



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE *Sapium*
macrocarpum (Euphorbiaceae).
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
INSECTICIDA E
IMPLICACIONES ECOLÓGICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. ARMANDO SILVESTRE RODRÍGUEZ CASTAÑEDA

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

MÉXICO D.F.

JUNIO, 2008



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.

RECONOCIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, con sede en la Facultad de Ciencias, por haberme permitido continuar con mi labor académica en nuestra máxima casa de estudios.

Al apoyo recibido por CONACYT, cuyo número de registro fue el 194038.

A Los miembros del comité tutorial, Dra. Cristina Pérez-Amador y Barrón, Dr. Zenón Cano Santana y M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por su conocimiento y apoyo vertido durante el período de estudios y titulación.

AGRADECIMIENTOS

A Mi tutor de tesis, M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por haberme dado la oportunidad de avanzar un poco más en el camino de la Ciencia.

Al Dr. Eduardo Aranda[†] y la M. en C. Laura Lina García por la aportación de las larvas de *Spodoptera frugiperda*, y sus valiosos consejos para el manejo y cría de las mismas.

A Mi familia, la cual ha colaborado a lo largo de casi 31 años con cobijo y sustento. Especialmente a **Mi madre** por darme la oportunidad de vivir y existir.

A **Simoneta** y Su mamá Laura que indudablemente forman parte de cada letra, palabra y párrafo vertidos en este escrito. Simoneta, no hay palabras ni cosas materiales que iguallen el hecho de ser la primera persona a la cual brindaste una mirada y una sonrisa. Laura, a veces los escritos e historias poseen más de un tomo. La vida posee vericuetos inimaginables que nos hacen dudar pero nuestra voluntad y valor propio, nos deben guiar.

A Mis compañeros de laboratorio Clarisa, Mariana, Noe, Rodolfo y Youssef por compartir largos periodos de plática, discusión, diversión, hambruna y saciedad, y a los cuales les deseo que triunfen como profesionistas y personas.

A Balam e Itzel, por haberme dado momentos muy gratos, donde compartimos amenas conversaciones, cobijo y sustento alimenticio basado en **salmón**.

A Verónica Cortés Avilés por Sus consejos y Su valiosa ayuda con el idioma inglés.

A los trabajadores miembros de la biblioteca del Instituto de química (sobretudo a la güerita y Jesús), por haberme facilitado gran parte del material bibliográfico y hemerográfico que componen esta tesis.

A los trabajadores miembros de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Laura Velásquez, Rebeca Ramírez y con especial mención, a la Lic. Martha Cariño Aguilar, quién llegó a confiar en mí, apoyándome con material de consulta.

Especialmente a la UNAM, por darme la gran oportunidad de continuar en sus instalaciones y poder aprender un poco mas del inmenso camino de la Ciencia. Sobretudo, por haberme permitido vislumbrar la vida como un mar de posibilidades, en el cual la persona decide hasta que punto deja de nadar en él.

A la vida, que ... sin embargo se mueve, y ya sea que nos parezca clara o no, indudablemente marcha como debiera.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	viii	
1	Introducción	1
1.1	Interacciones	1
1.1.2	Herbivoría	3
1.1.3	Interacción planta herbívoro	3
1.1.4	Interacción planta insecto fitófago	6
1.2	Metabolitos antialimentarios	9
2	Objetivos e hipótesis	12 y 13
3	Antecedentes	14
3.1	Herbivoría en selvas secas	14
3.2	La familia Euphorbiaceae	15
3.2.1	Composición química y utilización del látex	16
3.2.2	<i>Sapium macrocarpum</i>	17
3.2.3	Perfil químico del género <i>Sapium</i>	18
4	Método	20
4.1	Colecta del látex	20
4.2	Extracción y fraccionamiento del látex	20
4.3	Extracción y fraccionamiento biodirigido del látex	23
4.4	Bioensayos	25
4.4.1	Bioensayos de no elección y mortalidad	25
4.4.2	Evaluación de la mortalidad	26
4.4.3	Bioensayos de elección	26
4.4.4	Evaluación del área foliar consumida e índice antialimentario	27
4.5	Aislamiento y caracterización estructural de los componentes químicos del látex	28
5	Resultados	30
5.1	Bioensayos de no elección y mortalidad	30
5.1	Efecto del látex en la mortalidad y peso de <i>S. frugiperda</i>	30
5.2	Efecto del látex en la alimentación de <i>S. frugiperda</i>	33
5.2.1	Efecto de la fracción hexánica II en la alimentación de <i>S. frugiperda</i>	34
5.2.2	Efecto de las subfracciones 4, 9 y 10 obtenidas a partir del extracto hexánico II (F2) en la alimentación de <i>S. frugiperda</i>	36
5.3	La fracción etérea disminuye la alimentación de <i>S. frugiperda</i>	38
5.4	Efecto en la alimentación de <i>S. frugiperda</i> de las fracciones obtenidas a partir del látex	40
5.5	Índice antialimentario	42
5.6	Composición química de la subfracción 4	42

6	Discusión y conclusiones	45
7	Apéndices	57
	Apéndice I Modelo experimental	57
	Apéndice II Lugar de colecta	59
	Apéndice III Mapa de localización REBIOSH	61
	Apéndice IV Bioensayos de no elección y mortalidad	62
	Apéndice V Bioensayo de elección	63
	Apéndice VI Preparación de la dieta	64
	Apéndice VII Ingredientes de la dieta artificial	65
	Apéndice VIII Componentes de la solución vitamínica	65
	Apéndice IX Espectros de los ácidos grasos activos	66
	Literatura citada	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de la azadiractina	11
Figura 2	Tasa de herbivoría de 21 especies analizadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla Morelos	15
Figura 3	Diterpenos de forbol encontrados en <i>Sapium indicum</i>	19
Figura 4	Extracción y fraccionamiento del látex de <i>S. macrocarpum</i>	22
Figura 5	Extracción y fraccionamiento del látex de forma biodirigida	24
Figura 6 y 7	Efecto del látex de <i>S. macrocarpum</i> en la mortalidad de <i>S. frugiperda</i>	30 y 31
Figura 8	Efecto del látex en el peso de <i>S. frugiperda</i>	32
Figura 9	Efecto del látex en el consumo foliar de <i>S. frugiperda</i>	33
Figura 10	Efecto de la fracción hexánica II en el área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i>	35
Figura 11	Efecto de la subfracción 4 en el área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i>	36
Figura 12	Papel de la subfracción 9 en el área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i>	37
Figura 13	Papel de la subfracción 10 en el área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i>	37
Figura 14	Efecto del extracto etéreo en el consumo foliar de <i>S. frugiperda</i>	38
Figura 15	Participación del extracto polar II (F3) en el área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i>	39
Figura 16	Área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i> , al probar el extracto hexánico I	39
Figura 17	Área foliar consumida por <i>S. frugiperda</i> por efecto del extracto polar I (F6)	40
Figura 18	Consumo foliar promedio de <i>S. frugiperda</i> por efecto del látex, extractos y subfracciones obtenidas a partir del látex	41

Tabla 5.1	Índice porcentual de consumo foliar respecto al control, obtenido a partir de bioensayos de elección	41
Tabla 5.2	Índices antialimentarios de extractos del látex de <i>S. macrocarpum</i>	42
Tabla 5.3	Ácidos grasos aislados de la subfracción 4	44

RESUMEN

Los seres vivos interactúan continuamente entre sí y como resultado se generan procesos de adaptación y contra-adaptación, donde cada especie evoluciona de forma continua, manteniendo al día su respuesta hacia las especies con las que se relaciona. La herbivoría se considera una interacción de tipo antagónica donde las plantas se ven afectadas y los organismos herbívoros beneficiados. Como resultado se han generado mecanismos de adaptación para disminuir los posibles efectos negativos causados por los herbívoros. Por ejemplo se considera que las plantas han desarrollado defensas directas como lo son, la presencia de metabolitos secundarios, tricomas, endurecimiento de tallos y hojas; también han desarrollado defensas de tipo indirecto, como por ejemplo, compuestos volátiles que atraen a los depredadores del herbívoro. El presente estudio parte de observaciones y registros de campo efectuados en la Reserva de la Biosfera "Sierra de Huautla", en los cuales las especies caducifolias presentan una tasa de herbivoría mayor que las perennifolias. Se observó que *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae) una especie perennifolia, alcanza la tasa de herbivoría mas baja, fue seleccionada porque podría presentar alguna característica que le ayudase a defenderse de los herbívoros. *S. macrocarpum* secreta un látex que se distribuye en toda la planta; esto nos llevó a hipotetizar que el látex o algún componente presente en el, le conferirían protección contra la herbivoría. Se realizaron bioensayos de no elección y elección, donde se evaluó el papel del látex en la mortalidad y alimentación de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz). En el caso de la mortalidad,

se encontró que induce una mortalidad significativa durante los primeros estadios de desarrollo, y en lo que respecta a la alimentación, se obtuvo que el látex disminuye la alimentación de *S. frugiperda*. Se fraccionó el látex de forma biodirigida y se evaluó el papel de las fracciones en la alimentación, obteniendo que éste posee componentes químicos de naturaleza no polar que disminuyen la alimentación de *S. frugiperda*. La subfracción f4 obtenida de un extracto hexánico, está compuesta por 9 componentes pertenecientes a los ácidos grasos los cuales disminuyen significativamente la alimentación de *S. frugiperda*, aunque no fue posible determinar cual o cuales de los nueve ácidos grasos son los responsables del efecto negativo en la alimentación. Aunado a esto, se encontró que la subfracción f9 (derivada del mismo extracto hexánico) y extracto etéreo, muestran una tendencia a disminuir la alimentación. Esto muestra que el látex posee componentes químicos que modifican el desempeño de los insectos y que pueden ser considerados para controlar la dinámica poblacional de organismos plaga y disminuir con ello el efecto negativo en cultivos de importancia agrícola.

