

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Actividad biológica de especies del género *Bursera*,  
frente al desarrollo de *Spodoptera frugiperda* J. E.  
Smith (Lepidoptera: Noctuidae)”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

**BEATRIZ ZÚÑIGA RUIZ**

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER**



MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2005

0348811



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptonal.  
 NOMBRE: Beatriz Zuñiga Ruiz  
 FECHA: 05-10-05  
 FIRMA: [Firma]

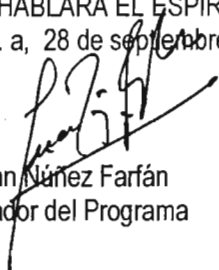
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
 Director General de Administración Escolar, UNAM  
 Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **ZUÑIGA RUIZ BEATRIZ** con número de cuenta **87249965** con la tesis titulada: **Actividad biológica de especies del género Bursera, frente al desarrollo de Spodoptera frugiperda J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)**, bajo la dirección del(a) **Dra. Patricia Guevara Fefer**.

Presidente:	Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón
Vocal:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Secretario:	Dra. Patricia Guevara Fefer
Suplente:	Dr. Eduardo Aranda Escobar
Suplente:	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cd. Universitaria, D.F. a, 28 de septiembre del 2005

  
 Dr. Juan Núñez Farfán  
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT**, por la beca otorgada con número de registro 163100, para realizar mis estudios de Posgrado.

A la **Dra. Patricia Guevara Fefer**, directora de esta tesis y más que eso, un gran ser humano, por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por las enseñanzas, la confianza y por los consejos en el ámbito académico y fuera de él. Mil gracias.

### **A los miembros del Comité Tutorial:**

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón, por su apoyo y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por el tiempo invertido en gran parte de este trabajo, del cual ya se están cosechando los frutos y por la disponibilidad en todo momento ante cualquier duda y trámite.

### **A los Doctores que conforman parte del Síno:**

Dra. Ana Luisa Anaya Lang, por sus comentarios y valiosas aportaciones en la redacción de esta tesis.

Dr. Eduardo Aranda Escobar, por siempre estar al pendiente de este proyecto y brindar ayuda ante cualquier vicisitud que se presentara, en la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Entomología del CIMMyT, al Dr. Bergvinson, Coordinador del laboratorio, por proporcionar las larvas de *S. frugiperda*, para la realización de este proyecto. En especial al Sr. Emiliano, que tan amablemente mantenía la población de los insectos en las condiciones necesarias y a los compañeros del laboratorio Nazario y Cresencio, por su sencillez y hospitalidad.

A la M. en C. Josefina Herrera Santoyo, por sus conocimientos y por su asesoramiento técnico en algunos experimentos, pero sobre todo por su amistad.

A la M. en C. Beatriz Rodarte Murguía, por la ayuda técnica en la última fase experimental y por siempre estar al pendiente.

A:

***Mi esposo:***

*Eleazar mi compañero de vida, por su amor y sobre todo por el apoyo incondicional, serenidad y paciencia, fundamentales para poder lograr esta meta, aportaste mucho, esto es tuyo también. TE AMO*

***Mis padres:***

*Marilé y Benjamín†, por darme lo mejor siempre: la vida, amor y educación, Mil gracias esto es una pequeña contribución de lo mucho que me han dado.*

***Mi abuelita:***

*Por tu ejemplo de lucha y ser parte fundamental en mi vida*

***Mi Familia:***

*Por su cariño y apoyo en todo momento*

***Mis amigos:***

*Por contar en cualquier momento con ustedes y sobre todo por su Amistad*

## INDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>10</b>
<b>EI GÉNERO <i>Bursera</i></b> .....	<b>10</b>
I.1.- <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
I.2.- <b>ANTECEDENTES</b> .....	17
I.2.1 Descripción y generalidades del género <i>Bursera</i> .....	19
I.2.2 Origen.....	20
I.2.3 Distribución.....	21
I.2.4 Estudios químicos del género <i>Bursera</i> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	26
I.3.- <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
I.3.1.- Recolecta del material vegetal .....	28
I.3.2.- Preparación de los Extractos .....	28
I.3.3.- Pruebas químicas de grupos de Metabolitos Secundarios.....	28
I.3.4.- <b>ENSAYOS BIOLÓGICOS</b> .....	29
I.3.4.a.- Ensayos de elección y no elección .....	29
I.3.4. a. 1.- Elección.....	30
I.3.4. a. 2.- No elección .....	30
I.3.4.b.- Suministrados en la dieta artificial .....	31
I.3.4.b.1) Hojas secas.....	31
I.3.4.b.2) Extractos .....	32
I.3.5.- Análisis estadístico .....	32
I.4.- <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
I.4.1.- Pruebas químicas.....	35
I.4.2.- Ensayos biológicos.....	36
I.4.2.1.- Elección, No elección .....	36
I.4.3.- Suministrados en la dieta artificial .....	38
I.4.4.- Pupación .....	43
I.4.5.- Sexo .....	44
I.4.6.- Extractos .....	46
I.4.7.- Pupación .....	50
I.4.8.- Sexo .....	52
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>55</b>
<b>EVALUACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TALLO DE ESPECIES DE <i>Bursera</i> EN EL DESARROOLLO DE <i>S. frugiperda</i> (J. E. Smith)</b> .....	<b>55</b>
II.1.- <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	55
II.1.2.- Para la familia burseraceae.....	59

OBJETIVOS PARTICULARES .....	60
II.2.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
II.2.1.- Material vegetal .....	62
II.2.2.- Extracción de aceites esenciales en tallo .....	62
II.2.3.- Análisis por Cromatografía de gases, acoplado a Masas (CG-MS) ....	62
II.2.4.- Ensayos biológicos.....	63
II.2.5.- Determinación de la actividad antiinflamatoria .....	63
II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	65
II.3.1.- Constituyentes de los aceites esenciales.....	65
II.3.2.- Ensayos biológicos.....	69
II.3.3.- Actividad antiinflamatoria .....	71
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>72</b>
<b>ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA EN LARVAS Y</b>	
<b>ADULTOS DE <i>S. frugiperda</i> (J. E. Smith). .....</b>	<b>72</b>
III.1.- INTRODUCCIÓN.....	72
III.2.- ANTECEDENTES.....	73
OBJETIVOS.....	76
III.3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	77
III.3.1.- ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	77
III.3.1.- ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	78
III.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA	
ACETILCOLINESTERASA.....	78
III.3.3.- Análisis estadístico.....	79
III.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	81
III.4.1.- ACETILCOLINESTERASA.....	81
CONCLUSIONES GENERALES .....	84
LITERATURA CITADA .....	85

## TABLAS

---

Tabla 1.- Modo de acción de los Metabolitos Secundarios (MS), en el metabolismo de los insectos.....	15
Tabla. 2.- Resultados del bioensayo de preferencia, con hojas frescas de las diferentes especies de <i>Bursera</i> .....	37
Tabla 3. Constituyentes identificados en los aceites esenciales de tallo en las especies del género <i>Bursera</i> .....	67
Tabla 4.- Actividad antiinflamatoria de fracciones volátiles de <i>Bursera spp.</i> .....	71

## DIAGRAMAS Y FIGURAS

---

Figura 1.- Interacciones entre plantas e insectos. (tomado de Mello et al., 2002).	11
Figura 2.-Distribución en México del género <i>Bursera</i> .....	22
Figura 3.-Dispositivo utilizado de discos foliares para los ensayos de elección, no elección .....	30
Diagrama. 1.-.....	31
Diagrama. 2.-.....	33
Figura 4. Efecto de las hojas secas 5% de 5 especies de <i>Bursera</i> , sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	38
Figura 5. Efecto de las hojas secas 5% de 5 especies de <i>Bursera</i> , sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	39
Figura 6. Efecto de las hojas 10% de 5 especies de <i>Bursera</i> , sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta.....	40
Figura 7. Efecto de las hojas (10%) en 5 especies de <i>Bursera</i> , sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	40
Figura 8. Efecto de las hojas (5%) de 4 especies de <i>Bursera</i> , sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta.....	41
Figura 9. Efecto de las hojas (5%) de 4 especies de <i>Bursera</i> , sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	41
Figura 10. Efecto de las hojas (10%) de 4 especies de <i>Bursera</i> , sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	42
Figura 11. Efecto de las hojas (10%) de 4 especies de <i>Bursera</i> , sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> , cuando fueron suministradas en la dieta. ....	42
Figura 12. Porcentaje de pupación en los organismos tratados con hoja seca al 5%, de las nueve especies del género <i>Bursera</i> . ....	43
Figura 13. Porcentaje de pupación en los organismos tratados con hoja seca al 10%, de las nueve especies del género <i>Bursera</i> . ....	44
Figura 14. Porcentaje de machos y hembras, tratados con hoja seca al 5%, de las nueve especies del género <i>Bursera</i> . ....	45
Figura 15. Porcentaje de machos y hembras, tratados con hoja seca al 10%, de las nueve especies del género <i>Bursera</i> . ....	46
Figura 16. Efecto de los extractos hexánicos suministrados en la dieta (0.1 g) y (0.01 g) sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> . ....	47



Figura 17. Efecto de los extractos hexánicos suministrados en la dieta (0.1 g) y (0.01 g) sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> .....	47
Figura 18. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.01 g), sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> . .....	48
Figura 19. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.01 g), sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> .....	49
Figura 20. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.1 g), sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> .....	49
Figura 21. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.1 g), sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> .....	50
Figura 22. Porcentaje de pupación en los organismos tratados, con extracto metanólico 0.01 g de 5 especies del género <i>Bursera</i>	
Figura 23. Porcentaje de pupación en los organismos tratados, con extracto metanólico 0.1 g de 5 especies del género <i>Bursera</i>	
Figura 24. Porcentaje de machos y hembras, tratados con extracto metanólico 0.01 g de cinco especies del género <i>Bursera</i> .....	52
Figura 25. Porcentaje de machos y hembras, tratadas con extracto metanólico 0.1 g/100 g de dieta, de cinco especies del género <i>Bursera</i> .....	54
Figura 26.-Distribución en la naturaleza de la vía mevalonato y fosfato deoxixilulosa, para la biosíntesis de isoprenoides (Tomado de Eisenreich, 2001).....	56
Figura 27.-Compartimentalización y rutas de biosíntesis para isoprenoides (Tomado de Rohmer, 1999).....	57
Figura 28. Determinación de la actividad antiinflamatoria en el edema inducido en la oreja de ratón. ....	64
Figura 29. Efecto de los aceites esenciales cuando fueron suministrados en la dieta 5 mg, sobre el peso de <i>S. frugiperda</i> .....	70
Figura 30. Efecto de los aceites esenciales cuando fueron suministrados en la dieta 5 mg sobre el tamaño de <i>S. frugiperda</i> .....	70
Diagrama 3.....	80
Figura 31. Actividad de la AChE en larvas de <i>S. frugiperda</i> , expuestas a (5 y 10%) de hojas secas de las diferentes especies de <i>Bursera</i> .....	82
Figura 32. Actividad de la AChE en palomillas de <i>S. frugiperda</i> , cuando se les suministró en la dieta el extracto metanólico (0.01 y 0.1 g) de las diferentes especies de <i>Bursera</i> , en la dieta artificial. ....	83

Numerosos estudios se han enfocado al conocimiento de compuestos de origen vegetal con actividad insecticida, como los metabolitos secundarios.

En este sentido, surgió el interés de llevar a cabo un estudio químico biodirigido de especies del género *Bursera* (Burseraceae) con gran diversidad en México y poco estudiado en su composición química, probando su actividad biológica frente al desarrollo de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), insecto que devasta cultivos de gran importancia económica en el país.

Para la realización del presente trabajo, se procedió a la obtención de extractos orgánicos y compuestos volátiles de las diferentes especies de *Bursera*.

Se evaluó el efecto de estos extractos sobre el desarrollo de *S. frugiperda* a través de ensayos biológicos, así como el efecto de las hojas secas y frescas; ambos fueron suministrados por separado a diferentes concentraciones en la dieta artificial del insecto, con el fin de evaluar, en periodos definidos, su tasa de crecimiento (tamaño y peso), porcentaje de pupación, así como, porcentaje de machos y hembras. Los resultados mostraron que existe un efecto significativo de las especies de estudio, en los parámetros de crecimiento del insecto con respecto al control, principalmente en el caso de *B. lancifolia* y *B. aptera*.

El análisis de los aceites esenciales se determinó a través de cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas, encontrándose que los constituyentes principales de estas especies de plantas son de tipo terpénico, principalmente monoterpenos como limoneno e hidrocarburos. Por otro lado, se determinó la actividad antiinflamatoria de estos extractos volátiles, los resultados no mostraron diferencias significativas frente al control.

Por otra parte se midió la actividad de la acetilcolinesterasa (AcHE), un neurotransmisor importante en el impulso nervioso, en larvas y palomillas que sobrevivieron a los ensayos biológicos realizados previamente, al suministrarles hoja seca y extracto metanólico respectivamente de las diferentes especies de *Bursera*. Encontrando un efecto significativo en la inhibición de la actividad de la AcHE, en las larvas tratadas con dos de las especies estudiadas *B. aleoxyllon* y *B. grandifolia*, observando que el efecto inhibitorio es dependiente de la dosis.

El género *Bursera* brinda una amplia gama de posibilidades de estudio tanto desde el punto de vista de sus metabolitos secundarios y el efecto de estos compuestos sobre la fisiología de los insectos.

Numerous studies have been focused to the knowledge of plant compounds with insecticide activity, mainly secondary metabolites. In this sense, we have interest to carry out chemical studies biodirected to species of genus *Bursera* (Burseraceae) due that this taxa has a great diversity in Mexico and is poor studied in its chemical composition. In this occasion, we are testing its biological activity in relation to the development of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), a moth that devastates crops of great economic importance in the country.

For this task, we proceed to obtain the organic extracts and volatile compounds of the different species of *Bursera*. The effect of these extracts was evaluated on the development of *S. frugiperda* through biological trials, as well as the effect in fresh and dry leaves; both were supplied by separated to different concentrations on the artificial diet of the insect, in order to evaluate, in definite periods, its growth rate (height and weight), percentage of pupation, as well as the percentage of male and female. Results showed that significant effect of the species of study, in the parameters of growth of the insect in function of the control, mainly in the case of *B. lancifolia* and *B. aptera*.

The analysis of essential oils was determined through chromatography of gases adapted to spectroscopy of masses, finding that the main constituents of these species of plants are terpenic compounds, mainly monoterpenes as limonens and hydrocarbons. On the other hand, the anti-inflammatory activity of these volatile extracts was determined, and the results did not show significant differences in relation to the control. Finally, the activity of the acetylcholinesterase (AChE) was measured, an important neurotransmitter of the nerve impulse, in larvae and adults that survived to the biological trials carried out previously, when we supply them dry leaf and methanolic extract respectively of the different species of *Bursera*. We found a significant effect on the inhibition of the activity of the AChE in larvae treated with two of the studied species *B. aleoxyllon* and *B. grandifolia*, observing that the inhibitory effect is dependent of the dose.

The genus *Bursera* offers an extensive range of study possibilities since the point of view of his secondary metabolites and the effect of these compounds on the physiology of the insects.

El género *Bursera* se encuentra distribuido en México con una gran diversidad de especies, algunas de ellas caracterizadas por la presencia de compuestos de tipo terpénico. Los escasos reportes acerca de la interacción de este género con herbívoros y su composición química, pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios encaminados a conocer esta interacción y los compuestos químicos que presentan, las diferentes especies de estudio.

El presente trabajo se encuentra estructurado en tres capítulos: en el primero se aborda un panorama general del género *Bursera* y de los metabolitos secundarios presentes en algunas especies de este género. Así como, los trabajos realizados para evaluar el efecto de hojas, extractos orgánicos y volátiles de las especies de estudio, sobre el crecimiento del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae).

En el segundo se analiza la composición de los aceites esenciales obtenidos de las diferentes especies y su efecto antiinflamatorio.

Finalmente el tercer capítulo aborda el estudio de la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, en larvas y palomillas de *S. frugiperda*, producido por hojas y extractos de las especies de *Bursera* estudiados.

## OBJETIVOS GENERALES

---

- ◆ Evaluar el efecto de hojas, extractos orgánicos y aceites esenciales de las diferentes especies del género *Bursera*, sobre el crecimiento de *Spodoptera frugiperda*, determinando si existe actividad antialimentaria.
- ◆ Determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios, en los extractos orgánicos de las hojas de las especies de estudio.
- ◆ Realizar un ensayo enzimático a fin de evaluar el efecto de las diferentes especies de *Bursera* sobre la actividad de la acetilcolinesterasa del insecto.

#### I.1.- INTRODUCCIÓN

---

En el ecosistema las plantas y los insectos están continuamente interactuando en una compleja vía. La interacción planta-insecto es un sistema dinámico, sujeto a continuas variaciones y cambios (Figura 1). Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para reducir el ataque de insectos, incluyendo respuestas específicas que activan diferentes vías metabólicas las cuales alteran considerablemente sus características químicas, físicas o fenológicas actuando como barreras para los insectos (Anaya, 2003). Por otro lado los insectos desarrollaron varias estrategias para superar estas barreras defensivas de las plantas, permitiendo así su sobrevivencia (Mello *et al.*, 2002). Dentro de las estrategias químicas de las plantas, se encuentra la producción de una serie de compuestos que no están relacionados directamente con el metabolismo básico; tales compuestos se conocen como metabolitos secundarios.

Investigaciones multidisciplinarias recientes sobre la fisiología y bioquímica de insectos y la ecología química, en especial el estudio de las interacciones planta-herbívoro, han revelado que compuestos derivados del metabolismo secundario pueden actuar como antialimentarios, repelentes, tóxicos, etc., ocasionando alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción, diapausa y comportamiento de los insectos (Bellés, 1988). Estos compuestos químicos que las plantas han desarrollado e incorporado a sus tejidos para repeler a los herbívoros por toxicidad directa o reduciendo la digestibilidad de las plantas o bien, como sustancias inducidas sintetizadas en respuesta al tejido dañado a través de un encuentro previo con un depredador, herbívoro, patógeno o parásito, que le confieren a la planta cierto grado de resistencia a los ataques subsecuentes

por estos organismos al afectar su comportamiento y fisiología (Anaya, 2003; Mello *et al.*, 2002).

Fraenkel (1959) fue uno de los primeros en sugerir que los compuestos secundarios se encuentran directamente implicados en el comportamiento alimentario de los insectos.

Posteriormente a los trabajos de Ehrlich y Raven (1964), el papel de los compuestos secundarios como los alcaloides, terpenos y flavonoides, ha sido explorado en relación con la herbivoría en insectos.

En este sentido los estudios se han enfocado sobre las angiospermas, los insectos y la química de los productos secundarios.

Se estima que existen más de un cuarto de millón de especies de angiospermas en el mundo y cerca de un millón de especies de insectos, el grupo numéricamente más importante del reino animal. El número total de especies no se conoce, pero podría ubicarse entre los 10 y 100 millones (Wilson, 1992).

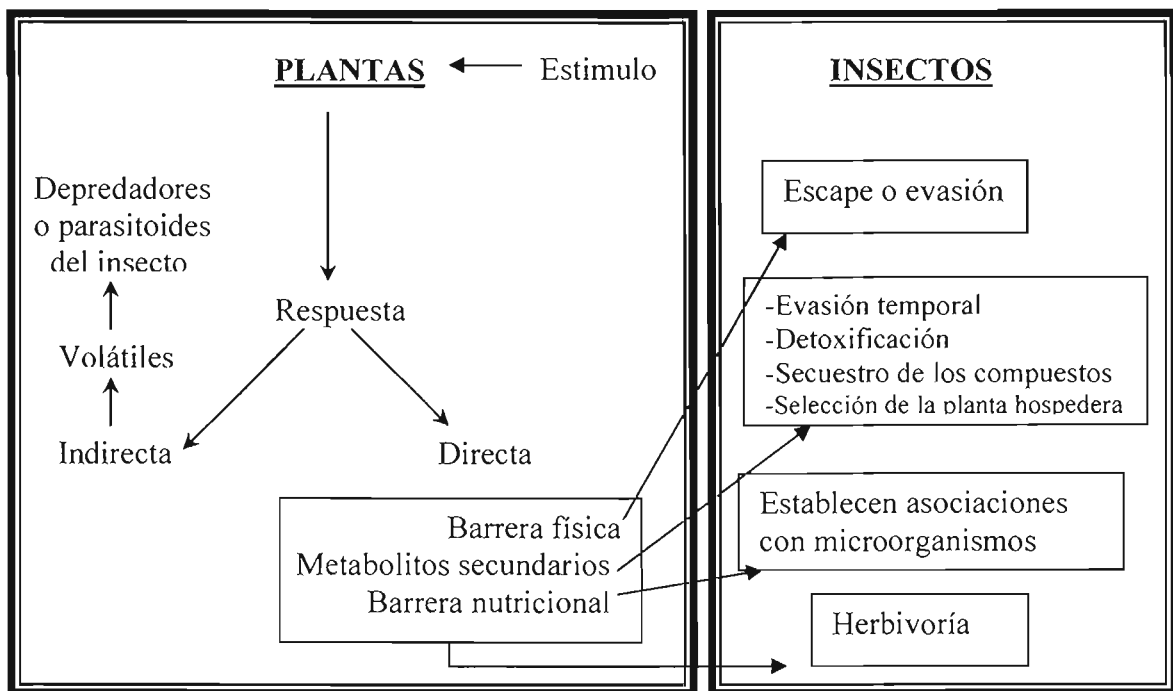


Figura 1.- Interacciones entre plantas e insectos. (tomado de Mello et al., 2002).



Con relación a los productos secundarios se han identificado más de 100,000 compuestos, entre los que podemos citar no menos de seis mil alcaloides y diez mil compuestos de origen terpénico, por mencionar algunos (Dixon, 2001).

La producción de una gran variedad de metabolitos secundarios por parte de las plantas, les confiere a éstas cierta resistencia, al afectar de manera muy diversa el comportamiento y la fisiología de los insectos.

Se ha planteado que los metabolitos secundarios son una respuesta de defensa general contra factores adversos o limitantes que se clasifican en bióticos y abióticos, es decir que la producción de compuestos secundarios se ve modificada cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés debido a estos factores (Sudha *et al.*, 2002). Existe además una distribución específica de ciertos metabolitos secundarios en las familias y géneros, en algunos casos hasta en especies, los cuales se pueden encontrar en un órgano determinado, como en tallo, raíz, inflorescencia, hoja o fruto (Berembaum, 1995).

Numerosos productos secundarios son muy tóxicos para los insectos, por ejemplo: alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides, entre otros.

Por otro lado algunos compuestos son antagonistas de hormonas de insectos, ciertas plantas producen determinados compuestos que pueden interferir en la regulación de algunos aspectos fisiológicos, bioquímicos o de comportamiento de los insectos, los cuales pueden ocasionar cambios en los procesos regulados por el sistema endócrino (crecimiento, metamorfosis, reproducción, diapausa), actuando como biomiméticos o antagonistas de hormonas de insectos, según Camps (1988), ejemplos de estos son:

- i) Fitojuvenoides.- Muestran una actividad biológica idéntica a la que inducen las hormonas juveniles de insectos, cuando se administran en la fase pre-adulta inhiben total o parcialmente la metamorfosis, como el farnesol.
- ii) Antihormonas juveniles.- Antagonizan la acción de la hormona juvenil, ocasionando una metamorfosis precoz en larvas, los adultos viables son estériles. Un ejemplo de ellos serían los precocenos.
- iii) Fitoecdisteroides.- La muda de los insectos está controlada por la ecdisona, sin embargo ésta hormona no es exclusiva de los insectos ya que en extractos de

plantas se han encontrado estructuras idénticas o similares, como la 20-hidroxicdisona, es el fitoecdisteroide más abundante en Pteridofitas, gimnospermas y angiospermas, después la ponasterona extraída de *Podocarpus nakaii*. Los efectos biológicos (malformación, esterilidad y muerte del insecto) dependen del modo de administración y del mismo compuesto.

- iv) Antiecdisonas.- Algunos metabolitos secundarios pueden tener esta actividad de interferir específicamente con alguna de las fases del proceso de muda, siendo útiles como agentes de control biorracional de insectos. Como la plumbagina aislada de *Plumbago capensis* que inhibe la ecdisis de cuatro especies de Lepidópteros y la azadiractina que también inhibe este proceso, su efecto ha sido comprobado en numerosas especies de insectos y también en nematodos; se le atribuye un efecto regulador de crecimiento, así como inhibidor de la alimentación y tóxico.

Otros compuestos de origen vegetal que afectan el comportamiento de insectos, que actúan como atrayentes, repelentes, estimulantes o inhibidores de la alimentación y de la oviposición, son clasificados como:

- i) Fagoestimulantes.- presentan una gran variedad de estructuras químicas principalmente glicósidos, ácidos, fosfolípidos y terpenoides. La estimulación es característica en los diversos órdenes de insectos, por ejemplo los Lepidópteros se estimulan por los derivados glicosídicos y los coleópteros por los ácidos (Camps, 1988).
- ii) Estimulantes de oviposición.- compuestos como los disulfuros de metilo y n-propilo de la cebolla, utilizados para inducir la oviposición en el lepidóptero *Hylenya antiqua* (Bellés, 1988).
- iii) Inhibidores de alimentación.- Estos son detectados después de haber iniciado el proceso de alimentación, interrumpiendo este proceso y conducen a la muerte por inanición (Bellés, 1988).
- iv) Sustancias antialimentarias.- se pueden clasificar con base en el tipo de estructura y su actividad sobre el insecto, según Coll (1988).

Los metabolitos secundarios más importantes son:

- Terpenos.- es uno de los grupos en el que se han estudiado un mayor número de sustancias, entre ellos se encuentran los:
  - Monoterpenos.- que inhiben la alimentación o recolección del néctar
  - Sesquiterpenos.- también reducen la alimentación como la Scorpioidina aislada de *Vernonia scorpioides*, o con actividad hormonal.
  - Diterpenos.- el grupo más numeroso de compuestos antialimentarios naturales aislados de plantas como las nagilactonas aisladas de *Podocarpus gracilior* activa frente a los lepidópteros *Heliothis zea* y *S. frugiperda*.
  - Triterpenos.- Algunos muestran efectos tóxicos como la azadiractina al interferir en los procesos de crecimiento y desarrollo que ocasionan algunas malformaciones, inhibición de la muda y muerte.
- Flavonoides.- Se han descrito como antialimentarios, en Coleópteros por ejemplo, el Campferol y la Quercetina que inhiben su alimentación.
- Alcaloides.- se identifican por su toxicidad, así como el sabor amargo. Algunos funcionan como fagoestimulantes. Como la tomatina aislada de la planta del tomate, actúa como factor limitante del consumo e impide el crecimiento de las larvas del coléoptero *Leptinotarsa decemlineata*.

Los modos de acción de algunos grupos de metabolitos secundarios se pueden observar en la tabla 1.

