



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPUESTOS BIOACTIVOS DE
*Cedrela dugesii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALEJANDRO GUTIÉRREZ SOLÍS



MÉXICO, D.F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Paginación

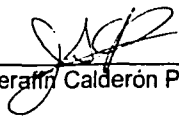
Discontinua

JURADO ASIGNADO:

Presidente	profesor:	Calderón Pardo José Serafín
Vocal	profesora:	Mata Essayag Rachel
Secretario	profesora:	Rojas Tomé Irma Susana
1^{er} suplente	profesora:	Acevedo Arteaga Laura Alicia
2^{do} suplente	profesora:	Ramírez Ahumada María Del Carmen

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio 7 (UIPM) del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:



Dr. José Serafín Calderón Pardo

Supervisor técnico:



Dr. Carlos L. A. Céspedes Acuña

Sustentante:



Alejandro Gutiérrez Solís

Agradecimientos

Al Dr. José P. Calderón Pardo, por su apoyo, paciencia y conducción en la realización del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Carlos L. A. Céspedes Acuña por su apoyo, asesoría e interés en la realización del presente proyecto.

A los miembros del jurado por sus importantes sugerencias en la realización del presente proyecto.

A la U.N.S.M por darme la oportunidad de desarrollarme en todos los aspectos y muy especialmente a la Facultad de Química y al Instituto de Química.

Dedicatorias

A Dios por permitirme terminar esta carrera, porque sin el no hubiera sido posible.

*A mis padres José H. Gutiérrez y Alicia Solís por darme su confianza, apoyo,
cariño y por sus consejos que fueron y son muy valiosos.*

*A mis hermanos Jorge, Enrique y Gerardo por estar siempre conmigo y por ser
realmente mis hermanos y mis amigos.*

*A mis amigos en especial a Lizbeth y Lissie Cohen por su amistad y cariño que
siempre me muestran.*

"Y Conoceréis La Verdad, Y La Verdad Os Hará Libres"

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS. _____	iii
I. OBJETIVOS. _____	1
II. HIPÓTESIS. _____	2
III. ANTECEDENTES. _____	3
3.1) Antecedentes botánicos del género <i>Cedrela</i> y de la especie <i>Cedrela dugesii</i> . _____	3
3.2) Antecedentes fitoquímicos de los limonoides. _____	17
3.2.1) Terpenoides. _____	17
3.2.2) Limonoides. _____	17
3.3) Generalidades sobre los insecticidas. _____	19
3.3.1) Clasificación de los insecticidas. _____	20
3.3.2) Clasificación de los insecticidas con base en el mecanismo de acción. _____	21
3.4) Generalidades sobre la germinación. _____	23
3.5) Generalidades sobre los herbicidas. _____	25
3.5.1) Clasificación de los herbicidas. _____	26
3.5.2) Clasificación de los herbicidas con base en el mecanismo de acción. _____	28
3.6) Generalidades sobre la especie <i>Spodopera frugiperda</i> . _____	31
3.6.1) Ciclo de vida de la especie <i>Spodopera frugiperda</i> . _____	31
IV. PARTE EXPERIMENTAL. _____	33
4.1) Estudio fitoquímico de <i>Cedrela dugesii</i> . _____	33
4.1.1) Recolección del material vegetal. _____	33
4.1.2) Preparación y fraccionamiento del extracto orgánico. _____	33
4.1.3) Aislamiento y purificación de los compuestos de las fracciones obtenidas. _____	34

ÍNDICE

	Página
4.2) Pruebas biológicas. _____	37
4.2.1) Determinación de la actividad herbicida. _____	37
4.2.2) Determinación de la actividad insecticida. _____	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____	41
5.1) Caracterización de los compuestos aislados. _____	41
5.1.1) Metabolitos aislados de <i>Cedrela dugesii</i> . _____	41
5.1.2) Caracterización de la fotogedunina. _____	42
5.1.3) Caracterización de la cedrelanólida. _____	42
5.2) Actividad biológica de los compuestos aislados de <i>Cedrela dugesii</i> . _____	42
5.2.1) Determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación de las semillas de prueba. _____	43
5.2.2) Determinación del efecto de los compuestos aislados sobre el crecimiento de la radícula y del tallo de las semillas de prueba. _____	45
5.2.3) Bioensayo con <i>Spodopera frugiperda</i> . _____	50
VI. CONCLUSIONES. _____	57
VII. BIBLIOGRAFÍA. _____	58
VIII. ESPECTROS. _____	62

ABREVIATURAS

Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
IR	Infrarrojo
EMIE	Espectrometría de masas
RMN ¹ H	Resonancia magnética de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética de carbono 13
Hz	Hertz
MHz	MegaHertz
ppm	Partes por millón
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
m/z	Masa/carga
M ⁺	Ión molecular
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
s	Singulete
dd	Doblete de doblete
t	Triplete
m	Multiplete
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
μM	Micromolar
mm	Milímetros
mL	Mililitros
L	Litro
P.F.	Punto de fusión
P.M.	Peso molecular
m ²	Metro cuadrado
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxiribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato

OBJETIVOS

I. OBJETIVOS

- Obtener el extracto con diclorometano del duramen molido de *Cedrela dugesii*.
- Realizar el fraccionamiento del extracto diclorometánico mediante el proceso de cromatografía en columna abierta.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios de las fracciones primarias del extracto obtenido de la *Cedrela dugesii* y posteriormente identificar los metabolitos secundarios utilizando métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar la actividad herbicida potencial de los metabolitos secundarios en semillas de prueba.
- Evaluar la actividad insecticida potencial de los metabolitos secundarios en larvas del insecto plaga *Spodoptera frugiperda*.

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes alelopáticos de las plantas pertenecientes al género *Cedrela* (familia Meliaceae), se plantea la posibilidad de que los extractos y los compuestos aislados de la especie *Cedrela dugesii* presenten actividad insecticida y/o herbicida.

Ya que unos de los compuestos principales de estas plantas son la gedunina (reconocido regulador de crecimiento de insectos) y la fotogedunina (inhibidor del crecimiento de las plantas herbáceas), es posible encontrar actividad alelopática.

ANTECEDENTES

III. ANTECEDENTES

3.1) Antecedentes botánicos del género *Cedrela* y de la especie *Cedrela dugesii*.

Las plantas de la familia Meliaceae, han sido usadas en la medicina tradicional y para controlar plagas de insectos en cultivos.²⁶ Entre los géneros principales pertenecientes a esta familia se encuentran los siguientes:

- *Azadirachta*
- *Aglia*
- *Carapa*
- *Cedrela*
- *Guarea*
- *Melia*
- *Ruagea*
- *Sandoricum*
- *Swietenia*
- *Toona*
- *Trichilia*

En particular, en el género *Cedrela* se han mencionado hasta 70 especies, pero en la actualidad se consideran alrededor de nueve, mismas que se encuentran distribuidas a lo largo de América tropical, desde México hasta Argentina. Corresponden aquí los árboles comúnmente llamados "cedros" o "cedros rojos", los cuales son reconocidos por su gran de gran importancia económica.²⁰ De acuerdo a la información descrita en la literatura se han logrado aislar numerosos metabolitos secundarios de este género como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

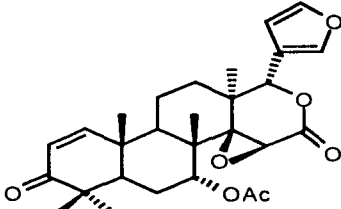
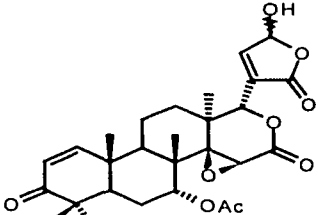
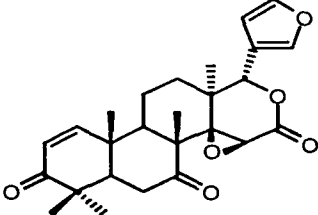
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="545 521 683 544"><u>gedunina (1)</u></p>	1
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="524 796 703 819"><u>fotogedunina (2)</u></p>	8
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="453 1072 773 1095"><u>7-desacetil-7-oxogedunina (3)</u></p>	1

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

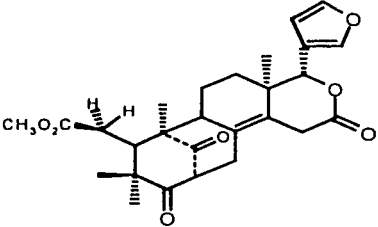
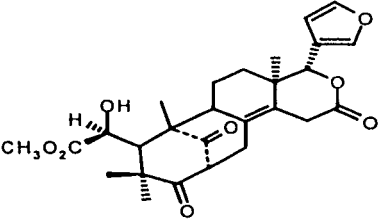
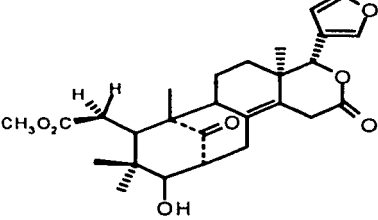
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="515 521 691 545"><u>mexicanólida</u> (4)</p>	6
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="471 796 736 821"><u>6-hidroximexicanólida</u> (5)</p>	31
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="471 1072 736 1096"><u>6-desoxiswietenólida</u> (6)</p>	31

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

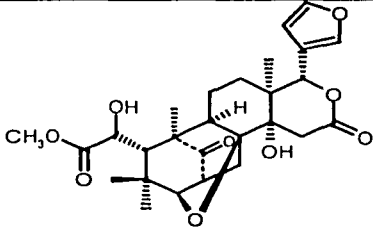
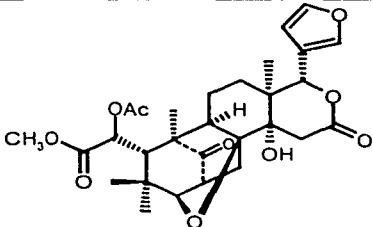
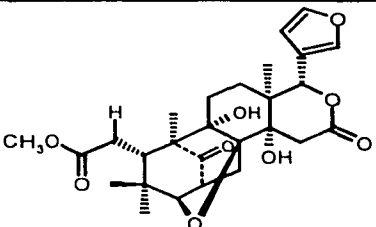
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>cedrodorina (7)</u></p>	37
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>6-acetoxicedrodorina (8)</u></p>	37
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>6-deoxy-9α-hidroxicedrodorina (9)</u></p>	37

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

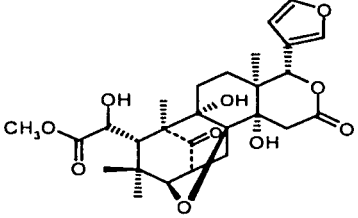
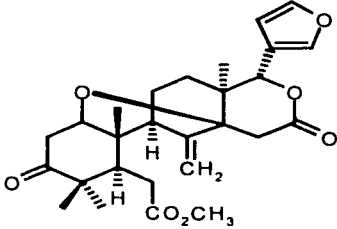
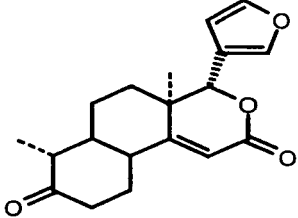
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="483 534 765 561"><u>9α-hidroxicedrorodina</u> (10)</p>	37
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="506 810 747 837"><u>metil angolensato</u> (11)</p>	14
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="548 1079 700 1106"><u>odoratina</u> (12)</p>	15

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

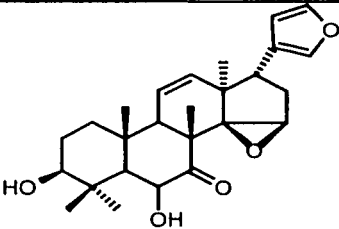
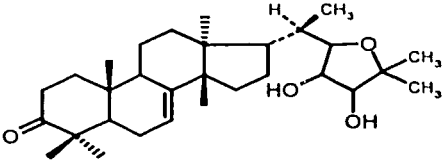
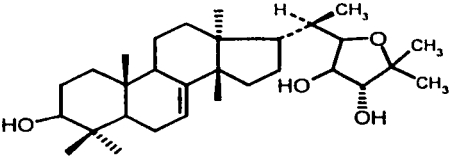
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="484 538 762 561"><u>tetranortriterpenoide</u> (13)</p>	18
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="545 821 703 844"><u>odoratona</u> (14)</p>	13
<i>C. odorata</i>	 <p data-bbox="538 1100 707 1123"><u>isodorato</u> (15)</p>	13

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

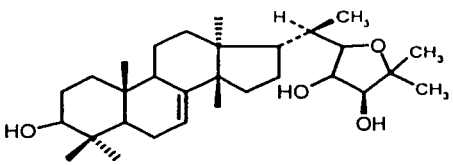
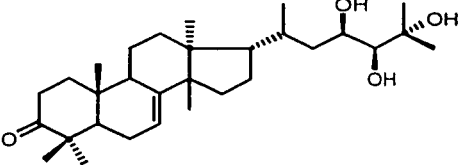
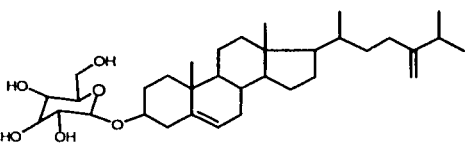
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>odoratol</u> (16)</p>	13
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>treo-23,24,25-trihydroxirucalan-7-en-3-ona</u> (17)</p>	10
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>3β-O-β-D-glucopiranosil-24-metilencolesterol</u> (18)</p>	10

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

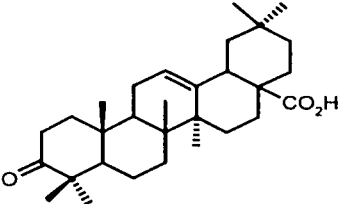
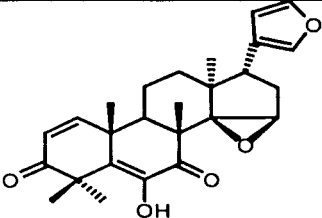
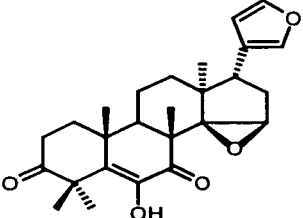
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. odorata</i>	 <p style="text-align: center;"><u>ac. oléanico</u> (19)</p>	10
<i>C. toona</i>	 <p style="text-align: center;"><u>cedrelona</u> (20)</p>	16
<i>C. toona</i>	 <p style="text-align: center;"><u>1,2-dihydrocedrelona</u> (21)</p>	16