SUMMARY

The alive beings interact continuously to each other and as result processes of adaptation and against-adaptation are generated, where each species evolves of continuous form, maintaining to the day its answer towards the species to which it is related. Herbivory is considered an interaction of antagonistic type where the plants are affected and the herbivorous organisms benefitted. As result adaptation mechanisms have been generated to diminish the possible negative effects caused by the herbivorous. For example it is considered that the plants have developed direct defenses as they are it, the presence of secondary metabolites, trichomes, hardening of stems and leaves; also they have developed defenses of indirect type, like for example, volatile compounds that they attract the predators of herbivorou. The present study part of observations and registries of field conducted in the Reserve of the Biosphere "Sierra of Huautla", in which the species deciduous present a rate of herbivory greater than perennials. It was observed that *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae) a perennial species, reached the lower herbivory rate, it was selected because could display some characteristic that aid to defend itself to it of the herbivorous. *S. macrocarpum* secrets a latex that is distributed in all the plant; this took to us to hypothesize that latex or some component present in it, conferred protection to it against herbivory. The paper of latex in the mortality and feeding of *Spodoptera frugiperda* (cogollero worm of the maize) was evaluated. In the case of mortality, one was that it induces a significant mortality, and with regard to the feeding, bioassays of election were made and it was

obtained that latex diminishes the feeding of *S. frugiperda*. Latex was divided of biodirected form and the paper of the fractions in the feeding was evaluated, obtaining that this one has chemical components of nonpolar nature which they diminish the feeding of *S. frugiperda*. The subfraction f4 obtained of a hexane extract, is composed by 9 components pertaining to fatty acids which diminish the feeding of *S. frugiperda* significantly, although was not possible to determine as or as of nine fatty acids was or were the responsible of the negative effect in the feeding. Combined to this, one was that the subfraction f9 (derived from the same hexane extract), ethereal extract and polar extract I, show a tendency to diminish the feeding. This shows that latex has chemical components that modify the performance of the insects and that can be considered to control the population dynamics of organisms plague and to diminish with it the negative effect in cultures of agricultural importance.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Interacciones

Los seres vivos interactúan de forma variable con los diversos componentes del ambiente, responden a ellos, e influyen de modo diverso sobre las condiciones de su hábitat. Por ejemplo, pueden añadir o sustraer recursos y modificar su disponibilidad para otros organismos (Begon *et al*, 1988). Las poblaciones interactúan cuando las propiedades o acciones llevadas a cabo por individuos de una de estas, inducen un cambio en alguna característica de la otra (Abrams, 1987). Como resultado del fenómeno de interacción, se generan procesos de adaptación y contra adaptación, donde cada especie evoluciona de forma continua, manteniendo al día su respuesta hacia la especie con la que interactúa (Otto y Nuismer, 2004). Las características que se modifican en una interacción y que generalmente son estudiadas son: el tamaño poblacional, la tasa de cambio del tamaño poblacional y la distribución espacial de la población (Abrams, 1987). Tomando en cuenta el mecanismo, o la forma en que se presenta la interacción entre los individuos, se distinguen varios tipos de interacciones: competencia, depredación, parasitismo, mutualismo y enfermedad (Brown *et al.*, 2001).

Las interacciones bióticas en su gran mayoría están mediadas por sustancias químicas, de forma que los organismos producen algún tipo de señal química y responden su vez en forma muy particular a la emisión de sustancias químicas producidas por otros seres vivos (Ruther *et al*, 2002). El estudio de la estructura de las sustancias químicas que median la comunicación o interacción

entre organismos (infoquímicos) y la función ecológica que estas desempeñan es el campo de acción de la ecología química (Ruther *et al*, 2002). Estas sustancias (metabolitos secundarios o productos naturales) son generalmente biosintetizados a partir de los metabolitos que participan en procesos fisiológicos primarios (Drew, 1977; Mann, 1987). Ellos son relevantes para la supervivencia y desempeño de las plantas, por lo que representan caracteres adaptativos que han estado sujetos a presiones de selección natural durante el proceso evolutivo (Wink, 2003). Se conocen más de 130,000 productos naturales, los cuales poseen amplia variación estructural y pueden participar en procesos como la atracción de polinizadores, defensa frente a depredadores (p. ej: herbívoros), pueden efectuar funciones fisiológicas como la captación de óxidos de nitrógeno (NO_2) y proteger contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (Cordell, 2000; Facchini, 2001; Schwab, 2003; Wink, 2003).

1.1.2 Herbivoría

La herbivoría constituye una interacción antagónica entre plantas y herbívoros (nemátodos, moluscos, insectos, peces, anfibios, aves y mamíferos), la cual se ha catalogado como una interacción depredatoria. En este proceso, las plantas presentan un daño causado por los herbívoros y se desencadenan relevantes repercusiones ecológicas y evolutivas tanto para la planta como para el herbívoro (Ehrlich y Raven, 1964). Se ha planteado, que derivado del proceso de herbivoría, las plantas han desarrollado evolutivamente mecanismos de defensa directos, constituidos por: sustancias químicas, barreras mecánicas y fenológicas; de la misma forma, se han relacionado mecanismos de defensa indirectos, como lo es, la producción de compuestos volátiles que atraen al depredador del herbívoro (Coley y Barone, 1996; De Moraes *et al.*, 1998; Farmer, 2001; Kessler y Baldwin, 2002).

1.1.3 Interacción planta herbívoro

Las relaciones planta–herbívoro (animal) han ocurrido a lo largo de aproximadamente 400 millones de años de evolución conjunta (Labandeira, 1998). Las plantas juegan un papel trascendental en las interacciones sostenidas entre comunidades y afectan la evolución, dinámica poblacional y estructura de comunidades de herbívoros y patógenos (Kennedy y Barbour, 1992). Las plantas proveen una gran diversidad de hábitats, alimento, sitios de oviposición y apareamiento (Edwards y Wratten, 1980; Mello y Silva-Filho, 2002).

Las plantas y los organismos fitófagos se encuentran en un proceso coevolutivo constante, el cual fue planteado por Erlich y Raven (1964) y definido como la presencia de un cambio evolutivo en una característica de los individuos de una población, en respuesta a una característica de los individuos de una segunda población, seguida por una respuesta evolutiva por la segunda población dada la respuesta en la primera (Janzen, 1980). Dichas respuestas recíprocas entre plantas y especies fitófagas tienden a incrementar la diversidad de especies en ambos grupos (Jermy, 1984). La teoría coevolutiva mantiene su planteamiento en cuatro postulados (Jermy, 1984): 1) los insectos fitófagos disminuyen el desempeño de las plantas, 2) los ataques de los insectos son utilizados por las plantas para desarrollar resistencia, 3) los metabolitos secundarios son el principal mecanismo de defensa contra el ataque de los insectos, y 4) la competencia interespecífica es un factor crucial en la evolución de los insectos.

A lo largo del proceso de interacción entre las plantas y herbívoros, se ha favorecido la aparición en las plantas de características cualitativas y cuantitativas que disminuyen la fitofagia (Kennedy y Barbour, 1992). Un ejemplo de esto lo constituye la presencia de compuestos químicos inherentes al metabolismo de las plantas como alcaloides, terpenos y glucósidos cianogénicos, aunados a ciertas características físicas de las plantas como la presencia de tricomas y el endurecimiento del tallo y hojas (Kennedy y Barbour, 1992; Mello y Silva-Filho, 2002).

El fenómeno de herbivoría es un fenómeno dinámico en el que las plantas y los herbívoros mutuamente regulan su dinámica poblacional y metabolismo (Van Emden y Way, 1973). Los organismos herbívoros modifican la dinámica poblacional y características del desempeño de las plantas, como lo es el crecimiento, éxito reproductivo, establecimiento de la plántula, tasa fotosintética y ocupación del hábitat (Kennedy y Barbour, 1992). Por su parte, las plantas pueden regular el desarrollo y crecimiento de insectos herbívoros al modular la calidad y cantidad de los nutrimentos presentes en la parte que usualmente es consumida. Mediante estos mecanismos, aumenta la mortalidad de los huevecillos depositados en las plantas por los insectos y disminuye la proporción y fecundidad de insectos colonizadores (Osborne, 1973; Van Emden y Way, 1973).