Grupo de MS	Modo de acción	Referencias
Alcaloides	Tóxicos Interferencia con la replicación del DNA Inhibición de enzimas Agonista de la Acetilcolina	Coll, (1988) Wink, (2003) Fellows <i>et al.</i> , (1986) Sultana <i>et al.</i> , (2002)
Flavonoides	Antialimentarios	Coll, (1988)
Terpenoides	Repelentes y disuasorios Interfieren en la producción de la muda e Inhibidores de la síntesis de quitina Inhibición de enzimas digestivas	Ave <i>et al.</i> , (1987)  Blackwell (1996) Koul <i>et al.</i> , (1996)
Taninos	Reductor de la digestibilidad	Rhoades (1979)
Saponinas	Repelentes y disuasorios	Soulé <i>et al.</i> , (2000)

Tabla 1.- Modo de acción de los Metabolitos Secundarios (MS), en el metabolismo de los insectos.

La toxicidad de cualquier producto secundario puede resultar difícil de medir con plena seguridad, debido a los múltiples factores involucrados en este fenómeno. La ingestión del compuesto sólo necesita modificar ligeramente la conducta del insecto para considerarse ecológicamente significativa.

También es importante conocer los mecanismos de respuesta de los insectos frente a los compuestos químicos de origen vegetal, uno de los mecanismos para evaluar el efecto de estos compuestos es mediante bioensayos. Tomando en cuenta diversos factores que se puedan presentar a la hora de realizarlos, como la diversidad de respuestas por parte de los insectos, entre estas se encuentran, sus hábitos alimenticios si son especialistas o generalistas, ya que los especialistas son más susceptibles a los aleloquímicos vegetales producidos por la planta hospedera, mientras que los generalistas son capaces de adaptarse a un mayor número de compuestos provenientes de diferentes especies vegetales (Schoonhoven, 1982), en ocasiones no responden a la alimentación con una

dieta fuera de lo normal, por lo que resulta difícil ensayar la eficacia de extractos, fracciones o compuestos vegetales aislados. Así mismo, algunos insectos mueren antes de aceptar una dieta en la que no se encuentren los estimulantes de su apetito, como en el caso de las larvas de la mariposa blanca de la col que habita en las crucíferas (Rojas, 1999).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se realizó un estudio químico biológico preliminar evaluando el efecto de las hojas de especies del género *Bursera*, así como de los extractos orgánicos y volátiles obtenidos de estas especies de plantas; al suministrárselos al insecto *Spodoptera frugiperda*, lepidóptero de interés agrícola utilizado como modelo para los ensayos biológicos, y determinar el papel que pueden estar ejerciendo sobre los insectos, midiendo la tasa de crecimiento (expresada en tamaño y peso), durante las primeras etapas de desarrollo larval.

## I.2.- ANTECEDENTES

---

Entre los órdenes más representativos de los insectos fitófagos, se encuentran los Lepidópteros (Strong, 1984); un ejemplo de ellos es el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, J. E. Smith, (Noctuidae). Es uno de los insectos plaga más perjudiciales que ataca cultivos de gran importancia económica en México, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del país (Robles, 1994).

Los adultos son palomillas de color gris oscuro, miden de 20 a 25 mm, las cuales ovipositan masas de huevecillos de color blanco cubiertos de pelusa, en el envés de las hojas. Cuando emergen las larvas color café grisáceo y cabeza negra, comienzan a alimentarse raspando la epidermis de la hoja y más tarde pasa al cogollo, en ocasiones pueden afectar espigas y mazorca. Después de seis estadios larvales el gusano cae al suelo e inicia la etapa de pupa en una celdilla de tierra a pocos centímetros debajo de la superficie del suelo, tiempo después emergen los adultos (Ortega, 1887).

La alimentación de los insectos fitófagos incluye una amplia variedad de sustancias orgánicas, la selección que éstos hacen de sus plantas hospederas puede ser por atracción visual y olfatoria, así como, el valor nutricional de la planta influye de manera significativa (Ross, 1982). Las plantas proveen recursos esenciales para los insectos, principalmente como sitios de alimentación, apareamiento, colocación de huevos y refugio, los cuales influyen en la selección de la planta hospedera (Boutler, 1993).

La abundancia de un alimento de determinada calidad influye en la población de insectos; y viceversa, las plagas y enfermedades aumentan cuando existe una abundancia de plantas susceptibles. Pero los factores más importantes para el insecto, desde el punto de vista biológico y bioquímico, son los compuestos atrayentes y repelentes de las plantas, los estimulantes o inhibidores

para el crecimiento de las plagas y su reproducción, los nutrientes, humedad, temperatura, edad y otros factores de las plantas.

La alimentación y el comienzo de la oviposición de varias especies de insectos está condicionada, entre otros factores, por un grupo de sustancias químicas (aceites esenciales, alcaloides, glucósidos, etc.), y se ha demostrado que los estimulantes alimentarios juegan un papel importante en la utilización de la planta hospedera más o menos por una combinación de estímulos físicos, químicos y fisiológicos (Brauer, 1985).

Una consecuencia de la lucha total para no dañar al ambiente son los métodos de control de plagas. Una alternativa es la investigación de compuestos antialimentarios o insecticidas de origen botánico que ha incrementado durante la última década (Jermy, 1990), por tres razones:

- 1) proporcionan un control de insectos plaga efectivo, resistente a otros insecticidas.
- 2) La mayoría son de vida corta en el ambiente y poseen un riesgo mínimo para otros organismos, incluyendo los depredadores benéficos o parásitos que ayudan a regular las plagas y a los depredadores de nivel superior en la cadena alimenticia incluyendo al hombre como consumidor de cultivos tratados.
- 3) Los compuestos de origen vegetal, pueden ser aceptados por progtallos de certificación orgánica y por ciertos grupos de consumidores, ya que son más fácilmente aprovechables que los insecticidas sintéticos, porque no dejan residuos tóxicos persistentes (Weinzierl, 2000).

Entre los insecticidas vegetales más representativos se encuentra el aceite del Neem, proveniente de las semillas de un árbol tropical y subtropical de la familia Meliaceae (*Azadirachta indica*). Nativa del Sur y Sureste de Asia que se puede encontrar en regiones de Africa, América y Australia; se le conoce también como margosa. La azadiractina es el ingrediente activo principal de los extractos del neem; es uno de los más de 70 limonoides producidos por este árbol, es un

triterpeno (Howatt, 1994). Todas las partes de la planta muestran alguna característica de repelencia a insectos debido a la presencia de este compuesto.

Han sido numerosos los reportes de los efectos del Neem en insectos, en los que se incluye: repelencia, alimentación disuasiva, impide la oviposición, reduce el crecimiento y desarrollo e interfiere con la reproducción (Weinzierl, 2000), es uno de los antialimentarios más importantes utilizados en la actualidad.

La búsqueda de compuestos de origen vegetal con actividad insecticida que permita el control de plagas como *S. frugiperda* es de suma importancia, al igual que el estudio de la interacción planta-insecto en un contexto ecológico, por lo que todos aquellos estudios orientados al análisis de la química de la planta, así como los diferentes bioensayos a realizar, permitirán conocer o acercarnos a las diferentes respuestas de las plantas y los organismos, que interactúan en esta relación.

Debido al potencial que tienen los compuestos de tipo terpénico, como antialimentarios, repelentes, etc., a insectos y la presencia de estos en el género *Bursera*, surgió el interés de llevar a cabo un estudio biodirigido de especies de este género, por un lado, por la gran diversidad de especies que existen en la República Mexicana y por otro, por conocer más su composición química, que aún se encuentra muy poco estudiada, así como, evaluar su actividad biológica frente a *Spodoptera frugiperda*, especie generalista utilizada como modelo en estudios dirigidos a la evaluación de actividad biológica.

### **I.2.1.- Descripción y generalidades del género *Bursera***

En México la familia Burseraceae se encuentra representada aproximadamente por 20 géneros y más de 600 especies; son árboles o arbustos de 4 a 10 m de altura o arbustos, dióicos, cuya corteza puede o no ser exfoliante y que producen aceites esenciales aromáticos. Presentan hojas alternas imparipinadas, bipinadas o trifolioladas, sus flores son pequeñas, dispuestas en racimos y sus frutos drupáceos (Rzedowski *et al.*, 1992).

La época de floración de la mayoría de las especies de *Bursera* es al final de la época de secas y al principio de la de lluvias (mayo-junio) y la fructificación se



lleva a cabo entre julio-noviembre. Las especies de *Bursera* se encuentran distribuidas en regiones cálidas y templadas, con mayor diversidad en la Cuenca del Balsas, siendo la región de máxima concentración de especies e individuos de este género (Toledo, 1982). El género *Bursera* está representado por dos secciones: sección *Bullockia* de corteza lisa no exfoliante y cuyas especies son llamadas comúnmente “copales” y la sección *Bursera* de corteza exfoliante, estas especies se conocen como “cuajotes”, palabra que deriva del Náhuatl “cuahuitl”=árbol y “xiotl”=lepra (Rzedowski *et al.*, 1979).

La importancia etnobotánica de la familia Burseraceae en México está relacionada con la quema de sus resinas en ceremonias religiosas, así como, en la elaboración de barnices, artesanías tradicionales en figuras talladas conocidas como alebrijes (Peters *et al.*, 2003); adicionalmente se le atribuyen propiedades medicinales frente a picaduras de animales como los escorpiones, en la preparación de ungüentos, para aliviar resfriados y dolores de cabeza, inhalando los vapores que se generan de la infusión de las resinas (Martínez, 1990), y además una posible actividad insecticida (Abad, 1996); esta última de interés central para el presente trabajo.

### **I.2.2.- Origen.**

En relación a su origen, las relaciones filogenéticas del género *Bursera* aún no se encuentran del todo establecidas debido a la escasez de especímenes de herbario con flores (Becerra *et al.*, 1999).

El primer ejemplar de *Bursera* recolectado se colocó dentro de la familia Anacardiaceae, con la cuál esta íntimamente relacionada y de la que se diferencia por la presencia de 2 óvulos por lóculo en Burseraceae y uno en Anacardiaceae (Forman *et al.*, 1988). Otra familia con la cual se encuentra muy relacionada es Simaroubaceae, con quien comparte una gran cantidad de caracteres embriológicos (Rao, 1970).

Rzedowski y col., (1979), compararon algunas características de *Bursera* con dos géneros cercanamente relacionados de África y el Sur de Asia, al analizar las relaciones que estos géneros tienen con las dos secciones que componen a

*Bursera*, hacen notar las afinidades morfológicas que parecen existir entre *Boswellia* y la sección *Bursera*, por un lado, y *Commiphora* y la sección *Bullockia* por otro, contemplando la posibilidad de considerar a *Bursera* como un taxón difilético, pero las relaciones con estos géneros aún no están claras.

Algunos sistemáticos también proponen que el origen puede ser monofilético, ya que *Commiphora* y *Bursera* podrían estar combinados dentro de un simple género. Otros consideran que *Bursera* está relacionado con *Boswellia* y en combinación con *Triomma* dentro de la subtribu *Burserinae* y *Commiphora* en otra subtribu, la *Commiphorinae* (Becerra *et al.*, 1999). Otros asumen que la familia Rutaceae, está cercanamente relacionada con Burseraceae (Chase *et al.*, 1999).

### **I.2.3.- Distribución**

El género *Bursera* contiene alrededor de un centenar de especies distribuidas exclusivamente en el continente Americano, desde el extremo sur de los Estados Unidos hasta Perú y el sureste de Brasil, incluyendo áreas insulares de las Antillas, Galápagos y las Revillagigedo (Rzedowski *et al.*, 1979).

La diversidad del género se concentra en México; aproximadamente 70 especies son endémicas con registros en todos los estados de la República (excepto Tlaxcala), alcanzando la mayor diversidad de especies y densidad de individuos en la depresión del Balsas, que incluye los estados de Michoacán y Guerrero (Figura 2). La mayor parte de las especies habitan regiones cálidas o con sequías largas e incluso se presentan en algunas regiones templadas y subhúmedas (Miranda, 1947; Toledo, 1982).

Figura 2.-Distribución en México del género *Bursera*



#### 1.2.4.- Estudios químicos del género *Bursera*

La química del género *Bursera* está constituido principalmente por terpenoides, en su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos (Evans *et al.*, 2000). El género exhibe gran variación química en la composición de terpenoides (en número, identidad y cantidades relativas). Algunas especies producen frecuentemente mezclas complejas que contienen algunos compuestos en particular, estos compuestos son principalmente de origen terpénico. Este tipo de mezclas, quizá hacen que estas plantas sean repelentes a herbívoros, actuando sinérgicamente, como antialimentarios o tóxicas. Otras especies de éste género

también producen resinas como estrategia contra herbívoros pero su constitución es muy simple, primordialmente de uno o dos monoterpenos (Becerra *et al.*, 2001).

Sin embargo aún se conoce muy poco acerca de la composición química de las especies de *Bursera*, por lo que a continuación se mencionan algunos de los trabajos que se han realizado con este género o familia:

Por medio de técnicas cromatográficas ha sido posible hacer un análisis comparativo entre los terpenoides presentes en los aceites esenciales de *Bursera*, relacionando estos resultados con características taxonómicas del género (Rzedowski *et al.*, 1982). Maupetit (1984), menciona la producción de gomas de resinas producidas por pequeños árboles los cuales son generalmente de las especies del género *Boswellia* (Burseraceae); *carterii* y *frereana*, en donde el constituyente principal de las gomas fue  $\alpha$ -pineno, para ambas especies.

Provant y col., (1987), aislaron aceites esenciales del tallo de *Boswellia neglecta*, *Commiphora africana*, *C. campestris* y *C. agadensis*, encontrando que la composición predominante de los aceites esenciales fue principalmente de monoterpenos y en mayor cantidad el  $\alpha$ -pineno. Otros constituyentes importantes encontrados fueron el  $\alpha$ -tujeno (*B. neglecta*, *C. africana*), sabineno (*C. campestris*), mirceno (*C. agadensis*), p-cimeno (*B. neglecta* y *C. africana*).

Howard (1990), reportó diferencias en la palatabilidad y características en las hojas de *Spondias mombin* y *Bursera simaruba*, cuando estas son defoliadas por hormigas *Atta colombica* y observó que para la primera, los nutrientes de las hojas y la humedad presentan una relación positiva en la palatabilidad. Para *Bursera simaruba* tanto la humedad en las hojas como el contenido fenólico están relacionados directamente con la palatabilidad, encontrándose principalmente taninos condensados, como repelentes.

Becerra (1994), reporta el impacto de la resina de *Bursera schlechtendalii*, sobre el crecimiento y sobrevivencia en larvas de crisomélidos, mencionando que esta planta produce terpenos los cuáles se encuentran en la corteza del tallo y en las hojas protegiéndolas contra los insectos. Este autor observó que al consumir las hojas las larvas disminuyen su crecimiento y se incrementa su mortandad.

Zoghbi y col., (1995), describen los constituyentes volátiles que se presentan en tallo y hoja de *Potrium heptaphyllum* (Burseraceae), encontrando que los principales compuestos volátiles en las hojas son terpinoleno,  $\beta$ -elemeno y  $\beta$ -cariofileno y el principal componente del tallo fue el terpinoleno.

Wickramaratne y col., (1995), aislaron cuatro lignanos citotóxicos de la corteza de tallo de *Bursera permollis* (Burseraceae), nombrados desoxypodofilotoxina, metil éter  $\beta$ -peltatin, metil éter picro- $\beta$ -peltatin y metil eter dehidro- $\beta$ -peltatin; también aislaron lignanos inactivos como nemerosina.

Peraza-Sánchez (1995), encontró un nuevo triterpeno de tipo lupano, lup-20 (29-en-3 $\beta$ , 23-diol, en la resina de *Bursera simaruba*.

Se ha reportado que *B. graveolens* produce una resina con olor muy fuerte y se usan los tallos para ahuyentar a la polilla de la ropa y a insectos que atacan semillas, se sabe que han hecho ciertos ensayos para preparar una especie de insecticida .

Evans y col., (2000), mencionan que *B. schlechtendalii*, produce resina en los canales de la hoja que secreta cuando es dañada. Los insectos que se alimentan de estas plantas como el escarabajo *Blepharida sp.* aprovechan la resina cuando se ven amenazadas por sus depredadores, cubriendo el dorso con una mezcla de heces y esta resina, rejurgitan varias veces además de realizar secreciones anales. En el análisis químico de los componentes volátiles de la resina, encontraron primordialmente monoterpenos como limoneno,  $\beta$ -felandreno y sabineno; también encontraron proporciones similares en la hoja, así como en las larvas de *Blepharida sp.*, en sus secreciones anales de estas y en la rejurgitación.

De acuerdo con los compuestos químicos encontrados, sugieren que estos escarabajos pueden compensar el alto riesgo de la depredación por el uso de los compuestos presentes en la planta para su defensa.

Hernández y col., (2003), aislaron compuestos de naturaleza terpénica de tipo verticiliano, el (+)-5-epi-verticilol, el biciclo-(9.3.1)-pentadeca-5(18)-9-13 trieno de *Bursera kerberi* y recientemente de *Bursera multifolia* el (+) verticilol y dos nuevos verticiloles (I) y (II), funcionalizados en C-5 y C-20, caracterizados de sus espectros de RMN.

## HIPÓTESIS

---

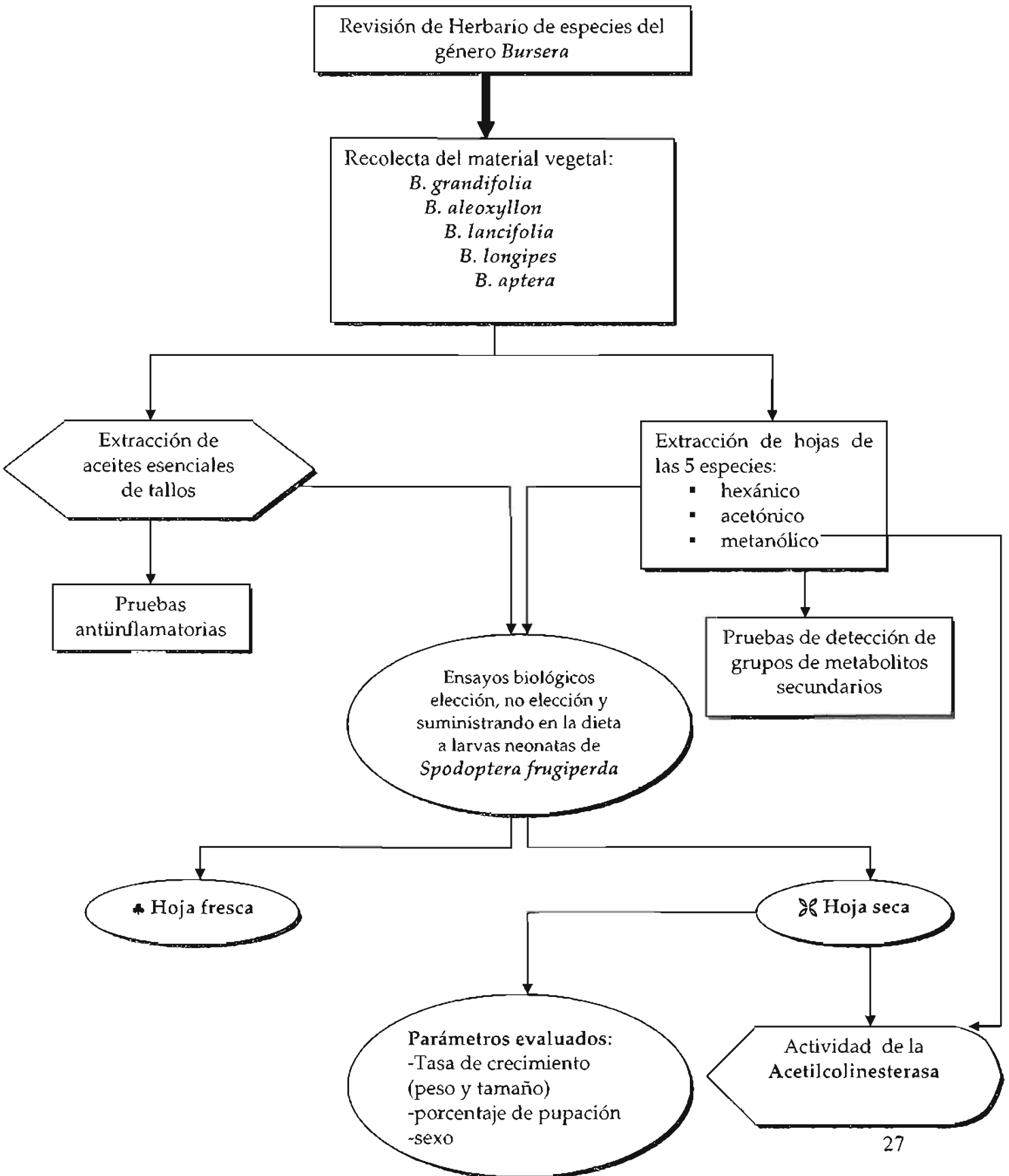
Si las hojas, extractos orgánicos y volátiles de las diferentes especies del género *Bursera* tienen efecto significativo en la tasa de crecimiento de *Spodoptera frugiperda*, entonces las diferentes especies pueden ser utilizadas e investigadas en la búsqueda de compuestos insecticidas de origen vegetal.

## OBJETIVOS

---

- ◆ Evaluar el efecto de hojas, extractos orgánicos y volátiles de las diferentes especies del género *Bursera*, en larvas de *Spodoptera frugiperda* a través de un ensayo de elección, no elección.
- ◆ Evaluar la respuesta en el crecimiento de larvas de *S. frugiperda*, al suministrarles hojas y extractos orgánicos de diferentes especies del género *Bursera*, en la dieta artificial del insecto.

### I.3.- MATERIAL Y MÉTODOS





### **I.3.1.- Recolecta del material vegetal**

La recolecta de las especies se realizó en el estado de Guerrero en cinco localidades: Teutla, Papalutla, Atenango del Río, Huitzucu y Xochipala, tomando una muestra representativa de la población, recolectándose diferentes partes de la planta (hoja, fruto y tallo), en costales previamente etiquetados y 2 ejemplares de cada especie que fueron prensados como material de herbario para su posterior determinación taxonómica.

Posteriormente el material fue trasladado al laboratorio para su análisis químico; los frutos y los tallos, así como una parte de las hojas se congelaron para mantenerlos frescos y la otra parte de éstas se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **I.3.2.- Preparación de los Extractos**

Una vez que se secaron las plantas, 100 g de las partes foliares de cada una de las especies fueron pulverizadas en un molino eléctrico, para llevar a cabo la extracción selectiva con disolventes orgánicos de diferente polaridad. Esta se inició con hexano, seguido de acetona y finalmente metanol. Así se obtuvieron los extractos para la realización de los ensayos, posteriormente se realizó la determinación de los principales grupos de compuestos químicos, que a continuación se mencionan.

### **I.3.3.- Pruebas químicas de grupos de Metabolitos Secundarios**

Las pruebas se realizaron con los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos obtenidos de las cinco especies, con las técnicas colorimétricas y de precipitación para cada uno de los grupos según Domínguez (1985): Libermann-Burchard para terpenos, ácido silicotúngstico para alcaloides, Shinoda para flavonoides y Mölish para glucósidos. Se decoloró el extracto con carbón activado a baño María por 5 min. Posteriormente, se preparó la solución madre (5 mg/ml), tomándose 1 ml para cada una de las pruebas y adicionando el reactivo respectivo; se observó el cambio de coloración o la precipitación que indicaba la presencia o ausencia de los grupos.

### **I.3.4.- ENSAYOS BIOLÓGICOS**

Los ensayos realizados con las hojas de las diferentes especies fueron de dos tipos (diagrama 2):

#### **I.3.4.a.- Ensayos de elección y no elección**

Se determinó la actividad antialimentaria mediante ensayos de alimentación de corta duración en condiciones de elección (con posibilidad de elección entre discos tratados y sin tratar) y no elección (sin posibilidad de elección), utilizándose discos foliares de las especies de *Bursera* y discos foliares de la planta hospedera *Zea mays*.

En todos los casos, la unidad experimental consistió en una caja petri de 15 X 90 mm, con 20 ml de agar al 2.5% para mantener frescos los discos foliares durante el ensayo. Sobre esta capa de agar se hicieron perforaciones circulares con un sacabocados del No. 17, donde fueron colocados los discos foliares de 15 mm de diámetro (Figura 3). Los discos foliares de maíz fueron tratados en la superficie con los aceites esenciales de tallo o con los extractos metanólicos obtenidos de las hojas. A cada disco se le aplicó 20  $\mu$ L de la muestra a evaluar a una concentración de 5000 ppm, de acuerdo a la metodología empleada por Ortego *et al.*, 1999.

Una vez tratados los discos foliares y evaporado el solvente (metanol en extractos y cloroformo en aceites esenciales), se colocaron dentro de cada caja 3 larvas neonatas de *S. frugiperda* y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Las cajas se incubaron a  $27^{\circ} \text{C} \pm 1.5^{\circ} \text{C}$  y  $60\% \pm 5\%$  de humedad relativa, con un fotoperiodo de luz oscuridad de 16:8 h.