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

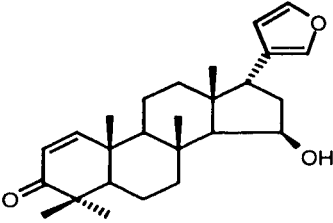
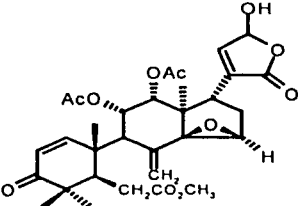
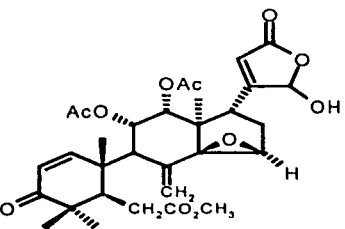
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. toona</i>	 <p data-bbox="476 521 723 544"><u>6-desoxicedrelona</u> (22)</p>	2
<i>C. toona</i>	 <p data-bbox="435 795 764 818"><u>23-(R,S)-hidroxitoonacilida</u> (23)</p>	24
<i>C. toona</i>	 <p data-bbox="435 1072 764 1095"><u>21-(R,S)-hidroxitoonacilida</u> (24)</p>	24

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

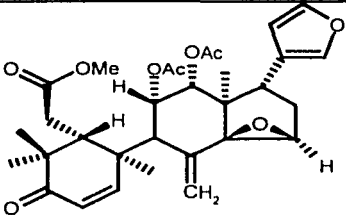
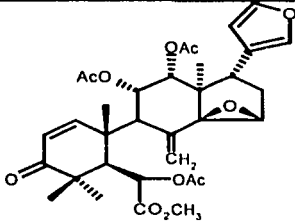
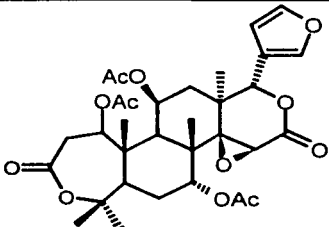
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. toona</i>	 <p style="text-align: center;"><u>toonacilina</u> (25)</p>	24
<i>C. toona</i>	 <p style="text-align: center;"><u>6-acetoxitoonacilina</u> (26)</p>	24
<i>C. mexicana</i>	 <p style="text-align: center;"><u>7α,11β-diacetoxidihidronomilina</u> (27)</p>	29

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

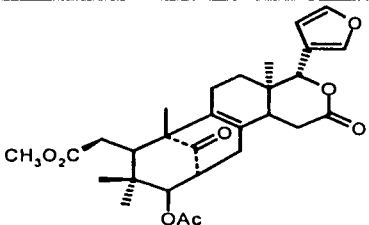
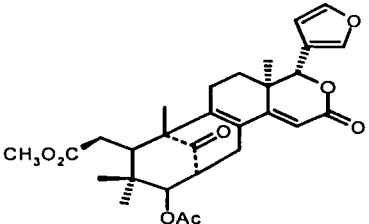
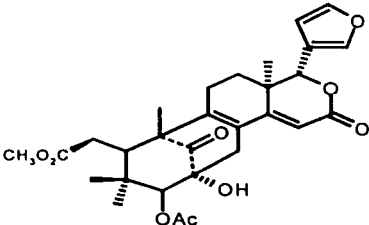
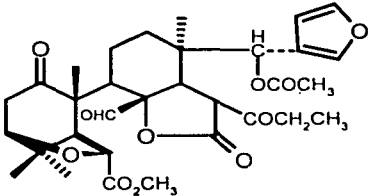
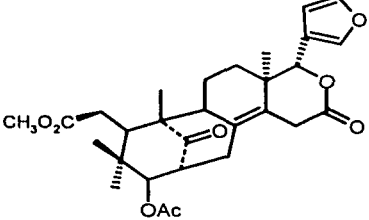
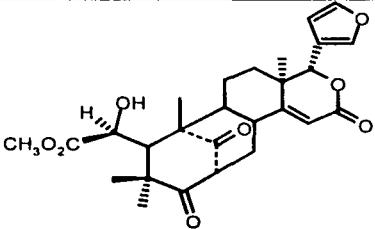
ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. angustifolia</i>	 <p><u>angustinólida I (28)</u></p>	25
<i>C. angustifolia</i>	 <p><u>angustidienólida II (29)</u></p>	25
<i>C. angustifolia</i>	 <p><u>2α-hidroxiangustidienólida III (30)</u></p>	25

Tabla 1. Limonoides aislados de especies del género *Cedrela*.

ESPECIE	ESTRUCTURA QUÍMICA	REFERENCIA
<i>C. salvadorensis</i>	 <p style="text-align: center;">cedrelanólida (31)</p>	34
<i>C. fissilis</i>	 <p style="text-align: center;">fissinólida (32)</p>	39
<i>C. glaziovii</i>	 <p style="text-align: center;">6-hidroxicarpina (33)</p>	11

La especie *C. dugesii*; es conocida comúnmente con los nombres de: cuatal, cuaterani, cueteramba (lengua purépecha), nogal, nogal corriente, nogalillo cimarrón y cedro.⁹ Este último es quizás el nombre común más citado en la literatura científica.

Los individuos de esta especie son árboles hasta de 12 m de altura, pero por lo general no pasan de 10 m. Su tronco es más o menos tortuoso de aproximadamente 60 cm de diámetro; la corteza del tronco es grisácea, lisa en la juventud, fisurada en forma de placas rectangulares en la madurez; sus hojas son paripinnadas, de 20 a 35 cm de largo y de 3 a 4 cm de ancho⁹, como se muestra en la figura 1.

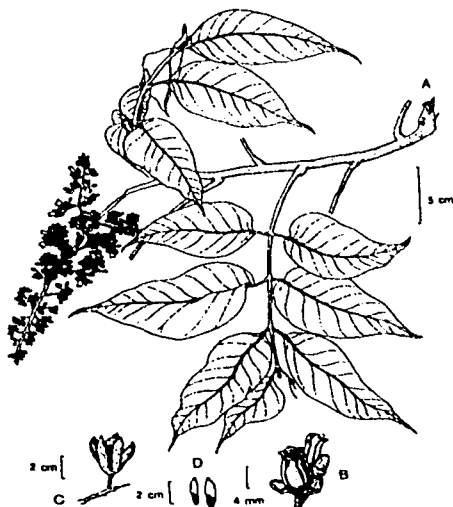


Figura 1. Imagen de la especie *Cedrela dugesii*. A. rama con inflorescencia; B. flores; C. fruto; D. semillas.

Esta especie habita en suelos poco profundos y de afloramientos rocosos y, aunque en otro tiempo probablemente fue frecuente y abundante, en la actualidad su crecimiento es escaso en lo que resta todavía del bosque tropical en el Bajío y se registra sólo en localidades algo dispersas en Guanajuato, norte de Michoacán y de los alrededores de las ciudades de Querétaro y San Juan del Río, como lo muestra la figura 2. Florece de marzo a junio, se ha colectado en fruto de abril a noviembre y permanece sin follaje en la época seca correspondiente a los primeros meses del año.⁹

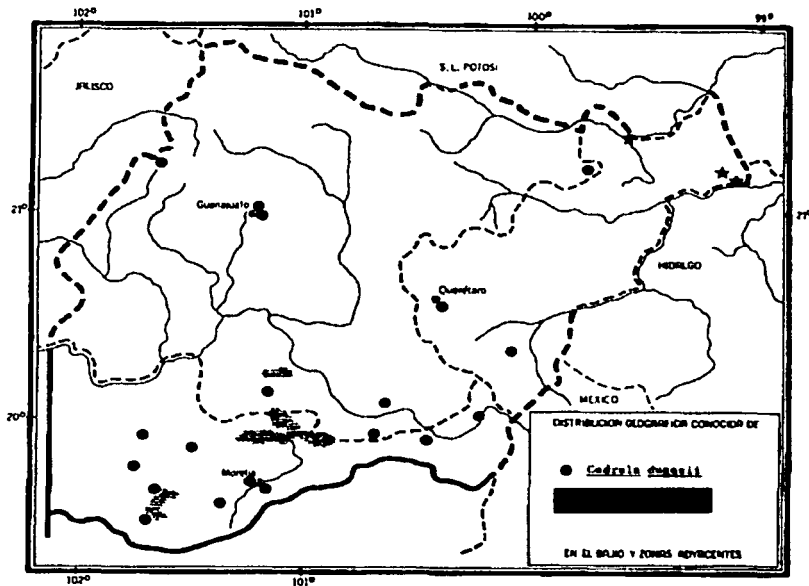


Figura 2. Distribución geográfica de la especie *Cedrela dugesii*.

3.2) Antecedentes fitoquímicos de los limonoides.

3.2.1) Terpenoides.

Los terpenoides son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, muchos se presentan en las plantas como constituyentes de los aceites esenciales. Los terpenoides son compuestos hidrocarbonados, que contienen oxígeno y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los constituyen como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los terpenoides.

Nombre	Número de unidades de isopreno
Monoterpenos	2
Sesquiterpenos	3
Diterpenos	4
Sesterterpenos	5
Triterpenos	6
Tetraterpenos	8

3.2.2) Limonoides.

Son biosintetizados en todos los tejidos de la planta y un mismo individuo puede producir diferentes tipos. Los limonoides son metabolitos secundarios que se biosintetizan en plantas del orden de los Rutales. Dentro de este orden, son característicos en la familia Meliaceae en la cual son diversos y abundantes y se encuentran menos frecuentemente en las familias Rutaceae y Cneoraceae.¹²

Los limonoides son triterpenoides modificados, derivados de un precursor con un esqueleto 4,4,8-trimetil-17furanilesteroides.¹² Existen cerca de 10 grupos

de limonoides clasificados en función de la estructura de los anillos A, B, C y D de los grupos funcionales que se incorporan en ellos o alrededor de ellos. En la figura 3 se muestra un ejemplo de la estructura de un limonoide.

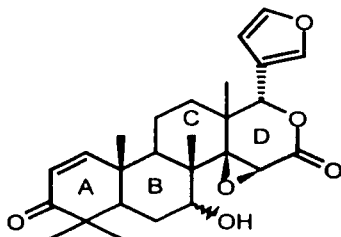


Figura 3. Ejemplo de un limonoide.

Los limonoides actúan principalmente como inhibidores de la alimentación en los insectos, lo que puede deberse en cierta medida a su sabor amargo; asimismo, poseen una marcada actividad de regulación de su crecimiento.^{12, 23} Además se sabe que la presencia de oxígeno en la estructura del anillo de ciclohexano contribuye a aumentar la toxicidad que presentan estos compuestos en insectos ya que estos metabolitos altamente oxigenados son más reactivos, causando daños atribuidos a la formación de aductos con el DNA a la unión con enzimas.

El hecho de que estos compuestos presenten frecuentemente efectos sobre el comportamiento y la fisiología de los insectos, sugiere que la principal razón de la producción de estos compuestos en las plantas, es la protección contra los insectos herbívoros.¹²

Por otra parte, aunque los limonoides son mejor conocidos por sus propiedades insecticidas en la literatura también se encuentran descritas una gran variedad de efectos medicinales en animales y en humanos, incluyendo algunos efectos anticarcinogénicos *in vitro* en estos últimos.¹² Otras propiedades de los limonoides incluyen la actividad fungicida, la bactericida, la antiviral y la fitotóxica.³⁵ La amplia gama de actividades biológicas que poseen estos compuestos, ha despertado el interés de muchos investigadores, quienes han estudiado este tipo de productos naturales.²²

3.3) Generalidades sobre los insecticidas.

El número de especies de insectos descritas actualmente es de aproximadamente un millón y es, numéricamente, el grupo más importante del reino animal. A esto se añade su gran capacidad de reproducción, su versatilidad ecológica y su facilidad de dispersión. Por ello no es de extrañar que se encuentren en todos los lugares del planeta, adaptados a las más distintas condiciones.⁵

Su incidencia sobre la actividad humana es muy importante y desde este punto de vista se acostumbra a clasificar a los insectos en benéficos y perjudiciales. Los primeros aportan materias primas (por ejemplo miel, seda) e intervienen decisivamente en la polinización de muchas plantas. Así mismo, 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 controlan de forma natural el desarrollo de insectos potencialmente dañinos.⁵

Sin embargo los perjuicios que causan a la especie humana son de gran importancia ya que son los causantes directos de parasitismos y molestias sobre el hombre y animales domésticos, y son transmisores de peligrosas enfermedades como el paludismo, que ha ocasionado millones de víctimas. Los efectos negativos de los insectos sobre las plantas cultivadas y productos almacenados, son muy notorios y en este sentido han constituido una de las causas de millonarias pérdidas económicas en la agricultura.⁵ En consecuencia, es necesario lograr su control a través de la utilización de sustancias insecticidas, las cuales se definen como compuestos químicos de origen mineral, vegetal y orgánico, que son capaces de producir la muerte de los Insectos en un tiempo considerablemente corto, al actuar mediante diversos mecanismos sobre el metabolismo de estos organismos.³²

3.3.1) Clasificación de los insecticidas.

a) Insecticidas clásicos.

Los insecticidas clásicos se dividen en dos grupos principales:

- Insecticidas de ingestión o acción interna: Se utilizan en la lucha contra insectos masticadores. Ejemplos: arseniatos, fosfuros y derivados del flúor, criolita, etc.
- Insecticidas de contacto: Fueron empleados clásicamente en la lucha contra insectos chupadores y que hoy día continúa con plena vigencia. Ejemplos: emulsiones de aceite como los aceites blancos o emulsiones tipo mayonesa.³²

b) Insecticidas de origen microbiológico.

Entre los compuestos de origen biológico que actúan como insecticidas, destacan los preparados a partir de diversas cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Al esporular esta bacteria produce un cristal con una toxina que afecta a las orugas que la ingieren. Entre sus inconvenientes, se encuentran la limitación de la acción insecticida, que normalmente sólo resulta plenamente eficaz en las primeras fases larvarias y su degradabilidad. Estos inconvenientes se convierten en ventajas si consideramos su baja incidencia en la contaminación del medio.⁵

c) Insecticidas de síntesis.

Entre los insecticidas sintéticos se encuentran los compuestos organoclorados (por ejemplo DDT), los compuestos organofosforados (por ejemplo paration), los carbamatos (por ejemplo aldicarb) y los piretroides (por ejemplo resmetrina y permetrina).⁵

3.3.2) Clasificación de los insecticidas con base en el mecanismo de acción.

a) Bloqueadores de los canales de calcio.