Las plantas modifican la cantidad y especificidad de los componentes volátiles que sintetizan, los cuales participan en la atracción de parasitoides, desencadenando con ello una interrelación en dos o más niveles tróficos (Van Emden y Way, 1973). Por ejemplo, se ha visto que plantas de manzano (*Malus domestica*), maíz (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y algodón (*Gossypium barbadense*) después de presentar daño foliar, liberan una mezcla de compuestos volátiles, con lo cual, atraen al depredador o parasitoide del insecto herbívoro (Stout y Bostock, 1999).

1.1.4 Interacción planta insecto fitófago

Se ha catalogado a un insecto como fitófago si se alimenta de tejido vegetal o de savia de las plantas (Jermy, 1984). Las interacciones entre plantas e insectos son tan amplias que son consideradas como de las más diversas que se sostienen entre taxas de comunidades terrestres (Thompson, 1988). Considerando la relación taxonómica de las plantas de las cuales se alimenta un grupo de insectos ya sea relacionados o no filogenéticamente, Jermy (1984) distingue cuatro tipos de relaciones entre plantas e insectos fitófagos: 1) especies de insectos estrechamente relacionadas ya sea mono u oligofagos que se alimentan de plantas filogenéticamente distantes, siendo muy común en el orden Lepidoptera (Lycaenidae, Hyponomeutidae), Diptera (Cecidomyidae, Anthomyidae) Coleoptera (Bruchidae, Curculionidae, Chrysomelidae), entre otros; 2) especies de insectos estrechamente relacionadas que mantienen un hábito alimenticio de oligofagia sobre un grupo de plantas pertenecientes a la misma familia o genero, se ha registrado en el orden Hemiptera, donde especies de la familia Kermesidae se alimentan sobre especies de plantas pertenecientes a la familia Fagaceae; 3) especies de insectos estrechamente relacionadas que mantienen un hábito alimentario de oligofagia en plantas muy relacionadas filogenéticamente, como es el caso de especies de la familia Adelgidae (Homoptera) que se alimentan de algunas especies de plantas de la familia Pinaceae, y 4) insectos polífagos que viven en plantas que se cree pertenecen a familias distintas e incluso diferentes ordenes, en este caso las especies de insectos utilizan a diferentes plantas como hospederas durante su ontogenesis,

como sucede con *Eurydema oleracea* (Hemiptera; Pentatomidae) (Jermy, 1984).

Al protegerse las plantas del ataque de los insectos éstas pueden ingresar a un nuevo nivel de adaptación que les puede encaminar hacia un proceso de radiación evolutiva. A su vez, también los insectos tienden a adaptarse a las plantas protegidas y con ello pueden encaminarse hacia un proceso de diversificación en ausencia de otras especies fitófagas competentes (Jermy, 1984).

La interacción planta-insecto es considerado un sistema dinámico y se encuentra sujeto a variaciones temporales. Ambos tipos de organismos se encuentran en una "carrera armamentista" (Mello y Silva-Filho, 2002). En el caso de las plantas, éstas reducen el daño ocasionado por los insectos desarrollando defensas químicas y barreras físicas, por su parte, los insectos hechan mano de estrategias que les permiten sobrepasar dichas barreras. Por ejemplo, un mecanismo empleado por los insectos mediante el cual controlan o eluden la toxicidad de un metabolito secundario, es el proceso de desintoxicación y secuestro de dicho metabolito mediante la participación de enzimas específicas presentes en su tracto digestivo; aunado a esto, los insectos han desarrollado una gama de conductas que usan para eludir el efecto adverso de dichos compuestos (Mello y Silva-Filho, 2002).

Los insectos fitófagos han sido clasificados como especialistas (monófagos u oligófagos) y generalistas (polífagos), siendo los especialistas los que se encuentran en mayor número (Bernays y Chapman, 1994). Los insectos

polípagos se encuentran adaptados de forma parcial a un mayor número de ambientes o parámetros ecológicos, por lo que sus mecanismos adaptativos resultan ser de mayor complejidad dado que tiende a responder a un mayor número de metabolitos secundarios pertenecientes a las plantas con las cuales interacciona (Mello y Silva-Filho, 2002). En el caso de los insectos especialistas, éstos guardan una relación más estrecha con su planta huésped, al grado que dicha planta puede fungir como lugar de encuentro del sexo opuesto o puede contener ciertos precursores de la biosíntesis de feromonas, o bien el insecto puede presentar mecanismos de desintoxicación y almacenamiento de metabolitos más específicos (Jermy, 1984; Mello y Silva-Filho, 2002). Se ha determinado que una restricción en el número de plantas huésped, confiere una mayor estabilidad al insecto. Un insecto especialista posee la capacidad de reconocer a su planta hospedera de las no hospederas utilizando un sistema de receptores sensoriales que reconocen o detectan cierto tipo de compuestos químicos presentes en la planta. Por tanto, los compuestos secundarios de las plantas funcionan como una huella dactilar altamente específica que conlleva al reconocimiento de la planta mediante un mecanismo quimiosensor que desencadena un proceso conductual en el insecto (Jermy, 1984). Al grado que se piensa que la selección de una nueva planta huésped resulta principalmente de cambios que se dan en el sistema quimiosensor del insecto (Jermy, 1984).

Al ser atacada una planta por un insecto, esta puede desencadenar una respuesta específica que previene el ataque de otro tipo de insectos. Se ha visto que diferentes tipos de insectos fitófagos pueden ser sensibles a un mismo tipo

de compuestos y pueden poseer mecanismos de detoxificación similares (Stout y Bostock, 1999)

1.2 Metabolitos antialimentarios

El manejo y control de plagas que afectan principalmente a plantas de interés alimenticio ha estado basada principalmente en el uso de plaguicidas de origen sintético de amplio espectro. El uso y abuso de este tipo de compuestos ha promovido su acumulación excesiva, incrementado el deterioro ambiental denotado por un aumento en la contaminación del aire, agua y suelo, implicando un impacto negativo sobre poblaciones de organismos no blancos incluyendo al hombre (Coats, 1994).

Por ello, una estrategia usada con la cual se disminuyen o evitan los efectos colaterales que acarrea el uso de plaguicidas y ayuda a controlar poblaciones perjudiciales en la agricultura, ha sido el aprovechar la relación evolutiva sostenida entre plantas e insectos herbívoros. Es decir, aprovechar la actividad que tienen los compuestos derivados del metabolismo secundario provenientes de las plantas sobre las poblaciones de insectos, dado que se observado que algunos metabolitos secundarios, pueden tener actividad tóxica o actúan como antialimentarios y disuaden a los insectos de continuar alimentándose de las plantas (Schoonhoven, 1982; Jain y Tripathi, 1993; Data *et al.*, 1996; Zalucki *et al.*, 2001). Se define a un compuesto antialimentario, como una sustancia que modifica la conducta del organismo herbívoro disuadiéndolo de continuar alimentándose y reduce el consumo del insecto sobre la planta

(Isman, 2002; Koul, 2005). La actividad antialimentaria derivada por acción de este tipo de compuestos, conlleva a la inducción de cambios en parámetros de las poblacionales de insectos (Perera *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha determinado que el insecto alcanza menor talla en su etapa de larva, oviposita menor cantidad de huevecillos, disminuye su talla y es menor el número de larvas y el porcentaje de pupas que emergen al estadio adulto (Data *et al.*, 1996; Perera *et al.*, 2000; Zalucki *et al.*, 2001; Ignacimuthu, 2004). Por ello, el uso de compuestos químicos con efecto antialimentario en poblaciones de insectos constituye una opción atractiva y viable para el manejo de poblaciones de insectos (Jain y Tripathi, 1993).

Los compuestos considerados como antialimentarios forman parte de un grupo más extenso de compuestos denominados semioquímicos, los cuales modifican el crecimiento, desarrollo, conducta y distribución de organismos de una especie distinta. Pertenecen al grupo de compuestos denominados alomonas, los cuales al ser producidos o adquiridos por un organismo y al entrar en contacto con un individuo de una especie distinta, ocasionan en el organismo receptor una respuesta conductual o fisiológica (Hick *et al.*, 1999; Koul, 2005). Se considera que las alomonas son compuestos producidos por vías del metabolismo secundario y son el principal mecanismo de defensa de las plantas frente al fenómeno de herbivoría (Hick *et al.*, 1999).

Koul (2005) menciona que se han descrito alrededor de 900 compuestos considerados como antialimentarios en insectos, dentro de un estimado de 100,000 metabolitos secundarios provenientes sólo de plantas terrestres. Se han

encontrado compuestos con actividad antialimentaria dentro del grupo de los alcaloides, flavonoides, mezclas de aceites esenciales y terpenos (triterpenos principalmente) siendo en el último grupo mencionado donde se ha determinado la mayoría de los antialimentarios conocidos (Jain y Tripathi, 1993). El antialimentario más representativo fue aislado del árbol de neem (*Azadirachta indica*) y se conoce como azadiractina (Lowery e Isman, 1993; Fig. 1).

