunidas	
	64-83	163-216 SOLIDO
	Germinación	ND
Elongación raíz	500.75	428.79
Elongación tallo	ND	ND
Peso seco	ND	ND

ND: No determinada

probadas. Debe hacerse notar que en algunos casos no pudo calcularse este parámetro debido a que no presentaron el 50% de inhibición de crecimiento.

Además también podemos observar que los extractos y algunas fracciones presentan un comportamiento como reguladores de crecimiento a bajas concentraciones y en cambio al aumentar la concentración de los mismos inhiben la germinación y desarrollo de las plántulas por lo cual actúan como herbicidas, es decir que su comportamiento frente a las especies blanco depende de la concentración a la que se encuentren presentes.

Puesto que lo que se busca es obtener pesticidas de origen biológico, debe evaluarse la necesidad de requerir tener una fracción o un compuesto puro o bien la utilización de un extracto debido a que implica menos gastos de obtención y por lo tanto es más económico de adquirir en el mercado, que una fracción o compuestos puros, lo cual beneficiaría el uso de los mismos en los cultivos.

#### **4.4 Actividad insecticida**

Se realizaron los bioensayos de prueba antialimentaria de no elección y prueba antialimentaria de elección ó preferencia, de acuerdo a lo descrito en la parte experimental, para observar el comportamiento de la alimentación de las larvas de *E. varivestis* al ser tratadas a distintas concentraciones con los extractos diclorometánico y metanólico de *C. ciliolata*. Los resultados reportados son los promedios obtenidos de las réplicas realizadas para cada bioensayo y se encuentran reportados en porcentajes de disminución de alimentación, en donde un 100 % indica una disminución total de la alimentación mientras que valores

negativos indicarían una estimulación de la alimentación. El error estándar se encuentra reportado en las tablas correspondientes con  $P < 0.05$  calculado en el programa Origin versión 4.1.

Los porcentajes de inhibición de alimentación fueron calculados considerando los porcentajes de área dañada de las hojas tratadas comparadas con el área dañada de las hojas control considerando la siguiente fórmula: % inhibición de la alimentación =  $[1 - (T/C)] * 100$ ; donde T= Cantidad consumida por el insecto de la hoja tratada y C= Cantidad consumida por el insecto de la hoja control. (González et al., 1996; Valladares et al., 1997; Fraga et al., 2001)

#### 4.4.1 Prueba antialimentaria de no elección.

La tabla y gráfica 17 muestran los resultados obtenidos para cada uno de los extractos probados: diclorometano y metanol. Se calculó el porcentaje de inhibición de la alimentación sobre las larvas de *E. varivestis* al ser expuestas a distintas concentraciones de los extractos. Describiendo a los extractos de manera independiente se puede observar que al aumentar la concentración del extracto diclorometánico el porcentaje de disminución de la alimentación se incrementa, observándose un mayor efecto a 200 ppm. Similarmente, el extracto metanólico presenta el mismo comportamiento frente a las larvas de *E. varivestis*, en donde el porcentaje de inhibición de la alimentación se incrementa conforme aumenta la concentración del mismo, siendo mayor a la concentración de 200 ppm.

Al comparar los extractos estudiados, se puede notar que ambos extractos presentan un comportamiento semejante, inhibiendo parcialmente la alimentación de las larvas de *E. varivestis*, el mayor porcentaje de inhibición de la alimentación

se obtuvo a 200 ppm para ambos extractos; sin embargo, el extracto metanólico posee mayor actividad antialimentaria, que el extracto diclorometánico, debido a que los porcentajes de disminución de la alimentación a las diversas concentraciones (10,20,50,100 y 200 ppm) son mayores para este extracto. Basándose en lo descrito anteriormente la tabla 17 muestra los resultados obtenidos para ambos extractos, en donde se puede apreciar que al aumentar la concentración de los extractos aumenta la actividad antialimentaria de los mismos, es decir a altas concentraciones se observa una mayor inhibición de la alimentación de las larvas que a bajas concentraciones.

Se calculo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Efectiva ( $CE_{50}$ ) concentración que inhibe la alimentación de las larvas al 50% para ambos extractos en la prueba antialimentaria de no elección; los resultados se describen en el cuadro 6.