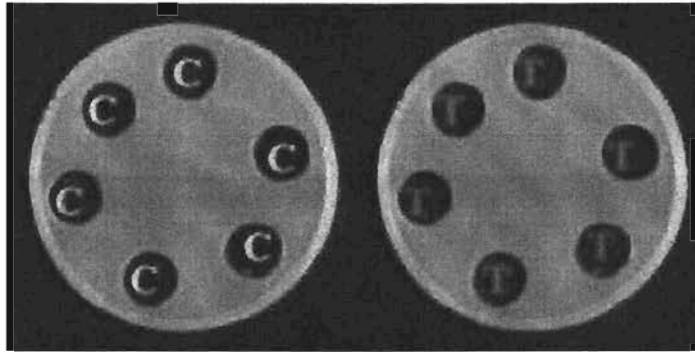


Figura 3.-Dispositivo utilizado de discos foliares para los ensayos de elección, no elección

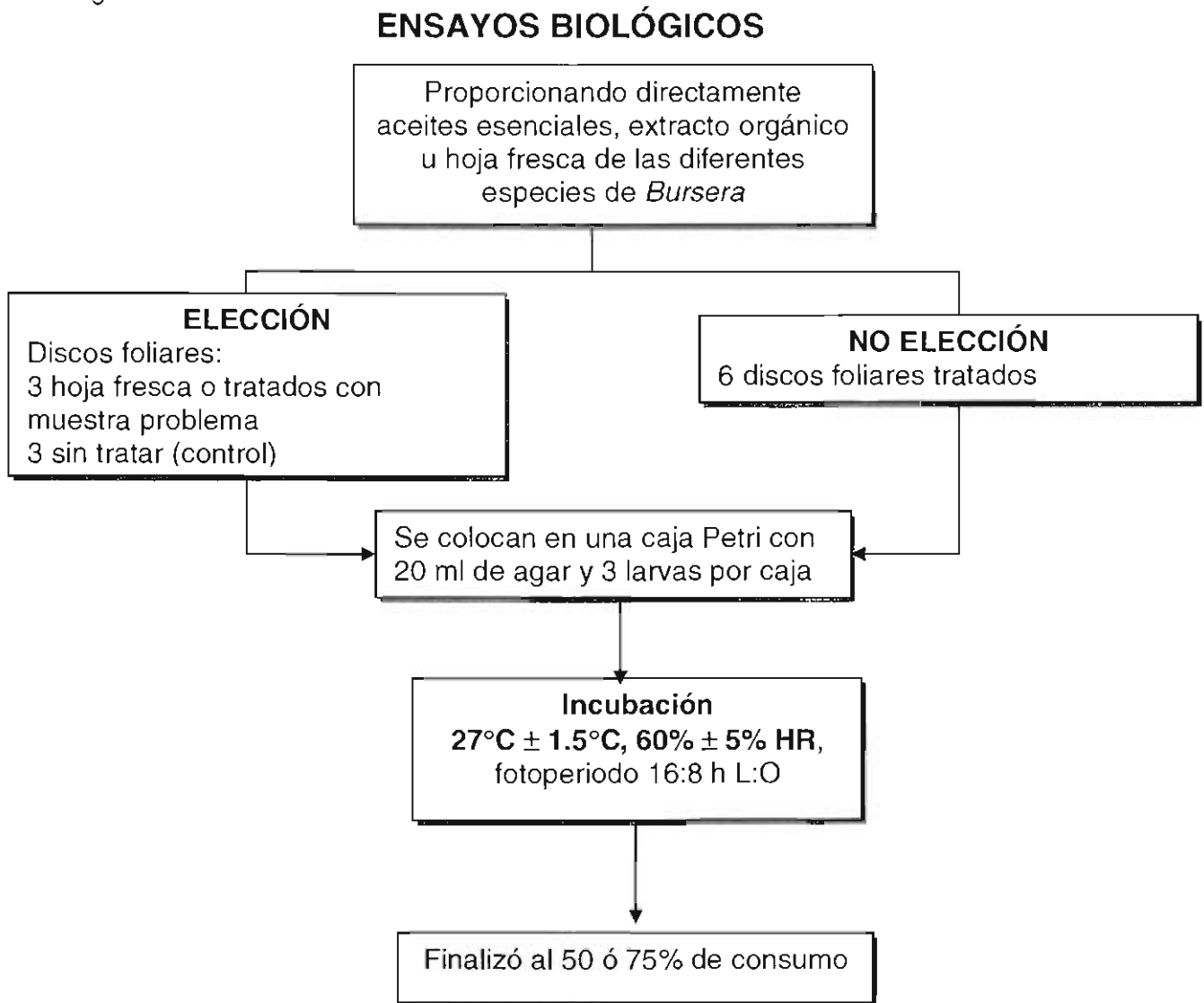
#### **1.3.4. a. 1.- Elección**

Este ensayo permite evaluar el efecto disuasivo de los aceites esenciales y los extractos de las hojas de las especies de estudio en los insectos. Se colocaron dentro de cada placa seis discos foliares. En el caso de las hojas frescas de las nueve especies, se colocaron tres discos de maíz y tres de una de las especies de *Bursera* a ensayar, colocados alternadamente, utilizando una placa por especie. En el caso de aceites esenciales y extractos, a tres de los discos se les aplicó de forma homogénea la muestra problema y a los otros tres 20  $\mu\text{L}$  del solvente (control); los discos se alternaron dentro de cada caja, de tal forma que el insecto podía elegir entre los discos foliares tratados y los no tratados, con cinco repeticiones por tratamiento. El ensayo finalizó cuando las larvas consumieron alrededor del 50% de los discos foliares.

#### **1.3.4. a. 2.- No elección**

Este ensayo evalúa el potencial fagodisuasivo de los aceites esenciales o de los extractos MeOH, sobre el insecto en situaciones de no elección. Los seis discos foliares de maíz fueron tratados, con 2  $\mu\text{L}$  de la muestra (extracto) a ensayar, en el caso del control, a los seis discos se les aplicó solo el disolvente, se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. El ensayo se dá por finalizado cuando las larvas han ingerido el 75% de los discos foliares en la caja control (Diagrama 1).

Diagrama. 1.-



#### **I.3.4.b.- Suministrados en la dieta artificial**

##### **I.3.4.b.1) Hojas secas**

Las hojas secas ya molidas de las nueve especies se mezclaron homogéneamente en la dieta artificial, a una proporción de 5 g/100 g y 10 g/100 g de dieta preparando 300g de dieta, para cada una de las concentraciones.

Se utilizaron recipientes de plástico de 30 ml, a los que se les adicionó 10 ml de dieta. Una vez solidificada, se colocaron 3 larvas neonatas por recipiente, sellándolos con película autoadherible, tela y una liga (para evitar fugas). El número de repeticiones por tratamiento, incluyendo el control, fue de 32. Las

condiciones de incubación fueron las descritas previamente, por un periodo de 21 días. Se realizó una evaluación de las variables morfométricas tamaño y peso cada 7 días; al final del periodo larvario se determinó el porcentaje de pupación y sexo.

Se realizó un control positivo con hojas secas de *Azadirachta indica*, colectada en el estado de Guerrero, Municipio de Papalutla, utilizando las mismas concentraciones de hoja seca de las muestras problema de 5%/100 g y 10%/100 g de dieta, suministradas e incubadas en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, para correlacionar los resultados obtenidos (diagrama 2).

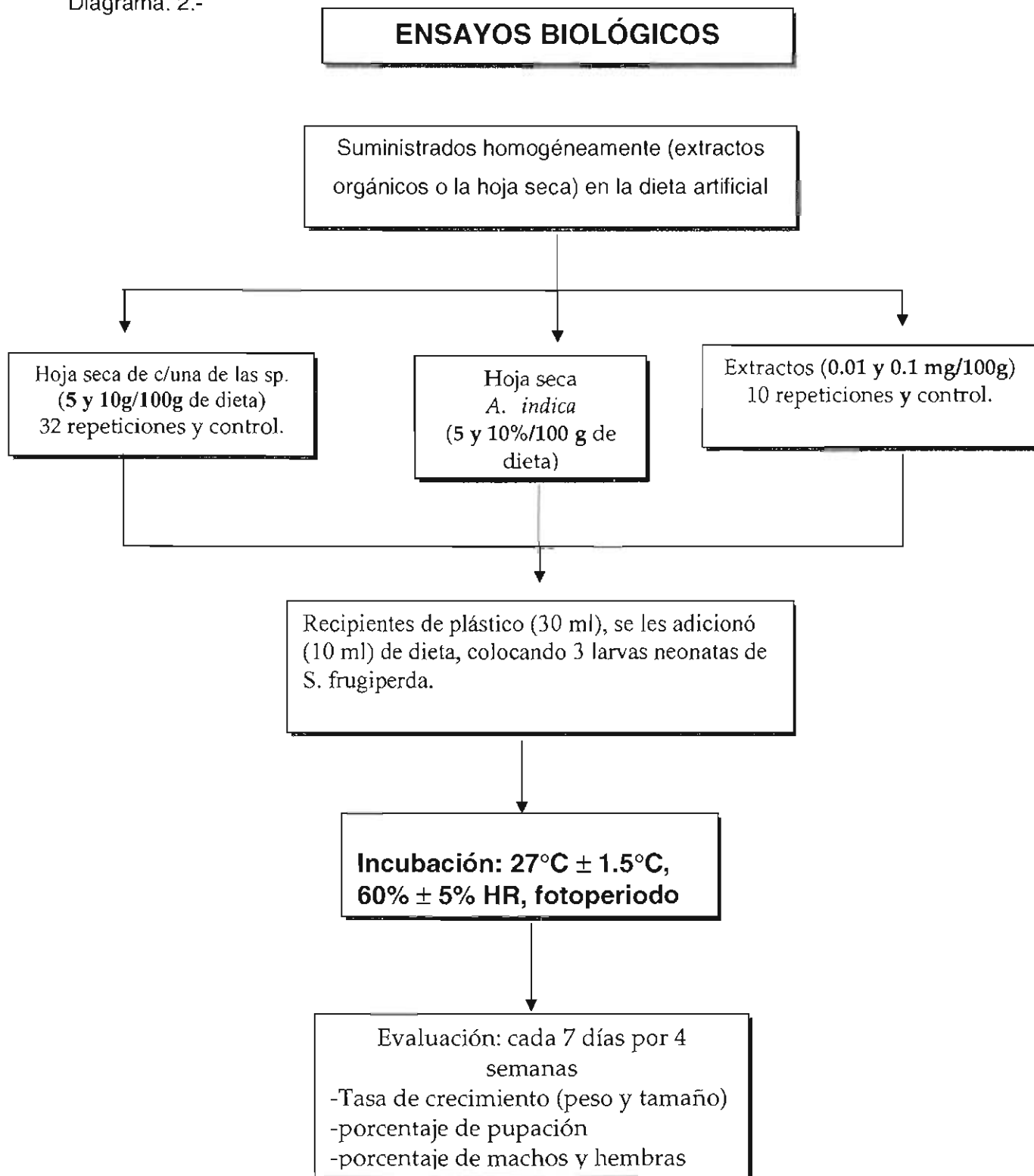
#### **I.3.4.b.2) Extractos**

Por otro lado los extractos orgánicos (hexánico, acetónico y metanólico) de las hojas de cinco especies, fueron suministrados en la dieta artificial de las larvas neonatas de *S. frugiperda*, a una concentración de 0.01 mg/100g y 0.1 mg/100g de dieta. Las cajas fueron incubadas en las condiciones antes descritas, así como los parámetros a evaluar. Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento, con su respectivo control (diagrama 2).

#### **I.3.5.- Análisis estadístico**

Con los resultados obtenidos de los ensayos de hoja seca y extractos suministrados en la dieta artificial del insecto, se realizó un análisis multivariado, utilizando la prueba de Tukey HSD, la cual hace una comparación entre los grupos (variables de estudio), con una  $p \leq 0.05$ , para cada uno de los tratamientos, utilizando el programa statistica v.11 para ambiente windows.

Diagrama. 2.-



#### I.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La revisión de los ejemplares de herbario y la determinación taxonómica fueron llevadas a cabo en colaboración con el Mtro. José Luis Contreras, las especies fueron depositadas en el herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con la siguiente determinación:

---

<b>ESPECIE</b>	<b>SECCIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>No. depósito</b>
<i>B. grandifolia</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante rojiza (mulatos)	HUAP11769
<i>B. longipes</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante rojiza (mulatos)	HUAP11779
<i>B. morelensis</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante rojiza (cuajote rojo)	HUAP11780
<i>B. lancifolia</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante amarillenta (cuajote amarillo)	HUAP11771
<i>B. aptera</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante amarillenta, (cuajote amarillo)	HUAP 11772
<i>B. glabrifolia</i>	<i>Bursera</i>	Corteza exfoliante amarillenta (cuajote amarillo)	HUAP11773
<i>B. aleoxylon</i>	<i>Bullockia</i>	Corteza lisa (copal)	HUAP11770
<i>B. velutina</i>	<i>Bullockia</i>	Corteza lisa (copal)	HUAP11776
<i>B. submoniliformis</i>	<i>Bullockia</i>	Corteza lisa (copal)	HUAP11777

---

### I.4.1.- Pruebas químicas

De los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de las hojas de cinco especies de *Bursera*, se obtuvieron los siguientes resultados de las pruebas de grupos químicos:

#### HEXÁNICO

	<i>B. grandifolia</i>	<i>B. aleoxyllon</i>	<i>B. lancifolia</i>	<i>B. longipes</i>	<i>B. aptera</i>
Terpenos	++	++	++	+	++
Flavonoides	-	+	+	-	+
Glucósidos	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-

#### ACETÓNICO

Terpenos	+	++	+++	++	++
Flavonoides	+	+	+	+	+++
Glucósidos	+	+	+	+	+
Alcaloides	++	++	++	++	++

#### METANÓLICO

Terpenos	+	+	++	+	++
Flavonoides	+	+	+	++++	++
Glucósidos	+	+	+	+	++
Alcaloides	-	-	-	-	-

Estas pruebas son cualitativas, por lo que el signo (+), denota la coloración o precipitación, para determinar la presencia de los grupos de metabolitos secundarios.



En el extracto hexánico se observó en general la presencia de dos grupos, principalmente terpenos y ligeramente alcaloides; este último grupo no se detectó, en *B. grandifolia* y *B. longipes*.

En el extracto acetónico se observó la presencia de los cuatro grupos, principalmente terpenos y alcaloides, y en menor grado flavonoides y glucósidos. La actividad de los metabolitos secundarios puede manifestarse sobre los quimiorreceptores presentes en el aparato bucal y en las antenas del insecto (Huotari *et al.*, 2003), algunos terpenos y alcaloides antialimentarios actúan sobre las maxilas del insecto (Bernays *et al.*, 2002).

En general, en los extractos metanólicos de las cinco especies, se observó la presencia de tres grupos: primordialmente terpenos, seguido de flavonoides y en menor grado de glucósidos. Los terpenos se observaron principalmente en *B. lancifolia* y *B. aptera*; la presencia de flavonoides es considerable en *B. longipes*, y en todas las especies se observó la ausencia de alcaloides.

La detección de terpenos y flavonoides en todos los extractos de hojas, sugiere la importancia de fraccionar, aislar y caracterizar estos compuestos y su utilización en la realización de ensayos biológicos.

## **I.4.2.- Ensayos biológicos**

### **I.4.2.1.- Elección, No elección**

A fin de determinar o tratar de conocer el periodo de respuesta del insecto durante el 1er estadio larval, las cajas se monitorearon a las 24 h. Se observó el 100% de mortandad de las larvas a las que se les suministró *B. aleoxyllon* y *B. aptera* (Tabla 2).

Todas las larvas a las que se les suministró *B. grandifolia*, *B. glabrifolia* y *B. velutina*, sobrevivieron aunque el consumo fue mínimo. En el caso de *B. longipes*, solo sobrevivió un 70% de las larvas.

Debido a que en estos casos, el consumo fué muy mínimo (no cuantificable), los resultados que se muestran en la Tabla 2, son cualitativos.

Finalmente en *B. lancifolia* y *B. submoniliformis*, sobrevivió el 80% de las larvas y en *B. morelensis* el 40%, pero no hubo consumo.

En general las larvas sobrevivientes, tenían muy poca movilidad, observándose migración hacia la parte superior de la caja. Aspecto importante ya que existe una mayor susceptibilidad en este estado larvario.

Estos resultados sugieren un efecto disuasivo de la alimentación causado por las especies mencionadas y la importancia de considerar en evaluaciones posteriores estadios larvales más avanzados, en virtud de la mayor susceptibilidad que presentan las larvas neonatas o de primeros estadios son más sensibles a los aleloquímicos que estadios más avanzados (Champagne *et al.*, 1992).

Especie	Sobrevivencia	Mortandad	Consumo	Características de las larvas
	(%)	(%)		
<i>B. aleoxyllon</i>	0	100	-	muertas en la parte superior de la caja.
<i>B. aptera</i>	0	100	-	muertas en la parte superior de la caja
<i>B. grandifolia</i>	100	0	poco	poca movilidad
<i>B. grabrifolia</i>	100	0	poco	poca movilidad, probaron y migraron.
<i>B. velutina</i>	100	0	poco	poca movilidad.
<i>B. longipes</i>	70	30	poco	poca movilidad. (en las orillas de la caja.
<i>B. lancifolia</i>	80	20	-	poca movilidad
<i>B. submoniliformis</i>	80	20	-	poca movilidad
<i>B. morelensis</i>	40	60	-	poca movilidad

Tabla. 2.- Resultados del bioensayo de preferencia, con hojas frescas de las diferentes especies de *Bursera*

Cuando les fueron suministrados a las larvas los extractos orgánicos y los aceites esenciales se observó el 100% de mortandad en todos los casos.

Lo que puede sugerir un efecto tóxico de estos compuestos en las larvas de *S. frugiperda*, debido a que éstas no consumieron absolutamente nada y murieron al poco tiempo de haber sido colocadas en la caja, además se observó un comportamiento de escape.

### I.4.3.- Suministrados en la dieta artificial

En el ensayo donde se les suministraron hojas secas de las 5 primeras especies a probar, en las concentraciones de ( 5 y 10 g/100g de dieta), (Figuras 4-7) se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos con las especies de *Bursera*, sobre el crecimiento de *S. frugiperda* con respecto al control (0.0027 mg en peso y 0.5208 cm en tamaño), principalmente en los organismos que se trataron con *B. lancifolia* (0.0006 mg, 0.2833 cm) y *B. aptera* (0.0006 mg, 0.3000). Se observó un decremento en la tasa de crecimiento (en tamaño y peso) de este insecto, en todos los tiempos de evaluación y 100% de mortandad a partir de los 14 días en el tratamiento al 5% con *B. aptera* y a los 21 días en estas dos especies activas (Figuras 4-7).

El periodo de medición se consideró hasta los 28 días, ya que después de este tiempo las larvas de los tratamientos comenzaron a pupar; en el control en este tiempo ya habían pupado.

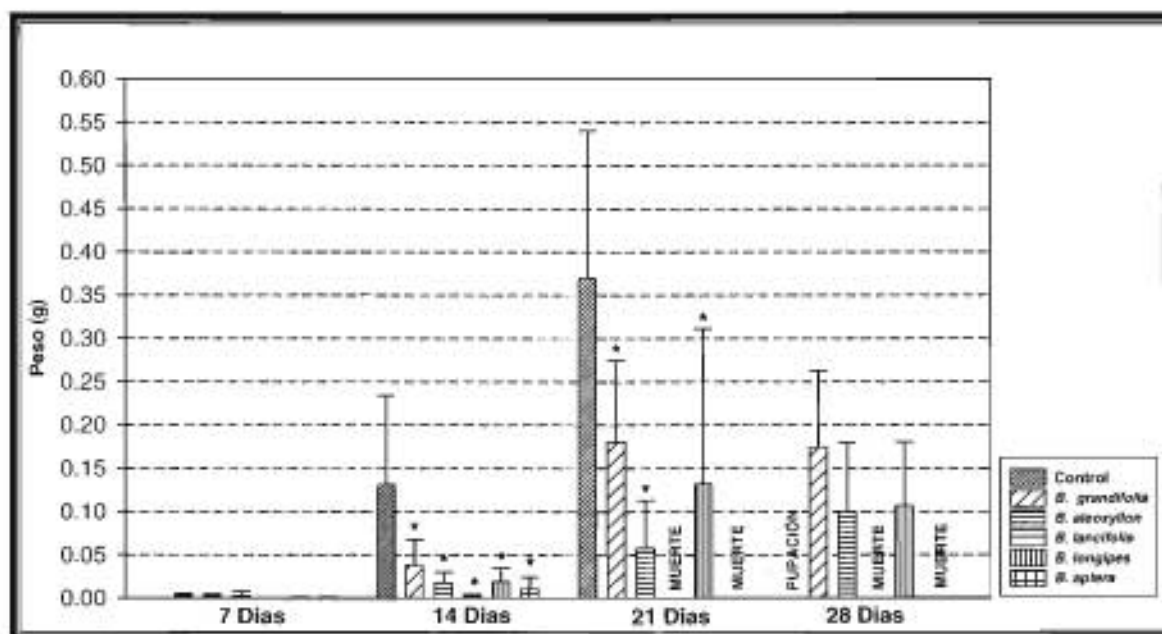


Figura 4. Efecto de las hojas secas 5% de 5 especies de *Bursera*, sobre el peso de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

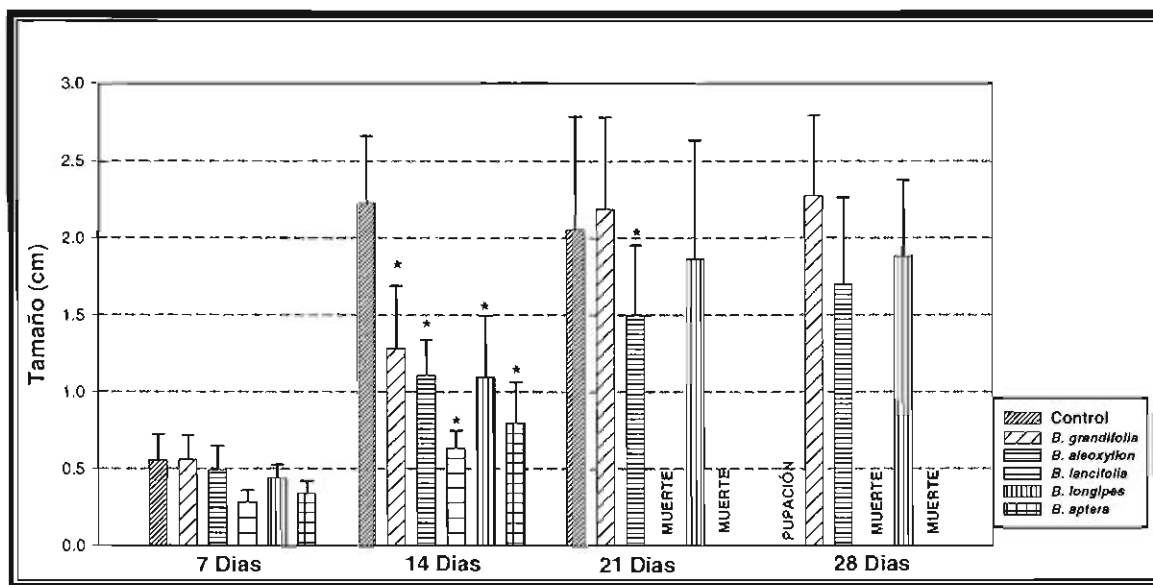


Figura 5. Efecto de las hojas secas 5% de 5 especies de *Bursera*, sobre el tamaño de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

En cuanto a las otras cuatro especies que se probaron (*B. glabrifolia*, *B. velutina*, *B. submoniliformis* y *B. morelensis*), se observó que en las larvas de *S. frugiperda* a las cuales se les suministró en la dieta *B. velutina*, la tasa de crecimiento (peso y tamaño) (Figuras 8-11), se vió afectada (disminución) de manera considerable en ambos tratamientos de (5 y 10 g/100 g de dieta), siendo más notorio en la mayor concentración de hoja seca (0.0004 mg en peso y 0.1800 cm de tamaño), en comparación con las otras especies y el control (0.0039 mg, 0.7194 cm). A los 14 días murieron todas. Otra de las especies que también disminuyó el peso y tamaño del insecto fue *B. morelensis*, también en las dos concentraciones (0.0033 mg, 0.6125 cm), aunque fue menor el efecto que el de *B. velutina* (Figuras 8-11). Sin embargo, todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes con respecto al control, en los dos parámetros a evaluar, peso y tamaño, siendo las especies más activas *B. velutina* y *B. morelensis*.

En todos los casos el periodo de medición se consideró hasta los 21 días, ya que después de este tiempo comenzaron a pupar.

En general en todos los ensayos realizados con las hojas de las diferentes especies de *Bursera* se observa que los organismos tienen un peso menor y

mayor tamaño. En cuanto a las concentraciones utilizadas se observa una disminución de las dos variables en la mayor concentración de hoja (10%).

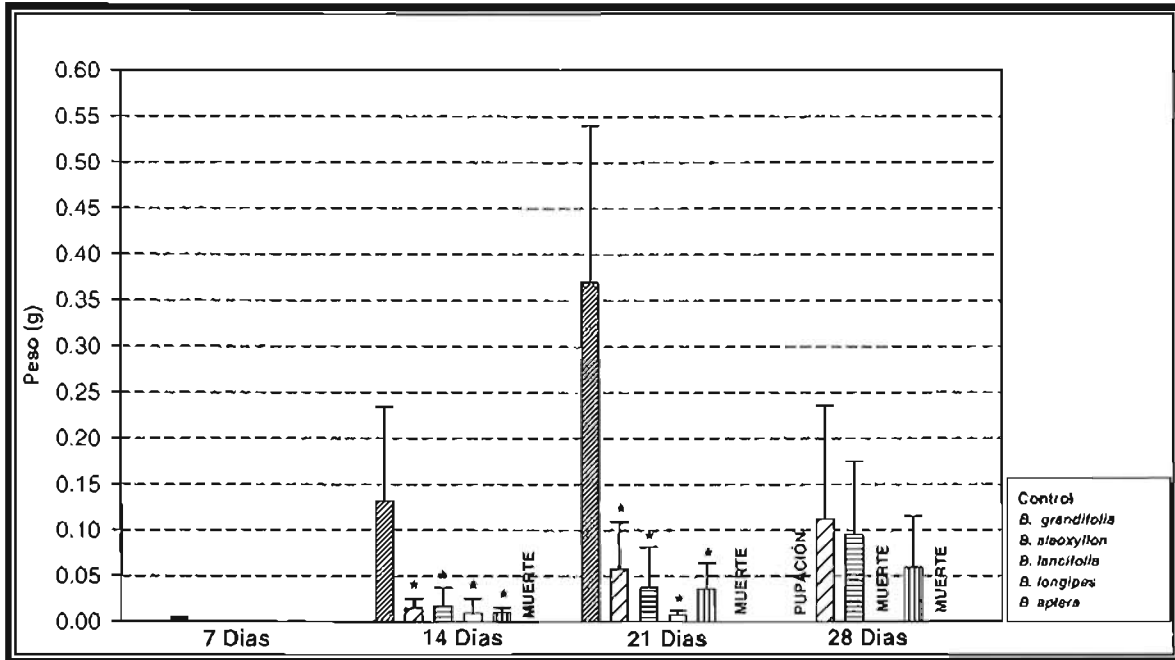


Figura 6. Efecto de las hojas 10% de 5 especies de *Bursera*, sobre el peso de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

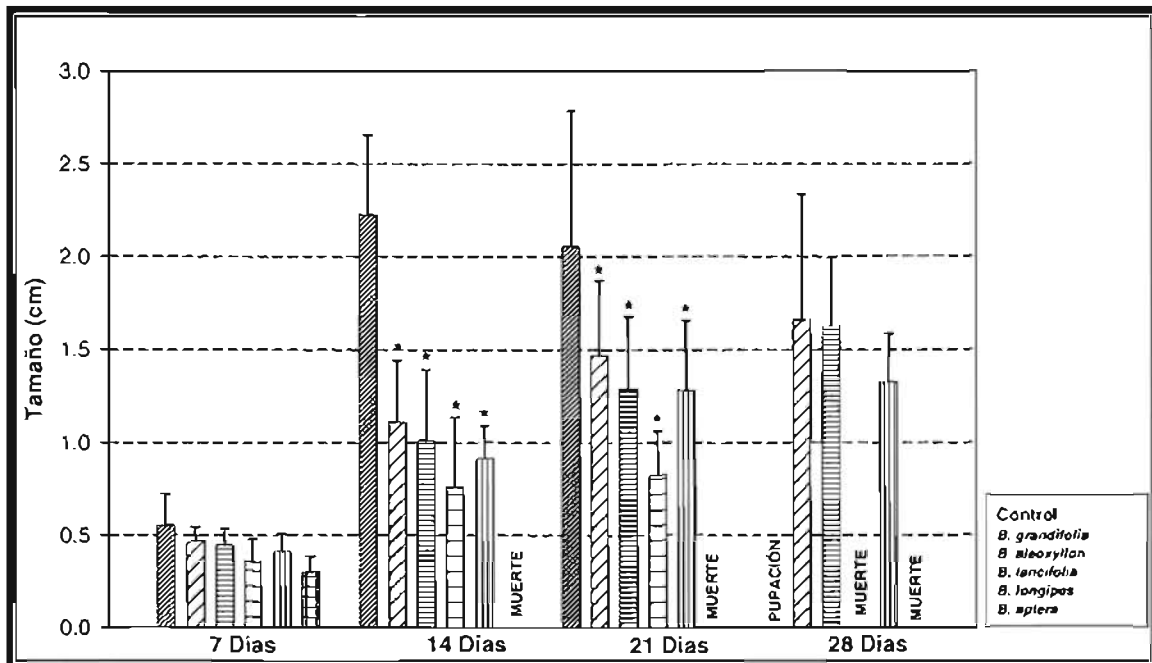


Figura 7. Efecto de las hojas (10%) en 5 especies de *Bursera*, sobre el tamaño de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