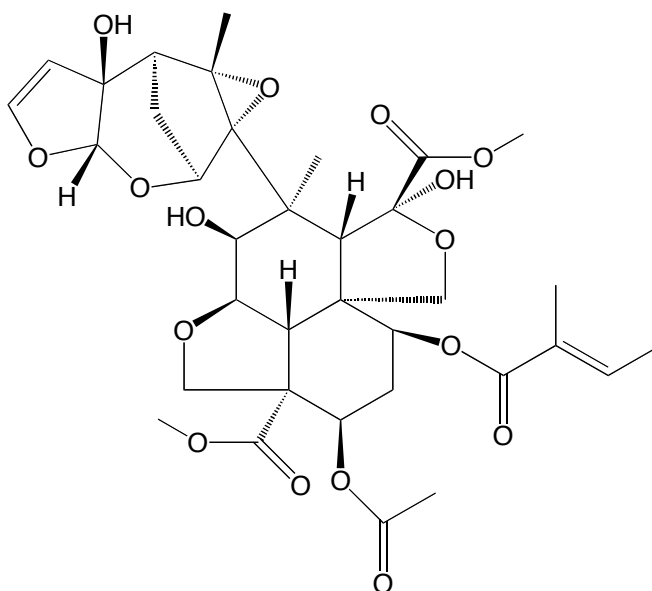


Figura 1.- Estructura química de la azadiractina.

2 OBJETIVOS

Los objetivos generales e hipótesis de este trabajo son:

- 1.- Determinar si el látex de *Sapium macrocarpum* puede inducir mortalidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* un hervíboro generalista.
- 2.- Determinar si el látex de *S. macrocarpum*, fracciones obtenidas a partir del mismo o componentes más específicos de las fracciones, puede reducir la alimentación de *S. frugiperda*.

Derivados de los anteriores, se plantean los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Conocer el efecto del látex de *S. macrocarpum*, sobre la supervivencia y alimentación de *S. frugiperda*.
- 2.- Evaluar el efecto en la alimentación de *S. frugiperda* de extractos del látex obtenidos con disolventes orgánicos.
- 3.- Fraccionar los extractos donde exista inhibición de la alimentación de *S. frugiperda* y probar nuevamente su efecto en la alimentación.
- 4.- Llevar a cabo la separación cromatográfica de las fracciones activas y obtener a partir de estas, sus principales constituyentes químicos, así como determinar su efecto en la alimentación de *S. frugiperda*.
- 5.- Conocer la estructura de los compuestos activos que disminuyen la alimentación de *S. frugiperda*.

La hipótesis en este trabajo tiene fundamento en reportes y observaciones de campo, donde se ha determinado que *S. macrocarpum* presenta bajas tasas de herbivoría y muestra una secreción de látex irritante, el cual se encuentra distribuido en toda la planta, por lo cual se espera que los componentes químicos del látex tengan un efecto negativo sobre la supervivencia y alimentación de *S. frugiperda*.

3 ANTECEDENTES

3.1 Herbivoría en selvas secas

El análisis de las consecuencias ecológicas y evolutivas de la herbivoría ha sido desarrollado en plantas de hábitat con una distribución tropical, principalmente llevado a cabo en selvas húmedas (Coley y Barone, 1996). A su vez, el estudio de la herbivoría en plantas de selvas tropicales secas es aún muy limitado y se cuenta con muy pocas revisiones de campo (Stanton, 1975; Janzen, 1981; Dirzo y Domínguez, 1995; Filip *et al.*, 1995; Carrasco, 2002). En este último tipo de vegetación, la herbivoría es un evento que ocurre en pulsos, los cuales se pueden percibir a simple vista (Dirzo y Domínguez, 1995). En las selvas bajas caducifolias de Mesoamérica se presenta una marcada variación interespecífica en la herbivoría, debido a que existe un contraste muy fuerte en la fenología de las plantas, lo cual es determinado por una orografía accidentada, que a su vez permite la existencia de sitios con mayor disponibilidad de agua entremezclados en una matriz de lomeríos y mesetas que experimentan estrés hídrico estacional. Dichos sitios méxicos, típicamente asociados a cañadas, conducen al desarrollo de franjas de vegetación de galería o riparia (Murphy y Lugo, 1986; Bullock *et al.*, 1995; Dirzo y Domínguez, 1995). Así, mientras la mayoría de las plantas establecidas fuera de las zonas de cañadas pierden su follaje durante la época seca, en la vegetación de arroyos que se localiza en zonas inundables o en bosques de galería, es notable la presencia de vegetación perennifolia (Stanton, 1975; Bullock *et al.*, 1995; Dirzo y Domínguez, 1995).

Estudios de campo realizados en México en la Reserva de la Biosfera "Sierra de Huautla" (Morelos), muestran un daño contrastante en la herbivoría foliar, sobre todo en la herbivoría en especies perennifolias, las cuales alcanzan niveles bajos de herbivoría, mientras que las hojas de las especies caducifolias, alcanzan a su vez niveles de daño intenso (Carrasco, 2002; Fig. 2).

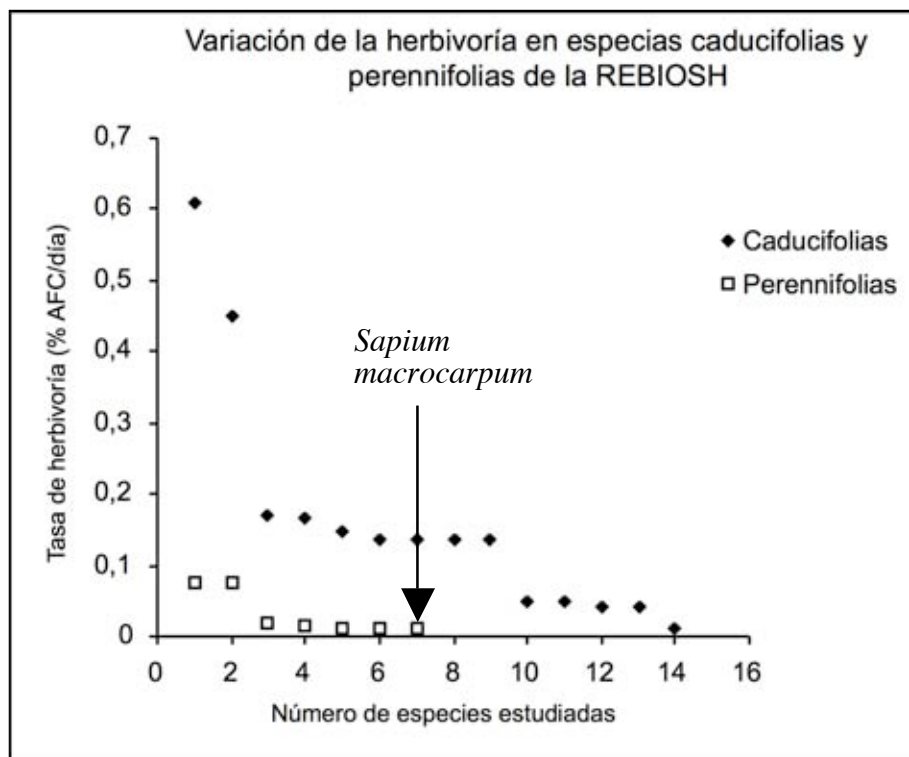


Figura 2.- Tasa de herbivoría de 21 especies analizadas en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla Morelos (REBIOSH; modificado de Carrasco, 2002).

3.2 La familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae comprende cerca de 7,700 especies distribuidas en 317 géneros (Huft, 1987). Posee una distribución pantropical confinada a las regiones neotropicales en América tropical (Huft, 1987). Dentro del perfil químico de esta familia, se ha determinado la presencia de una amplia gama de

metabolitos secundarios como terpenos (di y triterpenos), compuestos fenólicos (flavonoides, ligninas, cumarinas, taninos, quinonas, entre otros), alcaloides, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos (Rizk, 1987; Watson y Dallwitz, 1992; Seigler, 1994). Dentro de la familia Euphorbiaceae existen especies que pertenecen a los géneros *Croton*, *Euphorbia*, *Hura*, *Jatropha*, *Sapium* y *Sebastiania* las cuales secretan un látex lechoso que posee componentes químicos muy irritantes y por lo cual la familia es conocida como "purgativa" (Martínez, 1979; Flores *et al.*, 2001).

3.2.1 Composición química y utilización del látex

Dentro de los componentes químicos que confieren propiedades tóxicas o irritantes al látex de algunas especies de la familia Euphorbiaceae, se ha reportado la presencia de enzimas proteasas (Arima *et al.*, 2000), aminoácidos, terpenos (Evans y Schmidt, 1979) y polifenoles (Yoshida *et al.*, 1994) (ver Seigler, 1994).