Inducen parálisis en los insectos y los vertebrados, causando una contracción continua del músculo esquelético. (por ejemplo rianodol).

b) Inhibidores de la acetilcolina.

Estos insecticidas inhiben la acción de la acetilcolina, que es el principal

neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central de los insectos. Esta activación continua lleva a una sobre estimulación de las sinápsis colinérgicas y como resultado se producen convulsiones, parálisis, inapetencia y, por último, la muerte del insecto.

c) Reguladores del crecimiento de los insectos.

Los insectos expuestos a estos compuestos son incapaces de llegar a formar una cutícula normal, debido a que pierden su capacidad de sintetizar quitina. En ausencia de la quitina, la cutícula se vuelve delgada y frágil, por lo que es incapaz de soportar al insecto o mantener el rigor del capullo (ecdisis). (por ejemplo diflubenzuron).

e) Mimetizadores de la hormona juvenil.

Estos compuestos son estructuralmente similares a las hormonas juveniles de los insectos. La exposición a estos compuestos durante la fase de metamorfosis, genera insectos que poseen morfologías mixtas como de larva/pupa o de larva/adulto. Otra ventaja de estos compuestos, es que interrumpe el desarrollo reproductivo normal en los adultos y actúan como método de control. (por ejemplo metopreno).

f) Inhibidores de la alimentación.

Los inhibidores de la alimentación son sustancias que tras provocar en el insecto una respuesta de interrupción del proceso de alimentación después de un consumo inicial, conducen a su muerte por inanición, que sobreviene en la proximidad de la planta tratada. Así pues, puede decirse que el modo de acción

de un fagooinhibidor es a través de la ingestión. Los terpenoides son el grupo más estudiado de estos pesticidas, destacando el limonoide azadiractina.⁵

En general se requiere que los insecticidas controlen por lo menos, la mitad de los problemas ocasionados por los insectos que afectan la agricultura y la salud pública.²⁵ Aunque los insecticidas han controlado efectivamente algunas especies de insectos, su uso extenso y en ocasiones indiscriminado, ha provocado serias repercusiones sociales y ambientales. Es por ello que en las dos últimas décadas ha aumentado el interés en el uso de nuevos productos bioactivos de origen natural, que presenten menor probabilidad de dañar la ecología.³³

Los insecticidas benignos para el ambiente son de toxicidad selectiva, que no se acumulan y que exhiben una persistencia relativamente corta en el ambiente.³⁶ Estos agentes alternativos para el control de insectos incluyen a los insecticidas botánicos, por lo que las plantas son virtualmente la fuente más rica de sustancias bioactivas que poseen propiedades inhibitorias del crecimiento de insectos.³³

3.4) Generalidades sobre la germinación.

La germinación involucra tres fases o procesos principales:

FASE I: Las semillas absorben una cantidad suficiente de agua antes de que ocurra el vigoroso metabolismo de la germinación. Una semilla absorberá agua solo si la cáscara y/o las cubiertas son permeables. El agua es absorbida por ósmosis, lo que se lleva a cabo por la existencia o formación de una alta concentración de solutos en las células de la semilla.⁷

FASE II: Esta es la fase de la absorción de agua. Tan pronto como la semilla se hidrata, toman lugar los principales eventos metabólicos que preceden a la emergencia de la radícula en las semillas, las enzimas respiratorias se activan y las sustancias de reservas como el almidón se metabolizan para producir el combustible, en su mayoría ATP, para la síntesis de otras enzimas que se requieren para el crecimiento. Las semillas en periodo de latencia, también presentan actividad metabólica en esta fase.⁷

FASE III: Aunque las semillas en periodo de latencia, pueden entrar en la fase II únicamente las semillas germinantes entran en esta tercera fase, que coincide con la elongación de la radícula. Los carbohidratos, las grasas y las proteínas estas sustancias que se encuentran en los cotiledones como reservas o en el endospermo se movilizan para apoyar el desarrollo del nuevo embrión, lo que involucra la división celular, el alargamiento y la diferenciación. El patrón general del crecimiento del embrión y su desarrollo, varía entre las especies.⁷

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades inherentes a la semilla, como son el contenido de sustrato hidratable, la permeabilidad de la cubierta de la semilla, el tamaño de la semilla, etc; y de las condiciones que prevalecen durante la hidratación, entre ellas, la temperatura, el contenido de humedad, la composición del sustrato.

Las paredes celulares de los embriones en las semillas secas maduras, se encogen, confiriéndoles una apariencia de ondas cuando son observadas en el microscopio electrónico. Inicialmente, durante la imbibición, las paredes se expanden un poco y se engrosan al absorber agua, esto ocurre en todas las semillas, ya sean muertas, en periodo de latencia, o viables.

Para que la germinación llegue a su término, se debe expandir la radícula y penetrar las estructuras circundantes.⁷ La expansión de la radícula ocurre en dos fases. Existe al principio una fase lenta que dura 48 horas aproximadamente, durante la cual la raíz rompe la testa en el 30% de las semillas. Después de esto entran a la fase II que es rápida.

Las posibles causas para que inicie el crecimiento de la radícula son:

- 1) Disminución del potencial osmótico.
- 2) Relajación
- 3) Debilitamiento de los tejidos que rodean la radícula.
- 4) Una combinación de las causas anteriores.

La primera señal de que la germinación ha concluido, es usualmente un aumento en la longitud y en el peso húmedo de la radícula.

3.5) Generalidades sobre los herbicidas.

Por definición, una maleza es una planta indeseable. Sin embargo formular una definición más específica es difícil, ya que un tipo de planta que es deseable bajo ciertas condiciones, se vuelve indeseable en otras circunstancias.

Debido a los graves problemas que ocasionan las malezas (compiten con el cultivo, son huéspedes de plagas, dificultan las labores habituales de los cultivos etc.) se han convertido en un asunto de interés en muchas áreas y se han desarrollado varios métodos para su control, como son los métodos mecánicos, tales como la siega, la quema y la sofocación con materiales inertes; los

métodos biológicos, entre los que se encuentran la utilización de insectos y, por último, los métodos químicos, que han sido usados durante años y que han comprobado ser sumamente eficientes.

La destrucción selectiva de una especie vegetal, sin provocar daño en otras especies que crecen contiguamente, es difícil de conseguir; el modo de lograrlo consiste en aprovechar algunas características que no comparten, tales como el tamaño y la superficie de las hojas, la susceptibilidad a agentes químicos, así como las diferencias en las características físicas o fisiológicas de las plantas. Las sustancias químicas que interfieren de algún modo con el funcionamiento de las plantas, deteniendo su crecimiento y produciendo en muchos casos su muerte, se denominan *herbicidas*.

3.5.1) Clasificación de los herbicidas.

Los criterios que se utilizan para clasificar a los agentes herbicidas, son los siguientes:

a) Por su acción sobre las plantas.

- No selectivos o totales: Son sustancias que destruyen toda la vegetación presente, sin discriminación.
- Selectivos: Son sustancias que solo destruyen a las malas hierbas de los cultivos, pero deja ileso al cultivo.

Por otra parte ha sido común distinguir la acción de los herbicidas por su efecto en plantas de "hoja ancha" (dicotiledóneas) y de "hoja estrecha" (gramíneas).³

Un herbicida puede ser selectivo a concentraciones bajas y comportarse como no selectivo a concentraciones altas. El efecto herbicida depende también de la edad y del vigor de las plantas. En términos corrientes, la denominación total o no selectivo, conviene a productos de acción completa, en tanto que selectivo, es la calificación más propia para los herbicidas que respetan al cultivo de aplicación.

b) Por su modo de aplicación.

- De presiembra: se aplican antes de sembrar o de plantar.
- De preemergencia: se emplean después de la siembra o al mismo tiempo, pero siempre antes de que el cultivo emerja del suelo.
- De postemergencia: se usan sobre el cultivo ya emergido o implantado, y más o menos desarrollado.³

c) Por su acción sobre malezas.

- De contacto: cuando para destruir la planta se precisa el contacto directo con ella.
- Residuales o de superficie: son los herbicidas que se aplican al suelo, antes de nacer las hierbas o cuando estas están germinando al ser absorbidos por las raíces de las plántulas o por las semillas.³

d) Por su estructura química.

Con frecuencia los herbicidas se clasifican en grupos o familias de acuerdo con una cierta analogía o similitud en su estructura química, sin embargo, muchos compuestos herbicidas son difícilmente clasificables en alguno de esto

grupos clásicos y con frecuencia se incluyen en un grupo diverso de compuestos con muy variada estructura química.

Una gran parte de los herbicidas empleados son de carácter selectivo y en su aplicación deben tenerse en cuenta varios factores o características para su mejor eficacia como son:

- 1) Su incorporación y transporte por la savia.
- 2) Su persistencia, pues no basta que el herbicida actúe, sino también es de importancia que su efecto dure algún tiempo para evitar el crecimiento y el rebrote de las malas hierbas.
- 3) Su acción rápida o lenta.

3.5.2) Clasificación de los herbicidas con base en el mecanismo de acción.

a) Inhibición de la fotosíntesis.

Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis han sido los más estudiados, esto se debe a su baja toxicidad en mamíferos. De hecho, el 50% de los herbicidas comerciales inhiben este proceso. Un elevado número de herbicidas inhibe la fase luminosa de la fotosíntesis o la reacción de Hill, que consiste en la partición de la molécula de agua utilizando energía en forma de compuestos reducidos. Este proceso fisiológico tiene lugar en los cloroplastos.²⁸

La parte más importante de las células vegetales son los cloroplastos, los cuales son los organelos que llevan a cabo la fotosíntesis. Estas células absorben luz solar, agua y dióxido de carbono por medio de la clorofila, que es

un pigmento fotosintético para producir glucosa y oxígeno.⁸ Los cloroplastos no producen energía para la célula, sino que a través del proceso de la fotosíntesis, producen las materias primas que las mitocondrias usan para producir energía.

La mayoría de los herbicidas interfieren con el fotosistema II y con el ciclo de evolución del oxígeno. Los cloroplastos interceptan la energía luminosa y la transforman en una transferencia de electrones, que a veces, en lugar de disiparse en el ciclo fotosintético, producen diversos radicales de oxígeno con elevada capacidad de reacción. Dichos radicales dañan las membranas, y como consecuencia de todo ello impiden la síntesis de nuevos productos, azúcares en primer término.

b) Inhibición de la respiración y del transporte de electrones mitocondrial.

La función de las mitocondrias es darle energía a la célula. Estos organelos toman la glucosa y el oxígeno y los degradan para proveer ATP, agua y dióxido de carbono. Este proceso es llamado respiración celular. Las mitocondrias realizan una función exactamente opuesta a la de los cloroplastos, los que producen los compuestos necesarios para proveerle energía a la célula y la mitocondria los utiliza para fabricarla, por lo que estos procesos son complementarios.

La inhibición de la respiración puede afectar el sistema de transporte de electrones que tiene lugar en las mitocondrias en el que la oxidación está acoplada con la fosforilación de ADP para formar ATP.

Los herbicidas que interfieren con el funcionamiento del sistema mitocondrial se clasifican como inhibidores del transporte de electrones, desacoplantes,

inhibidores de la transferencia de energía y desacoplantes-inhibidores. Estos últimos son considerados así porque pueden actuar como desacopladores a concentraciones relativamente bajas y como inhibidores de la fosforilación oxidativa a concentraciones más elevadas.

Parece ser que mientras los inhibidores del transporte de electrones ejercen su acción al interferir con las sustancias portadoras de electrones, los inhibidores de la transferencia de energía bloquean la energía al combinarse con sustancias intermedias de la cadena de acoplamiento de energía.

Los compuestos que desacoplan la fosforilación oxidativa impiden por lo tanto la formación de alta energía (ATP) en la planta. Como resultado de lo anterior se altera el funcionamiento de la membrana plasmática y se produce la pérdida del contenido de las células.¹⁹

c) Interacciones con la membrana.

Los herbicidas afectan la función y la estructura de la membrana, de un modo directo o indirecto. Cuando penetran las membranas, pueden influenciar directamente los procesos de transporte, interactuando con los componentes proteínicos, como las ATPasas, y alteran la permeabilidad a través de interacciones fisicoquímicas o pueden hacerlo indirectamente modulando el abastecimiento de ATP requerido para energizar la membrana.

La interferencia o supresión de la producción de energía, por parte de los cloroplastos, de las mitocondrias o por la glicólisis, puede modular el transporte de materiales a través de las membranas, afectar la integridad de las membranas y alterar las actividades regulatorias y biosintéticas. Las

interferencias con algunas etapas de las rutas biosintéticas asociadas con la síntesis de DNA, RNA, proteínas o lípidos podría reflejarse en la composición de las membranas de las células que se forman después del tratamiento con los herbicidas.³⁰

3.6) Generalidades sobre la especie *Spodoptera frugiperda*

La especie *S. frugiperda* es un insecto que está ampliamente distribuido por América, ya que se encuentra en Canadá, Estados Unidos, México, América Central, El Caribe y Sudamérica. A este insecto se le conoce principalmente como plaga del maíz, aunque también se alimenta de arroz, sorgo, algodón, alfalfa, trébol, cacahuate, tabaco y muchas hortalizas.^{4,17} Daña principalmente a las plantas jóvenes y a las plantas mayores las retrasa seriamente, las flores y las mazorcas sufren daño, los tallos aparecen o minados a nivel del suelo.⁴

3.6.1) Ciclo de vida de la especie *Spodoptera frugiperda*.

Las palomillas de *S. frugiperda* depositan sus huevos en grupos de hasta 300 en cualquier superficie de la hoja. En 3 a 5 días hacen eclosión y pasan a la etapa de larvas que dura de 14 a 21 días, pasan por 5 a 6 estadios dependiendo de la temperatura y el tipo de alimento, la longitud que alcanzan las larvas cuando están maduras es de 35 a 40 mm. En la etapa de pupa las larvas penetran en el suelo y se transforman en pupas (empupar) pasando de 9 a 13 días, después de los cuales las palomillas adultas emergen con una envergadura de 32 a 38 mm.⁴ Como se puede ver en la figura 4.