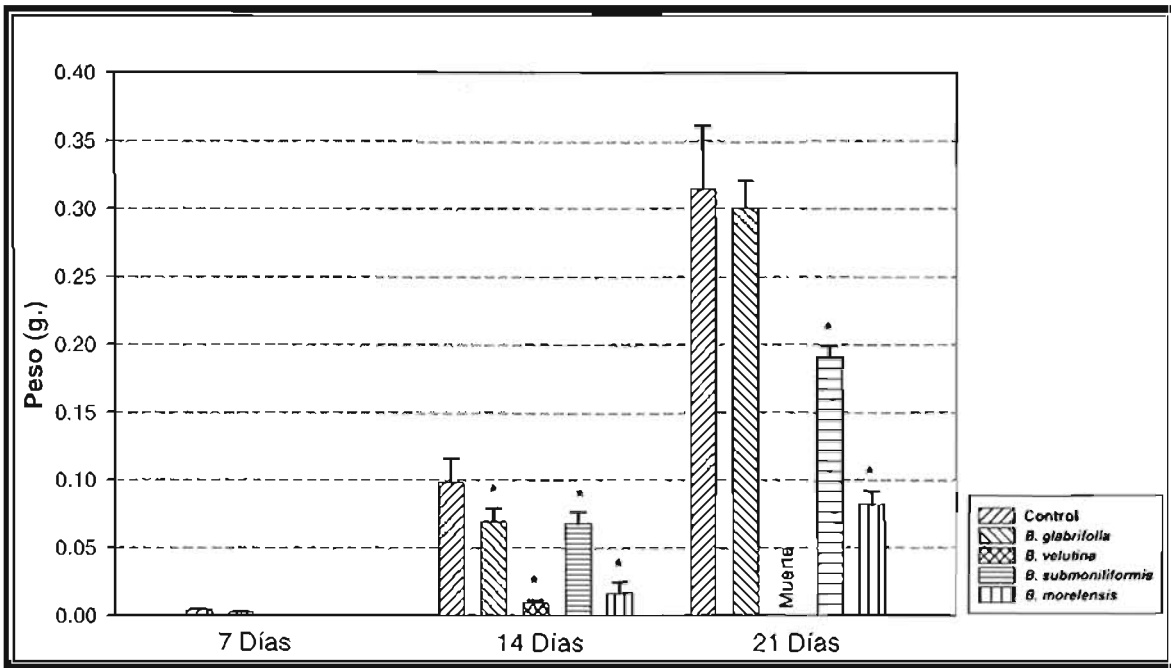


Figura 8. Efecto de las hojas (5%) de 4 especies de *Bursera*, sobre el peso de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

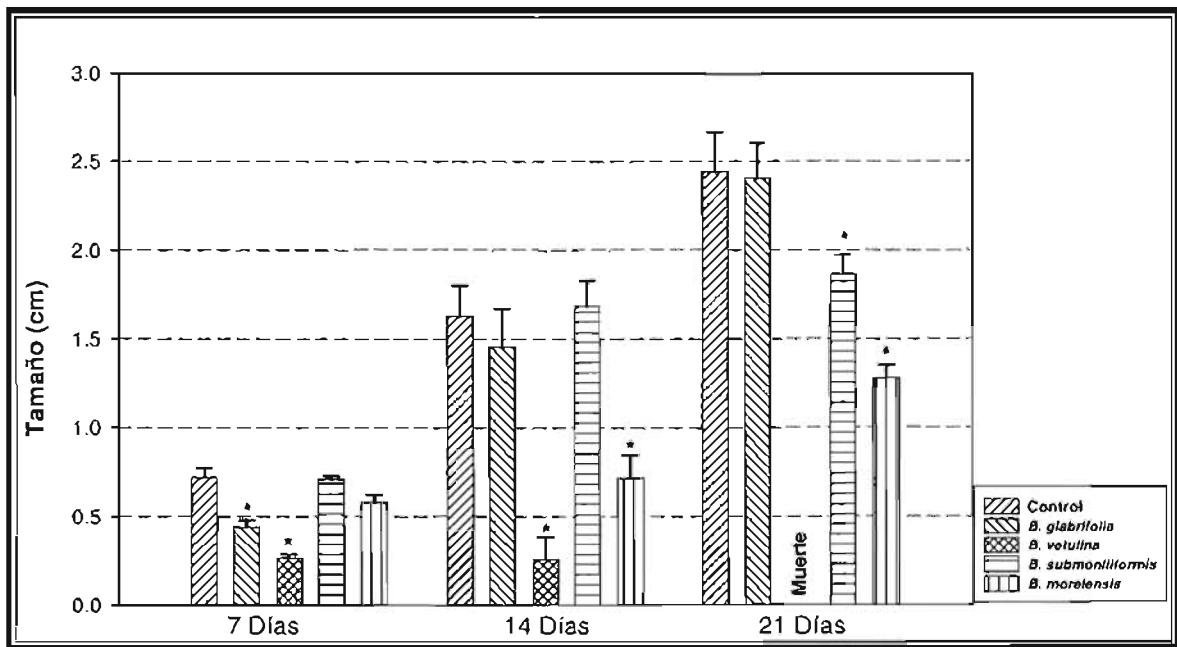


Figura 9. Efecto de las hojas (5%) de 4 especies de *Bursera*, sobre el tamaño de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

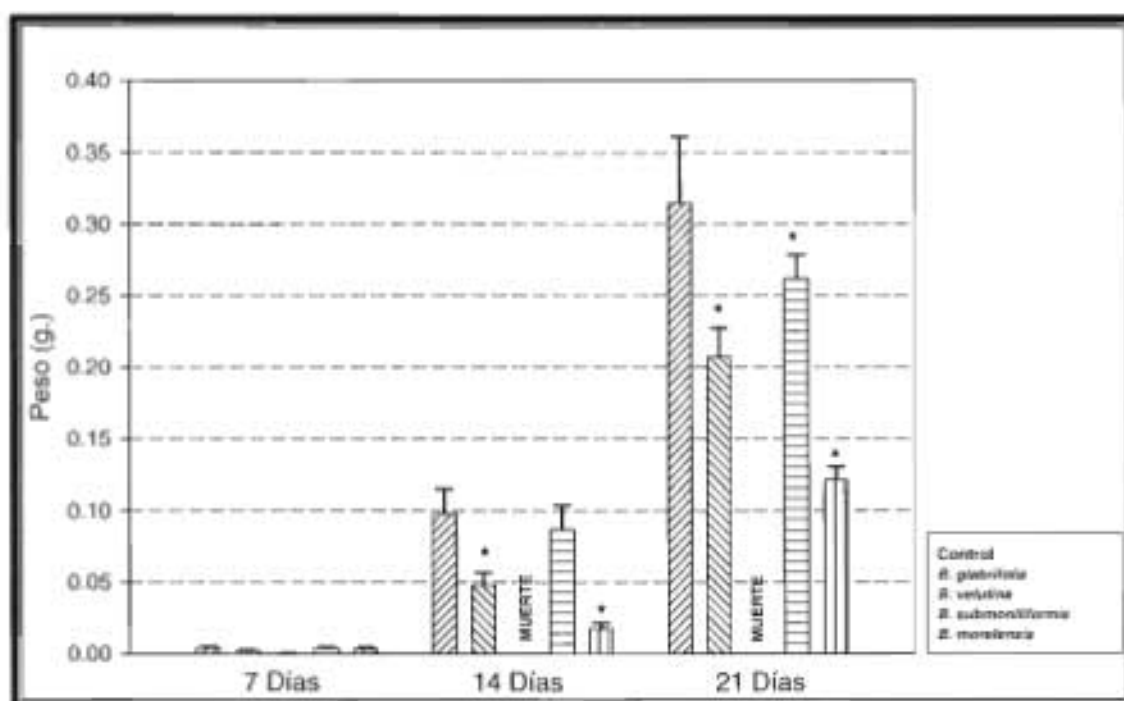


Figura 10. Efecto de las hojas (10%) de 4 especies de *Bursera*, sobre el peso de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

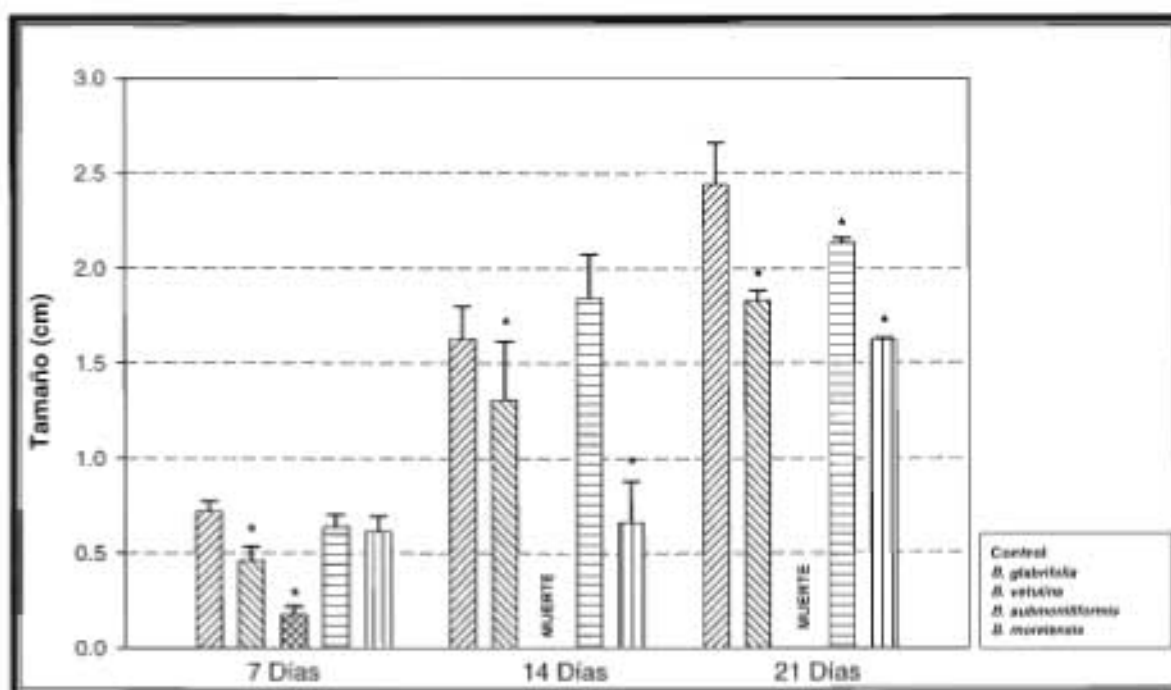


Figura 11. Efecto de las hojas (10%) de 4 especies de *Bursera*, sobre el tamaño de *S. frugiperda*, cuando fueron suministradas en la dieta.

#### 1.4.4.- Pupación

De las nueve especies de plantas ensayadas: los insectos tratados con seis de las especies *B. grandifolia*, *B. aleoxyllon*, *B. longipes*, *B. glabrifolia*, *B. submoniliformis* y *B. morelensis*, llegaron al estadio de pupa en el tratamiento de 5g/100 g de dieta (Figura 12). En el de 10 g/100 g de dieta, puparon solo los tratados con tres de las especies de estudio: *B. glabrifolia*, *B. submoniliformis* y *B. morelensis* (Figura 13).

El mayor porcentaje de pupación se encontró en el tratamiento con *B. submoniliformis*, en ambas concentraciones. Las especies que más afectaron este último estadio fueron *B. aleoxyllon* y *B. longipes* con un 14%, seguida *B. morelensis* con un 20% para la concentración del 5% de planta seca. Para el 10%, en *B. morelensis* pupó solo el 15%, observándose que la especie que tuvo mayor efecto en el porcentaje de pupación en ambos tratamientos fue *B. morelensis*.

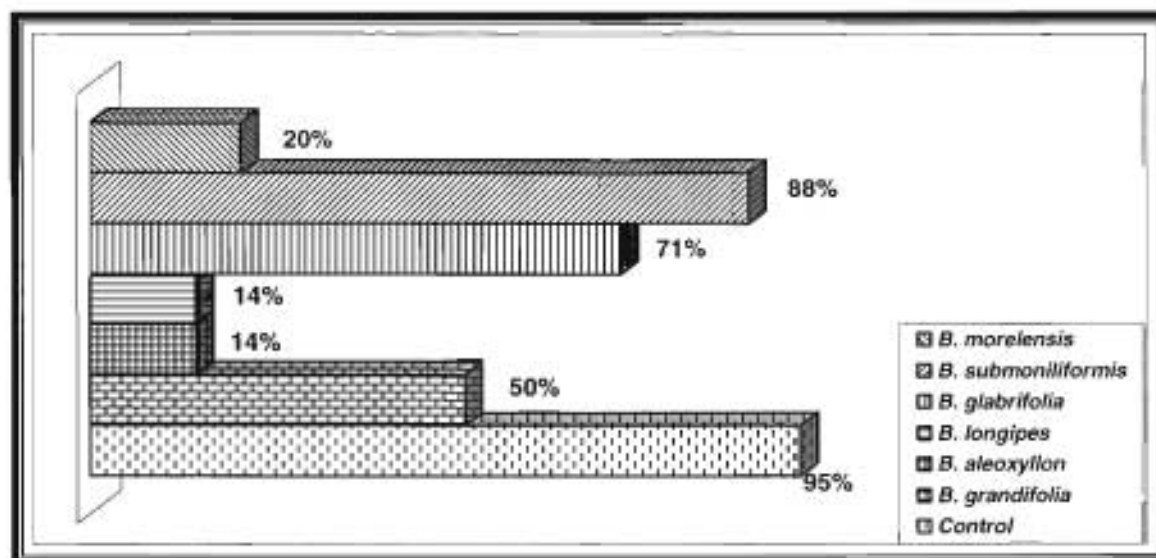


Figura 12. Porcentaje de pupación en los organismos tratados con hoja seca al 5%, de las nueve especies del género *Bursera*.



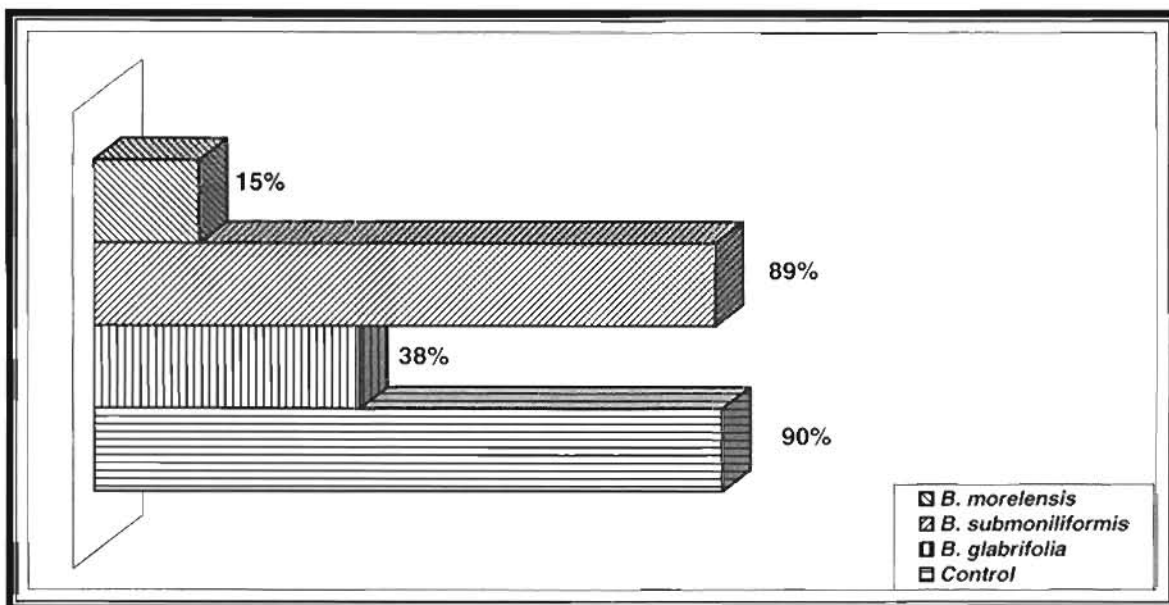


Figura 13. Porcentaje de pupación en los organismos tratados con hoja seca al 10%, de las nueve especies del género *Bursera*.

#### I.4.5.- Sexo

Las pupas que emergieron (adulto-palomilla) fueron las tratadas con tres de las especies, *B. glabrifolia*, *B. submoniliformis* y *B. morelensis*, para ambas concentraciones, observándose en general, que al 5% hubo mayor emergencia de hembras que machos (Figura 14), excepto para *B. glabrifolia* donde del 71% que puparon, el 45% fueron machos, de los cuales el 10% presentaron deformidades. El 26% fue de hembras con un 5% deformes.

En *B. submoniliformis* del 88% que pupó, el 8% murió como pupa y del 80% restante, 35% fueron machos de los cuales el 25% presentaba deformidades. El 45% restante fueron hembras con un 18% de deformes.

Para *B. morelensis*, del 20% que llegaron a pupa un 5% murió en este estadio, el 6% fueron palomillas macho, la mitad de los cuales eran deformes. El 9% fueron hembras, la mayoría deformes (7%) y el resto fueron hembras normales morfológicamente. Con *B. morelensis* se observaron considerables alteraciones en las palomillas.

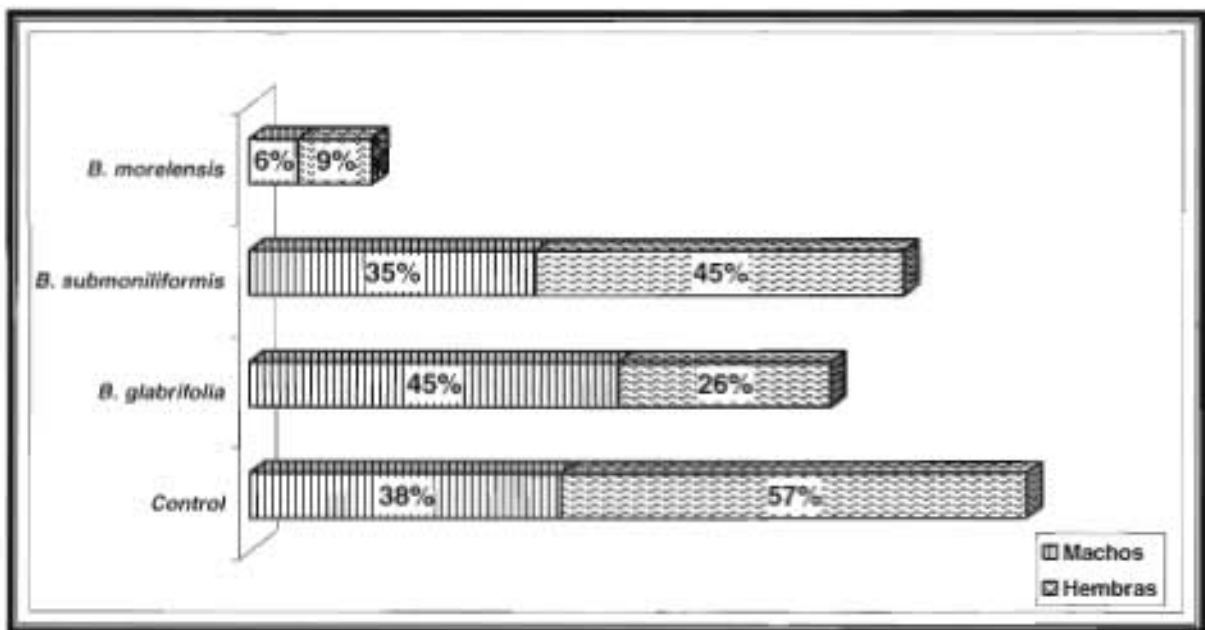


Figura 14. Porcentaje de machos y hembras, tratados con hoja seca al 5%, de las nueve especies del género *Bursera*.

En la concentración de 10% (Figura 15), del 38% de los organismos que puparon, en el tratamiento con *B. glabrifolia*, el 5% murió como pupa, el 18% fueron machos (10% deformes) y el 15% hembras (7% deformes). Para *B. submoniliformis* del 89% que pupó, el 10% murió, el 63% emergieron a palomillas macho (52% deformes) y el 16% a hembras (7% deformes). Finalmente en los organismos tratados con *B. morelensis*, del 15% que llegaron a pupar, el 5% murió como pupa, el 6% fueron machos (4% deformes) y el 4% hembras (3% deformes). En general se puede decir que de las tres especies, la que más afectó los últimos estadios de desarrollo de *S. frugiperda*, fue *B. morelensis*, en ambas concentraciones, siendo más evidente para la mayor concentración (10%), seguida *B. glabrifolia* y *B. submoniliformis*, observándose un efecto menor en esta última especie.

Sin embargo, a pesar de que estos organismos tratados con estas tres especies llegaron a palomillas, es considerable el porcentaje de adultos deformes en ambos sexos, por lo que sería difícil con estos organismos anormales lograr una progenie viable si es que la hubiera.

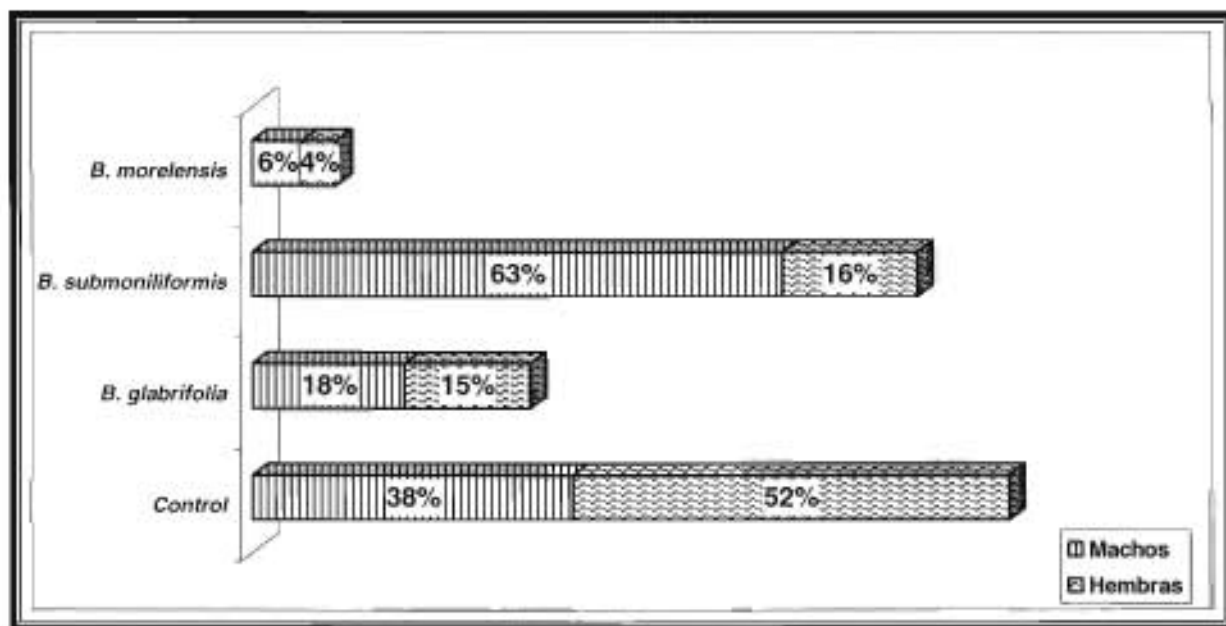


Figura 15. Porcentaje de machos y hembras, tratados con hoja seca al 10%, de las nueve especies del género *Bursera*.

#### I.4.6.- Extractos

De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba de Tukey, en los bioensayos con los extractos hexánicos en la concentración de (0.01 g/100g de dieta, se observa que los organismos tratados, principalmente con *B. longipes* (0.0214 mg en peso y 0.8636 cm en tamaño), disminuyeron su tasa de crecimiento, seguida *B. aleoxylon* (0.0324 mg, 1.32 cm), en comparación con el resto de las especies y el control (0.0334 mg, 1.41 cm), Figuras 16 y 17. En la mayor concentración (0.1 g), *B. grandifolia* afectó más el crecimiento del insecto (0.0175 mg, 0.9500 cm), así como *B. aptera* (0.0260 mg, 0.9444 cm).

En este ensayo solo se evaluó el 1er. estadio larval (hasta los 7 días), ya que para el siguiente estadio pocas larvas sobrevivieron (y no de todas las especies), los cuales no eran cuantificables estadísticamente.

Todos los organismos que se trataron con los extractos acetónicos murieron antes del primer periodo a evaluar.

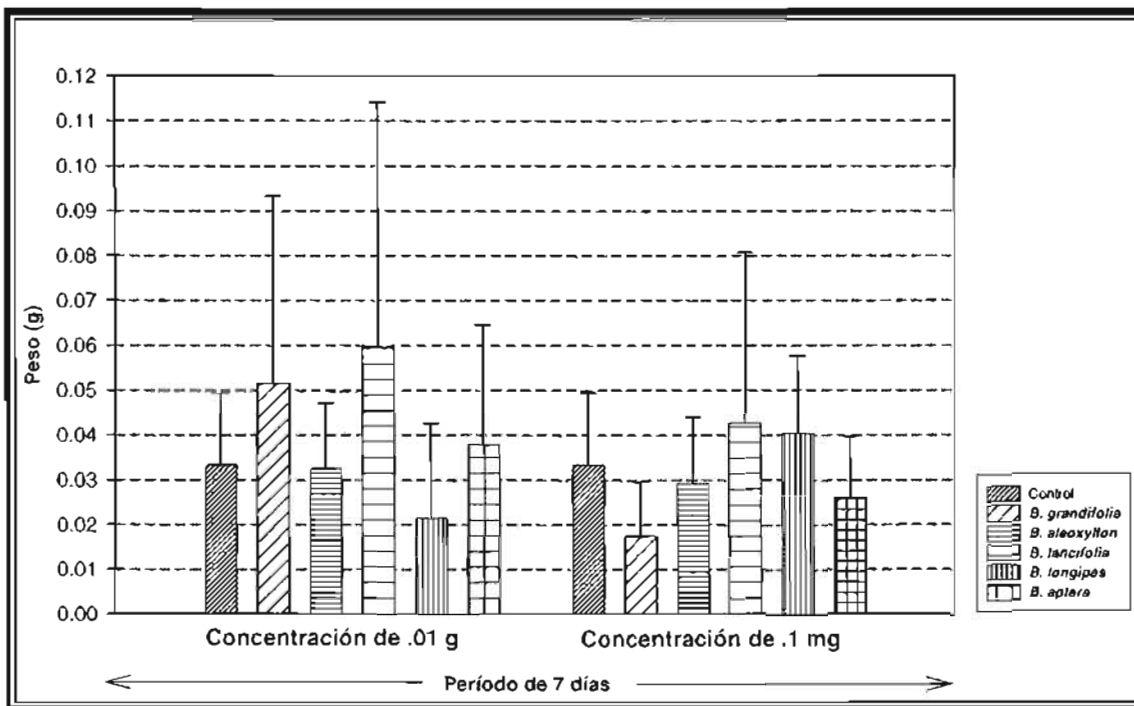


Figura 16. Efecto de los extractos hexánicos suministrados en la dieta (0.1 g) y (0.01 g) sobre el peso de *S. frugiperda*.