Cuadro 6. CMI obtenidas para los extractos diclorometánico y metanólico de *C. ciliolata*

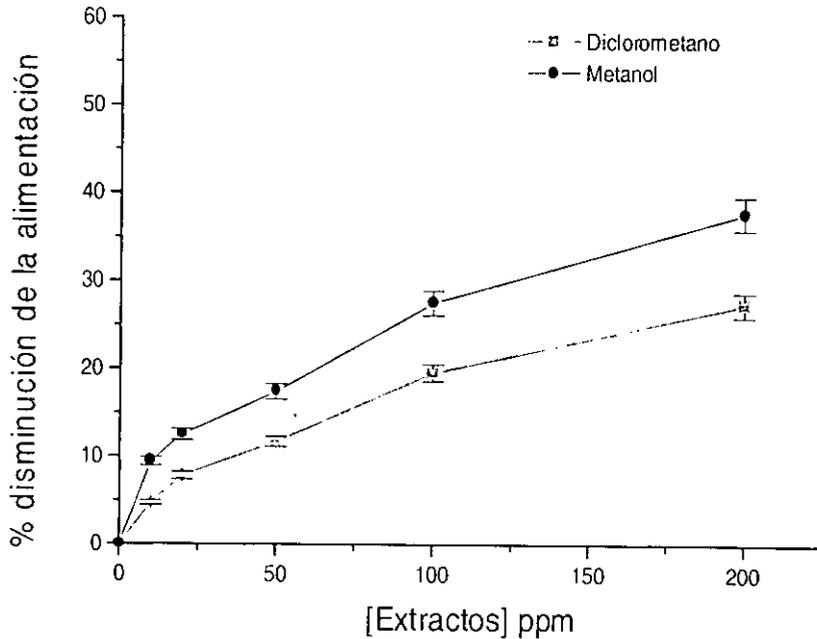
Extracto	CMI	% disminución alimentación	$CE_{50}$ (ppm)
Diclorometano	10 ppm	4.75	611 <sup>a</sup>
Metanol	10 ppm	9.46	561 <sup>a</sup>

$CE_{50}$  (Concentración efectiva que inhibe la alimentación de las larvas al 50%)

<sup>a</sup>concentración extrapolada de la gráfica.

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de *E. varivestis*

Concentración (ppm)	% inhibición de la alimentación de los extractos			
	Diclorometano		Metanol	
0	0	±0.0	0	±0.0
10	4.75	±0.2	9.46	±0.5
20	7.84	±0.4	12.52	±0.6
50	11.70	±0.6	17.38	±0.9
100	19.53	±1.0	27.50	±1.4
200	27.30	±1.4	37.64	±1.9

Gráfica 17. Porcentaje de inhibición de la alimentación de los extractos de *C. ciliolata* frente a las larvas de *E. varivestis*. Prueba antialimentaria de no elección.

#### 4.4.2 Prueba antialimentaria de elección ó preferencia.

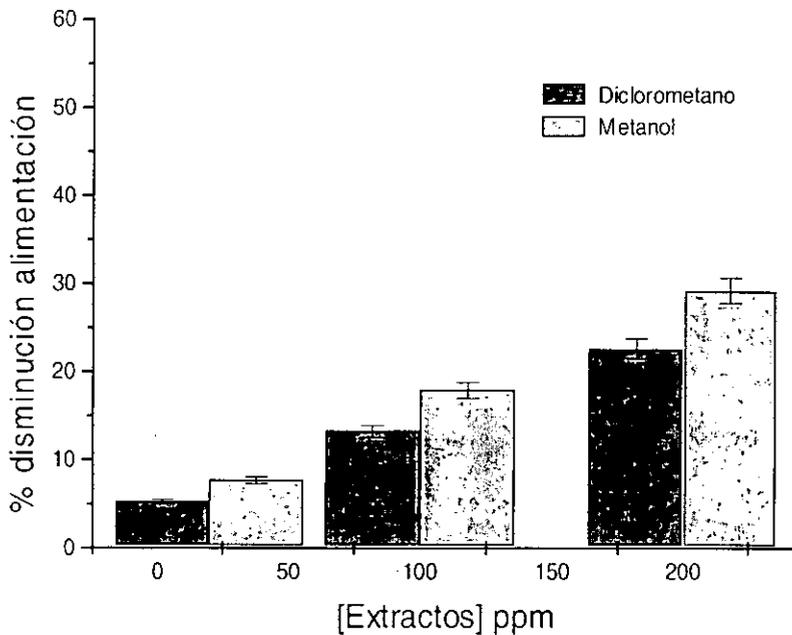
En la prueba de preferencia se pudo notar de manera visual que el insecto dañó más área de las hojas que no se encontraban impregnadas con los extractos que aquellas que si se encontraban impregnadas, lo cual puede corroborarse al observar la gráfica 18 en donde se puede notar el comportamiento de ambos extractos. Además, también podemos observar que dependiendo de la concentración, las larvas se comportan de distinta manera ya que a bajas concentraciones el porcentaje de inhibición de la alimentación es menor que a altas concentraciones, es decir a 200 ppm se observa el mayor efecto de inhibición de la alimentación. (Tabla y gráfica 18)