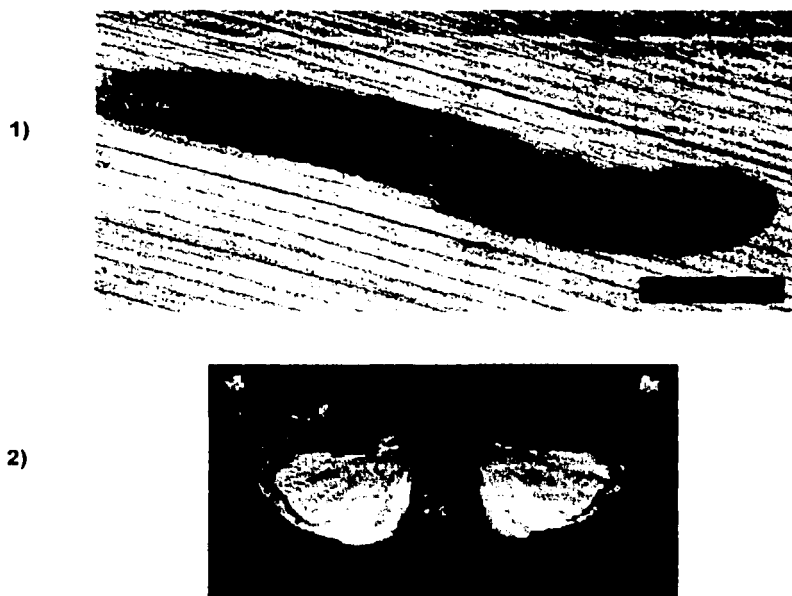


Figura 4. Imágenes de la especie *Spodoptera frugiperda* 1) larva adulta;
2) palomilla.

PARTE
EXPERIMENTAL

IV. Parte Experimental

4.1) Estudio fitoquímico de *Cedrela dugesii*.

4.1.1) Recolección del material vegetal.

La madera de *Cedrela dugesii* se recolectó en Morelia, estado de Michoacán, en el mes de Febrero de 1997, por M. T. Germán y P. Tenorio. Las muestras de referencia se encuentran depositadas en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM (Voucher M.T.G. y P.T. N° 2.174. N° de registro: 800.193).

4.1.2) Preparación y fraccionamiento del extracto orgánico.

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se fragmentó a tamaño de aserrín.

La madera molida de *Cedrela dugesii* (1.1 kg) se maceró con diclorometano (volumen total 40 L). El extracto resultante se concentró a presión reducida obteniéndose 55.4 g.

El extracto total se adsorbió en sílica gel 70/230 y se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna abierta empacada con sílica gel 60/254 (Merck) y utilizando como sistema de elución: hexano, hexano-acetato de etilo (en diferentes proporciones) y acetato de etilo. Se recolectaron 404 fracciones de 500 mL cada una. Cada fracción fue examinada por cromatografía en capa fina, empleando placas de aluminio con un espesor de 0.25 mm (sílica gel 60 F₂₅₄), combinándose todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este procedimiento generó un total de 35 grupos de fracciones.

4.1.3) Aislamiento y purificación de los compuestos de las fracciones obtenidas.

De las fracciones 203-215, eluidas con Hex:AcOEt 1:1, cristalizaron de manera espontánea 520 mg de un sólido en forma de polvo color blanco con punto de fusión de 285°C, el cual fue caracterizado como fotogedunina por comparación con una muestra auténtica obtenida de *Cedrelela oaxacensis*.²⁷

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la fotogedunina son las siguientes:

PF: 285°C

PM: 514.54

Formula: C₂₈H₃₄O₉

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3421 (OH), 1755 (C=O de lactona de 5 miembros α,β no saturada), 1707 (C=O de acetato y lactona de 6 miembros), 1655 (C=O de acetona de anillo de 6 miembros α,β no saturada y α,α disustituida).

EMIE m/z (intensidad rel.): 516 [M+2] (0.01), 515 [M+1] (0.04), 514 [M⁺] (11) (C₂₈H₃₄O₉), 454 [M⁺-AcOH] (13), 436 [M⁺-AcOH-H₂O] (6), 313 (17) (C₂₀H₂₇O₃), 299 (12) (C₂₀H₂₇O₂).

RMN-¹H (CDCl₃, ppm, 200 MHz): δ 0.93 (s, 3H, H-28), 0.94 (s, 3H, H-29), 1.03 (s, 3H, H-30), 1.10 (s, 3H, H-19), 1.12 (s, 3H, H-18), 1.97 (s, 3H, H-32), 2.01 (dd, J=12.6, 3.0 Hz, 1H, H-5), 3.37 (s, 1H, H-15), 2.00-1.75 (m, H-6 y H-6'), 4.41 (t,

J=3.0 Hz, 1H, H-7), 5.42 (s a 1H, H-17), 5.74 (d, J=10.2 Hz, 1H, H-2), 6.07 (s a 1H, H-23), 6.99 (d, J=10.2 Hz, 1H, H-1), 7.12 (s a, 1H, H-22).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 203.12 (s, C-3), 97.52 y 96.93 (C-23), 169.07 (c, C-31), 166.27 (s, C-16), 156.50 (d, C-1), 170.00 (C-21), 132.11 (s, C-20), 125.22 (d, C-2), 150.99 y 150.12 (d, C-22), 75.25 y 75.46 (d, C-17), 72.54 (d, C-7), 69.03 (s, C-14), 56.03 (s, C-15), 45.36 (d, C-5), 43.36 (s, C-4), 41.97 (s, C-8), 39.45 (s, C-10), 38.74 (s, C-9), 38.74 (d, C-13), 26.54 (c, C-28), 24.66 (t, C-12), 22.59 (t, C-6), 20.48 (c, C-32), 20.63 (c, C-29), 19.19 (c, C-19), 16.48 y 16.60 (c, C-18), 17.71 (c, C-30), 14.20 (t, C-11).

De las fracciones 352-375, eluidas con Hex:AcOEt 1:1, cristalizaron de manera espontánea 720 mg de un sólido cristalino incoloro, con un punto de fusión de 280°C, el cual fue caracterizado como cedrelanólida por comparación con una muestra auténtica obtenida de *Cedrela salvadorensis*.³⁴

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la cedrelanólida son las siguientes:

PF: 280°C

PM: 600.63

Formula: C₃₂H₄₀O₁₁

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 1790, 1747, 1727, 1701, 1502, 1458, 1370, 1183, 1162, 1088, 1028, 990, 874.

EMIE m/z (Intensidad rel.): 541 (M⁺-59, 1), 511 (1.4), 455 (25), 431 (20), 370 (50), 137 (100), 95 (41), 57 (37).

HRFABMS m/z: 601.2626 [$M^+ + 1$]

RMN-¹H (CDCl₃, ppm, 300 MHz): δ 0.83 (s, 3H, H-18), 1.15 (s, 3H, H-29), 1.18 (t, 3H, H-3''), 1.27 (s, 3H, H-28), 1.28 (s, 3H, H-19), 2.08 (s, 3H, H-2'), 2.91 (s, a, 1H, H-5), 3.99 (d, J=13.2 Hz, 1H, H-15), 4.60 (s, a, 1H, H-6), 5.51 (s, a, 1H, H-17), 6.24 (d, d, J=1.8, 0.9 Hz, 1H, H-22), 7.33 (s, a, 1H, H-23), 7.36 (t, J=1.8 Hz, 1H, H-21), 10.38 (s, 1H, H-30).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 212.18 (s, C-1), 204.92 (s, C-1''), 196.53 (d, C-30), 172.73 (s, C-7), 170.51 (s, C-16), 168.73 (s, C-1'), 142.81 (d, C-23), 140.78 (d, C-21), 121.65 (s, C-20), 109.53 (d, C-22), 88.50 (s, C-8), 82.78 (d, C-3), 77.55 (d, C-6), 73.74 (d, C-17), 61.99 (d, C-14), 54.52 (d, C-5), 54.05 (s, C-4), 52.36 (c, OMe), 52.33 (d, C-9), 51.29 (d, C-15), 45.38 (t, C-2), 42.43 (s, C-10), 39.39 (s, C-13), 38.71 (t, C-2''), 37.45 (t, C-12), 25.98 (c, C-29), 23.18 (t, C-11), 23.06 (c, C-18), 22.78 (c, C-19), 22.56 (c, C-28), 21.12 (c, C-2'), 7.25 (c, C-3'').

Los puntos de fusión se obtuvieron en un aparato Fisher-Jones y no han sido corregidos.

Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro IR Perkin-Elmer 283-B.

Los espectros de masas de impacto electrónico se obtuvieron en un equipo JEOL JMS-SX102A (70eV).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C), se registraron en un espectrofotómetro Varian VXR-300s o en un espectrofotómetro Varian-Gemini 200.

4.2) Pruebas biológicas.

Las pruebas biológicas que se realizaron a los compuestos aislados de *Cedrela dugesii* son pruebas para determinar la actividad herbicida y la actividad insecticida, siguiendo la metodología que se describe a continuación.

4.2.1) Determinación de la actividad herbicida.

El efecto de los compuestos obtenidos sobre la germinación se evaluó mediante el método de la caja Petri, utilizando semillas de *Physalis ixocarpa* (tomate), *Trifolium pratense* (trébol), *Echinochloa crusgalli* (maleza) y *Lolium multiflorum* (maleza), como especies de prueba.

Los ensayos se llevaron a cabo colocando en cada caja de Petri un disco de papel filtro de 10 cm de diámetro (Whatman del # 1) humedeciendo con agua destilada. A continuación las cajas se esterilizaron en un autoclave a presión de 18 kg/m², durante 15 minutos.³⁸

Las semillas fueron seleccionadas procurando uniformidad en el tamaño y descartando las que se encontraron dañadas. Las semillas utilizadas se desinfectaron sumergiéndolas durante 10 minutos en una disolución de hipoclorito de sodio al 5% y enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril.²¹

Las muestras problema se prepararon disolviendo los compuestos en metanol y se prepararon disoluciones metanólicas de concentraciones finales de 50, 100, 200 y 300 µg/mL, en el caso de la fotogedunina, y de 40, 80, 120 y 160 µg/mL para la cedrelanólida. Posteriormente, se dejó evaporar el metanol

y se agregaron 8 mL de agua destilada estéril para obtener las concentraciones antes mencionadas. A continuación se colocaron las semillas en las cajas de Petri, en las cantidades indicadas en la tabla 3 y se sellaron las cajas con papel parafilm par proporcionar una aeración adecuada y evitar la evaporación de agua. Esto se realizó en una campana de flujo laminar para evitar contaminación. Los ensayos se realizaron por triplicado. Simultáneamente, se prepararon controles, para los controles positivos se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético a una concentración final de 10 µg/mL y para los negativos simplemente contenían el mismo tipo de disolvente y en ambos casos contenían el mismo número de semillas y el mismo volumen de agua. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el empleo del programa estadístico SAS ANOVA y GLM (SAS institute, 1982).

Tabla 3. Número de semillas usadas en la germinación para cada compuesto:

1. Fotogedunina

Semilla	Cantidad
<i>Physalis ixocarpa</i>	50
<i>Trifolium pratense</i>	50
<i>Lolium multiflorum</i>	50

2. Cedrelanólida

Semilla	Cantidad
<i>Physalis ixocarpa</i>	50
<i>Trifolium pratense</i>	50
<i>Echinochloa crusgalli</i>	50

Por último, las cajas de Petri se colocaron en una incubadora a 28°C en completa oscuridad durante 5-6 días y transcurrido este tiempo, se procedió a medir la longitud del tallo y de la raíz y se contó el número de semillas que germinaron. Con estos datos se calculó el porcentaje de germinación, y se determino el efecto de los compuestos aislados sobre el crecimiento de la raíz y del tallo de las semillas.

4.2.2) Determinación actividad insecticida.

Los compuestos aislados fueron evaluados para determinar su actividad insecticida contra larvas del insecto *Spodoptera frugiperda*, conocido comúnmente con los nombres de gusano cogollero, pelón, palomilla de maíz, gusano vainero⁴ y falso gusano soldado.¹⁷

Además, por todo lo citado anteriormente en los antecedentes, el insecto adquiere gran importancia como plaga y de ahí su elección como insecto de prueba, para poder determinar la actividad insecticida de los compuestos aislados en éste estudio.

Las larvas usadas para los experimentos se obtuvieron de un cultivo del Centro de Investigación en Biotecnología en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

Los ensayos se realizaron utilizando cajas de polipropileno que contenían 24 celdillas individuales con dieta fresca. En cada celdilla se colocó la concentración correspondiente de cada compuesto dejando evaporar el disolvente en una campana. Las concentraciones de la fotogedunina fueron de 5, 10, 19.2, 25, 38.4 y 52 ppm y de 5, 25, 52 y 70 ppm para la cedrelanólida. Los controles contenían solo el disolvente usado y se dejó evaporar. Posteriormente se escogieron las larvas y se transfirieron a las celdillas, una larva por celdilla, las cajas se taparon y se incubaron. Después de 6 días las larvas supervivientes se transfirieron a viales separados que contenían dieta fresca y se continuó la incubación. Las larvas fueron transferidas a viales con dieta fresca cada 7 días. Se registro el peso y la longitud de las larvas, el séptimo y el último día antes de que

se transformaran en pupas (aproximadamente después de 23 días que es el tiempo que dura la etapa larvaria).⁴ Otras mediciones que se registraron del ciclo de vida fueron: mortalidad de las larvas, tiempo de pupa, supervivencia de pupas y emergencia de los adultos.

Todas las pruebas se realizaron en una cámara de ambiente controlada con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de obscuridad, con temperatura de 25°C de día y 19°C de noche y una humedad relativa de 80% ± 5%. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el empleo del programa estadístico SAS ANOVA y GLM (SAS institute, 1982).

RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN

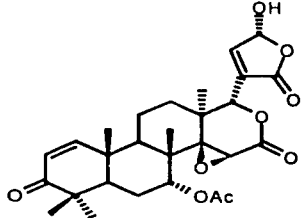
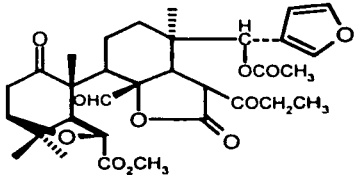
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1) Caracterización de los compuestos aislados.

5.1.1) Metabolitos aislados de *Cedrela dugesii*.

Al realizar el fraccionamiento del extracto de diclorometano de la especie *Cedrela dugesii*, se logró el aislamiento de dos metabolitos secundarios: la fotogedunina y la cedrelanólida como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Metabolitos secundarios aislados de *Cedrela dugesii*.