El látex presente en algunos géneros de la familia euphorbiaceae y en particular el presente en el género *Euphorbia*, ha sido utilizado por pescadores como veneno para atrapar peces. Por ejemplo los rizomas de *Euphorbia biglandulosa* son aplastados o machacados para liberar el látex en arroyos o ríos de bajo afluente. Derivado de esto, los peces son paralizados por el efecto tóxico del látex y pueden ser utilizados para consumo humano. Otras especies de la familia Euphorbiaceae utilizadas también como piscicidas son *Aleurites*

montana, *Antidesma venosum*, *Croton sylvaticus* y *Elaeophorbium drupifera* (Rizk, 1987).

Rizk (1987) menciona que el látex de algunas especies del género *Euphorbia* y de *Hippomane mancinella* ha sido utilizado en la caza de leopardos y leones, principalmente en países del continente africano. El látex se unta en las flechas de caza y fungen como veneno. También se ha reportado que el látex se utiliza para eliminar verrugas presentes en la piel (González y López, 1983).

3.2.2 *Sapium macrocarpum*

Sapium macrocarpum (Euphorbiaceae; Müller Arg., 1863) es conocido como árbol de leche de fruto grande. Está representado por árboles de 8 a 35 metros de altura, con inflorescencias terminales, solitarias y bisexuales, que tienen afinidad tropical a subtropical; florecen de abril a julio, presentan fruto en los meses que van de mayo a noviembre y poseen látex lechoso que se utiliza para obtener un tipo de caucho (Huft, 1987; Burger y Huft, 1995). La especie posee dos sinonimias: *Sapium mexicanum* (Hemsley, 1901) y *Sapium thelocarpum* (Schum. y Pittier, 1908). Se distribuye en Belice, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá (Jablonsky, 1968; Missouri Botanical Garden, 2005). *S. Macrocarpum*; en México se distribuye en Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Veracruz (Martínez, 1979). Dado que esta especie secreta látex al cual se le atribuyen propiedades sumamente tóxicas e incluso venenosas, se le han

atribuido diferentes nombres regionales como amatillo, chonte, lechón, hincha huevos y palo lechón (Jablonsky, 1968; Martínez, 1979).

3.2.3 Perfil químico del género *Sapium*

Las plantas del género *Sapium* han sido muy poco estudiadas desde el punto de vista químico. La mayoría de los compuestos químicos aislados e identificados en este género, se basan en estudios realizados en *Sapium indicum*. A partir de quien se ha logrado identificar la presencia de diterpenos de forbol y a los cuales se les han atribuido propiedades anti-micobacterianas y anti-inflamatorias (Chumkaew *et al.*, 2003; Fig. 3). Asimismo, en estudios realizados con estos compuestos en la langosta *Locusta migratoria migratorioides* (Acrididae), se observó, que estos diterpenos participan en el aumento del transporte de colina y en la liberación de el neurotransmisor acetilcolina en el espacio sinaptonémico (Knipper y Breer, 1987).

4 MÉTODO

4.1 Colecta de látex

El día 30 de junio del 2005, se colectaron 67.1 g del látex de *S. macrocarpum* usando protección facial y guantes para evitar una posible irritación en la piel. Para extraer el látex de la planta se hizo un pequeño corte en la punta de las ramas o en la base de las hojas o fruto y se dejó escurrir el látex colectándose en un tubo de ensaye. Posteriormente, se vertió éste en un matraz de 100 mL el cual se encontraba almacenado en hielo seco, para evitar la modificación de los componentes del látex. Finalmente, el látex se mantuvo a -4°C hasta su uso.

4.2 Extracción y fraccionamiento del látex

El total del látex (67.1 g) se disolvieron en 100 mL de metanol y apareció un sólido que correspondió a la parte insoluble, la cual fue separada por filtración y se extrajo con 700 mL de acetona a 40°C . Se obtuvieron 11.8 g de una fracción insoluble (F1) y una soluble. Posteriormente, se evaporó la acetona y la fracción soluble se particionó en una mezcla de 120 mL metanol/agua (2:1) y 500 mL de hexano. Se eliminó el hexano en un rotavapor a 38°C y se obtuvieron 6.83 g de la fracción hexánica II (F2). Finalmente se evaporó el metanol y agua a presión reducida y se obtuvieron 0.22 g de la fracción polar II (F3).

En lo que respecta a la parte soluble de la solución metanólica inicial, se eliminó el metanol a presión reducida y posteriormente se extrajo con 500 mL de hexano. Se obtuvieron 1.19 g de una fracción soluble en hexano (F4) y una fracción insoluble. Posteriormente, la fracción insoluble en hexano que

corresponde a un sólido amarillento se particionó en una mezcla de 120 mL metanol/agua (2:1) y 500 mL de éter. Se evaporó el éter en un rotavapor a 38°C y se obtiene una fracción etérea (F5). Finalmente se evapora el metanol y agua a presión reducida y se obtiene una fracción polar I (F6). (ver Fig. 4).

4.2 Extracción y fraccionamiento del látex de *S. macrocarpum*

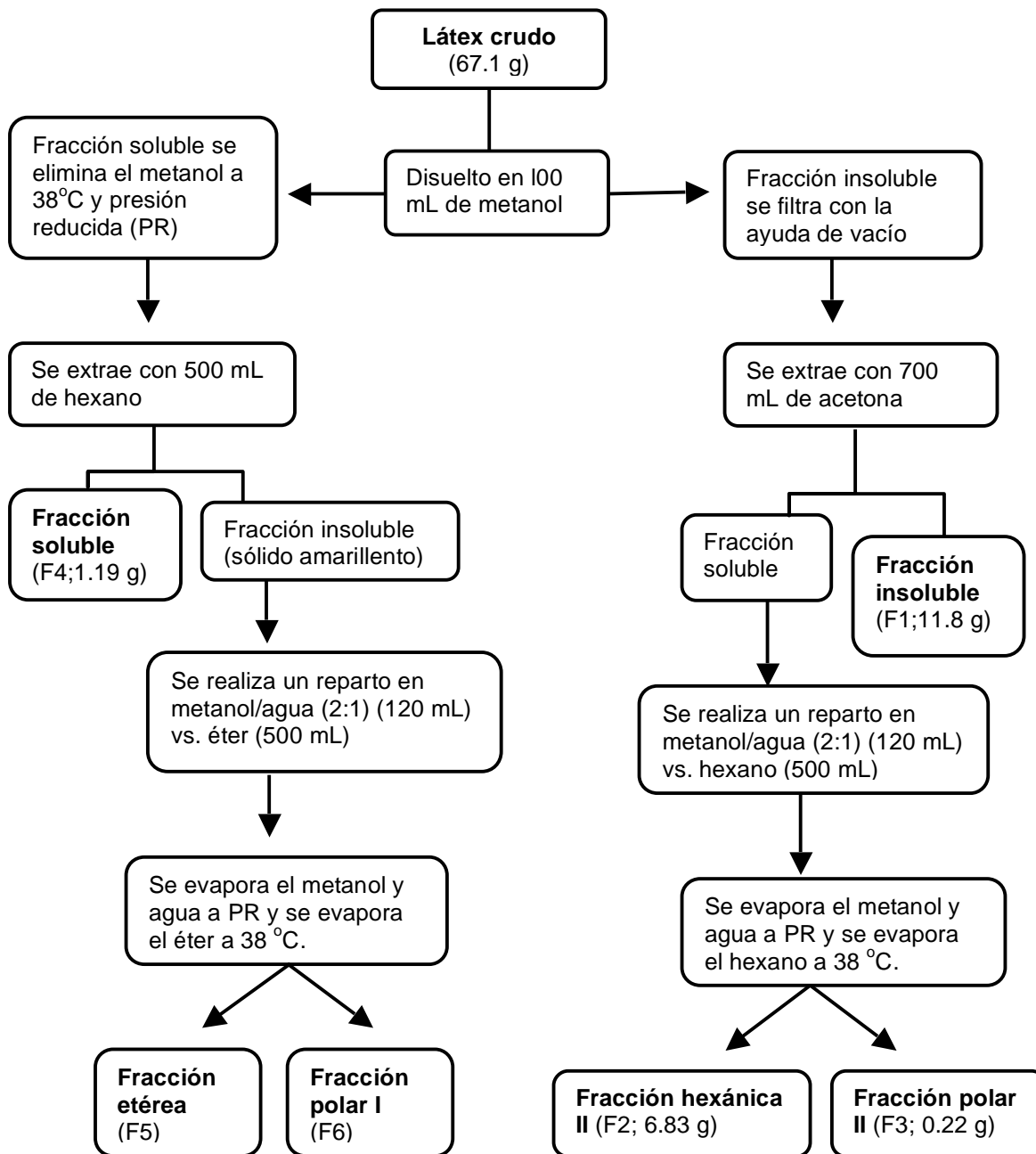


Figura 4. Esquema que muestra la forma en que fueron obtenidas las fracciones del látex de *S. macrocarpum*.