Al comparar el extracto metanólico y diclorometánico se puede apreciar que ambos extractos poseen actividad antialimentaria pero el extracto metanólico presenta porcentajes de disminución de la alimentación mayores que las mostradas por el extracto diclorometánico, a las distintas concentraciones (20, 100 y 200 ppm); lo cual indicaría que presenta mayor actividad antialimentaria frente a las larvas de *E. varivestis*.

De los resultados obtenidos de ambas pruebas, podemos observar que las larvas prefirieron alimentarse de las hojas que no estaban impregnadas de extracto, que de aquellas que si lo contenían adherido a si mismas, además, dependiendo de la concentración que se encontraba impregnada en las hojas fue la inhibición que presentaron en su alimentación; por lo cual aparentemente al aumentar la concentración obtendríamos una mayor disminución de la alimentación de las larvas. También se observa que el extracto metanólico posee mayor actividad que el extracto diclorometánico lo cual puede corroborarse con los valores de CMI y CE<sub>50</sub> obtenidos para cada extracto en el ensayo de actividad antialimentaria. La CMI para ambos extractos es la misma pero la inhibición de la

Tabla 18. Porcentajes de inhibición de alimentación de las larvas de *E. varivestis*

Concentración (ppm)	% inhibición alimentación de los extractos	
	Diclorometano	Metanol
20	5.26 ±0.3	7.70 ±0.4
100	13.25 ±0.7	17.86 ±0.9
200	22.60 ±1.1	29.15 ±1.5

Gráfica 18. Porcentajes de inhibición de la alimentación de los extractos de *C. ciliolata* frente a las larvas de *E. varivestis*. Prueba de elección ó preferencia

alimentación es mayor para el extracto metanólico. Asimismo, suponiendo el mismo comportamiento de las curvas obtenidas para los extractos, se puede calcular la  $CI_{50}$  para ambos extractos, sin embargo la  $CI_{50}$  del extracto metanólico es menor que la que presenta el extracto diclorometánico lo cual indica que el extracto metanólico a menor concentración 561 ppm inhibiría la alimentación de las larvas hasta un 50%.

Se encuentran reportados en la literatura algunos estudios realizados con otras especies de la familia Meliaceae como el extracto de acetona de *Trichillia pallida* probado frente a *Spodoptera littoralis* la cual mostró una potente actividad antialimentaria a 100 ppm, sin embargo la actividad que presentaron los compuestos aislados de dicho extracto fue menor lo cual indicaría un posible efecto sinergista de los compuestos. (Simmonds et al., 2001). Además algunos compuestos aislados de *Melia toosendan*, presentaron actividad antialimentaria a débil a 1000 ppm. (Nakatani et al., 1999). De acuerdo a lo descrito anteriormente los extractos de *C. ciliolata* serían buenos candidatos para seguir siendo estudiados, evaluando otros parámetros frente a los mismos insectos y realizar los ensayos con otras especies de insectos.

También se debe tener en cuenta que se trabajó con extractos y si los compuestos responsables de la actividad antialimentaria no presentan sinergismo como se menciona para el extracto de *Trichillia pallida*; entonces al probar las fracciones y/o compuestos posibles de aislar de esta planta, la actividad antialimentaria aumentaría.

El trabajo descrito fue un estudio preliminar para determinar si los extractos poseían actividad antialimentaria frente a las larvas de *E. varivestis*. En este ensayo no se monitoreó en días intermedios durante la prueba, por lo cual no es

posible determinar el comportamiento de las larvas en estos días; sin embargo sería un interesante tema para desarrollar posteriormente y de esta manera poder observar el desarrollo de las larvas a través de sus distintas fases de su ciclo de vida hasta llegar a ser adultas (tiempo y fases de pupación, peso adquirido, entre otros).

Basándose en los resultados descritos anteriormente se puede observar que la inhibición de la alimentación de las larvas de *E. varivestis* son dependientes de la concentración, debido a que su porcentaje de disminución de alimentación varía según la concentración a la que fueron expuestas, además que podemos confirmar la definición de antialimentario descrita por Coll, ya que después de que las larvas ingirieron un poco de alimento prefirieron no seguir alimentándose.