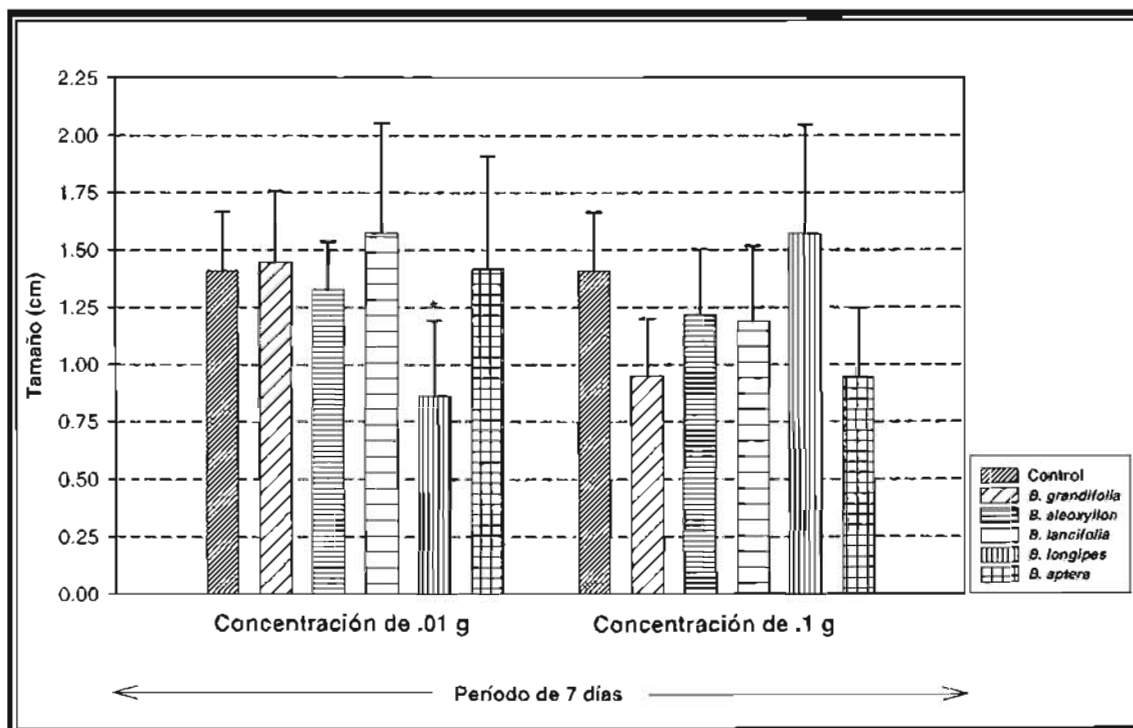


Figura 17. Efecto de los extractos hexánicos suministrados en la dieta (0.1 g) y (0.01 g) sobre el tamaño de *S. frugiperda*.

Para los extractos metanólicos (Figuras 18-21), en general se observa un mismo comportamiento de las variables dependientes con las dos concentraciones. La especie más activa para la concentración de 0.01 mg es *B. grandifolia* (0.0060 mg en peso y 0.7700 en tamaño), a los 7 días y a los 14 días 0.1376 mg y 1.9667 cm, (Figuras 18 y 19).

En cuanto a la concentración de 0.1 g/100 g de dieta (Figuras 20 y 21), la especie que más afectó el crecimiento de *S. frugiperda* fue *B. lancifolia* (0.0026 mg en peso, 0.4500 cm en tamaño), seguido de *B. aleoxyllon* (0.0044 mg, 0.5000 cm) y *B. aptera* (0.0047 mg, 0.5400 cm), observando en estas especies diferencias con respecto al control, en todos los tiempos de evaluación.

En general el crecimiento de los insectos disminuyó cuando se les suministraron los extractos en la mayor concentración, con respecto al control. Siendo el extracto acetónico el de mayor efecto sobre los parámetros evaluados.

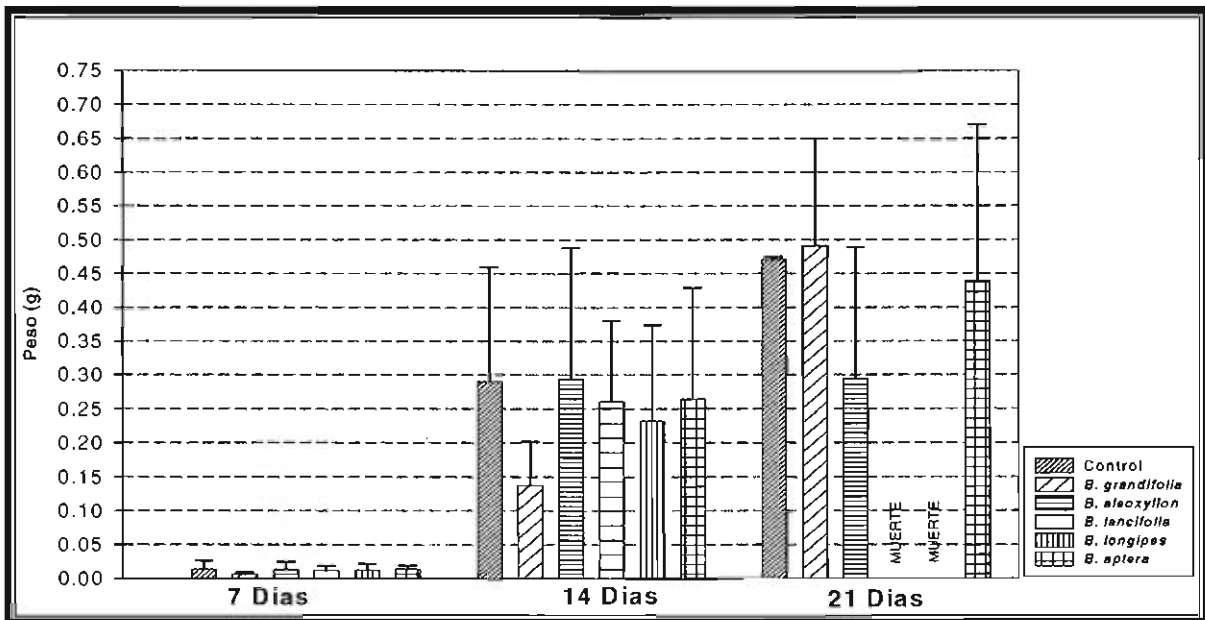


Figura 18. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.01 g), sobre el peso de *S. frugiperda*.

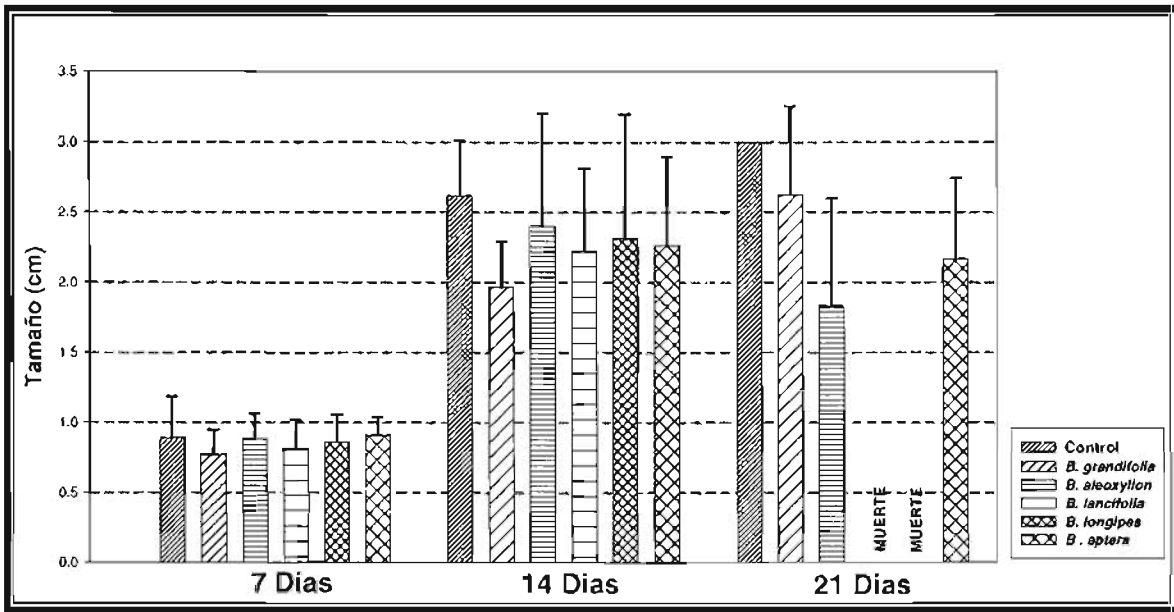


Figura 19. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.01 g), sobre el tamaño de *S. frugiperda*.

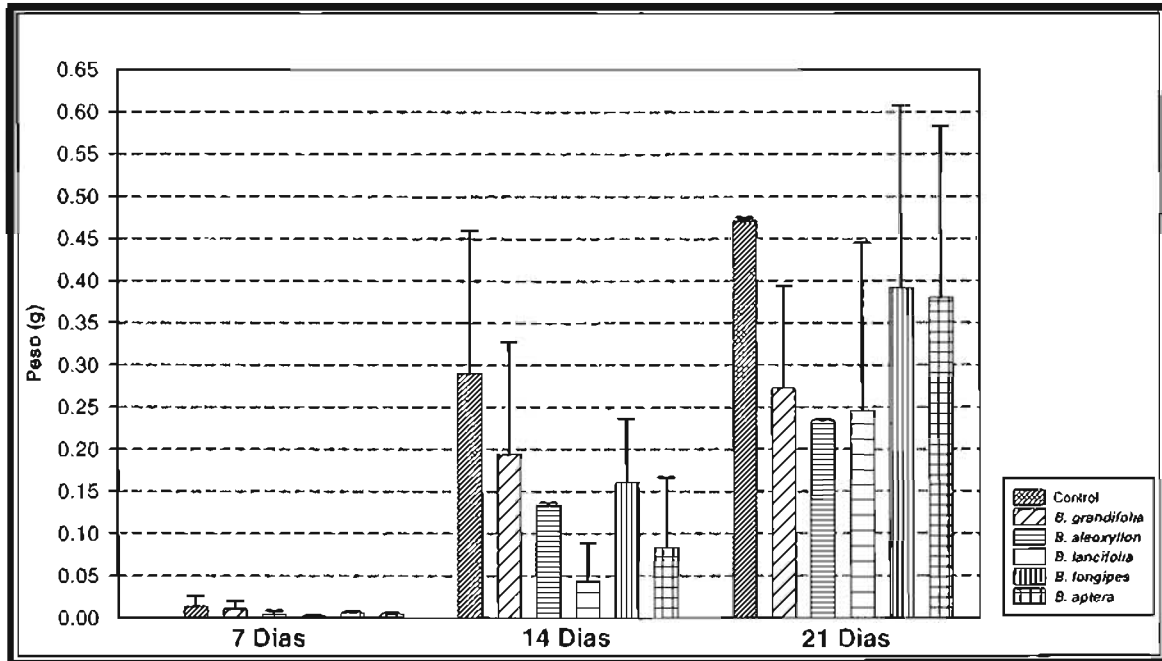


Figura 20. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.1 g), sobre el peso de *S. frugiperda*.

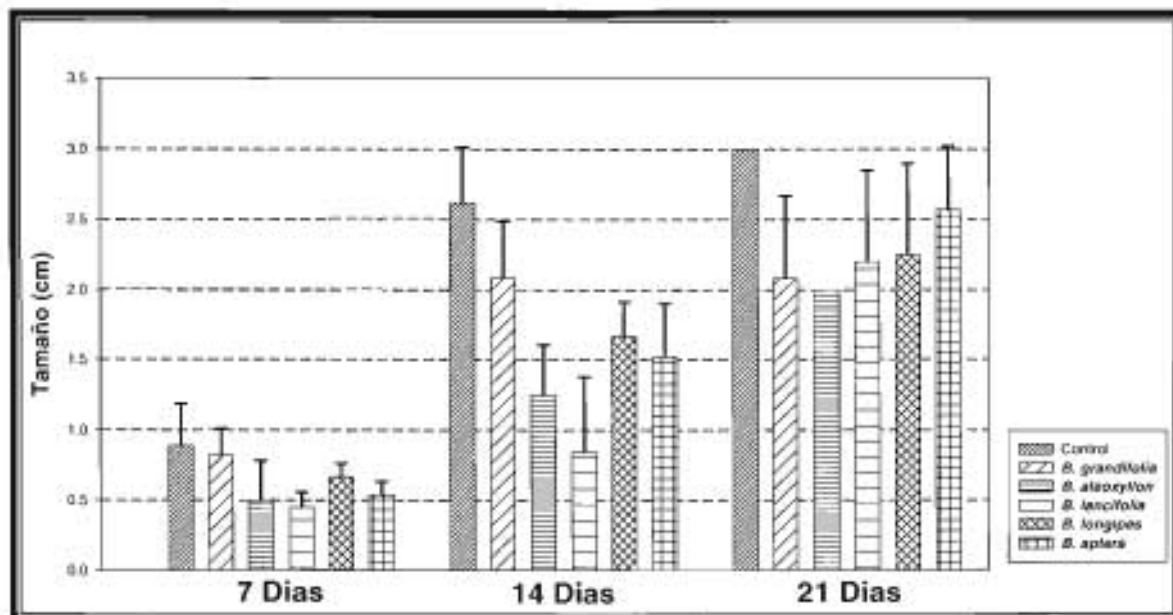


Figura 21. Efecto de los extractos metanólicos suministrados en la dieta (0.1 g), sobre el tamaño de *S. frugiperda*.

#### I.4.7.- Pupación

De las cinco especies ensayadas en la concentración de 0.01 g de extracto metanólico (Figura 22), se observó que todos los insectos que sobrevivieron a estos tratamientos puparon de un 30-80% y en el control el 90%. El mayor porcentaje de pupación se encontró en *B. grandifolia*, con un 80%, y el menor en *B. longipes* con un 30%.

Para la mayor concentración 0.1 g de extracto metanólico (Figura 23), se observó que el porcentaje de pupación fue menor de un 20-60%, y en el control un 90%. El mayor porcentaje 60% se encontró en *B. aptera* y el menor, de 20%, en dos de las especies de estudio, en *B. lancifolia* y *B. aleoxyllon*.

Sin embargo, el mayor porcentaje de pupación para ambas concentraciones, se detectó en los organismos tratados con la especie *B. aptera*.

Los organismos que se trataron con los extractos hexánico y acetónico, se vieron afectados considerablemente en su desarrollo y no puparon.

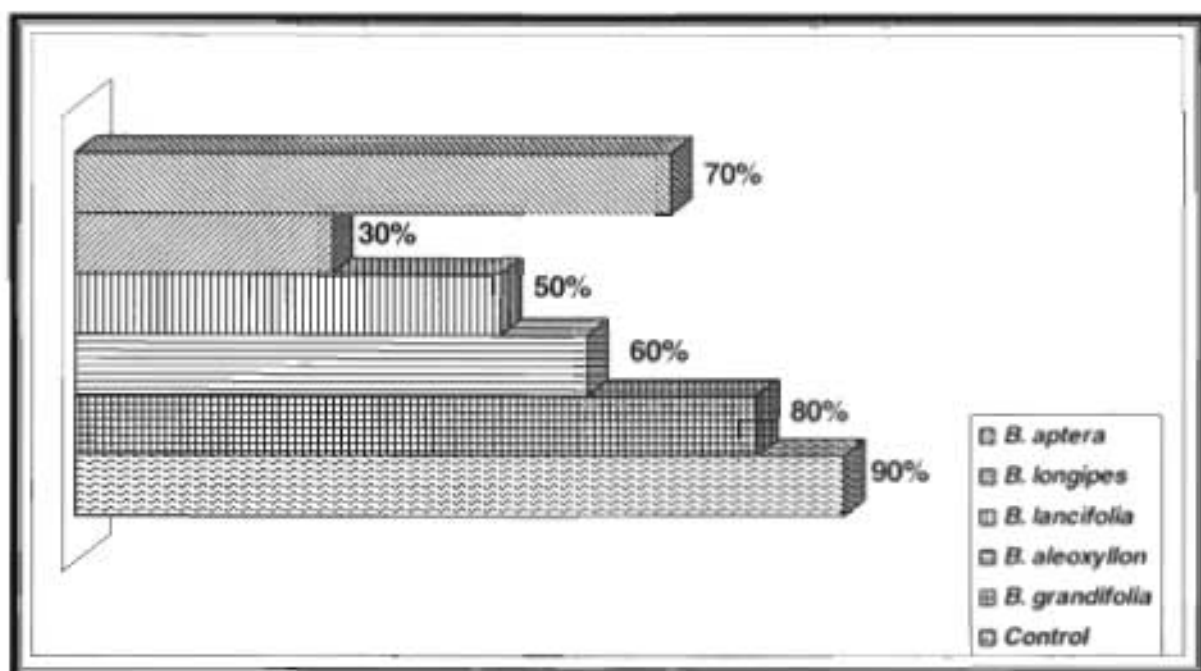


Figura 22. Porcentaje de pupación en los organismos tratados, con extracto metanólico 0.01 g de 5 especies del género *Bursera*.

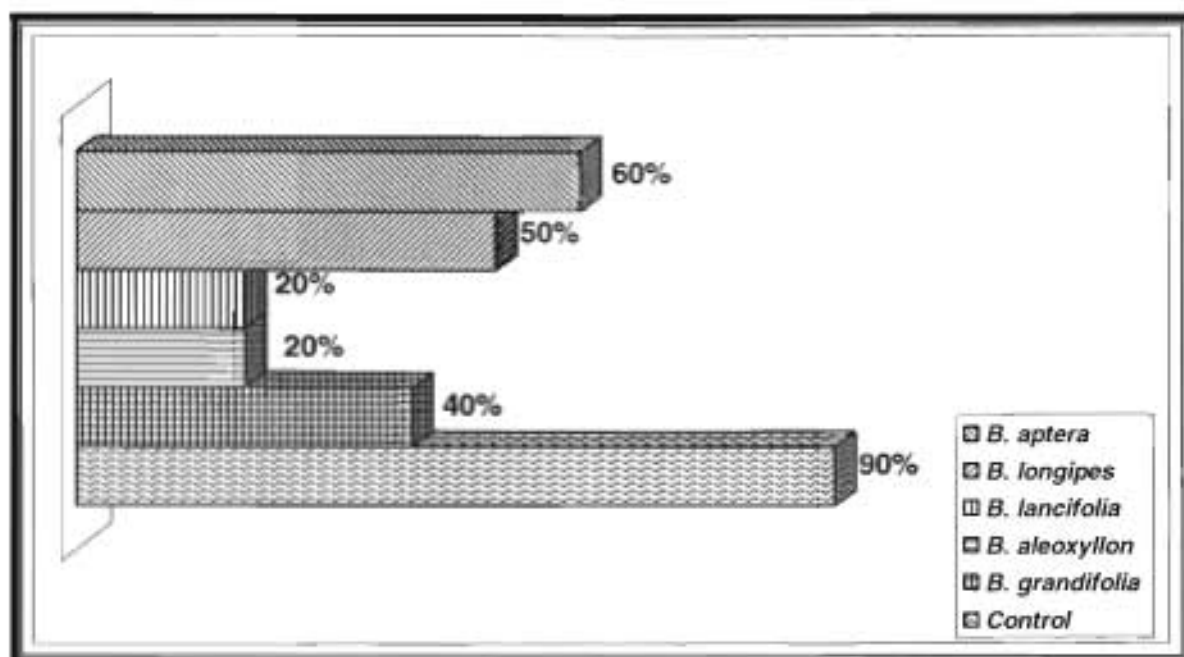


Figura 23. Porcentaje de pupación en los organismos tratados, con extracto metanólico 0.1 g de 5 especies del género *Bursera*.



#### I.4.8.- Sexo

Se observó que con las cinco especies de estudio, los individuos de *S. frugiperda* emergieron de pupas a palomillas (Figura 24), en la concentración de 0.01 g de extracto metanólico, detectándose mayor porcentaje de machos que hembras en tres de las especies, principalmente en *B. lancifolia*; del 50% que pupó, el 40% fueron machos, de los cuales el 17% presentó deformidades y el 10% restante murió como pupa. *B. aleoxyllon* tuvo un total de 60% de pupas, 5% murió, el 40% fueron machos (5% deformes) y un 15% hembras (7% deformes); y en *B. longipes*, del 30% de pupas, 5% murió, 18% fueron machos (6% deformes) y 7% hembras (3% deformes).

En las dos especies restantes emergieron más hembras que machos: en *B. grandifolia*, de un 80% de pupas, 20% murieron en este estadio, un 40% se identificaron como hembras, de las cuales un 33% presentó deformidades y el 20% restante fueron machos, presentando el 14% deformidades. En *B. aptera* de un 70% de pupación, el 15% murió, el 45% fueron hembras (20 deformes) y el 10% restante fueron machos (4% deformes) Figura 24.

El 90% de pupas del control, el 5% murieron y el porcentaje de machos y hembras fue similar, de un 40 y 45% respectivamente.

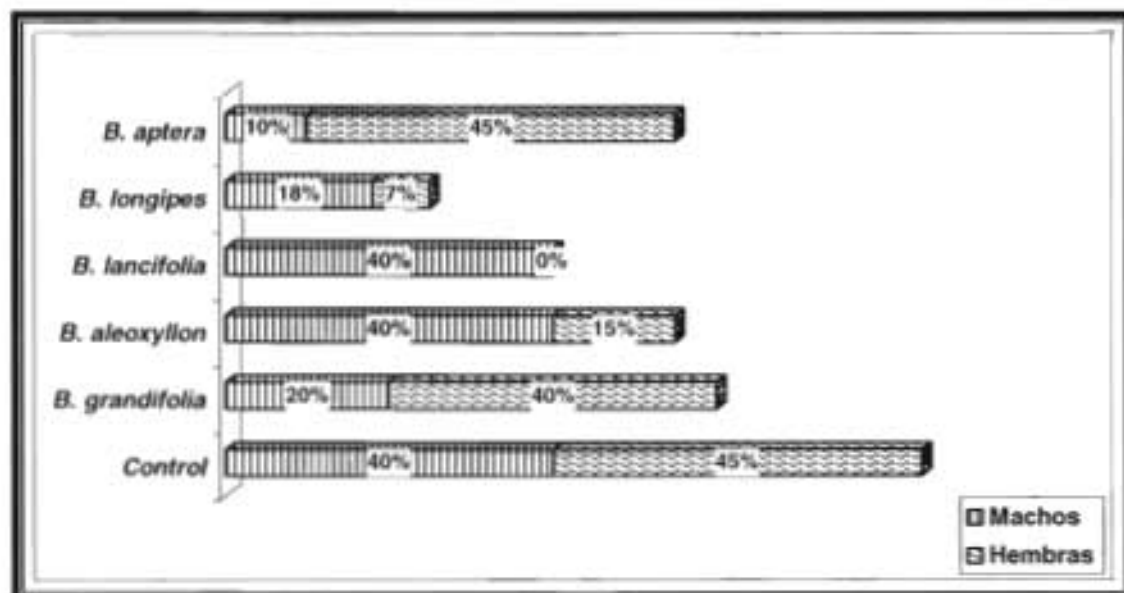


Figura 24. Porcentaje de machos y hembras, tratados con extracto metanólico 0.01 g de cinco especies del género *Bursera*.

En la concentración de 0.1g de extracto metanólico (Figura 25), la emergencia de pupas a palomillas se observó en las cinco especies. En dos especies se identificaron más hembras que machos, principalmente en *B. aptera*; del 60% que pupó, 5% murieron como pupa, 29% fueron hembras, de las cuales el 21% eran deformes, el 26% restante se identificó como machos de los cuales el 17 % presentaron deformidades. Del 50% de pupas tratadas con *B. longipes*, 7% murió, 20% fueron hembras (10% deformes) y 13% machos (4% deformes).

En las otras dos especies se identificó mayor porcentaje de machos que de hembras como en *B. grandifolia*; del 40% que pupó, 3% murió en este estadio, 20% fueron machos (9% deformes) y 17% hembras (7% deformes). En *B. aleoxyllon* de un 20% de pupas, 4% murió, 9% de machos (4% deformes) y 7% hembras (3% deformes).

En la última especie, *B. lancifolia*, que presentó el 20% de pupación, el 6% murió como pupa y el porcentaje de machos y hembras fue el mismo (7%), con un 6 y 5% de adultos deformes.

En el control, de un total de 90% de pupas, el 4% murió en este estadio y el porcentaje de machos y hembras fue muy similar (42 y 44% respectivamente) (Figura 25).

Las especies que más afectaron el último estadio del ciclo de vida de *S. frugiperda* fueron: *B. grandifolia* para la concentración de 0.01g, *B.lancifolia* y *B. aptera* en la concentración de 0.1 g, se observó el mayor porcentaje de palomillas deformes. Sin embargo, todas las especies tuvieron un efecto en este estadio ya que un 50% de la población de palomillas o más en algunos casos, presentaron anomalías morfológicas.

Los resultados de los ensayos biológicos nos permiten afirmar, en general, que existen productos de origen vegetal que previenen o reducen la alimentación en los insectos como resultado de efectos pre-ingestivos (disuasivos de la alimentación) y post-ingestivos (tóxicos), lo que está de acuerdo a lo observado por Klocke *et al.*, (1991).