4.3 Extracción y fraccionamiento biodirigido del látex

Como ya fue esquematizado en la figura 4, se obtienen 6 fracciones principales del látex (F1-F6). Aunado a esto, de la fracción 2 que corresponde a la fracción hexánica II, 3.4 g de esta, fueron sometidos a separación por cromatografía en columna. La columna fue eluída con hexano:cloruro de metileno en una proporción 9:1 y 8:2. A partir de esto se obtuvieron 53 fracciones, de las cuales se obtuvieron en mayor cantidad tres fracciones, correspondientes a la fracción 4, 9 y 10 (Fig. 5). Dichas fracciones fueron probadas en los bioensayos de elección, en los cuales sólo la fracción 4 indujo una actividad antialimentaria en *Spodoptera frugiperda*. A su vez de la fracción 4 se lograron identificar nueve compuestos pertenecientes a los ácidos grasos considerados como poco comunes (Fig. 9). La separación de estos compuestos fue efectuada mediante el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (ya descritos). El tipo de columna que se utilizó fue una ultra de 2.25 m de largo, 25 μm y 0.25 mm de grosor. La separación se efectuó con una temperatura inicial de 40 °C por un lapso de un min y fue aumentando la temperatura 7 °C cada minuto, hasta llegar a una temperatura final de 250 °C, donde permaneció 10 min. El gas que se utilizó como acarreador fue helio.

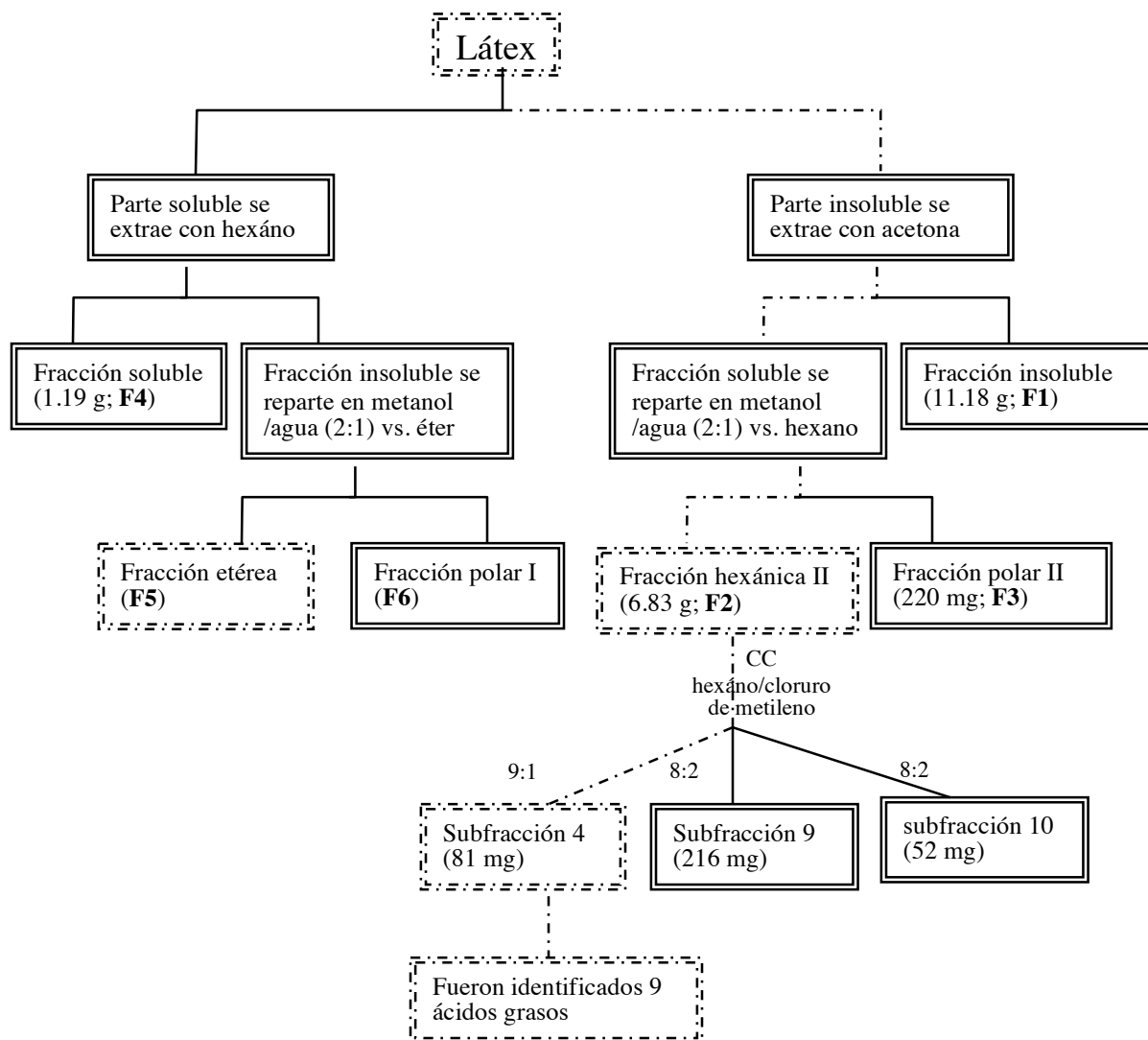


Figura 5.- Extracción y fraccionamiento del látex realizada en forma biodirigida. Las líneas y los recuadros punteados representan a los extractos o fracciones que muestran actividad antialimentaria significativa.

4.4 Bioensayos

4.4.1 Bioensayos de no elección y mortalidad

Se evaluó el efecto del látex en el porcentaje de larvas sobrevivientes y peso alcanzado durante el estadio de larva *S. frugiperda*, modificando la metodología propuesta por Hernández, *et al.*, (1999). La primera cría de larvas de *S. frugiperda*, fue proporcionada por el Dr. Eduardo Aranda[†] del Centro de Estudios e Investigaciones Biológicas (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

La forma en que se efectuaron los bioensayos fue la siguiente:

Se coloca una larva neonata de *S. frugiperda* en cada pozo de una placa de 24 pozos (ver apéndices I y IV), los cuales están recubiertos en la parte del fondo por una dieta artificial tipo merídica (Carson, 2001; ver apéndices VI, VII y VIII). De cada extracto o fracción disueltos en disolvente, son adicionados 35 μ l a cada pozo en una concentración de 1000 ppm. El control sólo contiene 35 μ l del disolvente utilizado, el cual es adicionado 24 h antes de realizar el bioensayo, con la finalidad de que se evapore en su totalidad. Posteriormente, se coloca una larva en cada pozo y se incuban las cajas recubiertas con papel o plástico adherente por una semana a $27 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa (HR) de $60 \pm 5 \%$ y un fotoperiodo de luz:oscuridad 16:8 h. Una vez transcurrida la semana, se registra el peso de las larvas y el porcentaje de mortalidad alcanzado. Posteriormente se pone una larva en cada caja Petri de 3.5 cm de diámetro en presencia de aproximadamente 2 g de dieta artificial y una porción de algodón húmedo. Se dejan incubando a $27 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ con una HR de $60 \pm 5 \%$

y un fotoperiodo de luz:oscuridad 16:8 h. Al paso de cada semana se registra nuevamente el peso alcanzado, la mortalidad, los cambios fenotípicos que muestran las larvas y el porcentaje de larvas que alcanzan el estado de pupa. Además, se limpia la superficie de la caja Petri y se recambia la dieta cada 2 días.

4.4.2 Evaluación de la mortalidad

La eficacia del tratamiento para inducir mortalidad fue calculada por el método denominado porcentaje control (%C), donde el porcentaje de eficacia es corregido tomando en consideración la mortalidad natural observada en las cajas control siguiendo la fórmula de Abbott (1925) como sigue: $\%C = (Cs - Ts) / Cs$, donde Cs y Ts representan el porcentaje de larvas que sobreviven en los pozos control y tratados respectivamente. El porcentaje de larvas que sobreviven fue calculado como $100 (I_r / (I_r + I_t))$, donde I_r representa el número de larvas que sobrevive al tratamiento e I_t el número de larvas muertas debidas al tratamiento.

4.4.3 Bioensayos de elección

Se determinó el efecto de las fracciones del látex sobre la alimentación de *S. frugiperda*, mediante bioensayos de elección (González-Coloma, *et al.*, 1995 y Valencia *et al.*, 2000). Se adiciona agar al 3% en un vaso deprecipitado de 1L, se calienta y se agita para disolverlo en su totalidad. Después es vertido en

cajas Petri de 8.5 cm. de diámetro aproximadamente 2 mm de altura y se deja enfriar. Posteriormente con la ayuda de un sacabocados se hacen cuatro perforaciones en el agar en forma de cruz y en cada perforación se inserta un fragmento de hoja de espinaca comestible (*Spinacea oleraceae*) aproximadamente del mismo tamaño (con el envés hacia arriba). Se procede a colocar sobre dos de los cuatro fragmentos de hoja, 10 µl de una solución del extracto a 1000 ppm y en el caso del control sólo se adiciona disolvente. Se deja evaporar el disolvente y en cada caja Petri se colocan dos larvas de *S. frugiperda* de quinto estadio (aproximadamente 17.2 mm de largo y 2.0 mm de ancho de capsula cefálica) y se les cubre con la tapa para que no escapen. Las larvas a utilizar se dejan toda la noche sin alimento.