Esta observación se encuentra reportado en la literatura, debido a que algunos insectos prefieren morir de inanición que aceptar una dieta carente de su estimulante normal de la alimentación o bien con compuestos disuasivos de la alimentación, dicho efecto se ha observado con la larva de la mariposa blanca de la col *Pieris brassicae* (Harborne, 1988)

La contribución de este trabajo así como otros publicados con productos naturales, podrían ayudar a obtener o a desarrollar sustancias contra el ataque de los insectos a los cultivos. Los insecticidas de origen natural podrían ofrecer una fuente de agentes para el control de plagas y podrían ser una alternativa eficiente a evitar la resistencia a los insecticidas sintéticos.

Además debe de hacerse notar que los extractos de *C. ciliolata* al presentar actividad antialimentaria son candidatos como insecticidas de tipo indirectos debido a que los insectos al dejar de alimentarse mueren de inanición, lo cual

sería de gran ayuda en los cultivos principalmente de frijol que es en donde los insectos presentan su mayor daño en la agricultura.

En condiciones naturales (observación de campo) *C. ciliolata* causa un efecto significativo sobre diferentes organismos en la comunidad debido a que alrededor de este árbol no crecen otras especies en un radio de 2-3 metros aproximadamente, además de presentar actividad disuasiva frente a los insectos. Lo cual puede confirmarse con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas; es decir posee actividad alelopática frente a las semillas y plántulas de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa* y actividad antialimentaria frente a las larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant.

Debido a la nula o baja fitotoxicidad mostrada a bajas concentraciones ( 0-10 ppm), es decir debido a su comportamiento como regulador del crecimiento, presentada frente a las semillas dicotiledóneas y al pronunciado efecto antialimentario a concentraciones similares, los extractos de esta planta son muy buenos candidatos para estudios de tipo antialimentario más profundos considerando su posible potencial en futuras aplicaciones agroquímicas.

El resultado de este trabajo ayuda a encontrar herbicidas y/o reguladores del crecimiento sin efectos secundarios o adversos para el medio ambiente y al desarrollo de nuevos herbicidas podría darse en la regulación de procesos de germinación, crecimiento de raíces y tallo. Al igual que estos bioensayos la actividad antialimentaria que presentaron los extractos puede ser de gran utilidad para el aislamiento de nuevos metabolitos de origen natural o para el estudio de nuevas especies de plantas que puedan ayudar al control de plagas en la agricultura.

Además, el estudio realizado es importante debido a que enriquecemos y contribuimos al conocimiento de la flora mexicana en relación a las interacciones planta-planta y planta-insecto, además de motivar el estudio de nuevas especies endémicas de la flora mexicana.

## V. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se determinó que los extractos y fracciones de la madera de *Cedrela ciliolata* presentaron actividad alelopática e insecticida frente a las distintas especies blanco probadas.
2. La actividad alelopática de los extractos y fracciones primarias reunidas de *Cedrela ciliolata* se evaluó a través de la prueba "Evaluación del efecto sobre el desarrollo de las semillas en la caja Petri" en dos especies de semillas *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*, observando parámetros como: germinación, elongación de raíz, elongación de tallo y peso seco.
3. El extracto diclorometánico presentó mayor actividad alelopática frente a las especies de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*.
4. Todas las fracciones primarias reunidas evaluadas presentaron actividad alelopática, sin embargo las fracciones 64-83, 163-216 sólido y 217-238 líquido fueron las fracciones más activas.
5. La fracción 163-216 sólido y 217-238 líquido actúan de manera selectiva, a diferencia de la fracción 64-83 la cual no actúa de manera selectiva, frente a las semillas de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*.
6. La fracción 64-83 líquido presenta actividad herbicida frente a las semillas de *L. multiflorum* y *P. ixocarpa*.
7. La fracción 163-216 sólido se comporta como herbicida frente a las semillas de *P. ixocarpa* y como regulador del crecimiento en semillas de *L. multiflorum*.