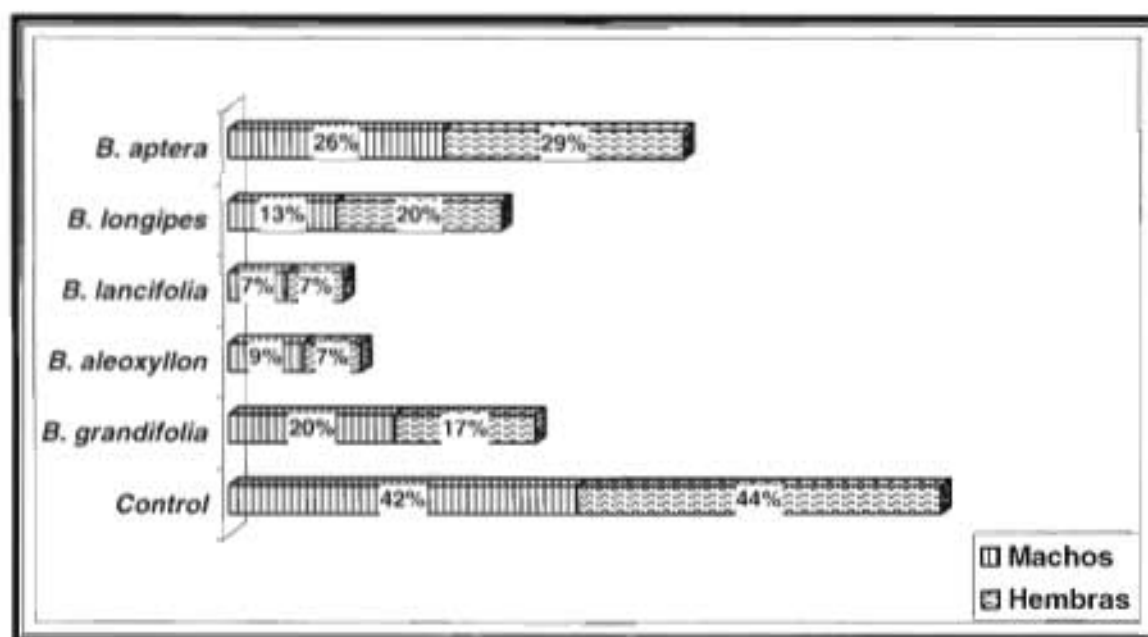


Figura 25. Porcentaje de machos y hembras, tratadas con extracto metanólico 0.1 g/100 g de dieta, de cinco especies del género *Bursera*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que las especies de *Bursera* evaluadas presentan actividad antialimentaria en mayor o menor grado, por lo que es necesario continuar con estudios que nos lleven a conocer el efecto sobre un modelo de insecto especialista, y de esta forma poder establecer diferenciación entre los insectos con diferentes hábitos alimenticios y que además nos permitan conocer el espectro de acción sobre estos, tanto de las plantas como de sus extractos y compuestos aislados, ya que las respuestas de las plantas frente a insectos se deben en muchos casos a compuestos metabólicamente relacionados que actúan conjuntamente con diferentes espectros de actividad (Jermy, 1990)

En este sentido el aislamiento y la caracterización química de los compuestos, principalmente de tipo terpénico, detectados en los aceites esenciales y los extractos orgánicos de las especies estudiadas cobran importancia en virtud de haber tenido una actividad antialimentaria observada en los ensayos realizados.

# EVALUACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TALLO DE ESPECIES DE *Bursera* EN EL DESARROLLO DE *S. frugiperda* (J. E. Smith)

---

## II.1.- INTRODUCCIÓN

---

Los componentes volátiles provenientes de plantas han atraído la atención del hombre desde la antigüedad como principios aromáticos. El estudio de estos compuestos se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importante para muchos países, ya que inicialmente eran considerados como material de desecho del metabolismo de las plantas; actualmente ya se reconoce su importancia biológica en numerosos procesos fisiológicos y ecológicos.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos o compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), en general son de olor agradable, encontrándose ampliamente distribuidos en las diferentes partes de la planta.

Los aceites esenciales pueden actuar como atrayentes para polinizadores específicos de ciertas especies; así mismo, al ser liberados protegen a la planta actuando como disuasivos o repelentes alimentarios frente a herbívoros y funcionan como atrayentes de los parasitoides o enemigos naturales de éstos (Anaya, 2003).

Los constituyentes principales de los aceites esenciales son compuestos de tipo terpénico. La gran diversidad de compuestos de naturaleza terpénica, y de sustancias con ellos relacionadas, encontrados en las plantas, es un buen ejemplo de la capacidad de síntesis de los vegetales. Se han descrito miles de estructuras terpénicas en las angiospermas. Los compuestos que forman parte de este numeroso grupo de productos naturales pueden realizar diferentes actividades

biológicas: atraen y repelen insectos herbívoros, funcionan como hormonas e inhibidores del crecimiento, entre otras (Azcon, 1993).

En los sistemas vivos, todos los terpenos o isoprenoides, son biosintetizados de dos precursores de C<sub>5</sub>: difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato dimetilalilo (DMAPP); antes se pensaba que la biosíntesis de estos precursores de terpenos solo ocurría a través de la vía del mevalonato estudiada en levaduras y células animales. Sin embargo, recientemente se ha descubierto una ruta independiente en bacterias y plantas, siendo el primer precursor el fosfato de desoxixilulosa (Figura 26) .

	<i>Mevalonato</i>		<i>Deoxixilulosa</i>
Bacteria	☺	o	☺
Archaea	☺		
Fungi	☺	y/o	☺
Algae			☺
Plantae	☺		
cloroplasto	☺		☺
mitocondria	☺		
Protozoa			
Animalia			

Figura 26.-Distribución en la naturaleza de la vía mevalonato y fosfato deoxixilulosa, para la biosíntesis de isoprenoides (Tomado de Eisenreich, 2001).

En plantas vasculares, la ruta del mevalonato opera en el citoplasma y la mitocondria, en donde se sintetizan esteroides, sesquiterpenos y ubiquinonas. Los monoterpenos, diterpenos y carotenoides, se forman vía fosfato de desoxixilulosa en los plastidios/cloroplastos (Figura 27). La información de esta nueva vía ha permitido el desarrollo de nuevos antibióticos, herbicidas y antimaláricos, sin embargo algunos intermedios involucrados aún se desconocen (Rohmer, 1999, Eisenreich, 2001).

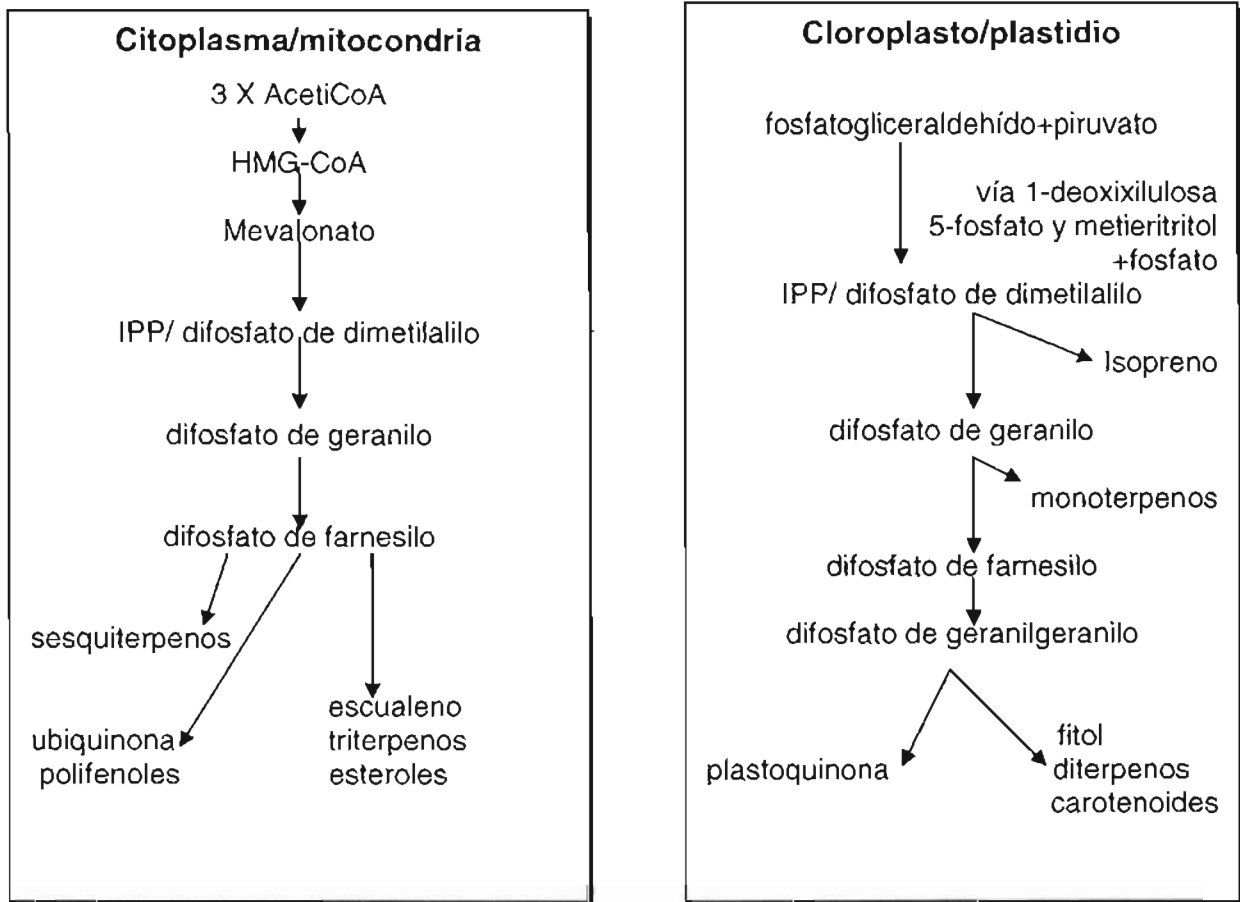


Figura 27.-Compartimentalización y rutas de biosíntesis para isoprenoides (Tomado de Rohmer,1999)

La variedad de compuestos volátiles que emiten las flores y partes vegetativas tienen efectos en el comportamiento de otros organismos, como los herbívoros.

Se ha establecido que el herbívoro induce volátiles que sirven de defensa indirecta como señal química atrayendo a enemigos naturales como depredadores o parásitos de herbívoros, reduciéndose el daño en la planta. Los volátiles contribuyen a la defensa en parte por su toxicidad directa a insectos. Además, estos compuestos tienen una gran influencia no solo en animales sino también en plantas vecinas (Paré, 1997).

Numerosos trabajos reportan:

La presencia de un compuesto denominado volicitina, aislado de secreciones orales de las orugas del gusano del betabel, observando que cuando se aplica este compuesto a las hojas dañadas de plántulas de maíz, se induce la emisión de volátiles que atraen a las avispas, enemigos naturales de las orugas (Alborn *et al.*, 1997). Cuando las hojas son dañadas mecánicamente y no se aplica la volicitina no hay emisión de dichos volátiles. Por lo tanto se considera que este compuesto juega un papel clave en las señales químicas y en los procesos bioquímicos que regulan las interacciones tritróficas entre plantas, insectos herbívoros y enemigos naturales de los herbívoros.

El mecanismo que regula la síntesis y liberación de compuestos volátiles en plantas es aun poco conocido, la volicitina es un inductor encontrado en las secreciones de algunos insectos herbívoros. Sin embargo, el daño de una planta por diferentes herbívoros puede inducir diferentes proporciones de estos compuestos. Otro de los compuestos estudiados es el ácido jasmónico considerado como un mensajero en la trasmisión de señales en las plantas (Paré *et al.* 1999).

Shinoda y col. (2002) identificaron una saponina triterpénica aislada de hojas de la crucífera *Barbarea vulgaris*; este compuesto se encuentra relacionado con *Plutella xylostella*, lepidóptero especialista considerado como patógeno en los cultivos de crucíferas. Se reporta una íntima relación entre este insecto y las crucíferas, relación mediada por la presencia de glucosinolatos así como isotiocinatos, los cuales estimulan la oviposición de adultos y alimentación de las larvas, en este sentido los glucosinolatos producidos por *B. vulgaris* intervienen en el desarrollo del segundo estadio de *P. xylostella*.

Martins y col., (2003) reportan el análisis de los aceites esenciales de los tallos de *Santiria trimera* con un alto contenido de monoterpenos ( $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno en un 66% y 20% respectivamente) y con actividad significativa frente a diferentes microorganismos como bacterias y hongos.

Salgueiro y col., (2002) evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las partes aéreas de *Lippia graveolens* caracterizando un alto contenido de monoterpenos particularmente carvacrol, timol, p-cimeno. Con actividad frente a bacterias gram positivas y gram negativas así como a hongos.

### II.1.2.- Para la familia burseraceae

En el caso de esta familia se reporta que los exudados y resinas son utilizados en la medicina tradicional para infecciones bacteriales y antiinflamatorias (Abad *et al.* 1996, Sosa *et al.* 2002). La infusión de corteza de *B. microphylla*, se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades venéreas y *B. simarouba*, en varias partes de México como diurético, así como para tratamientos contra la diarrea, disentería e infecciones intestinales (Case *et al.* 2003). Así mismo se ha reportado que el extracto hexánico de hoja de esta planta exhibe potente actividad antiinflamatoria hasta de un 67% del edema (Abad *et al.*, 1996).

Los extractos acuosos de resinas de otras especies pertenecientes a esta familia , como *Boswellia dalzielii*, *B. carteri*, *Commiphora mukul* y *C. incisa*, también reportan su potente actividad antiinflamatoria hasta un 59%, lo cual soporta su uso en la medicina tradicional en la India y África, como remedio para el tratamiento de algunas enfermedades, como la artritis (Dowiejua *et al.*, 1993).

Sin embargo, en México la composición química de este género ha sido poco estudiada, se sabe que están provistas de aceites esenciales aromáticos (Rzedowski y Ortíz, 1982) y quizá estos sirvan de atrayentes y/o antialimentarios para insectos plaga.

Debido a la importancia biológica que tienen estos compuestos y los reportes en *Bursera*, en este trabajo se analizaron los aceites esenciales de tallo de nueve especies del género, a fin de determinar su efecto en larvas de *S. frugiperda*.



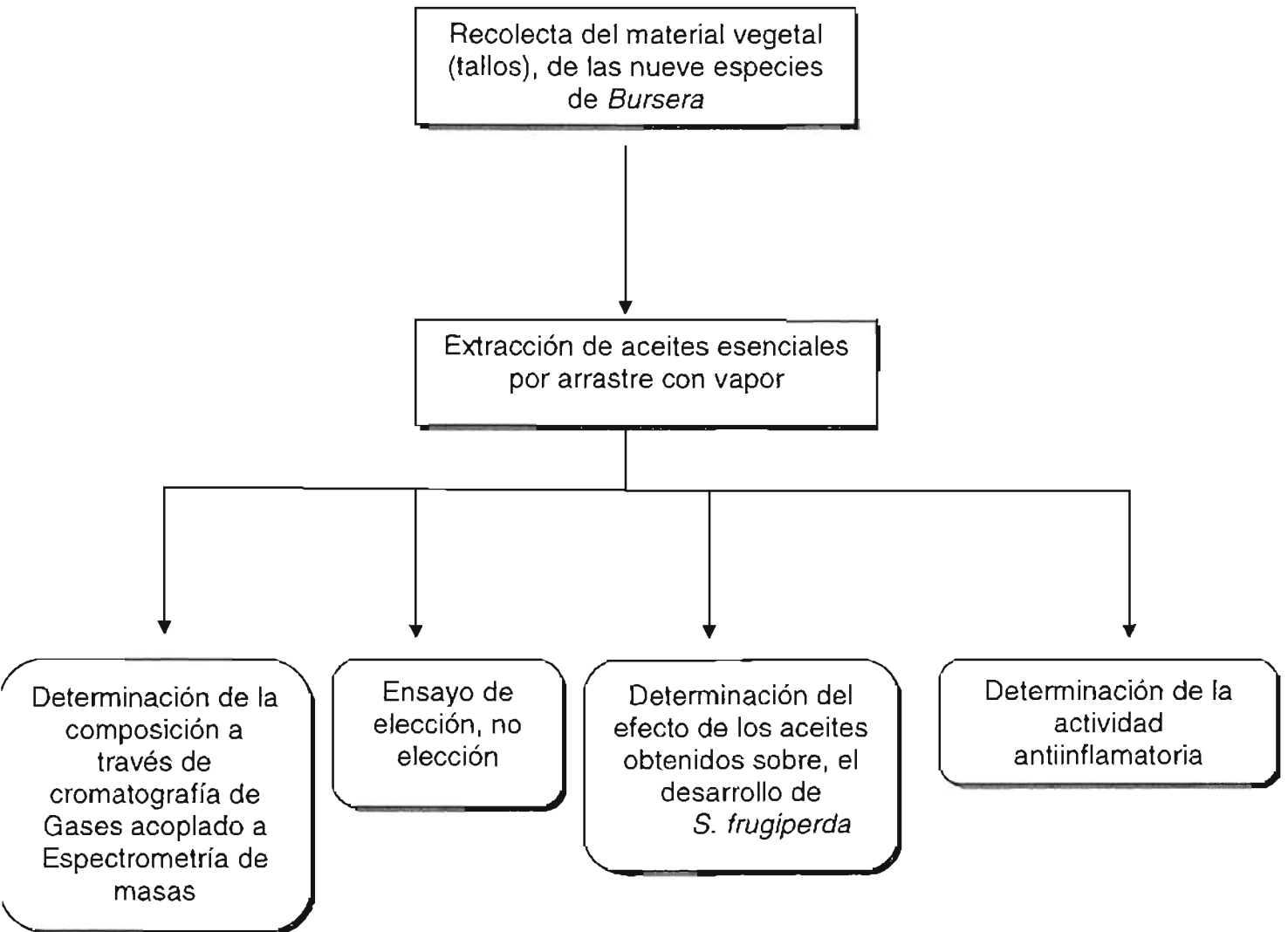
## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Obtención de aceites esenciales de tallos de nueve especies del género *Bursera* y su caracterización a fin de realizar una comparación de los compuestos que constituyen a los extractos volátiles, de cada una de las especies.
- Evaluación del efecto de los aceites esenciales obtenidos sobre el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* por medio de un ensayo biológico.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos volátiles obtenidos, considerando el uso de algunas especies en la medicina tradicional.

## II.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

---



### **II.2.1.- Material vegetal**

Las especies utilizadas para este trabajo fueron las mismas que las estudiadas en la experiencia anterior.

### **II.2.2.- Extracción de aceites esenciales en tallo**

La obtención de los aceites esenciales se realizó a través de una destilación por arrastre con vapor, se colocaron 600 g de tallo fresco de la planta en trozos pequeños, en un matraz bola de 5 L, montada en una mantilla conectada a un reóstato. Por otro lado, en un matraz bola con 2 L de agua a punto de ebullición se generó el vapor, dejando la muestra extraer durante 10 hrs. La esencia así arrastrada es posteriormente condensada y recolectada. La fase acuosa obtenida se sometió, a una extracción con éter etílico por triplicado, posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro.

Finalmente la eliminación el éter se realizó por una destilación fraccionada, para obtener el aceite, el cuál fue colocado en un frasco previamente etiquetado y pesado, para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

### **II.2.3.- Análisis por Cromatografía de gases, acoplado a Masas (CG-MS)**

Las fracciones volátiles de tallo, fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, se utilizó una columna capilar HP-2 (metil-silicon), de 25 X 0.2 mm d. l, grosor de película, 0.33  $\mu\text{m}$ ; Como gas acarreador se utilizó He con un flujo de 1.0 mL/min. El programa de temperatura para el análisis fue de 40°C/5min a 305°C a 8°C/min durante 10 min. La temperatura del inyector fue de 250°C y el volumen de inyección de 0.8  $\mu\text{L}$ .

El espectro de masas se obtuvo por medio de un aparato JEOL AX505 HA a 70 eV. Los índices de retención para los componentes fueron determinados

según el método de Van der Dool (1963), utilizando n-alcános (C9-C24) como estándares.

La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención relativos con datos de literatura.

El espectro de masas fue comparado con una librería interna (Publica NIST 1997, del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) y librerías Wiley/NBS, comparándolos también con datos de literatura.

#### **II.2.4.- Ensayos biológicos**

Para la realización de este ensayo se utilizaron larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, las cuales fueron colocadas en recipientes que contenían dieta artificial con el aceite mezclado homogéneamente a una concentración de 5 mg de aceite esencial/100g de dieta, para cada una de las especies. Posteriormente se colocaron en una cámara de incubación marca Binder, de condiciones controladas a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  y  $60\% \pm \text{HR}$ , así como un fotoperiodo de luz oscuridad de 16:8h, durante 48 h, observando el comportamiento alimenticio de las larvas a las 24h y 48 h. Con 10 repeticiones para cada una de las especies y su respectivo control.

#### **II.2.5.- Determinación de la actividad antiinflamatoria**

La actividad antiinflamatoria se evaluó por medio de un edema inducido en oreja de ratón, con una solución de 2.5  $\mu\text{g}$  de TPA (Tetradecanoil forbol acetato) disueltos en 10  $\mu\text{L}$  de etanol-acetona 1:1, aplicando tópicamente en ambas orejas de 3 ratones macho de la cepa CD-1 (25-30 mg). Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante ( $24^{\circ}\text{C}$ ), con un fotoperiodo de 12:12h luz-oscuridad con libre acceso a agua y alimento. Las muestras de las fracciones volátiles y la Indometacina como referencia fueron disueltas en hexano y Acetona respectivamente.

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (3.5 mg/Kg). Después de 10 min, en la oreja derecha del ratón se aplicó 0.31 mg de los aceites a probar y a la oreja izquierda sólo se le suministró el disolvente (hexano). Cuatro horas

después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomó una muestra (9 mm de diámetro) de ambas orejas. A los animales control sólo se les administró el disolvente (hexano) Figura 28.

La diferencia de peso entre las muestras fue el promedio de la respuesta del hematoma. El porcentaje de inhibición del edema se calcula por la siguiente ecuación:

**% Inhibición**=  $(Cr-Ct/Cr \times 100)$ , donde Cr= respuesta del edema con solo TPA y Ct= TPA + muestra de los volátiles.

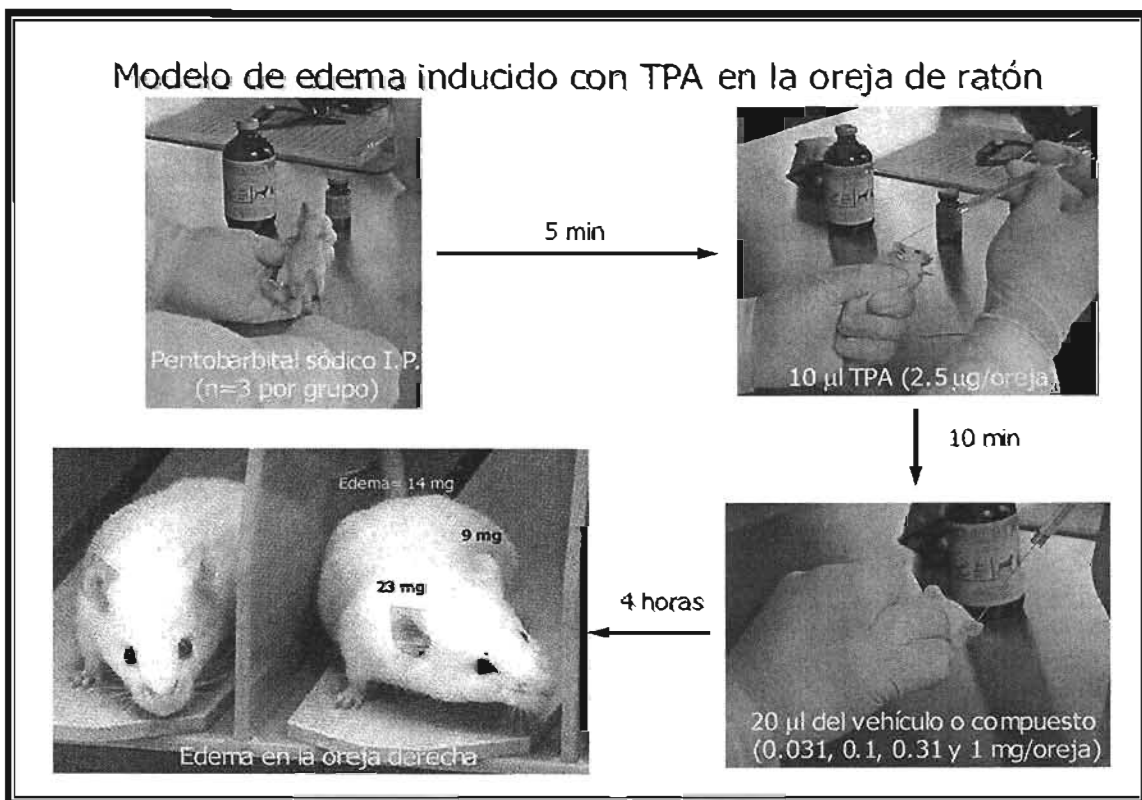


Figura 28. Determinación de la actividad antiinflamatoria en el edema inducido en la oreja de ratón.

## II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### II.3.1.- Constituyentes de los aceites esenciales

El porcentaje relativo de compuestos volátiles de las tallos de cada una de las especies de *Bursera*, con respecto al peso fresco de las tallos se menciona a continuación:

0.29% *B. grandifolia* (BGN), 0.28% *B. aleoxyllon* (BAX), 0.10% *B. lancifolia* (BLF), 0.23% *B. aptera* (BAT), 0.02% *B. glabrifolia* (BGB), 0.04% *B. velutina* (BV), 0.05% *B. submoniliformis* (BS) y 0.21% *B. morelensis* (BM).

Los principales constituyentes de estas fracciones volátiles, se señalan en la Tabla 3. Un total de 40 componentes fueron identificados en las nueve especies, de los cuales el 80% son Terpenos y el 20% hidrocarburos. Los más abundantes son monoterpenos, como limoneno,  $\alpha$ -terpineol, 4-ol-terpineno,  $\alpha$ -tujeno y linalol, por citar a los más abundantes. El limoneno es el componente que se encontró en la mayoría de las especies. En *B. aptera*, es el principal constituyente del aceite esencial con un 94.6%. En *B. aleoxyllon* no se detectó, sin embargo se encontró linalol, antranilato de linaloilo y  $\alpha$ -terpineol, constituyendo el 85%.

La composición obtenida para *B. glabrifolia* difiere de *B. aleoxyllon* en el limoneno,  $\alpha$ -tujeno y 4-ol-terpineno, ya que están ausentes en *B. aleoxyllon*. Por otro lado, el linalol constituye el 49.3% del peso de esta especie, el cual no fue detectado en *B. glabrifolia*, sin embargo, son especies que se pueden confundir fácilmente (Peter *et al.*, 2003), pero los perfiles químicos de los extractos volátiles de sus tallos, pueden utilizarse para su identificación.

Por otro lado, comparando los compuestos volátiles de ambas secciones se observó que *B. submoniliformis*, *B. velutina*, *B. aleoxyllon* y *B. glabrifolia*, especies pertenecientes a la sección *Bullockia*, contienen la mayor variedad de compuestos de tipo monoterpénico, en contraste con las de la sección *Bursera*.