ESPECIE	COMPUESTO
<i>Cedrela dugesii</i>	 <p style="text-align: center;"><u>fotogedunina</u></p>
<i>Cedrela dugesii</i>	 <p style="text-align: center;"><u>cedrelanólida</u></p>

5.1.2) Caracterización de la fotogedunina.

De las fracciones 203 a la 215 se aisló un sólido en forma de polvo color blanco, el cual fue identificado como la fotogedunina. Este compuesto fue caracterizado por comparación con una muestra auténtica obtenida de *Cedrelela oaxacensis*, además de la comparación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas (espectros 1, 2, 3, 3b y 4).

5.1.3) Caracterización de la cedrelanólida.

De las fracciones 352 a la 375 se aisló un sólido en forma de cristales incoloros, el cual fue identificado como la cedrelanólida. Este compuesto fue caracterizado por comparación con una muestra auténtica obtenida de *Cedrelela salvadorensis*, además de la comparación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas (espectros 5, 6, 7, 7b y 8).

5.2) Actividad biológica de los compuestos aislados de *Cedrelela dugesii*.

Los ensayos biológicos que se realizaron a los compuestos aislados para determinar la actividad herbicida fueron, la determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación y sobre el crecimiento radicular y del tallo en semillas y para determinar la actividad insecticida se hizo el bioensayo con *Spodoptera frugiperda*.

5.2.1) Determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la germinación de las semillas de prueba.

Con el objetivo de determinar la posible actividad herbicida de los compuestos aislados de *C. dugesii* se evaluó su actividad sobre el proceso de germinación de diferentes tipos de semillas para cada compuesto como se muestra en la tabla 5. Se calculó el porcentaje de germinación 6 días después de la imbibición aproximadamente, tomando los valores del control negativo como el 100% de germinación.

Tabla 5. Clasificación de las semillas usadas en la germinación:

1. Fotogedunina		2. Cedrelanólida	
Semilla	Clasificación	Semilla	Clasificación
<i>Physalis ixocarpa</i>	Dicotiledónea	<i>Physalis ixocarpa</i>	Dicotiledónea
<i>Trifolium pratense</i>	Dicotiledónea	<i>Trifolium pratense</i>	Dicotiledónea
<i>Lolium multiflorum</i>	Monocotiledónea	<i>Echinochloa crusgalli</i>	Monocotiledónea

La figura 5 muestra los resultados obtenidos para la fotogedunina y como puede observarse, este compuesto tuvo un efecto inhibitorio importante sobre la germinación de las semillas de prueba, presentando un efecto mayor sobre las semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*) y de la maleza (*Lolium multiflorum*), con un 64 y 65 % de inhibición, respectivamente, a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, el trébol (*Trifolium pratense*) sufrió un 30% de inhibición a la misma concentración. En todas las especies se observó que al aumentar la concentración del compuesto de prueba, aumenta la inhibición, por lo que el efecto inhibitorio es dependiente de la concentración.

1)

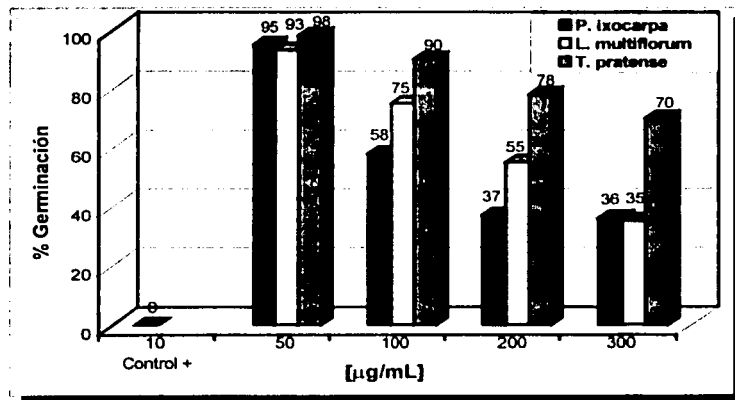


Figura 5. Efecto de la fotogedunina sobre la germinación de las semillas de prueba, ■ tomate; □ maleza; ▣ trébol; además del ■ control + que obtuvo 100% de inhibición para todas las semillas.

Por otro lado, en la figura 6 se muestran los resultados de la cedrelanólida, en este caso se observó que no presentó el mismo efecto que la fotogedunina, puesto que no inhibió de manera importante la germinación. Por ejemplo, el tomate (*P. ixocarpa*) tiene un 8% de inhibición a una concentración de 120 µg/mL, la maleza (*E. crusgalli*) presentó un 9.1% de inhibición y el trébol (*T. pratense*) tuvo un 9.3% de inhibición, ambas a una concentración de 40 µg/mL. Comparando los efectos de estos dos compuestos se puede notar que la fotogedunina es el compuesto que afectó de manera importante la germinación de las semillas de prueba.

2)

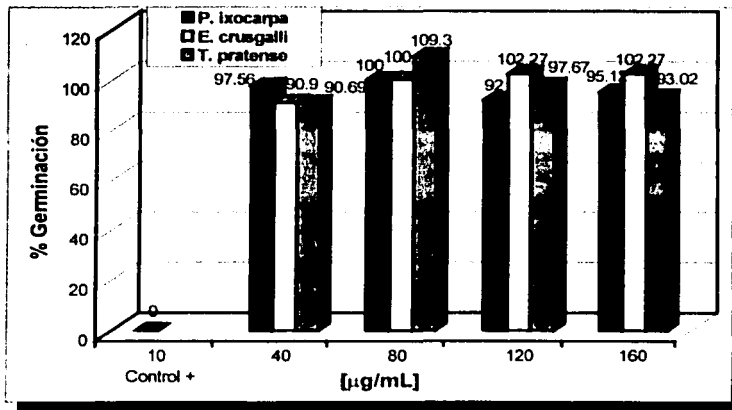


Figura 6. Efecto de la cedrelanólida sobre la germinación de las semillas de prueba, ■ tomate; □ maleza; ▣ trébol; además del ■ control + que obtuvo 100% de inhibición para todas las semillas.

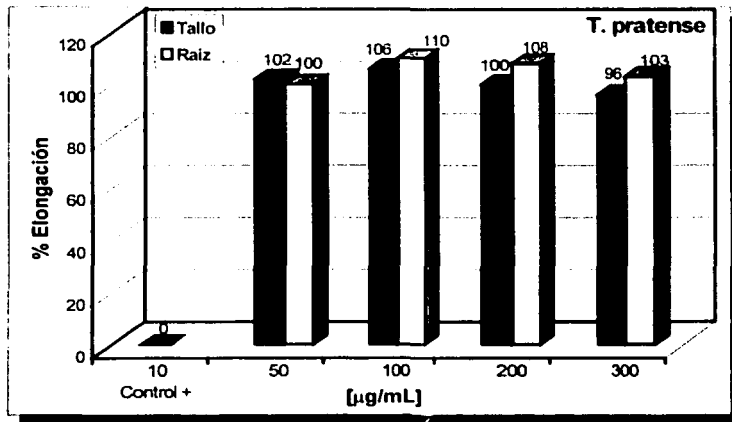
5.2.2) Determinación del efecto de los compuestos aislados sobre el crecimiento de la radícula y del tallo de las semillas de prueba.

Otra evaluación hecha durante el bioensayo de germinación fue la medición de la longitud de la raíz y del tallo después de 5-6 días de incubación a 28°C en completa obscuridad. Se tomaron los valores del control como el 100% de elongación.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos para la fotogedunina. Como puede observarse este compuesto no afectó el crecimiento radicular del trébol (*T. pratense*), pues se aprecia en todas las concentraciones un ligero

aumento en crecimiento tanto del tallo como de la raíz, alcanzando un aumento del 6 y del 10%, respectivamente, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, el tomate (*P. ixocarpa*) no vio afectado su crecimiento a bajas concentraciones, pero al incrementarse se presentó una inhibición importante del crecimiento del tallo en 51% de inhibición; sin embargo la raíz no sufrió inhibición, sino un ligero aumento en el crecimiento del 10%, todo esto a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. Por último, con la maleza (*L. multiflorum*) fue en donde se presentó una inhibición importante y se observó que la inhibición es mayor al aumentar la concentración, el tallo sufrió inhibición de su crecimiento en 80% y en la raíz se alcanzó 76% de inhibición, en ambos casos la concentración fue de 300 $\mu\text{g/mL}$. Se puede notar que la fotogedunina en esta fase no afecta al trébol, afecta parcialmente al tomate (afectando solo al tallo) y afecta totalmente a la maleza (afectando tallo y raíz).

3)



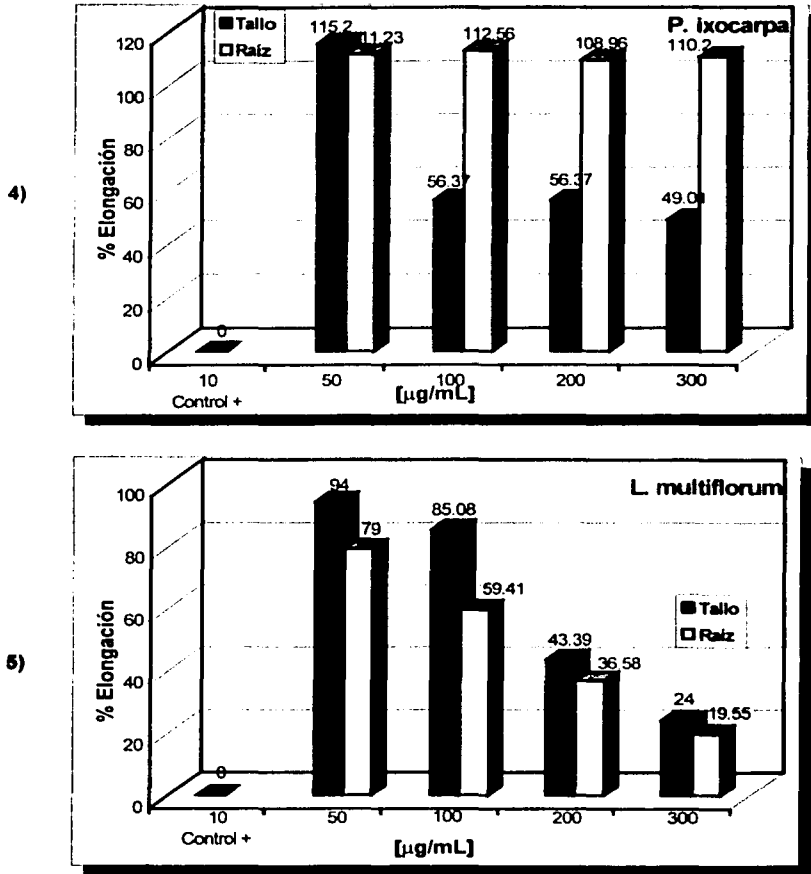
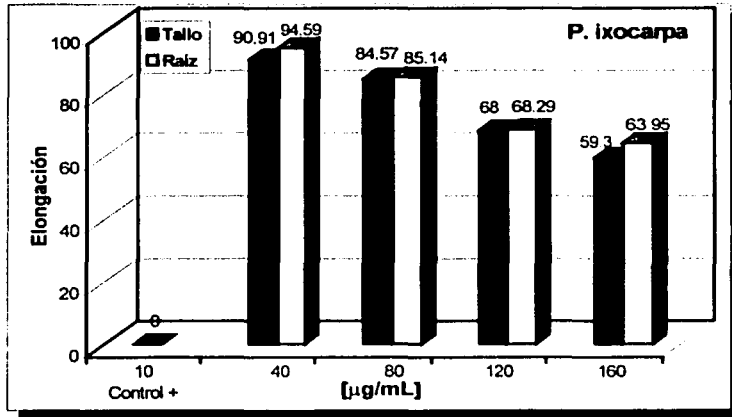


Figura 7. Efecto de la fotogedunina sobre el crecimiento del tallo y de la raíz de las semillas de prueba. 3) trébol; 4) tomate; 5) maleza.

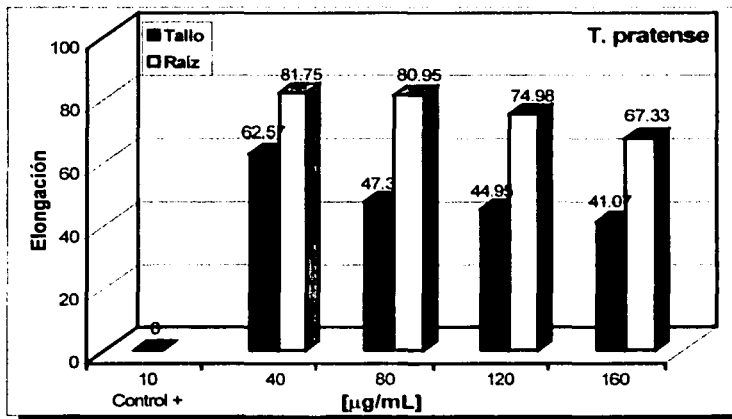
En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos para la cedrelanólida, y como se aprecia este compuesto tuvo un efecto inhibitorio importante en dos especies de las semillas de prueba, pues se demostró que al aumentar la concentración aumenta la inhibición. Una de estas semillas fue la del tomate (*P. ixocarpa*), ya que sufrió inhibición del crecimiento del tallo del 41% y en el crecimiento de la raíz la inhibición fue de 36%, en ambos casos la concentración de los compuestos fue de 160 $\mu\text{g/mL}$. Otra semilla en donde se observó un efecto fue en la del trébol (*T. pratense*), ya que la inhibición del crecimiento del tallo fue de 59% y la inhibición del crecimiento de la raíz fue de 33%, en ambos casos la concentración fue de 160 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a las semillas de la maleza (*E. crusgalli*) se presentó una inhibición, pero no tan marcada como en el caso de las otras dos semillas, pues el crecimiento del tallo se inhibió en un 12%, mientras que la inhibición del crecimiento de la raíz fue más evidente con un 26% de inhibición; en ambos casos la concentración fue de 120 $\mu\text{g/mL}$. Se puede señalar que el cedrelanólida en esta fase afecta a las tres semillas de prueba, este efecto se aprecia más evidentemente en las semillas de tomate y trébol.

Comparando los efectos de los dos compuestos en el alargamiento o elongación del tallo y la raíz podemos apreciar que tanto la fotogedunina como el cedrelanólida afectan la elongación, pero solo el cedrelanólida afecta a los tres tipos de semillas de prueba. Por su parte la fotogedunina solo afecta a dos tipos de semilla de prueba, afecta parcialmente al tomate y totalmente a la maleza.