8. La fracción 217-238 líquido actúa como herbicida frente a las semillas de *L. multiflorum* y como regulador del crecimiento en semillas de *P. ixocarpa*.
9. La actividad insecticida de los extractos de *Cedrela ciliolata* fue evaluada a través de las pruebas de actividad antialimentaria de no elección y de elección con larvas de *E. varivestis*.
10. El extracto metanólico presentó mayor actividad antialimentaria frente a las larvas de *E. varivestis*.
11. De los bioensayos realizados se puede observar que el efecto inhibitorio o estimulador para ambos extractos y fracciones evaluadas son dependientes de la concentración.
12. En la actividad alelopática los extractos son más activos que las fracciones primarias reunidas, lo cual indicaría un efecto sinergista por parte de los compuestos presentes en las fracciones primarias reunidas.
13. Este estudio muestra que la alelopatía es una posible estrategia de control de malezas en la agricultura.
14. El conocimiento detallado de las acciones alelopáticas, así como de la actividad insecticida de las plantas pueden ayudarnos al descubrimiento de excelentes modelos para desarrollo de nuevos herbicidas altamente selectivos.
15. Los extractos y fracciones de esta planta son muy buenos candidatos para ser considerados en futuras aplicaciones agroquímicas.

## VI. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios de actividad alelopatía y antialimentaria utilizando nuevas especies de semillas (mono y dicotiledóneas) y de insectos con las fracciones y extractos activos.
2. Determinar si las fracciones primarias reunidas poseen actividad antialimentaria frente a las larvas de *E. varivestis*.
3. Evaluar nuevos parámetros en la actividad antialimentaria como son mortalidad, desarrollo de las distintas fases de las larvas hasta su metamorfosis a insectos adultos.
4. Aislar a los metabolitos responsables de las actividades reportadas para su posterior identificación.
5. Todos los estudios realizados en el presente trabajo fueron efectuados *in vitro* por lo cual sería interesante poderlos estudiar directamente en los cultivos para observar si mantienen su efecto.
6. Evaluar los efectos alimentarios en otros plagas que atacan otros cultivos dicotiledóneos con importancia agrícola.

## VII BIBLIOGRAFIA

- Aliotta G., De Angelis, G., Mallik A., Sepe, J., Willis R. (1998) The historical Basis and Life Sciences. Lekehead University. International Alelopathy Society. Department of Life Sciences. Italy
- Alkofahi, A., Rupprecht, Anderson, J., McLaughlin, J., Mikolajczack, K., Scott, B. 1989. Search for New Pesticides from Higher Plants, pp 25-43 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. ACS. *Symp. Ser.* **387** Washington D.C.
- Anaya, A., Calera, M., Mata, R and Pereda R. 1990 Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem Ecology* **16**, 7, 2145-2152
- Anaya, A., Hernández, B., Pelayo, H., Calera, M., Fernández, E. 1995. Allelopathy in Mexican Plants, pp 224-239 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS. *Symp. Ser.* **582** Washington D.C.
- Anaya, A., Ramos, J., Hernández, G., Cruz, R. 1987. Allelopathy in Mexico, pp 89-101 in Waller, G.R. (ed.). Allelochemicals Role in Agriculture and Forestry. ACS. *Symp. Ser.* **330** Washington D.C.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. (1981). Cedro en atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol 1. Instituto Nacional Indigenista, México, 1981.
- Arnason, J. McKinnon, S., Durst, A. (1993) Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action in Downum, K., Romeo, J., Stafford, H. Phytochemical potential of tropical plants. Plenum Press, Nueva York, pp 107-131.
- Bach, P. (1992). Control biológico de plagas de insectos y malas hierbas. CECSA. México. pp 581-583, 741-745 .
- Bautista, N., Vejar, G., Carrilo, J. (1994) Técnicas para la cría de insectos. Colegio de Postgraduados en Ciencias agrícolas. Instituto de Fitosanidad. Industria editorial Mexicana. Edo. México, México. pp 73-77
- Bell, A., Perera, C., Nunn, P., Simmonds, M., Blaney, W. 1996. Non-protein amino acids of *Lathyrus latifolius* as feeding deterrents and phagostimulants in *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry*, **43**, 5, 1003-1007.