En cuanto a los sesquiterpenos sólo se detectaron en tres especies, *B. lancifolia*, *B. grandifolia* y principalmente en *B. velutina*; de los nueve que se encontraron, ocho están presentes en esta especie con un 35.6% del total en el aceite esencial, siendo predominante el  $\beta$ -eudesmol, también para *B. lancifolia*, seguido de espatulenol y guaiol con un total de 29%.

La fracción volátil obtenida de los tallos de *B. aptera* muestra una mezcla binaria de limoneno y el diterpenoide kaur-16-eno, el cuál se ha encontrado previamente en el aceite esencial de *Xylopiya aethiopica* (Annonaceae) (Karioti *et al.*, 2004). Este se conoce como el primer reporte de la presencia de este diterpenoide de tipo kaureno en los volátiles de plantas de la familia Burseraceae.

Por otro lado una serie de hidrocarburos de cadena larga fueron aislados e identificados de los tallos de *B. lancifolia*, *B. velutina* y *B. submoniliformis*. La Tabla 3 indica que estos alcanos están presentes en especies de las dos secciones, tanto *Bursera* como *Bullockia*. Estos compuestos representan un porcentaje considerable de los aceites esenciales de estas especies, por ejemplo el 3,8-dimetilundecano, el heptadecano y el docosano, suman un total de 36.6% del peso total del extracto de *B. lancifolia*. El docosano está presente en las tres especies y es el hidrocarburo aislado más abundante. Teniendo la mayor diversidad de compuestos *B. submoniliformis* con un 25.1%.

Trabajos previos reportan que alcanos epicuticulares de algunas plantas del desierto de Baja California contienen alcanos como C-29 y C-31, encontrados en hojas de *B. microphylla* (Proksch *et al.*, 1981).

Este se considera también el primer trabajo que reporta la presencia de hidrocarburos de cadena larga en volátiles de tallo de especies de *Bursera*, sin embargo el papel de estos alcanos aun se desconoce.

Tabla 3. Constituyentes identificados en los aceites esenciales de tallo en las especies del género *Bursera*

Compuestos	Especies										Identificación <sup>c</sup>
	Abundancia relativa (%)										
	IR <sup>b</sup>	BGN	BAX	BLF	BLP	BAT	BGB	BV	BS	BM	
<b>MONOTERPENOS</b>											
α-terpineol	1186	1.96	20.21	15.20	1.82	–	31.57	10.75	–	7.17	d, e, f
β-terpineol	1176	2.74	–	7.28	2.32	–	34.48	3.86	3.82	8.44	d, e, f
α-tujeno	930	23.49	–	–	2.13	–	7.37	–	4.53	14.94	d, e, f
limoneno	1029	63.99	–	14.51	–	94.57	13.39	15.72	8.14	56.54	d, e, f
linalol	1097	–	49.27	–	1.98	–	–	1.40	3.43	–	d, e, f
mirreno	989	–	2.06	–	–	–	–	–	–	–	d, e, f
bornileno	1065	–	1.62	–	–	–	–	–	–	–	d, e,
nerol	1224	–	3.00	–	–	–	–	–	–	–	d, e, f
antranilatode linaloilo	1240	–	14.54	–	–	–	–	–	–	–	e
acetato de geranilo	1364	–	2.92	–	–	–	–	–	–	–	d, e
acetato de nerilo	1344	–	5.10	–	–	–	–	–	–	–	d, e
verbenona	1202	–	–	–	2.06	–	7.51	–	–	–	d, e, f
α-pineno	940	–	–	–	–	–	3.06	–	–	–	d, e, f
β-pineno	980	–	–	–	–	–	2.60	–	–	–	d, e, f
β-terpineno	1176	–	–	–	–	–	–	–	4.95	–	d, e, f
γ-terpineno	1060	–	–	–	–	–	–	1.38	4.41	–	d, e
carveol	1215	–	–	–	–	–	–	5.53	–	–	d, e
iso-carveol	1223	–	–	–	–	–	–	1.77	–	–	d, e
carvona	1229	–	–	–	–	–	–	5.73	–	–	d, e
cis-p-2-menten-1-ol	1118	–	–	–	–	–	–	–	3.43	–	d, e
alcohol cumico	1269	–	–	–	–	–	–	–	5.45	–	d, e
cis-5-hidroxi-1,8-cineol	1246	–	–	–	–	–	–	–	4.05	–	d, e
carvotanacetona	1233	–	–	–	–	–	–	–	3.26	6.46	d, e
timol	1271	–	–	–	–	–	–	–	4.83	–	d, e, f
acetato de terpinenol	1280	–	–	–	–	–	–	–	3.49	–	d, e



Compuestos	IR <sup>a</sup>	BGN	BAX	BLF	BLP	BAT	BGB	BV	BS	BM	Identificación b
<b>SESQUITERPENOS</b>											
β-cubebeno	1388	1.40	-	-	6.22	-	-	1.01	-	-	d, e
β-eudesmol	1650	-	-	14.41	-	-	-	12.93	-	-	d, e
elemanol	1550	-	-	6.03	-	-	-	1.45	-	-	d, e
δ-cadineno	1512	-	-	-	3.37	-	-	1.38	-	-	d, e
Agaroespirol	1590	-	-	6.10	-	-	-	-	-	-	e
spathulenol	1576	-	-	-	-	-	-	7.87	-	-	d, e
guaiol	1598	-	-	-	-	-	-	3.59	-	-	d, e
<b>OTROS</b>											
<b>COMPUESTOS</b>											
<b>DITERPENOS</b>											
Kaur-16-ene	2029	-	-	-	-	5.42	-	-	-	-	e, f
<b>HIDROCARBUROS</b>											
<b>DE CADENA LARGA</b>											
3,8-dimetilundecano	1061	-	-	5.56	1.69	-	-	-	-	-	d, e
heptadecano	1700	-	-	12.99	-	-	-	-	-	-	d, e
docosano	2200	-	-	17.99	9.53	-	-	2.29	7.98	-	d, e
heneicosano	2100	-	-	-	-	-	-	1.82	-	-	d, e
tetracosano	2400	-	-	-	-	-	-	1.32	4.40	-	d, e
2,6,10,14-tetrametilhexadecano	1886	-	-	-	-	-	-	-	4.38	-	d, e
eicosano	2000	-	-	-	-	-	-	-	3.95	-	d, e
<b>COMPUESTOS</b>											
<b>MISCELANEOS</b>											
Ácido hexanodioico o ester dietil	2330								9.69	6.46	e
(%) total		93.6	98.7	100	27.12	100	100	90.7	82.2	100	

<sup>a</sup>Índice de Retención (IR) de CG, calculado utilizando C<sub>9</sub> a C<sub>24</sub> n-alcenos

<sup>b</sup>Identificación de los compuestos: d=comparación de IR con datos reportados; e=comparación del espectro de masas con librerías MS (NIST y Wiley/ NBS); f= comparación del espectro de masas con literatura

% abundancia relativa: datos del cromatograma

### II.3.2.- Ensayos biológicos

Se observó en general que durante el desarrollo de *S. frugiperda* durante los tiempos de evaluación, las larvas tuvieron mayor tamaño y menos peso (Figuras 29 y 30). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (0.3835 mg en peso y 2.89 cm en tamaño), sin embargo, la especie que mayor efecto tuvo en el desarrollo del gusano cogollero, fue *B. lancifolia* con un peso de 0.1539 mg y 1.8143 cm de tamaño, seguido de *B. aleoxyllon* (0.1939 mg, 1.850 cm), siendo más evidente a los 14 días.

A los 21 días que comenzó el proceso de pupación en los organismos control, se observó mortandad de las larvas tratadas con cuatro de las especies (*B. aleoxyllon*, *B. lancifolia*, *B. longipes* y *B. aptera*). La primera de las especies es la que tuvo un mayor efecto sobre el crecimiento del insecto.

Los insectos pueden ser repelidos por compuestos volátiles emitidos por las plantas, o una vez que se establecen sobre éstas, pueden ser disuadidos de continuar alimentándose u ovopositando (Schoonhoven, 1982). Los metabolitos secundarios tóxicos como los terpenos pueden actuar en el sistema endócrino del insecto, actuando como reguladores del crecimiento que inhiben la formación de la muda o alterando la función que regulan estos mecanismos.

En este sentido los resultados indican un efecto significativo de los compuestos de naturaleza terpénica presentes en el género *Bursera*, los cuales pueden considerarse como fuente potencial de antialimentarios o insecticidas de algunos insectos plaga.

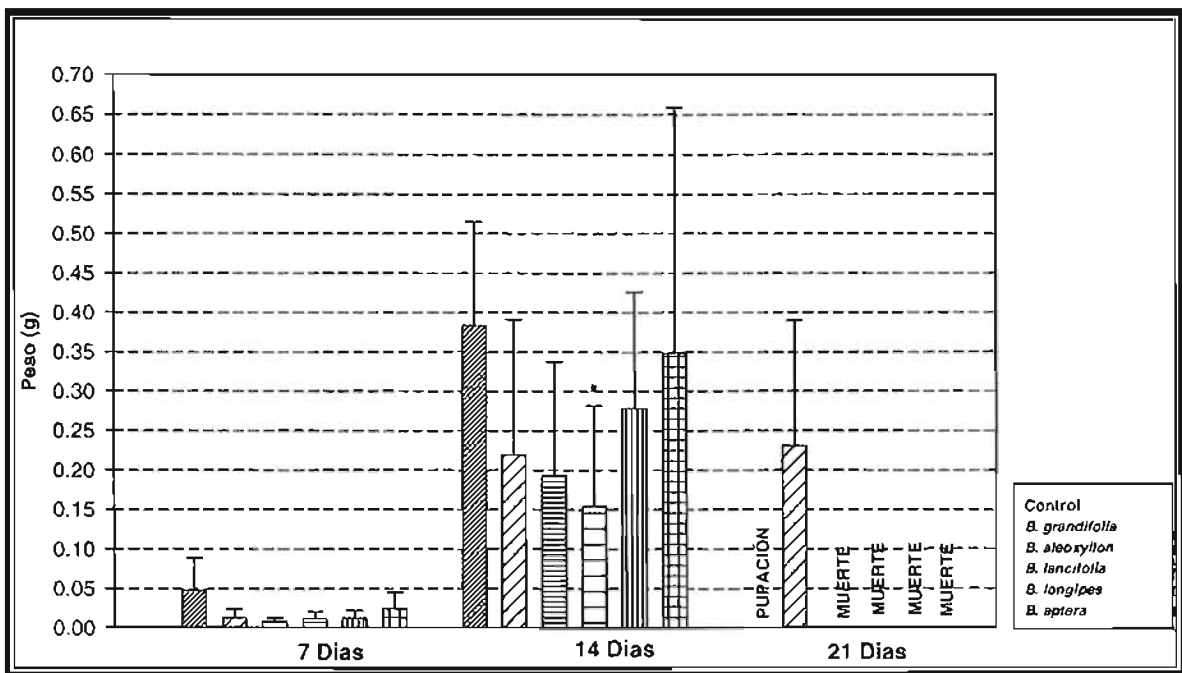


Figura 29. Efecto de los aceites esenciales cuando fueron suministrados en la dieta 5 mg, sobre el peso de *S. frugiperda*.

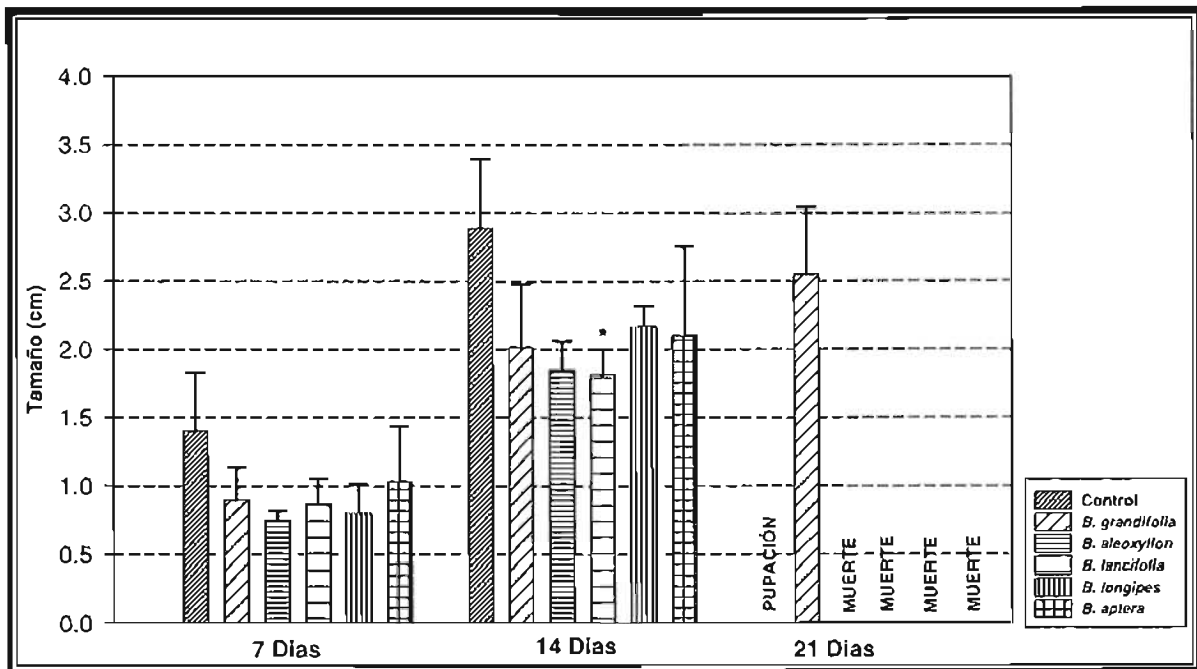


Figura 30. Efecto de los aceites esenciales cuando fueron suministrados en la dieta 5 mg sobre el tamaño de *S. frugiperda*.

### II.3.3.- Actividad antiinflamatoria

Los aceites obtenidos de las especies de *Bursera*, fueron ensayados para determinar su actividad antiinflamatoria, utilizando el edema inducido con TPA en la oreja de ratón. En general los extractos mostraron solo una moderada actividad antiinflamatoria (Tabla 4). Los únicos volátiles que fueron inactivos son los de *B. aleoxyllon* y *B. velutina*, en el caso de la primera inclusive exacerbó el edema, en comparación con el control, lo que podría indicar que sus aceites esenciales son tóxicos o irritantes.

El mayor porcentaje de inhibición del edema se observó en *B. lancifolia*, con un 16.5%, que representa la mitad de la actividad mostrada por la Indometacina (control positivo), seguido de *B. longipes* con un 15.30% y *B. glabrifolia* con un 13.04% (Tabla 4).

Estos resultados de actividad antiinflamatoria moderada soportan parcialmente el uso de algunas preparaciones tópicas de especies del género *Bursera* como antiinflamatorias, utilizadas en tiempos antiguos en la medicina tradicional (Abad *et al.*, 1996; Sosa *et al.*, 2002).

Tabla 4.- Actividad antiinflamatoria de fracciones volátiles de *Bursera spp.*

Tratamiento	X edema (mg) ± ES	±% de Inhibición
Indometacina	11.09 ± 0.8	31.4
Control (TPA)	16.33 ± 1.8	
<i>Bursera grandifolia</i>	16.0 ± 1.6	2.02
<i>Bursera aleoxyllon</i>	16.5 ± 0.8	> control
<i>Bursera lancifolia</i>	13.6 ± 1.0	16.56
<i>Bursera longipes</i>	13.8 ± 1.3	15.30
<i>Bursera aptera</i>	14.7 ± 2.4	9.98
<i>Bursera glabrifolia</i>	14.2 ± 1.6	13.04
<i>Bursera velutina</i>	16.3 ± 1.7	0.18
<i>Bursera submoniliformis</i>	15.4 ± 0.6	5.69
<i>Bursera morelensis</i>	14.9 ± 2.5	8.39

% de inhibición =  $(Cr - Ct) / Cr * 100$ . Cr se refiere a la respuesta del edema con solo TPA y Ct a la respuesta con TPA, más la muestra de los volátiles.

### ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA EN LARVAS Y ADULTOS DE *S. frugiperda* (J. E. Smith).

---

#### III.1.- INTRODUCCIÓN

---

La resistencia de los insectos a insecticidas representa un problema importante en la agricultura porque afecta la producción de los cultivos. Por otro lado son diversas las respuestas de los insectos frente a las plantas. Actualmente se ha tratado de erradicar a los insectos plaga utilizando insecticidas químicos, sin embargo, la resistencia a estos compuestos ha incrementado; por lo que la búsqueda de compuestos de origen vegetal con actividad insecticida ha cobrado interés, como resultado del estudio entre la interacción planta-herbívoro y en particular planta-insecto.

La mayoría de los trabajos encaminados a determinar el papel de los componentes presentes en las especies de estudio, sobre el desarrollo de los insectos, se han enfocado a evaluar porcentajes de mortandad, tasa de crecimiento (tamaño y peso), oviposición, porcentaje de emergencia de hembras y machos, etc. Sin embargo el estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados como respuesta de los insectos deben ser evaluados a fin de conocer los efectos a nivel de la biología del insecto.

Por tal motivo se realizó la determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa, enzima clave en el Sistema Nervioso de los insectos, si ésta se vé afectada, causa parálisis y muerte del insecto. Debido a su importancia se evaluó en larvas de *S. frugiperda* de 28 días de vida, cuando se les suministró polvo fino de la planta seca de las cinco especies del género *Bursera* en la dieta merídica, en dos diferentes concentraciones. Así como la evaluación en palomillas (adultos), cuando se le suministró extracto metanólico de las mismas especies de árboles. Los organismos que sobrevivieron a las condiciones antes mencionadas, se procedió a evaluar la actividad de la acetilconlinesterasa.

## III.2.- ANTECEDENTES

---

Múltiples defensas prevalecen en las interacciones ecológicas planta-insecto, los insectos herbívoros tienen la capacidad de desarrollar adaptaciones en el comportamiento, modificaciones en los procesos fisiológicos y mecanismos de resistencia bioquímicos como respuestas a presiones de selección química (Brattsten, 1988). Dentro de las adaptaciones en los procesos fisiológicos es la forma rápida de excreción de los tóxicos ingeridos, su secuestro o almacenamiento en compartimentos del cuerpo en espacios especializados. Así por ejemplo *S. frugiperda* presenta una proteína con actividad de la carboxilesterasa que se adhiere a los insecticidas a través de uniones éster las cuales se encuentran en sus cuerpos grasos (Brattsten, 1988).

Otras respuestas relacionadas con la resistencia de los insectos a insecticidas resulta de tres mecanismos principalmente, cuando:

- 1) La penetración del insecticida es reducida
- 2) El insecticida es metabolizado más eficientemente por esterases, mezclando oxidasas o glutatión transferasas
- 3) El blanco del insecticida se modifica

Las pruebas de quimiorrecepción juegan un papel esencial en los insectos, para la selección de su alimento. Los sensilios gustatorios concentrados en las partes bucales, otros en los apéndices externos o en el canal alimenticio, son los responsables de transmitir el estímulo químico dentro de las señales nerviosas que intervienen en el comportamiento de aceptación o repelencia de nutrientes (Mullin, 1994), lo cual da como resultado la aceptación de plantas hospederas por herbívoros, en donde se requiere de niveles favorables de quimiorrecepción y de fagoestimulantes (Dethier, 1980).

Estos organismos tienen neuronas primarias, contienen ambas una dendrita y una conexión axonal directa para el sistema nervioso central, en donde se encuentra involucrado el neurotransmisor acetilcolina y la enzima que la hidroliza la acetilcolinesterasa (AChE) E.C.3.1.1.7.

Más de 250 copias del gen que codifica para esterasas, están presentes en algunos insectos resistentes, entre ellas se encuentra la acetilcolinesterasa, es una glicoproteína extracelular con un peso molecular de aproximadamente 80,000 Da, se encuentra en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso central,. Esta enzima es importante en la transmisión colinérgica, hidrolizando rápidamente al neurotransmisor Acetilcolina, lo que permite un control preciso del tiempo que dura la activación sináptica (Jiménez-Díaz *et al.*, 2000), siendo clave en el sistema nervioso de los insectos, ya que el sistema colinérgico es esencial para estos.

La AChE es blanco de organofosfatos y carbamatos muestran propiedades catalíticas en cepas resistentes. Estos insecticidas se utilizan comúnmente para el control de plagas, su modo de acción es a través de la unión covalente en el sitio activo de la enzima, causando la muerte del insecto (Brattsten, 1988). Sin embargo algunos insectos no se ven afectados por estas sustancias tóxicas, porque ellos poseen alterada la acetilcolinesterasa que es menos sensible al metabolito activo de estos compuestos.

Se ha observado que existe una fuerte correlación entre la actividad de la AChE en el sistema nervioso central y la susceptibilidad a insecticidas. Siendo el principal responsable de esta susceptibilidad el gen que codifica para esta enzima, por la substitución de un aminoácido, de una fenilalanina por una tirosina (Fournier *et al.*, 1992).

Por tal motivo la inhibición enzimática de la acetilcolinesterasa, se utiliza como herramienta para determinar los efectos de organofosfatos, así como de metabolitos secundarios presentes en plantas (Day *et al.*, 1990).

El grupo de metabolitos secundarios, que contiene efectos químicos adversos a esta enzima en insectos son los terpenos (Miyazawa *et al.*, 1998), ya que tienen una propiedad común que es su hidrofobicidad. Algunos compuestos hidrofóbicos están asociados con la desactivación de proteínas y la inhibición enzimática.

Una de las enzimas particularmente susceptible a interacciones hidrofóbicas es la AChE, causando parálisis y muerte del insecto.

Ryan y col., (1988) encontraron que cinco monoterpenos como el citral (aldehído), pulegona (Cetona), linalol (alcohol), (-)-Acetato de Bornilo (éster) y cineol (éter), son inhibidores competitivos de la acetilcolinesterasa, los cuales compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima. El sitio activo de la interacción del sustrato (acetilcolina) con la AChE, se representa usualmente por tres subsitios, el aniónico, esterico y el hidrofóbico, de los cinco monoterpenos ninguno posee una región cargada y sólo uno tiene un grupo carbonilo. Esto sugiere, por eliminación, que ellos tienen principalmente un efecto hidrofóbico, lo cual se relaciona con la actividad insecticida de varios compuestos metil carbamatos y organofosfatos debido a la región hidrofóbica de la AChE.



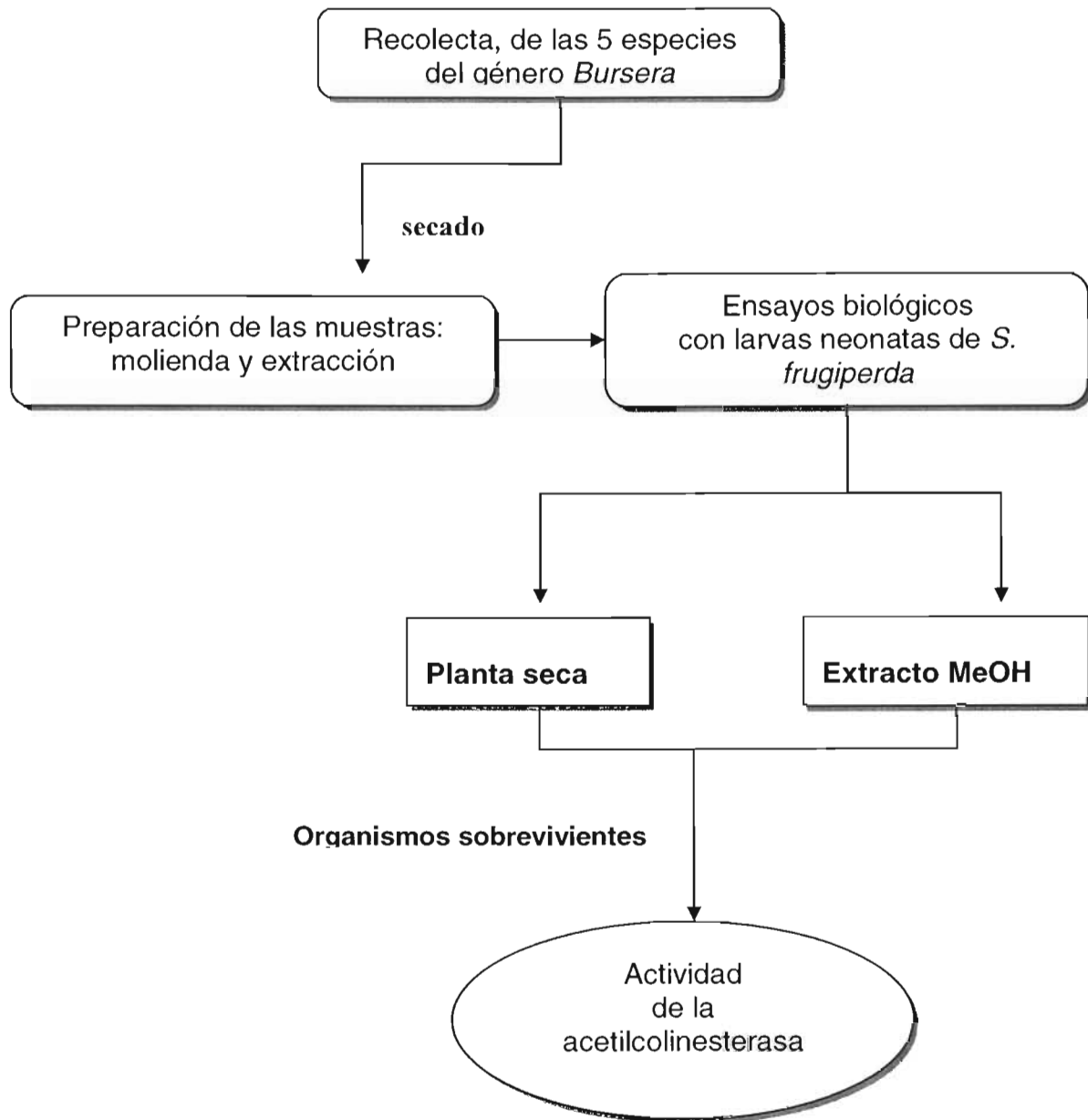
## OBJETIVOS

---

- Realizar con los organismos sobrevivientes a los cuales se les suministró planta seca en los ensayos biológicos, la actividad de la acetilcolinesterasa.
- Evaluar la actividad de la acetilcolinesterasa, en los organismos que sobrevivieron a los ensayos biológicos, cuando se les suministró extracto metanólico.

### III.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

---



### III.3.1.- ENSAYOS BIOLÓGICOS

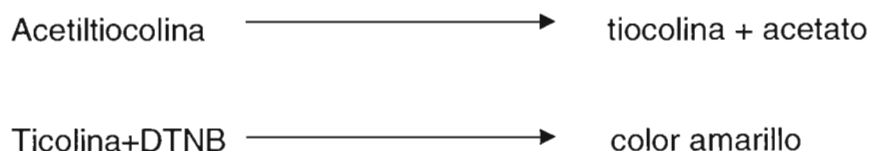
Los ensayos biológicos se realizaron, como se describe en el capítulo experiencia anteriormente mencionada.