Se detiene el ensayo cuando las larvas han comido el 75% de las hojas control o tratadas. No se detiene el ensayo si consumen sólo una hoja control y un solo tratamiento (deben consumir las dos hojas de una misma condición) (ver apéndice V).

4.4.4 Evaluación del área foliar consumida e índice antialimentario

A partir de las áreas foliares no consumidas en los bioensayos de elección, se obtuvo un promedio de área foliar consumida y con ellos se calculó un índice antialimentario de acuerdo con la fórmula $\%IA = (1 - (C_e/C_c)) \times 100$, donde C_e representa el área foliar consumida en las hojas experimentales y C_c el área consumida en las hojas control (Valencia *et al.*, 2000).

Las áreas de consumo foliar fueron calculadas usando el área conocida comprendida por el sacabocados, que a su vez fue utilizado para cortar las hojas de espinaca. Primero las hojas o fragmentos de hoja que no eran consumidas fueron adheridos a una hoja en blanco, posteriormente fueron escaneadas y utilizando el programa de libre acceso Scion Image se calculó el área no consumida, la cual fue restada del área total y fue obtenida el área consumida. Por cada condición o extracto probado fueron utilizadas cinco cajas Petri y por ende se obtuvo el promedio de consumo foliar.

Para determinar el efecto del látex en el desempeño de *S. frugiperda* (peso alcanzado en el estadio de larva e índice antialimentario), los resultados fueron evaluados utilizando una prueba de *t* para datos pareados y un análisis de varianza (AnDeVA) usando el programa SPSS versión 13.0, tomando un valor de $p \leq 0.05$ como significancia.

4.5 Aislamiento y caracterización estructural de los componentes químicos del látex

El análisis de los componentes químicos presentes en las diferentes fracciones obtenidas fue efectuado de forma biodirigida, es decir se procedió a separar e identificar los componentes químicos de la fracción que mostraron un efecto inhibitorio significativo del desempeño de *S. frugiperda*.

La separación y purificación de los compuestos obtenidos se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria gel sílice (Aldrich 200-400 mesh, 60 Å), así como cromatografía en placa fina (CCF),

utilizando placas de gel de sílice (ALUGRAM[®], SIL G/UV₂₅₄) reveladas con una lámpara de luz ultravioleta (ENF-260C) y una solución de 1% de sulfato sérico en ácido sulfúrico 2N. En la elucidación estructural de los compuestos químicos se utilizó la técnica de espectroscopía de infrarrojo (IR) (espectrofotómetro FT-IR Nicolet Magna 750), además de un espectrómetro de masas (Jeol-JMS-AX505HA acoplado a un cromatógrafo de gases (5890 series II) (Villegas, 2004). Las estructuras obtenidas a partir del método anterior fueron comparadas para su validación con las presentes en la base de datos publicada por McIlaferty (1988).

5 RESULTADOS

5.1 Bioensayos de no elección y mortalidad

5.1 Efecto del látex en la mortalidad y peso de *S. frugiperda*

Se evaluó la actividad del látex en la mortalidad de *S. frugiperda*, durante las tres semanas que dura su periodo larvario. El porcentaje de mortalidad de *S. frugiperda* al suministrar el látex muestra, que el látex induce 70% de mortalidad durante el desarrollo de *S. frugiperda* (Figs. 6 y 7).

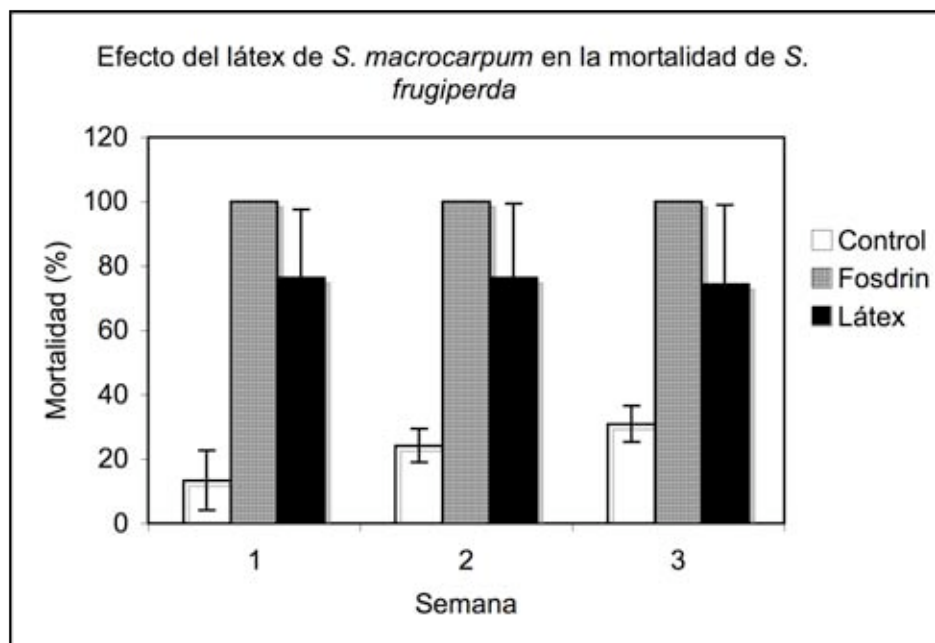


Figura 6.- Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta artificial bajo tres condiciones: control ($t=5.66$, *g.l.* 6, $p=0.001$), fosdrin ($t=4.1$, *g.l.* 4, $p=0.013$) y látex de *S. macrocarpum* ($t=3.7$, *g.l.* 4, $p=0.018$).

Dado que la mortalidad vista en la figura 6 es expresada en porcentajes, y que a su vez, dichos valores no adquieren una distribución normal, para ver el grado de significancia de la mortalidad a lo largo del periodo larvario de *S. frugiperda*, se procedió a convertir los porcentajes en números continuos utilizando la fórmula $X = \text{Arcsen}(\sqrt{(x/100)})$, de forma que se distribuyeran normalmente y poder determinar si existían diferencias significativas en la mortalidad por efecto del látex (fig. 7)

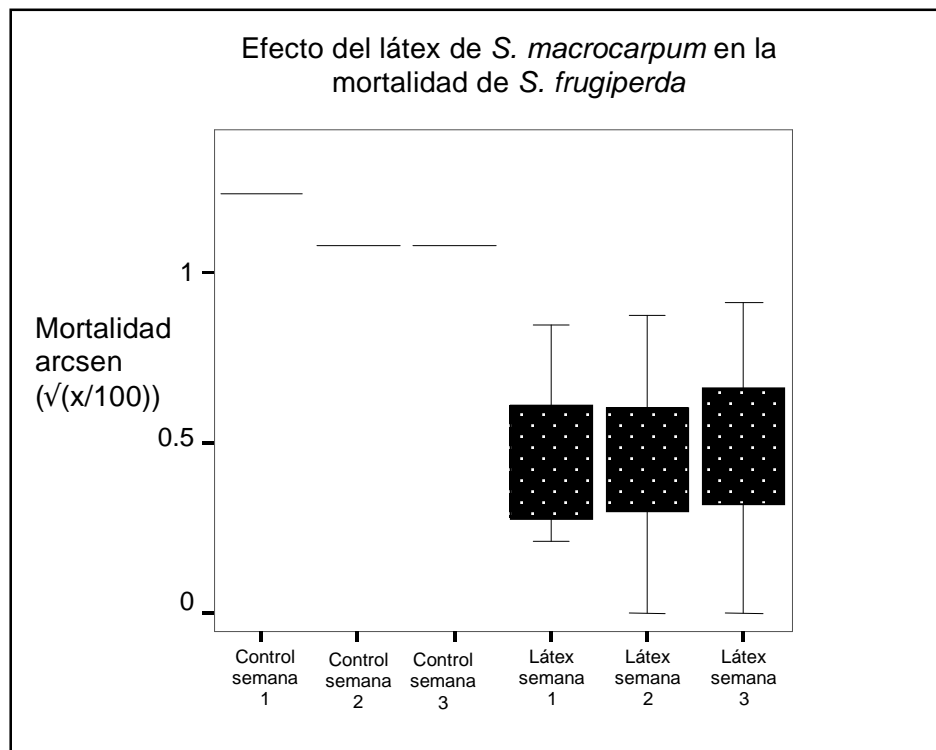


Figura 7.- Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con dieta artificial bajo tres condiciones: control ($t=5.66$, g.l. 6, $p=0.001$), fosdrin ($t=4.1$, g.l.4, $p=0.013$) y látex de *S. macrocarpum* ($t=3.7$, g.l. 4, $p=0.018$).