- Bevan, C., Powell, J., Taylor, D. 1963. West african timbers. VI. Petroleum extracts from species of genera *Khaya*, *Guarea*, *Carapa* and *Cedrela*. *J. Chem. Soc.*, 980-982
- Black, M., Bewley, J. (1994) Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York. pp 1-30
- Bruno, M., Vassallo, N., Simmonds, M. 1999. A diterpenoid with antifeedant activity from *Scutellaria rubicunda*. *Phytochemistry*, **50**, 973-976
- Bye R., Linares, E., Estrada, E. (1995) Biological Diversity of Medicinal Plants in Mexico in Arnason, J., Mata, R., Romeo, J. Recent advances in Phytochemistry, Phytochemistry of Medicinal Plants. Vol. 29. Plenum Press, New York, USA, pp 65- 82.
- Calderón, G. (1993) Flora del Bajío y de las regiones adyacentes. Instituto de Ecología UNAM Xalapa, Veracruz. Fascículo 11, pp 1- 13.
- Camps, F. (1988). Relaciones planta-insecto. Insecticidas de origen vegetal, in Belles, X. (Coord). Insecticidas biorracionales . Nuevas tendencias. Consejo superior de Investigaciones científicas. Madrid, España. pp 69-86
- Castañeda, P., García, M., Hernández, B., Torres, B., Anaya, A., Mata, R. 1992. Effects of some compounds isolated from *Celaenodredon mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. Chem Ecology*, **18**, 7, 1025-1037
- Céspedes, C., Calderón, J., King, B., Lotina, B. 1998. Phytochemical and biochemical characterization of epimeric photogedunin derivatives. Their different sites of interaction on the redox electron transport carrier of *Spinacea oleracea* L. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2810-2816
- Céspedes, C., Calderón, J., Lina, L., Aranda, E. 2000. Growth Inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem*, **48**, 1903-1908
- Céspedes, C., Calderón J., Salazar, R., Segura, R., and Lotina B. 2001. Plant-Growth inhibitory activity of Cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*. *J. Chem Ecology*, **27**, 1, 137-149
- Coll, J. (1988). Inhibidores de la alimentación de los insectos, in Belles, X. (Coord). Insecticidas biorracionales . Nuevas tendencias. Consejo superior de Investigaciones científicas. Madrid, España, pp 355-405

- Coulson, R., Witter, J. (1990). Entomología forestal, Ecología y Control. Ed. Limusa Noriega, México pp 223-253
- Champagne, D., Isman, M., Towers, N. 1989. Insecticidal activity of Phytochemicals and extracts of the Meliaceae, pp 95-109 in Arnason, J.T., Philogène B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. *ACS. Symp. Ser. 387* Washington D.C.
- Champagne, D., Koul, O., Isman, B., Scudder, G., Towers, G. 1992. Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*, **31**, 377-394
- Cheng, H. 1995. Characterization of the Mechanisms of Allelopathy, pp 132-141 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS. Symp. Ser. 582* Washington D.C.
- Chiu, S. 1989. Recent Advances in Research on Botanical Insecticides in China, pp 69-77 in Arnason, J.T., Philogène B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. *ACS. Symp. Ser. 387* Washington D.C.
- Duke, S. (1991). Plant terpenoids as pesticides in Keeler, R., Tu, A. Handbook of natural toxins. Vol 6. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pp 269-291
- Duke, S., Abbas, H. Año Natural Products with Potential Use as Herbicides. pp 348-362 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS Symp. Ser. 582* Washington D.C.
- Duke, S., Lydon, J. 1993. Natural Phytotoxins as Herbicides, pp 110-124 in Duke, S., Menn, J., Plimmer, J. (eds.). *Pest Control with Enhanced Environmental Safety. ACS. Symp. Ser. 524* Washington D.C.
- Einghellig, F. 1985. Effects of Allelopathic Chemicals on Crop Productivity, pp 109-129 in Hedin, P. A., Cutler, H., Hammock, B., Menn, J., Moreland, B (eds.). *Bioregulators for Pest Control. ACS. Symp. Ser. 276* Washington D.C.
- Einghellig, F. 1995. Allelopathy: Current Status and Future Goals, pp 1-24 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS. Symp. Ser. 582* Washington D.C.
- Einghellig, F. 1995. Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy, pp 96-116 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS. Symp. Ser. 582* Washington D.C.
- Escoubas, P., Lajide, L., Mizutani, J. 1995. Termite antifeedant activity in *Aframomum melegueta*. *Phytochemistry*, **40**, 4, 1097-1099