6)



7)



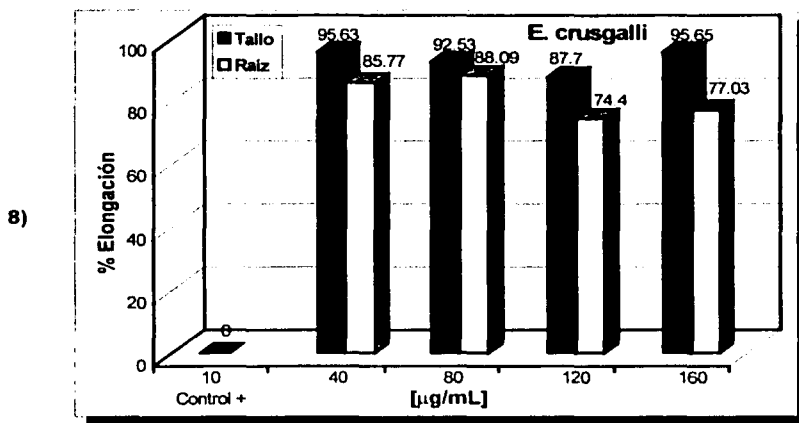


Figura 8. Efecto de la cedrelanólida sobre el crecimiento del tallo y de la raíz de las semillas de prueba. 6) tomate; 7) trébol; 8) maleza.

5.2.3) Bioensayo con *Spodoptera frugiperda*.

En el bioensayo con *S. frugiperda* se registraron varias mediciones durante el ciclo de vida del insecto (larva, pupa y adulto). Las primeras mediciones se realizaron después de 7 días de incubación, como se muestra en la tabla 6.

Se observó que en la etapa larvaria los compuestos probados inhibieron el crecimiento en comparación con el control. En el caso de la fotogedunina las máximas inhibiciones en el peso y en la longitud promedio fueron del 97 y 63%, respectivamente, cuando se incorporó a la dieta en una concentración de 38.4

ppm. Para la concentración de 52.0 ppm no se registró el peso ni la longitud porque hubo 100% de mortalidad.

Tabla 6. Actividad de la fotogedunina y la cedrelanólida sobre los parámetros del crecimiento larvario de *Spodoptera frugiperda* (después de 7 días de incubación).

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso promedio (%)	Longitud promedio (%)
Control	--	100	100
Fotogedunina	5.0	20.88	70.52
	10.0	18.35	105.26
	19.2	9.57	56.84
	25.0	5.11	35.78
	38.4	4.05	36.84
	52.0	---	---
Cedrelanólida	5.0	36.88	126.31
	25.0	27.54	100.00
	52.0	20.39	73.68
	70.0	12.05	53.68

En relación con la cedrelanólida, esta presentó la máxima inhibición sobre el crecimiento cuando se incorporó a la dieta a una concentración de 70 ppm, inhibiendo el peso y la longitud promedio en un 88 y 46%, respectivamente.

Por otro lado, tanto la fotogedunina como el cedrelanólida indujeron mortalidad larvaria; en el caso de la fotogedunina el efecto fue más evidente, pues se produjo mortalidad larvaria del 100% cuando el compuesto se encuentra en una concentración de 52 ppm. Por otro lado, la cedrelanólida mostró un efecto menos drástico, causando una mortalidad larvaria del 38% cuando el compuesto se adicionó en una concentración de 70 ppm, como se muestra en la figura 9.

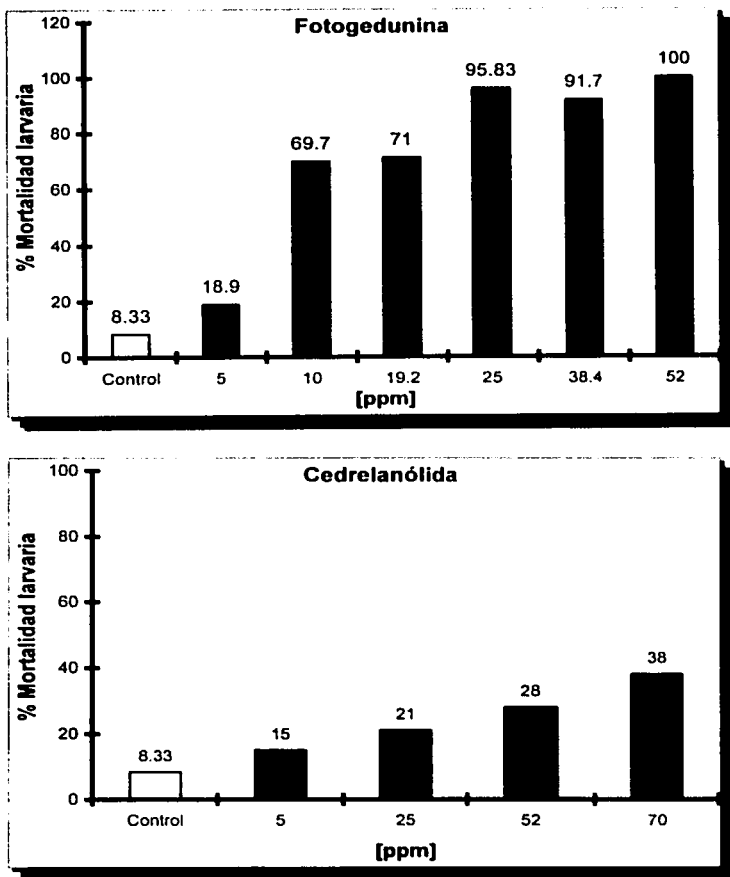


Figura 9. Actividad de la fotogedunina y la cedrelanólida en la mortalidad larvaria (después de 7 días de incubación).

Posteriormente, a los 23 días aproximadamente se realizaron otras mediciones que se presentan en la tabla 7. Se observó que los compuestos continuaron inhibiendo el crecimiento de las larvas con respecto al control, dicha inhibición fue mayor que la presentada a los 7 días. La fotogedunina presentó inhibiciones de peso y de longitud promedio de 99.61 y 88%, respectivamente, cuando la fotogedunina se encuentra a una concentración de 25 ppm. A este tiempo para la concentración de 38.4 ppm se presentó 100% de mortalidad por lo cual no se registraron los datos de peso ni de longitud.

En el caso de la cedrelanólida, los % de inhibición que produjo en cuanto al peso y longitud promedio fueron de 91.66 y 81%, respectivamente, a una concentración de 52 ppm. En la concentración de 70 ppm no se registraron los datos de peso ni de longitud por tener 100% de mortalidad.

Tabla 7. Actividad de la fotogedunina y el cedrelanólida sobre los parámetros del crecimiento larvario de *Spodoptera frugiperda* (después de 23 días de incubación).

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso promedio (%)	Longitud promedio (%)
control	--	100	100
Fotogedunina	5.0	34.01	67.50
	10.0	10.41	36.42
	19.2	0.47	12.14
	25.0	0.39	12.14
	38.2	---	---
Cedrelanólida	5.0	11.86	31.07
	25.0	8.86	23.92
	52.0	8.54	18.92

Una vez que las larvas se transformaron en pupas se registraron otras mediciones que se muestran en la tabla 8. De estos resultados se desprende que el tiempo de formación de pupas no se vio retrasado, pues varía un día aproximadamente con respecto al control con cualquiera de los dos compuestos.

Tabla 8. Actividad de la fotogedunina y el cedrelanólida sobre los parámetros de formación de pupas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Tiempo promedio de formación de pupas (días)	Supervivencia de pupas (%)
Control	--	22.0	87.5
Fotogedunina	5.0	21.5	66.7
	10.0	22.0	20.8
	19.2	23.0	17.6
Cedrelanólida	5.0	22.0	79.2
	25.0	21.5	66.7
	52.0	22.5	62.5

En cuanto al porcentaje de supervivencia de las pupas, es decir, el porcentaje de larvas que alcanzaron la etapa de pupa, este disminuyó en todas las concentraciones probadas de los dos compuestos en comparación al control. El efecto más importante lo presentó la fotogedunina ya que un 18% de larvas alcanzaron la etapa de pupa, a una concentración de 19.2 ppm. En cuanto a la cedrelanólida, este compuesto presentó un efecto menos marcado ya que un 63% de larvas alcanzaron la etapa de pupa.

Finalmente en la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la etapa adulta. En este caso se registró el tiempo medio para alcanzar la edad adulta o el promedio de emergencia, el cual no se vio afectado por el cedrelanólida, ya que el tiempo es idéntico al del control. Por otra parte, la fotogedunina retrasó

levemente (2 días) el tiempo medio para alcanzar la edad adulta, esto ocurrió a una concentración de 19.2 ppm.

En cuanto al porcentaje de emergencia, es decir, el porcentaje de pupas que alcanzaron la etapa adulta (palomilla), en todas las concentraciones de la fotogedunina se presentó mortalidad adicional y como consecuencia menor supervivencia en la etapa adulta, presentándose un efecto mayor en la concentración de 19.2 ppm con un 4.17% de emergencia de adultos. Por otra parte el cedrelanólida no mostró reducciones posteriores en cuanto a la supervivencia en la etapa adulta, causando un efecto menor al de la fotogedunina.

Tabla 9. Actividad de la fotogedunina y el cedrelanólida sobre los parámetros de emergencia de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Promedio Emergencia (días)	Emergencia (%)
Control	--	33	83.3
Fotogedunina	5.0	31.0	12.5
	10.0	32.0	8.33
	19.2	35.0	4.17
Cedrelanólida	5.0	33	79.2
	25.0	33	62.5
	52.0	33	50.0

En general comparando la fotogedunina con el cedrelanólida, se puede observar que la fotogedunina es el compuesto que presentó un mayor efecto en cada una de las diferentes mediciones que se realizaron durante el ciclo de vida de la *Spodoptera frugiperda*, pues causó mayor mortalidad larvaria, redujo el

crecimiento de los insectos y redujo el porcentaje de larvas que llegaron a la etapa de pupa y a la etapa adulta. El modo de acción de estos compuestos está siendo investigado y puede deberse a la combinación de la acción inhibitoria de la alimentación y a la toxicidad postdigestiva, como se encontró para otros limonoides.¹²

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- Del estudio fitoquímico de la especie *Cedrela dugesii* se aislaron dos metabolitos secundarios, mismos que se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas como la fotogedunina y la cedrelanólida.

- Se determinó el efecto regulador del crecimiento vegetal de los limonoides aislados de *Cedrela dugesii*, encontrándose que los compuestos fotogedunina y cedrelanólido muestran actividad, inhibiendo el crecimiento vegetal de las semillas usadas.

- Se determinó la actividad inhibitoria del crecimiento sobre larvas del insecto *Spodoptera frugiperda* encontrándose que dichos compuestos mostraron actividad significativa contra el insecto.

- El presente estudio de la especie *Cedrela dugesii* muestra que el género *Cedrela* es una fuente importante de productos naturales con actividad biológica, por lo que se sugiere completar el estudio de las fracciones obtenidas de la cromatografía para conocer el contenido metabólico secundario de esta especie.

- En cuanto a la actividad herbicida e insecticida, se recomienda hacer estudios más profundos con el fin de establecer el o los mecanismos de acción tanto de la actividad herbicida como de la actividad insecticida.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

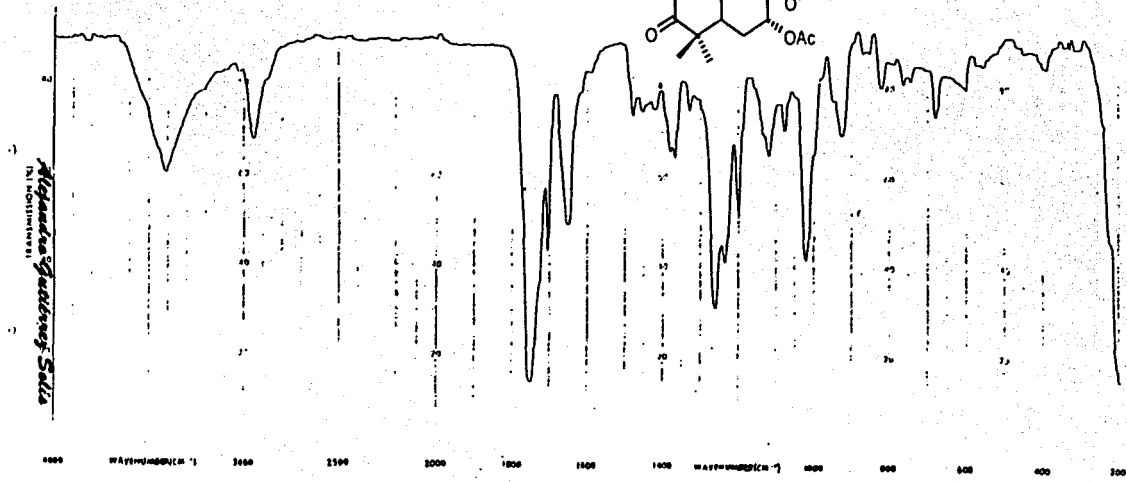
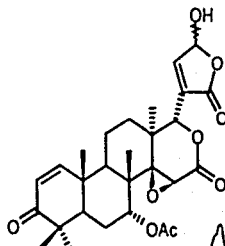
1. Adeoye, S. A. and Bekoe, C. R. (1965). "The molecular structure of *Cedrela odorata* substance B." **Chemical Communication**, **301-302**.
2. Banerji, R and Mitra, C. R. (1975). "Deoxycedrelone, a new tetranortriterpenoid from *Cedrela toona* h." **Planta Médica**, **28:52-55**.
3. Barberá, C. (1989). "Pesticidas agrícolas." Editorial Omega, 4ª edición, **Barcelona España, 365-374**.
4. Bautista, M. N., Cota, V. G., Carrillo, S. J. L. (1994). "Técnicas para cría de insectos." **Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Instituto de Fitosanidad, 49-57**.
5. Belles, X. (1988). "Insecticidas biorracionales." **Editorial Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 3-14, 355-377**.
6. Bevan, C. W., Powell, J. W. and Taylor, A. D. H. (1965). "West African timbers. X. Structure of *Cedrela odorata* substance B." **Chemical Communication**, **281-282**.
7. Bewley, J. D. and Black, M. (1994). "Seeds." **Plenum Press, 2ª edición, New York and London, 147-197**.
8. Burke, B. A., Chan, W. R., Magnus, K. E., Taylor, D. A. H. (1969). "Extractives of *Cedrela odorata*. III. Structure of photogedunin." **Tetrahedron**, **25:5007-5011**.
9. Calderón, G., Germán, M. T. (1993). "Flora del Bajío y de regiones adyacentes (*Meliaceae*)." **Instituto de ecología A. C., Centro regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México, 11:2-7**.
10. Campos, A. M., Oliveira, F. S., Machado, M. I., Braz-Filho, R., Matos, F. J. A. (1991). "Triterpenes from *Cedrela odorata*." **Phytochemistry**, **30:1225-1229**.
11. Connolly, J. D. and Handa, K. L. (1969). "Tetranortriterpenoids and related substances. XII. 6-Hydroxycarpin and a tetracyclic triterpenoid pentaol and *Cedrela glaziovii*." **Journal of Chemical Society C**, **2435-2436**.
12. Champagne, D. E., Koul, O., Isman, B. M., Scudder, G. G. E. and Towers, G. H. N. (1992). "Biological activity of limonoids from the Rutales." **Phytochemistry**, **31:377-394**.