### III.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA

Las larvas que se utilizaron para este experimento, son las que sobrevivieron de los bioensayos a las que se les suministró hoja seca de las 5 especies de *Bursera* (5 y 10%/100g de dieta) y por otro lado se utilizaron también adultos que sobrevivieron cuando se les proporcionó el extracto metanólico (10 y 100 µg/100 g de dieta) de estas mismas especies. Los organismos se congelaron a -20° C.

Para llevar a cabo la actividad enzimática, las larvas y los adultos (sin alas) se homogeneizaron en un politron modelo PT-1200, Brinkmann, Westbury, en 1.4 ml de Tris-HCl, 10 mM pH 7.2, Triton x-100 al 0.1%, NaCl 1 M y 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4°C, para remover los restos celulares. El extracto libre de células se utilizó como fuente de la enzima.

La actividad de la AChE se determinó utilizando el método fotométrico de Ellman (1961), midiendo el incremento del color amarillo producido de la tiocolina la cual reacciona con el ion dithiobisnitrobenzoato.



Este método es extremadamente sensitivo y se puede aplicar a pequeñas cantidades de tejido o a bajas concentraciones de enzima.

El yoduro de la Acetilcolina (substrato de la acetilcolinesterasa), Sigma Aldrich, fue disuelto en un buffer de fosfatos 0.1 M (pH 8.0), al igual que el DTNB (3-carboxy-4-nitofenildisulfido), reactivo de Ellman.

Para llevar a cabo la reacción se mezcló 0.1 ml de la solución de la enzima, 0.1 ml de DTNB, 0.8 ml de el substrato y 2.4 ml del buffer de fosfatos (pH 8.0).

La solución control fue similarmente preparada excepto de la solución problema. Ambas soluciones, control y problema, fueron preincubadas a 25° C por 10 min; Después de la preincubación se midió la absorbancia por duplicado espectrofotométricamente a 412 nm, comparándolas con el control.

La actividad fue expresada en moles de sustrato hidrolizado (ATC) por miligramo de peso húmedo (diagrama 3).

Finalmente para calcular las moles de ATC, se calculó con las siguiente fórmula (Ellman, 1961)

$$R = \frac{\Delta A}{1.36 (10^4)} \times \frac{1}{(100/2680) C_o}$$

en donde **R**= velocidad en moles de sustrato hidrolizado por min/ g de tejido

**ΔA** = cambio en absorbancia por min

**C<sub>o</sub>** = concentración original de tejido (mg/ml)

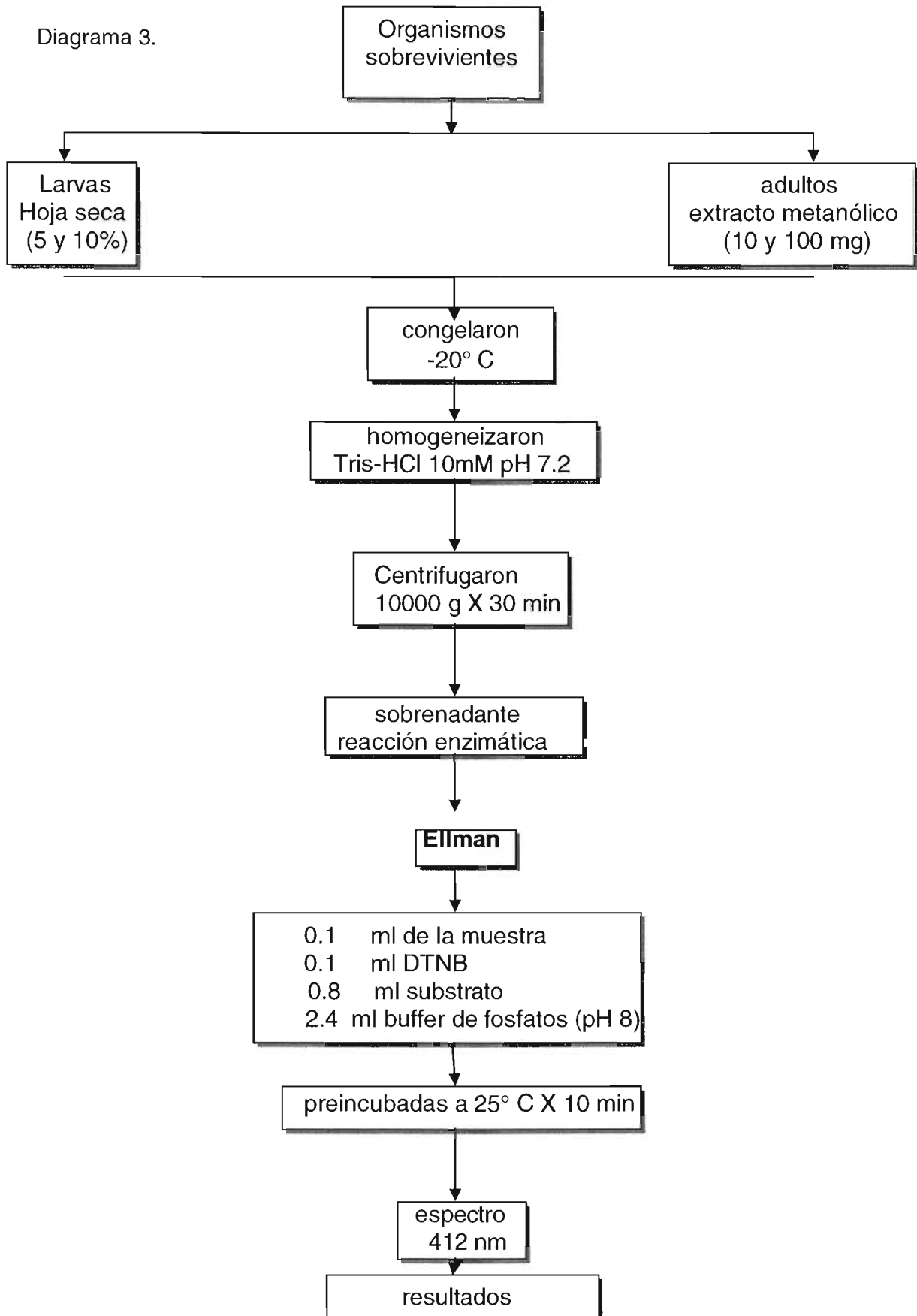
### III.3.3.- Análisis estadístico

Se aplicó una prueba de Tukey en el programa Statistics 9.0, comparando el control con los grupos de tamaño y peso en cada tiempo evaluado y t de Student, para la actividad de la AChE, comparando la diferencia entre el control y los grupos experimentales, en el programa Origin 6.0.

Los niveles de significancia para los análisis estadísticos empleados fueron tomados como  $p \leq 0.05$  en todos los casos.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Diagrama 3.



### III.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

#### III.4.1.- ACETILCOLINESTERASA

Todas las especies tuvieron efecto significativo en la actividad de la AChE evaluada en las larvas de *S. frugiperda* tratadas con hoja seca (Figura 21). El efecto de inhibición es dependiente de la dosis en los organismos tratados con *B. grandifolia* (5%), ya que presentan un porcentaje de inhibición de la AChE del 81%, mientras que los organismos tratados con la misma especie pero con la dosis de (10%), tuvieron una inhibición de más del 95% (Figura 31).

En los organismos que se expusieron a los extractos metanólicos, la actividad de la AChE fue menor (Figura 32) que en las larvas. Se observó mayor inhibición en la concentración de 100 mg, de un 4% para *B. grandifolia* y el más alto fue del 65%, para *B. longipes* (Figura 32).

La existencia de evidencias acerca del efecto inhibitorio de los compuestos de tipo terpénico sobre la acetilcolinesterasa demuestra su papel como compuestos de defensa o alomonas (Ryan *et al.*, 1988). De acuerdo con este mismo autor el papel de esta enzima está estrechamente vinculado al fenómeno de coevolución planta-insecto y mediado por los compuestos de tipo terpenoide. Ya que los metabolitos secundarios con actividad tóxica pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología del insecto. Los modos de acción más conocidos son aquellos que afectan el sistema nervioso, como agonistas de neurotransmisores o interfiriendo con los canales implicados en la transmisión del impulso nervioso (Wink, 2003).

Considerando los resultados acerca de la actividad de la acetilcolinesterasa encontradas en nuestros resultados, es importante mencionar la necesidad de continuar la evaluación en este sentido en virtud de las diferentes respuestas que se tienen en cada uno de los diferentes estadios del insecto, frente a los

compuestos químicos. Por otro lado, sería importante realizar el análisis en insectos especialistas.

También es importante evaluar en otros sistemas enzimáticos, tales como, los involucrados en la digestión de insectos, como la evaluación de la actividad de enzimas de detoxificación, ya que los insectos son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos exógenos, entre los que se encuentran los metabolitos secundarios presentes en sus plantas hospederas (Brattsen, 1979; Ahmad *et al.*, 1986).

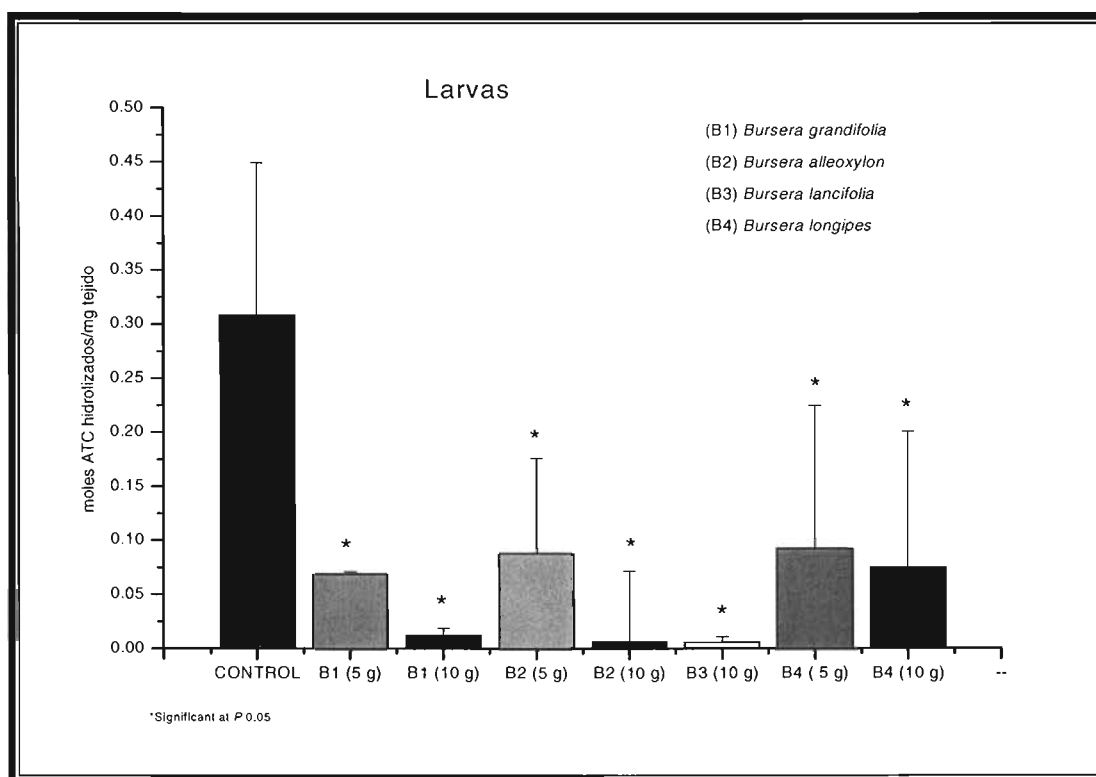


Figura 31. Actividad de la AChE en larvas de *S. frugiperda*, expuestas a (5 y 10%) de hojas secas de las diferentes especies de *Bursera*.

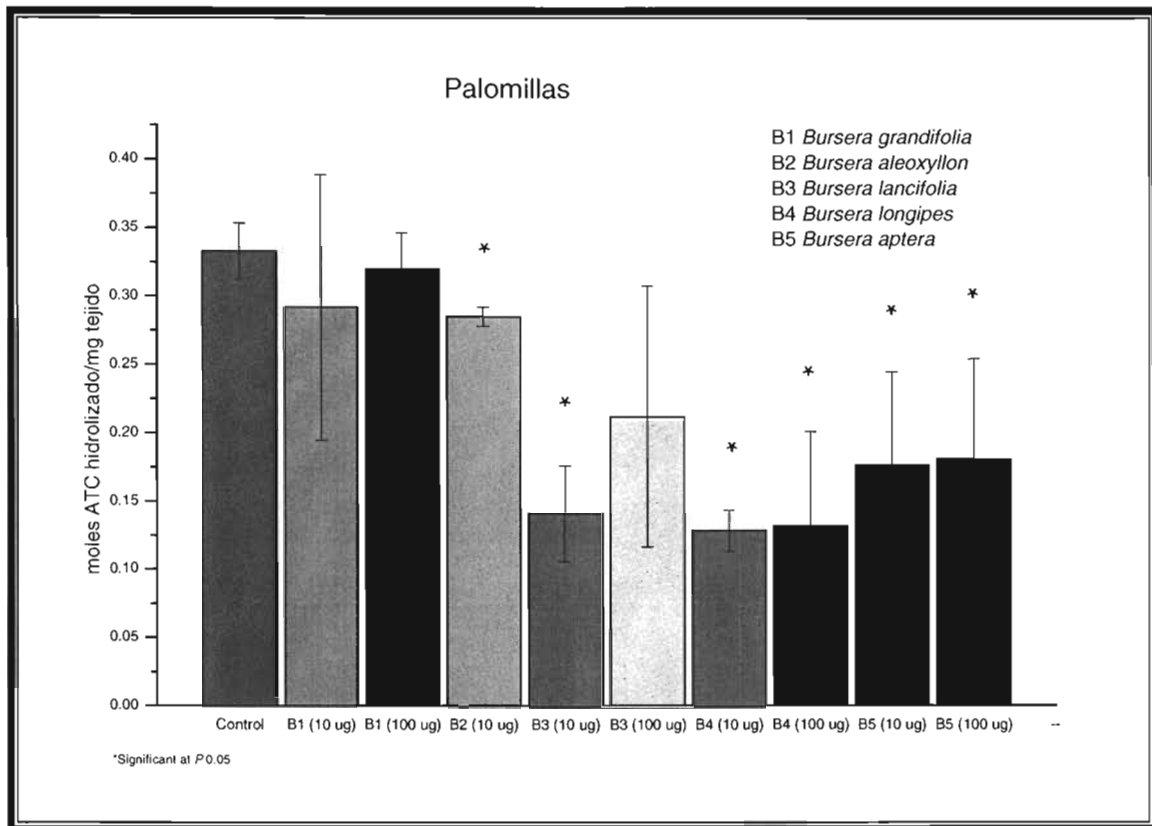


Figura 32. Actividad de la AChE en palomillas de *S. frugiperda*, cuando se les suministró en la dieta el extracto metanólico (0.01 y 0.1 g) de las diferentes especies de *Bursera*, en la dieta artificial.



## CONCLUSIONES GENERALES

---

- Las especies que tuvieron un efecto significativo inhibiendo el crecimiento (expresado en tamaño y peso) de *Spodoptera frugiperda*, fueron *B. lancifolia* y *B. aptera*, por lo tanto se acepta la hipótesis de trabajo en relación a la utilización de estas especies, en la búsqueda de compuestos insecticidas de origen vegetal
- La detección de metabolitos secundarios tales como los terpenos presentes en los extractos orgánicos analizados, sugieren la importancia de aislarlos y caracterizarlos en virtud de ser considerados compuestos importantes en la relación planta-insecto.
- La composición química de los extractos volátiles aislados consiste de monoterpenos, entre los más abundantes están limoneno,  $\alpha$ -terpineol y  $\beta$ -terpineol, y de hidrocarburos, los cuales podrían ser los responsables del efecto antialimentario.
- La actividad de la Acetilcolinesterasa se inhibió considerablemente (97%) por efecto de *B. lancifolia* y *B. aleoxyllon* (95%).
- El ensayo de la actividad de la acetilcolinesterasa, debe ser contemplado o analizado en conjunto con otro tipo de actividad enzimática, como las enzimas involucradas en la digestión, tal como las proteasas.
- El género *Bursera* brinda la posibilidad de continuar con estudios encaminados a la búsqueda de compuestos de origen natural con propiedades insecticidas. En este sentido se sugiere la separación y fraccionamiento de aquellos extractos que presentaron mayor actividad y la realización de ensayos que ayuden a determinar el efecto tanto de fracciones como de compuestos puros y caracterizarlos a nivel químico.

## LITERATURA CITADA

---

- Abad, M. J., Bermejo, P., Carretero, E., Martínez-Acitores, C., Noguera, B. Villar, A. (1996). Anti-inflammatory activity of some medicinal plant extract from Venezuela. *J. Ethnopharmacol.* **55:63-68.**
- Alborn, H. T., Turlings, T. C. J., Jones, T. H., Stenhagen, G., Loughrin, J. H. and Tumlinson, J. H. (1997). An elicitor of plant volatiles from Beet Armyworm oral secretion. *Sci.* **276:945-949.**
- Anaya, L. A. L. (2003). Ecología química. Instituto de Ecología, UNAM y Plaza y Valdés, S. A. de C. V., México, D. F., 349 p.
- Ave, D. A., Gergoy, P. and Tingey, W. (1987). Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tubeosum*. *Entomol. Exp. Appl.* **44 :131-138.**
- Becerra, J. X. (1994). Squirt-gun defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy. *Ecol.* **75:1991-1996.**
- Becerra, J. X. and Venable, D. L. (1999). Nuclear ribosomal DNA phylogeny and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *Am. J. Bot.* **86 (7):1047-1057.**
- Becerra, J. X., Venable, D. L., Evans, P. H. and Bowers, W. S. (2001). Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *Amer. Zool.* **41:865-876.**
- Bellés, X. (1988). Insecticidas Biorracionales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 405 p.
- Berenbaum, M. B. and Rosenthal, G. A. (1992). Plant Secondary Metabolites. Vol. 1. The Chemical participants. Academic Press, New York.
- Boutler, D. (1993). Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochem.* **34: 1453-1466.**
- Brattsten, L. B. (1988). Enzymic adaptation in leaf-feeding insects to host-plant allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* **14:919-1939.**
- Brauer, O. (1985). Fitogenética Aplicada. Edit. Limusa, México, D. F. p. 217-240.
- Camps, F. (1988). Relaciones planta-insecto. Insecticidas de origen vegetal. Capítulo 3, Insecticidas Biorracionales. Consejo Superior de investigaciones científicas, Madrid, España. pp. 69-85.

- Case, R. J. Tucker, A. O. Maciarello, M J. and Wheeler, K. A. (2003). Chemistry and ethnobotany of commercial incense copals, copal blanco, copal oro, and copal negro of North America. *Econ. Bot.* **57**:189-202.
- Champagne, D. E., Koul, O. Isman, M. B. Scudder, G. E. and Towers, G. H. N. (1992). Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochem.* **31**:377-394.
- Chase, M. W. Morton, C. M., Kallunki, J. A. (1999). Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from RBC and ATP sequence variation. *Am J. Bot.* **86 (8)**: 1191-1205.
- Coll, J. (1988). Inhibidores de la alimentación de los insectos. Capítulo 14. Insecticidas Biorracionales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. pp.355-377.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**:843-847.
- Domínguez, X. A. (1985). Métodos de Investigación fitoquímica. Edit. Limusa, México, D. F. 281 p.
- Duwiejua, M., Zeitlin, I. J., Waterman, P. G., Chapman, J., Mhango, G. J. and Provan, G. J. (1993). Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *Planta Med.* **59**:12-16.
- Ehrlich, P. R. and Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* **18**:586-608.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6(2)**: 78-84.
- Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* **7**:88-95.
- Evans, P. H., Becerra, J. X., Venable, D. L. And Bowers, W. S. (2000). Chemical analysis of squirt-un defense in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. *J. Chem. Ecol.* **26 (3)**:745-754.
- Fellows, L. E., Evans, S. V., Nash, R. J. and Bell, E. A. (1986). Polyhidroxy plant alkaloids as glycosidase inhibitors and their possible ecological role. Pp. 72-78. En: Natural Resistance of plants to pest. Gree, M. B and Hedin, P. A. (Eds), Americal Chem. Soc., Washington.
- Forman, L., Brandham, E., Harley, M & J. Lawrence. (1988). *Beiselia mexicana* (Burseraceae) and its affinities. *Kew Bull.* **44 (1)**: 1-31.

- Fournier, D., Marc Bride, J., Hoffmann, F. And Karch, F. (1992). Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **267:14270-14274.**
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances. *Science* **129:1466-1470.**
- Futuyma, D. J., Cart, R. P. and Noordwijky, I. V. (1984). Adaption to hos plants in the fall cuckerworm *Alsophila pometaria* and its bearing on the evolution of host affiliation in phytophagous insects. *Am. Nat.* **123:287-296.**
- Hernández, Juan. D., Herrero, N., López, P. Y., Román, U. L. Cerda-García-Rojas, C. M.y Joseph-Nathan, P. (2003). *Rev. Soc. Quím. Méx.* **47, Núm. Especial, 105.**
- Howard, J. (1990). Infidelity of leaf cutting ants to host plants: Resource heterogeneity of defense induction. *Oec.***82 (3):394-401.**
- Howatt, K. (1994). *Azadirachta indica*: One tree's arsenal against. *Pest.* p. 1-8.
- Jermý, T. (1990). Prospects of antifeedant approach to pest control. A critical review. *J. Chem. Ecol.* **10 (11):3151-3165.**
- Karioti, A. Hadjipavlou-Litina, D. Mensah, M. L. K. Fleischer, T. C. and Skaltsa, H. (2004). Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem, bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *J. Agric. Food Chem.* **52:8094-8098.**
- Klocke, J. A. and Kubo, I. (1991). Defense of plants through regulation of insect feeding behavior. *Flor. Entomol.* **74: 18-23.**
- Kubo, I., Fukuyama, Y. and Chapya, A. (1983). Structure of ajugarin-V. *Chem. Lett.* **223-224.**
- Koul, O., Shankar, S. and Kapil, R. S. (1996). The effect of neem alelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* **79:43-50**
- Martínez, M. (1990). *Las plantas medicinales de México.* Ediciones Botas. México, D. F.
- Martins, A. P., Salgueiro, L. R., Gonçalves, M. J., Proença da Cunha, A., Vila, R. and Cañigueral, S. (2003). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Santiria trimera* Bark. *Planta Med.* **69:77-79.**

- Mello, M. O. and Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* **14 (2);71-81.**
- Miranda, F. (1947). Estudios sobre la vegetación de México-V Rasgos de la vegetación en la cuenca del Río de las Balsas. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **8: 95-114.**
- Miyazawa, M., Kakiuchi, A., Watanabe, H. And Kameoka, H. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by volatile  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones. *Nat. Product Lett.* **12:131-134.**
- Ortega, C., A. (1987). Insectos nocivos del maíz: Una guía para su identificación en el campo, México, D. F., CIMMYT. 106 p.
- Ortego, F., López-Olguín, J. Ruiz, M. and Castañera, P. (1999). Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. *Pest. Biochem. Physiol.* **63: 76-84.**
- Paré, P. W., and Tumilinson, J. H., (1999). Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Phys.* **121 :325-331.**
- Peraza-Sánchez, S. R. Salazar-Aguilar, N. E. and Peña-Rodríguez, L. M. (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* **58:271-274.**
- Peter, CH. M., Purata, S. E. Chibnik, M. Brosi, B. J. López, A. M. and Ambosio, M. (2003). The life and times of *Bursera glabrifolia* (H.B. K.) Engl. In México: A parable for ethnobotny. *Econ. Bot.* **57 (4):431-441.**
- Proksch, P., Sternburg, C., Rodríguez, E. (1981). Epicuticular alkanes from desert plants of Baja California. *Biochem Syst Ecol* **9:205-6.**
- Provant, G. F., Gray, A. I., Waterman, p. G. (1987). Monoterpene rich resins from some Kenyan Burseraceae. *Flav. Frag. J.* **2(3): 115-118.**
- Rao, D. (1970). Burseraceae. *Bull Indian Natl. Sci. Acad.* **41:148-150.**
- Rhoades, D. F. (1979). Evolution of plant chemical defense against herbivores. En: Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal and Janzen (Eds) Academic Press, Inc.
- Robles, S., R. (1994). Producción de granos y forrajes. Limusa, México, D. F., pp. 9-152.
- Rohmer, M. (1999). A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. *Comp. Nat. Prod. Chem. Vol. 2*, Cane, D., Ed., Pergamon Press, pp. 45-68.

- Rojas, J. C. (1999). Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* **25**: 1867-1883.
- Ross, H. H. (1982). Introducción a la entomología general y aplicada. Omega, Barcelona España, 5ª ed., 536 p.
- Ryan, M. F. And Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* **14**:1965-1975.
- Rzedowski, J., Kruse, H. (1979). Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon* **28**:103-116.
- Rzedowski, J. and Ortiz, E. (1982). Estudios quimiotaxonómicos de *Bursera* (Burseraceae) I. *Bursera chemaodicta* sp. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **43**:73-80.
- Rzedowski, J. and Guevara-Fefer, F. (1992). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 3. Familia Burseraceae. Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Veracruz, México, pp. 1-46.
- Schoonhoven, L. M. (1982). Biological aspects of antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* **31**:57-69.
- Shinoda, T., Nagao, T., Nakayama, M., Serizawa, H., Koshioka, M., Okabe, H., and Kawai, A. (2002). Identification of a Triterpenoid Saponin from a Crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Chem. Ecol.* **28**:587-599.
- Sosa, S. Balick, M. J., Arvigo, R. Esposito, R. G. Pizza, C. Altinier, G. and Urbano, (2002). A Screening of the topical anti-inflammatory activity of some central American plants. *J. Ethnopharmacol.* **81**:211-215.
- Soulé, S., Guéntner, C. Vazquez, A., Argandona, V., Moyna, P. and Ferreira, F. (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochem.* **55**:217-222.
- Strong, D. R. 1984. Insects on plants. Harvard University Press, Cambridge, 313
- Sultana, I., Hosokawa, C. Nishimura, K., Ikeda, I. and Ozoe, Y. (2002). Benzylidene anabaseines act as high-affinity agonist for insect nicotinic Acetylcholine receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:637-643.
- Toledo, A. C. (1982). El género *Bursera* en el estado de Guerrero. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.
- Van der Dool, and H. Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **11**:463-471.

- Van Emden, H. F. (1972). En *Phytochemical ecology* (Harborne, J. B., ed.), Academic Press, New York, p.25.
- Weinzierl, R. A. (2000). *Biological and biotechnological control of insect pest.* ed. Rechcigl. Edit. Lewis Publishers, London. p. 101-121.
- Wickaramaratne, D. B. M. Mar, W., Chai, H., Castillo, J. J. Farnsworth, N. R. Soejarto, D. D. *et al.* (1995). Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Med.***61: 80-81.**
- Wilson, E. O. (1992). *The diversity of life.* The Belknap Press of harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolite form an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* **64:3-19.**
- Zoghbi, M. G. B., Maia, J. G S. and Luz, A. I. R. (1995). Volatile constituents form leaves and stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J. Ess. Oil Res.* **7:541-543.**