- Faini, F., Labbe, C., Salgado, I., Coll, J. 1997. Chemistry, Toxicity and antifeedant activity of the Resin of *Flourensia thurifera*. *Biochem. Syst. and Ecol.* **25**, 3, 189-193
- Fischer, N., Tarrisever, N., Williamson, B. 1988. Allelopathy in the Florida Scrub community as a model for natural herbicide actions. pp 233-249 in Cutler, H (ed). *Biologically active natural products potential use in agriculture. ACS Symp. Ser.* **380** Washington D.C.
- Fraga, B., Terrero, D., Gutiérrez, C., González, A. 2001. Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. *Phytochemistry*, **56**, 315-320
- Garcia, L. (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ed. Mundi Prens. Madrid, España. pp 24-49, 73-79, 104-105, 107-157
- Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products in Colgate, S., Molyneux, R. Detection, isolation and structural determination. CRC Press, USA, pp 9-57
- González, A., Jiménez, I., Ravelo, A., Coll, J., González, J., Lloria, J. 1997. Antifeedant activity of sesquiterpenes from Celastraceae. *Biochem Syst. and Ecology*. **25**, 6, 513-519.
- Govindachari, T., Suresh, G., Banumary, B., Masilamani, S., Geetha, G., Kumari, G. 1999. Antifungal activity of some B, D-seco limonoids from two meliaceous plants. *J. Chem. Ecol.*, **25**, 923-933
- Harborne, J. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, USA., pp 82-117
- Hedin, P. 1991. Use of Natural Products in Pest Control, pp 1-11 in Hedin, P. (ed). *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. ACS. Symp. Ser. **449** Washington D.C.
- Isman, M., Matura, H., McKinnon, S., Durst, T., Neil, G., Arnason J. (1996) *Phytochemistry of the Meliaceae* in Romeo, J., Saunders, J., Barbosa, P. *Phytochemical Diversity and Redundance in Ecological Interactions*. Vol. 30. Plenum Press, Nueva York and London pp 155-178
- Jacobson, M. 1989 . Botanical Pesticides. pp 1-10 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). *Insecticides of plant Origin*. ACS. Symp. Ser. **387** Washington D.C.
- Jain, D., Tripathi, A. 1993. Potential of Natural Products as Insect antifeedants. *Phytotherapy Res.*, **7**, 327-334

- Jiménez, A. Mata, R., Perda, R., Calderón, J., Isman, M., Nicol, R., Arnason, J. 1997. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1225-1234
- Klocke, J. 1987. Natural Plant compounds useful in Insect control, pp 396-415 in Waller, G.R. (ed.). *Allelochemicals Role in Agriculture and Forestry. ACS. Symp. Ser.* **330** Washington D.C.
- Klocke, J., Balandrin, M., Barnby, M., Bryan, R. 1989. Limonoids, Phenolics and Furanocoumarins as Insect Antifeedants, Repellents, and Growth Inhibitory Compounds, pp 136-149 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). *Insecticides of plant Origin. ACS. Symp. Ser.* **387** Washington D.C.
- Kubo, I. (1993). Insect control agents from tropical plants in Downum, K., Romeo, J., Stafford, H. *Recent Advances in Phytochemistry*. Plenum Press, Nueva York, pp 133-151
- Labrado, R., Caseley, J. (1996). Manejo de malezas para países en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación FAO. Roma Italia, pp 3-39, 173-240.
- Lee, M., Klocke, J., Barnby, M., Yamasaki, B., Balandrin M. 1991. Insecticidal Constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae), pp 293-304 in Hedin, P. (ed). *Naturally Occurring Pest Bioregulators. ACS. Symp. Ser.* **449** Washington D.C.
- Ley, S. (1990) *Synthesis and Modification of Azadirachtin and related antifeedants*, in *Recent advances in the Chemistry of Insect Control II*. Royal society of Chemistry, Printed in Great Britain by Whistable Litho Printers Ltd.
- Li, H., Nishimura, H., Hasegawa K., Mizutani J. 1992 Allelopathy of *Sasa Cernua*. *J. Chem Ecology*, **18** 10:1785-1796
- Lotina, B., Albores, M., García, L. Herbicidas y Productividad agrícola. *Rev. Soc. Quím. Mex.* **33**, 3, 109-117
- Lotina, B., Mata, R., Calderón, J., Céspedes, C., Jiménez, M. 1998. Secondary metabolites isolated from Mexican plants: Target and mechanism of action on photosynthesis. *Recent Res. Devol. in Agric. and Food Chem.* **2**, 731-749
- Macias, F. 1995. Allelopathy in the Search for natural herbicide models. pp 310-329 in Inderjit, Dakshini, K., Einhellig, F. (eds). *Allelopathy. Organisms, processes and applications. ACS. Symp. Ser.* **582** Washington D.C.