13. Chan, W. R., Holder, N. L., Snatzke, G., Fehlhäber, H. W., Taylor, D. R. (1968). "Extractives of *Cedrela odorata*. II. The structures of *Cedrela* tetracyclic triterpenes odoratol, isoodoratol and odoratone." **Journal of Chemical Society C**, **20:2485-2489**.
14. Chan, W. R., Magnus, K. E., and Mootoo, B. S. (1967). "Extractives from *Cedrela odorata* L. The structure of methyl angolensale." **Journal of Chemical Society**, **171-177**.
15. Chan, W. R., Taylor, D. R., Aplin, R. T. (1972). "Extracts of *Cedrela odorata*. IV. Structure of odoratin, an undecanortriterpene." **Tetrahedron**, **28:431-437**.
16. Chatterjee, A., Chakraborty, T. and Chandrasekharan, S. (1971). "Chemical investigation of *Cedrela toona*." **Phytochemistry**, **10:2533-2535**.
17. Davidson, H. R., Lyon, F. W. (1992). "Plagas de insectos agrícolas y del jardín." **Editorial Limusa, México D.F.**, 176-179.
18. El-Shamy, A. M., El-Shabrawy, A. O., Solim, M. A. and Motowo, H. M. (1988). "A new tetranortriterpenoid from *Cedrela odorata*." **Fitoterapia**, **59:219-220**.
19. García, T. L. y Fernández, Q. C. (1989). "Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas." **Editorial Mundi Prensa, España**, **27-43**, **120-127**, **131-154**.
20. Germán M. T., Styles, B. T. (1978). "Revisión taxonómica del género *Cedrela* en México y Centro América." **Turrialba**, **28:261-274**.
21. Horak, J. M. and Sweat, K. J. (1994). "Germination, emergence, and seedling establishment of Buffalo gourd (*Cucurbita foetidissima*)." **Weed Science**, **42:358-363**.
22. Huang, R. C., Tadera, K., Yagi, F., Minami, Y., Okamura, H. and Nakatani, M. (1996). "Limonoids from *Melia azedarach*." **Phytochemistry**, **43:581-583**.
23. Jiménez, A., Mata, R., Pereda, R., Calderón, Isman, B. M., Nicol, R. and Arnason, J. T. (1997). "Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*." **Journal of Chemical Ecology**, **23:1225-1234**.
24. Kraus, W., Griminger, W. and Sawitzki, G. (1978). "New insect antifeedants from *Meliaceae*." **Journal of Natural Products**, **2:115-116**.

25. Lavie, D., Levy, E. C., Rosito, C., Zelnik, R. (1970). "Tetranortriterpenoids from *Cedrela angustifolia*." **Tetrahedron**, **26:219-226**.
26. Lidert, Z., Taylor, H. A. D., Thirugnanam, M. (1985). "Insect antifeedant activity of four prieurianin-type limonoids." **Journal of Natural Products**, **48:843-845**
27. López, M. R. M. (1996). "Estudio fitoquímico de corteza de *Cedrela oaxacensis*." **Trabajo de Grado, Instituto de Química, UNAM**.
28. Lotina-Hennsen, B., Albores, V. M., Garcia, Ch. L. (1989). "Herbicidas y productividad agrícola." **Rev. Soc. Quím. Méx.**, **33:109-117**.
29. Marcelle, G. B. and Mootoo, B. S. (1981). " 7α , 11β -diacetoxihidronomilina, a new tetranortriterpenoid from *Cedrela mexicana*." **Tetrahedron Letters**, **22:505-508**.
30. Moreland, D. E. (1980). "Mechanisms of action of herbicides." **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **31:597-638**.
31. Okorie, D. A. and Taylor, D. A. H. (1968). "Extractives from the seed of *Cedrela odorata*." **Phytochemistry**, **7:1683-1686**.
32. Planes, S., Carrero, J. M. (1995). "Plagas del campo." **Editorial Mundi Prensa**, **12ª edición, Barcelona, 87-107**.
33. Saxena, R. C. (1989). "Insecticides from neem." **American Chemical Society**, **chapter 9:110-128**.
34. Segura, R., Calderón, J., Toscano, R., Gutiérrez, A., Mata, R. (1994). "Cedrelanólido I, a new limonoid from *Cedrela salvadorensis*." **Tetrahedron Letters**, **35:3437-3440**.
35. Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M., Bye, R., Linares, E. (1993). "Tetranortriterpenoids of *Swietenia humilis*." **Journal of Natural Products**, **56:1567-1574**.
36. Stark, J. D., Walter, J. F. (1995). "Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides." **J. Agric. Food Chem.**, **43:507-512**.
37. Veitch, N. C., Wright, G. A. and Stevenson, P. C. (1999). "Four new tetranortriterpenoids from *Cedrela odorata* associated with leaf rejection by *Exophthalmus jekelianus*." **Journal of Natural Products**, **62:1260-1263**.

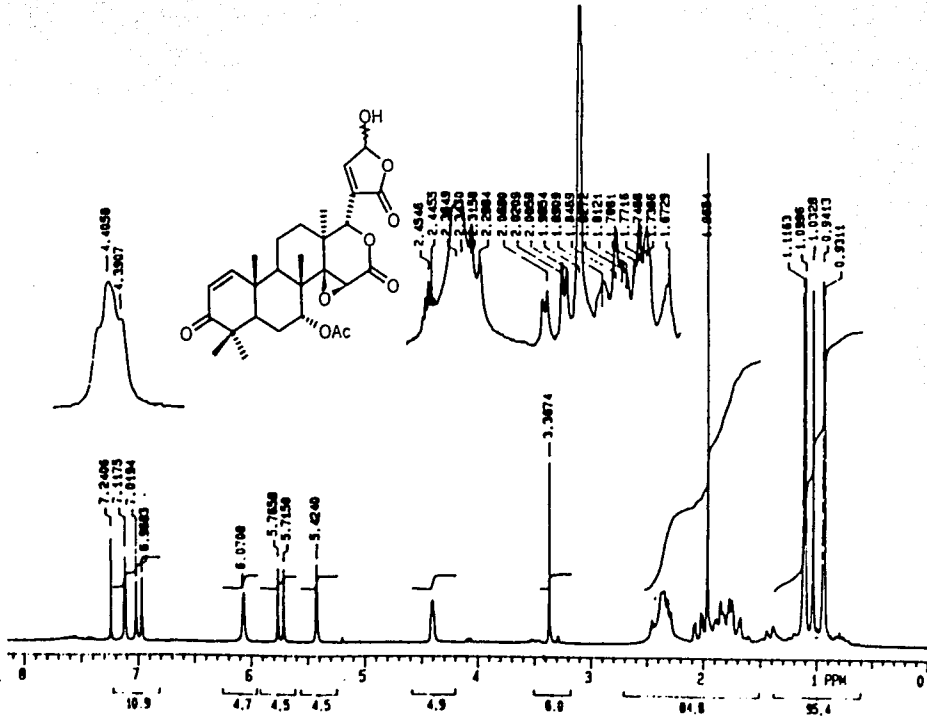
38. Wilen, W. R., Ewan, E. B. and Gusta, V. L. (1994). "Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance." *Canadian Journal Bot.*, **72:1009-1017**.
39. Zeinik, R. and Rosito, C. M. (1966). "Fissinolide." *Tetrahedron Letters*, **1:6441-6444**.

ESPECTROS



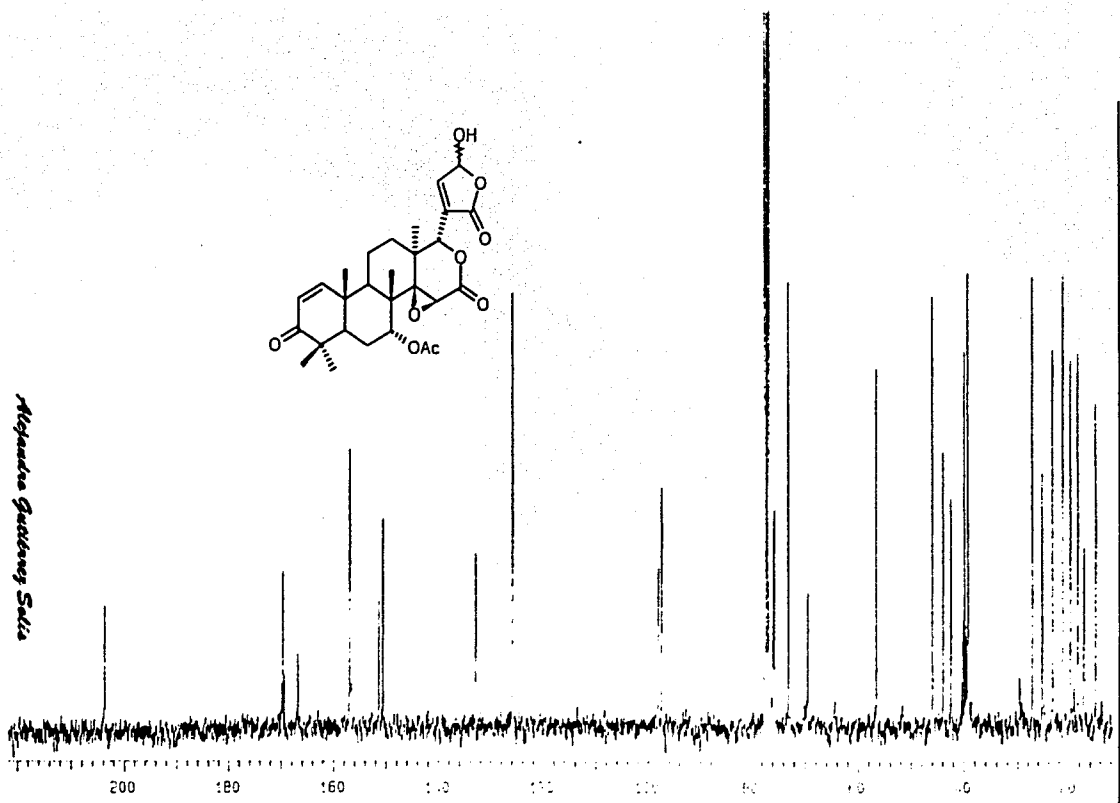
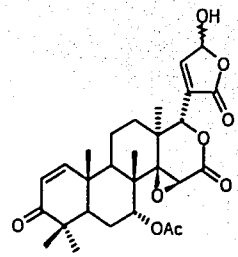
Atlanthera spathulifera Solms
N. 1001111111