- Macias, F., Galindo, C., Molinillo, J., Cutler, H. (1999) Recent advances in Allelopathy Vol. I A science for the Future.. International allelopathy Society. Servicio de Publicaciones Universidad de Cádiz. Cádiz España pp 3-24, 29-46, 423-446, 483-462
- Macias, F., Galindo, J., Castellano, D., Velasco, R. 1999. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): trans, trans- Germacranolides. *J. Agric. Food Chem*, **47**, 4407-4414
- Macias, F., Galindo, J., Castellano, D., Velasco, R. 2000. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): Guaianolides. *J. Agric. Food Chem*, **48**, 5288-5296
- MacKinnon, S., Durst, T., Arnason, J. 1997 Antimalarial Activity of tropical Meliaceae extracts and Gedunin Derivatives. *J. Nat. Prod.* **60**, 336-341
- Mata, R. 1996. Bioactive compounds of medicinal and agrochemical interest from Mexican plants. *Rev. Latinoam. Quím*, **24**, 76-83
- Matsuda, H., Yoshikawa, M., Kubo M. 1998. Anticonceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutecarpa* var *bodinieri*. *Planta Med.* **64**, 339-342
- Mauseth, J. (1988). Plant anatomy. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. USA.
- Mohammed, S., Bentley, M., Randall, A., Mendel, M. 1988. A new limonoid insect antifeedant from the fruit of *Melia volkensii*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1, 168-171.
- Nakatani, M., Chun, R., Okamura, H., Igawa, T., Tadera, K. 1998. Degraded limonoid from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, **49**, 6, 1773-1776
- Nakatani, M., Shimokoro, Zhou, J., Okamura, H., Iwaga, T., Tadera, K., Nayakama, Naoki, H. 1999. Limonoids from *Melia toosendan*. *Phytochemistry*, **52**, 709-714.
- Pennington, T. (1981) Flora Neotropical, a monograph of Neotropical Meliaceae. The New York Botanical Garden. New York, pp 1-25, 358-385.
- Plimmer, J. 1985. Role of Natural Product Chemistry, pp 323-335 in Thompson, C.A. (ed.). The Chemistry of Allelopathy. ACS. Symp. Ser. 268 Washington D.C.
- Putman, A. 1985. Allelopathic Research in Agriculture, pp 1-8 in Thompson, C.A. (ed.). The Chemistry of Allelopathy. ACS. Symp. Ser. 268 Washington D.C.

- Rembold, H. 1989. Azadirachtins. Their structure and Mode of action, pp 150-163 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. ACS. *Symp. Ser.* **387** Washington D.C.
- Rice, E. 1987. Allelopathy: An Overview, pp 8-22 in Waller, G.R. (ed.). Allelochemicals Role in Agriculture and Forestry. ACS. *Symp. Ser.* **330** Washington D.C.
- Rice, E. (1984) Allelopathy. Academic Press. USA . pp 292-308, 320-343
- Romeo, J., Simmonds, M. 1989. Nonprotein Amino Acid Feeding Deterrents from Calliandra, pp 59-68 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. ACS. *Symp. Ser.* **387** Washington D.C.
- Saxena, R. 1989. Insecticides from Neem, pp 110-135 in Arnason, J.T., Philogene B. J., Morand, P (eds.). Insecticides of plant Origin. ACS. *Symp. Ser.* **387** Washington D.C.
- Segura, R., Mata, R., Anaya, A., Hernández, B., Villena, R., Soriano, M., Bye, R., Linares. 1993. New tetranortriterpenoids from *Switenia humilis*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1567-1574
- Simmonds, M., Stevenson, P., Porter, E., Veitch, N. 2001. Insect antifeedant activity of three New tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. *J. Nat. Prod.* **64**, 117-1120
- Singh, M., Khokhar, K., Malik, M., Singh, R. 1997 Evaluation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extracts against American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3262-3268
- Standley, P. (1983) Trees and Shrubs of Mexico, Germany , pp 553-562 .
- Tada, K., Takido, M., Kitanaka, S. 1999. Limonoids from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, **51**, 787-791
- Valladares, G., Defaco, T., Palacios, S., Carpinella, M. 1997. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (meliaceae) extracts against the *Elm leaf Beetle* (coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, **90**, 3, 747-750
- Vietch, N., Wright, G., Stevenson, P. 1999. Four new tetranortriterpenoids from *Cedrela odorata* associated with leaf rejection by *Exopthalmus jekelianus*. *J. Nat. Prod.* **62**, 1260-1263

Vives, J. (1988) Control de plagas de insectos. Problemas y alternativas in Belles, X. (Coord). Insecticidas biorracionales. Nuevas tendencias. Consejo superior de Investigaciones científicas. Madrid, España, pp 3-14

Wheeler, D., Isman, M., Sánchez, P., Arnason J. 2001. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochem. Syst. and Ecol.* **29**, 347-358