ESPECTRO 1



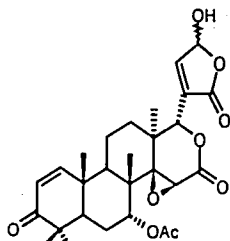
ESPECTRO 2

Alphacalcidol

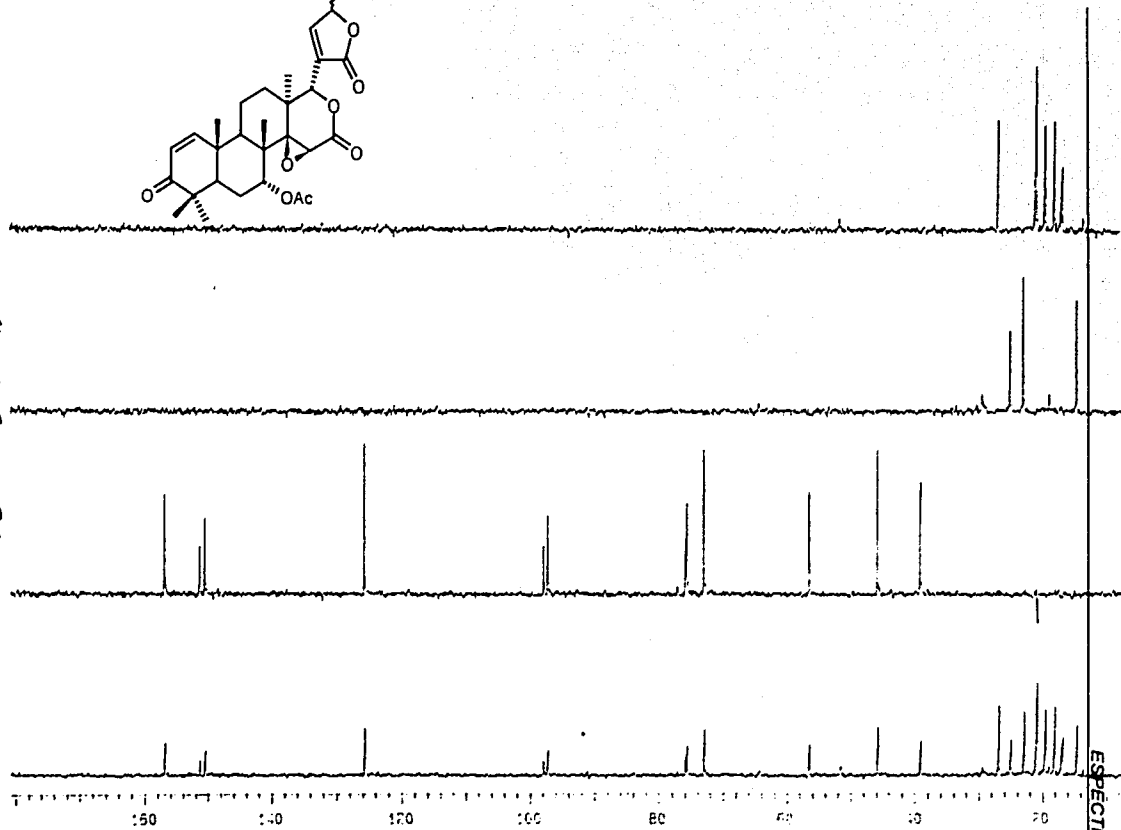


ESPECTROS

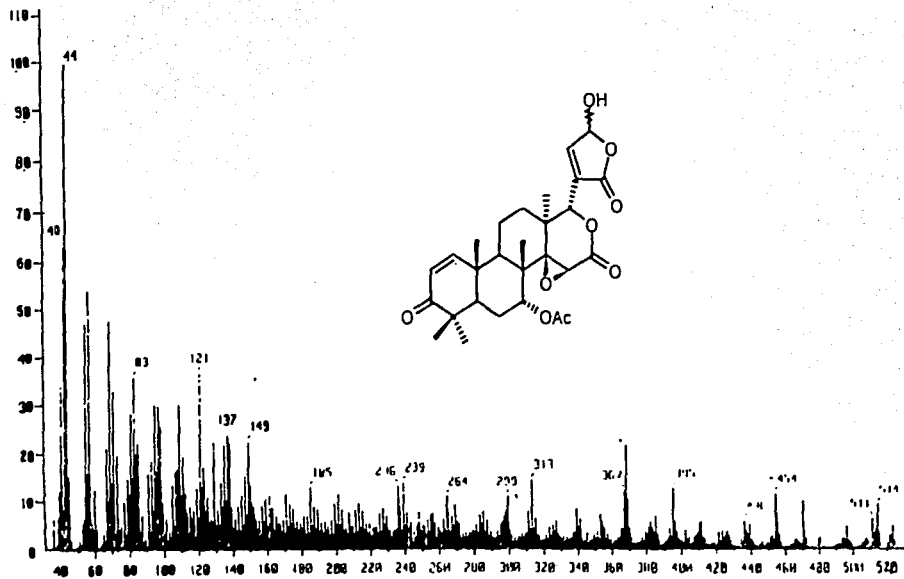
ESPECTRO 3

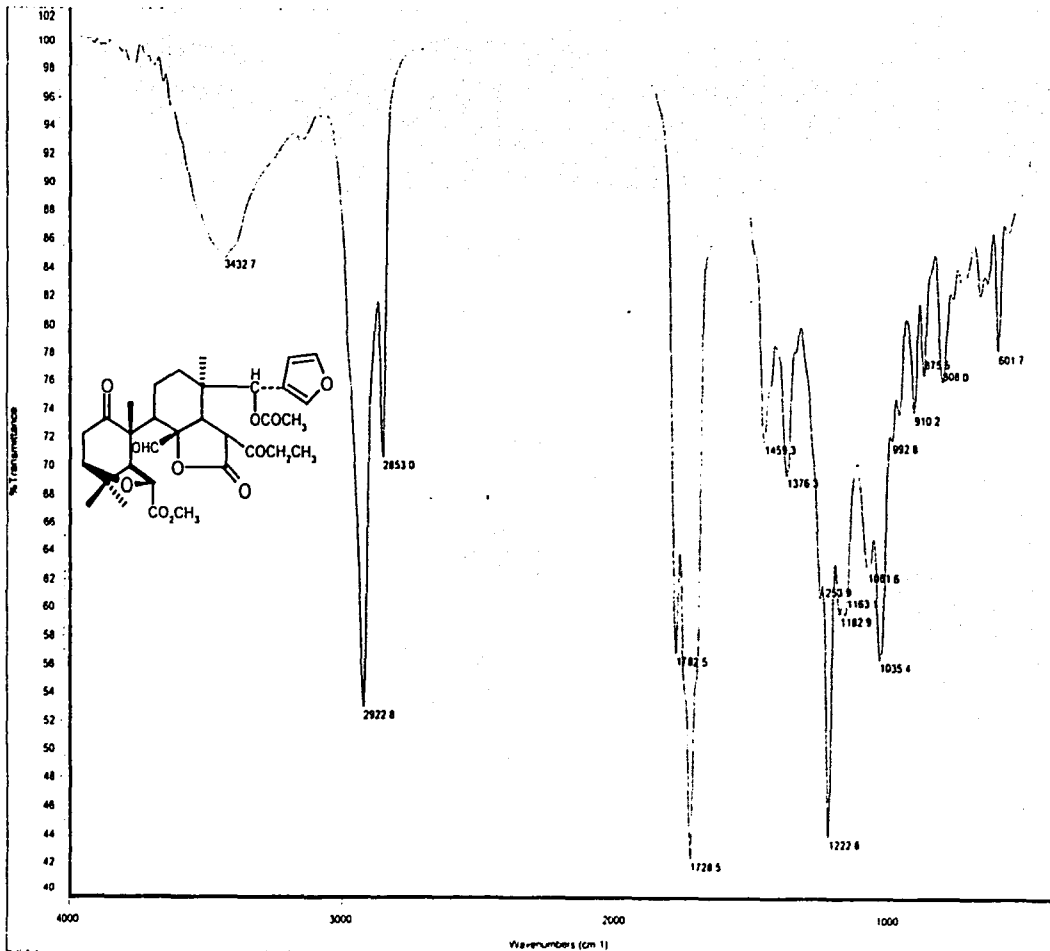


Micandaria Gussonei Salka

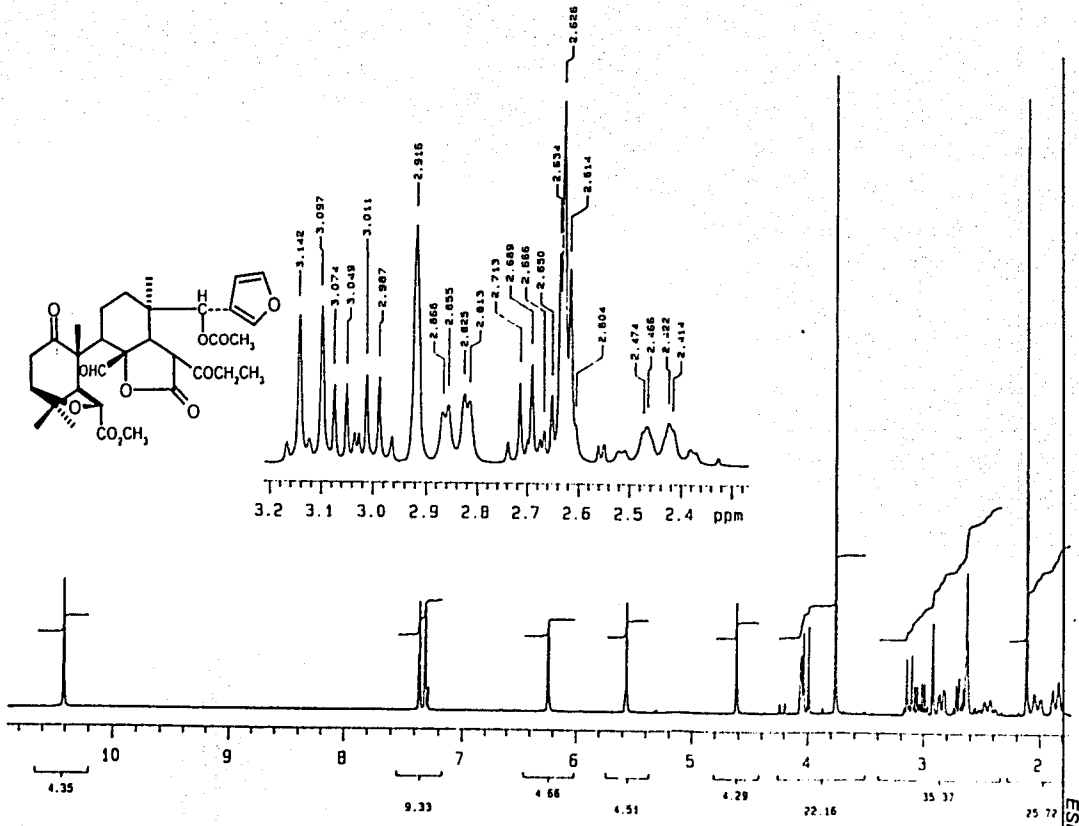


Micandina guianensis Solms





ESPECTRO 5

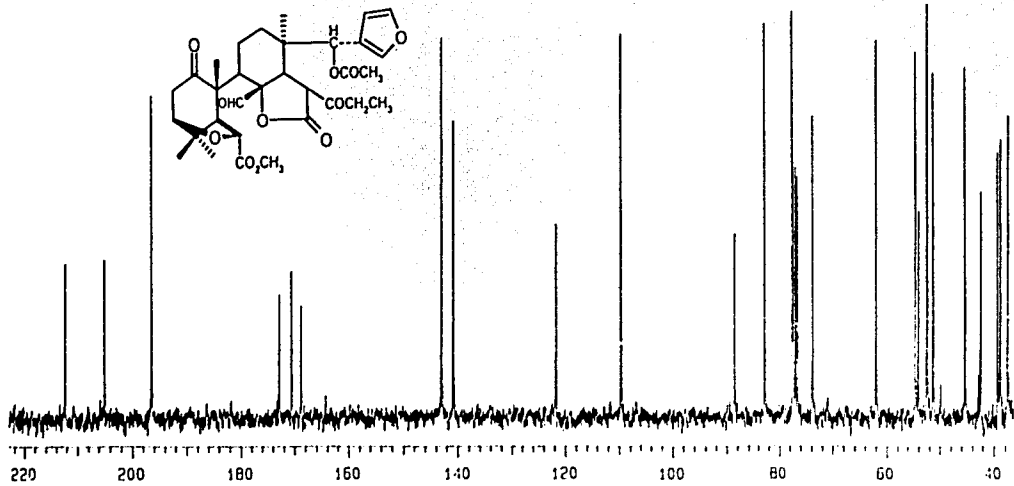


ESPECTRO 6

SECRET
DE LA FIBROTECA

Micodermis guianensis Sells

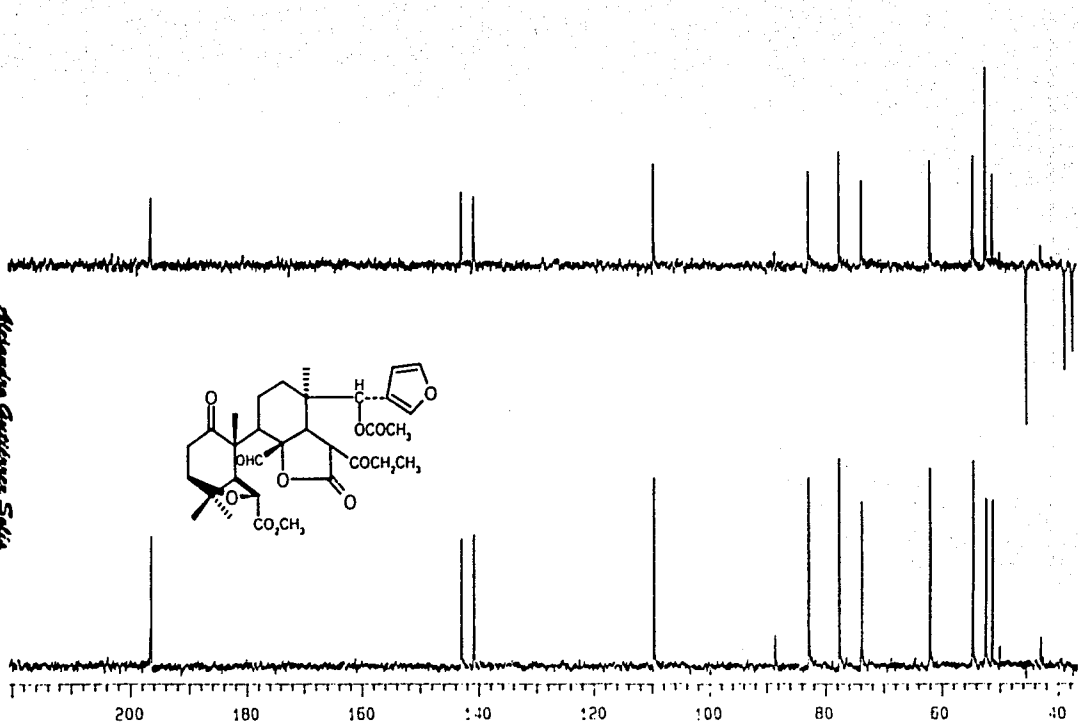
69



ESPECTRO 7

ESPECTROS

Negativa Quaternary Solis

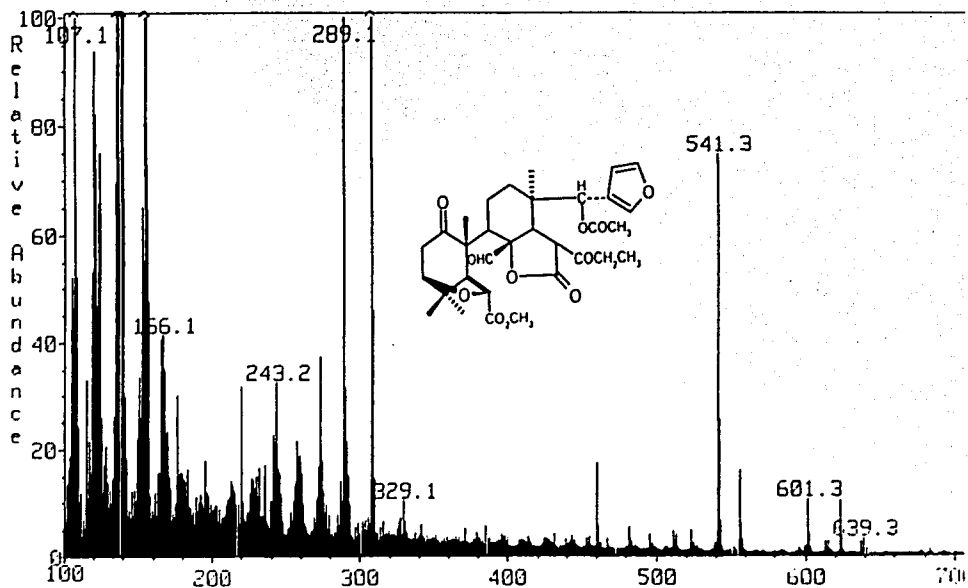


ESPECTROS

70

ESPECTRO 7b

Melastoma gutierrezii Salis



71

ESPECTRO 8

ESPECTROS