El registro de la mortalidad se realizó en diferentes días, se observó que entre el cuarto y séptimo día de tratamiento con el látex, se alcanza el mayor porcentaje de mortalidad en *S. frugiperda* (aproximadamente 70%). A partir de ahí, se

estabiliza el registro de muertes y generalmente sólo logran sobrevivir entre dos y tres larvas.

Al evaluar el efecto del látex en el peso de *S. frugiperda*, se observó que las larvas sobrevivientes tienden a disminuir su peso ($p=0.059$) (figura 8).

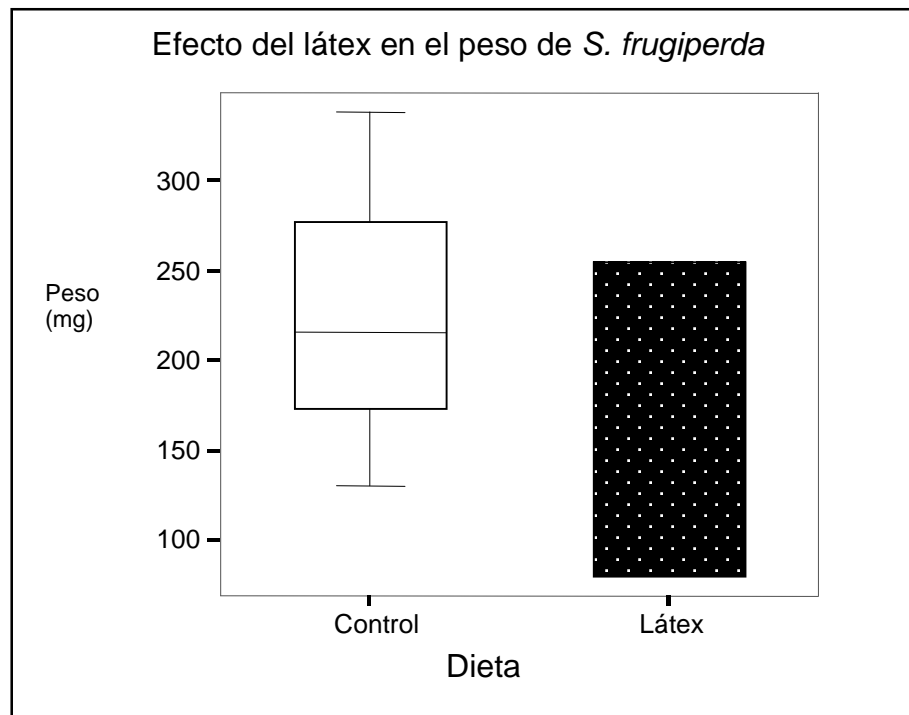


Figura 8.- Efecto del látex en el peso promedio alcanzado durante la primera semana del estadio de larva de *S. frugiperda*, alimentada con dieta artificial en condiciones control y con látex de *S. macrocarpum*. No se observan diferencias significativas en el peso ($p=0.059$). Las barras de error representan los intervalos de confianza al 95%.

5.2 Efecto del látex del látex en la alimentación de *S. frugiperda*

Se llevó a cabo la evaluación del látex en la alimentación de *S. frugiperda*. Los resultados mostrados son promedios representativos de siete bioensayos realizados de forma independiente, en los cuales se observa que el látex reduce significativamente la alimentación de *S. frugiperda* (figura 9).

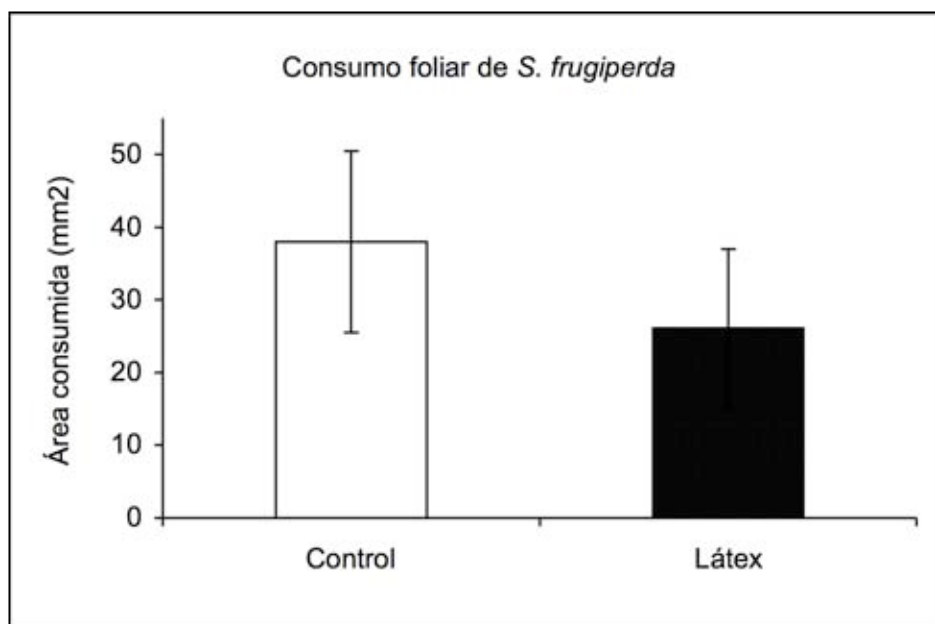


Figura 9.- Área foliar consumida por larvas de *S. frugiperda*, después de ser sometidas al látex a 1000 ppm. Se aprecian diferencias significativas en el consumo ($t=4.446$, *g.l.* 6, $p=0.004$). Se muestra el consumo promedio de siete bioensayos realizados de forma independiente.

5.2.1 Efecto de la fracción hexánica II en la alimentación de *S. frugiperda*

Al probar el efecto del látex en la alimentación de *S. frugiperda* se registra que el látex disminuye la alimentación, por ende, se procedió a realizar una extracción del látex como se esquematiza en la figura 4. De acuerdo a esto, se evaluó la actividad en la alimentación de *S. frugiperda* de las fracciones F2-F6. El extracto insoluble en acetona correspondiente a la F1 no fue evaluado, dado que corresponde a una fracción sólida y la primera fracción usada para ver su efecto en la alimentación de *S. frugiperda*, correspondió al extracto hexánico II (F2). Aunque al observar los promedios de área foliar consumida de la fracción F2, no se observan diferencias significativas en el consumo foliar de parte del grupo control y experimental ($p=0.054$), si hay una tendencia muy marcada en disminuir la alimentación (Fig. 10). Por lo que consideramos conveniente realizar la extracción biodirigida de esta fracción.

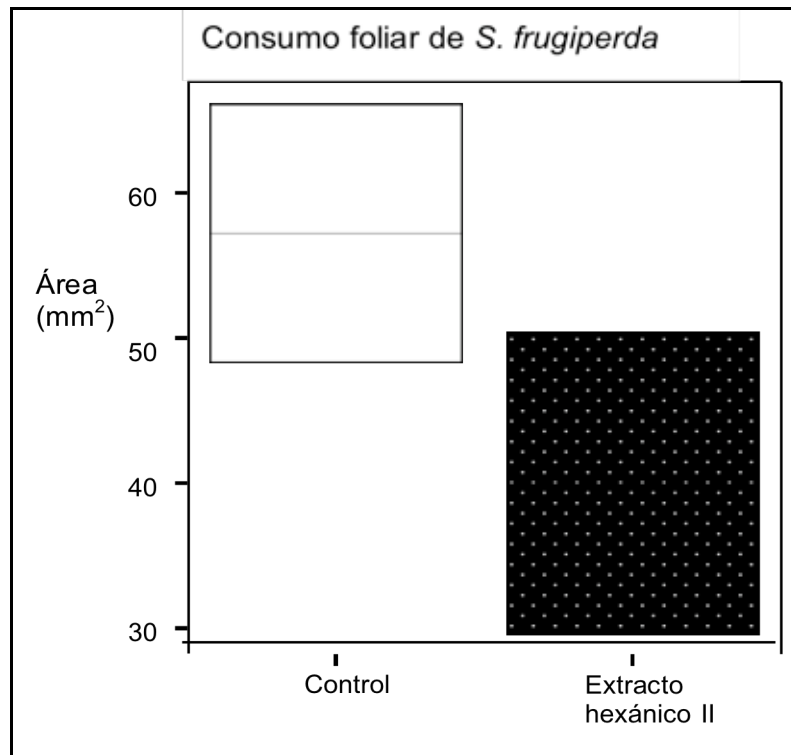


Figura 10.- Efecto de la fracción hexánica II (F2) en el área foliar consumida por *S. frugiperda*. No hay diferencias significativas en el consumo ($t=11.795$, g.l. 1, $p=0.054$).

5.2.2 Efecto de las subfracciones 4, 9 y 10 obtenidas a partir del extracto hexánico II (F2) en la alimentación de *S. frugiperda*.

La fracción F2, tiende a disminuir la alimentación de *S. frugiperda*, por lo que se fraccionó en cromatografía en columna, con la finalidad de aislar sus componentes y probarlos nuevamente en los bioensayos de elección. Se obtuvieron tres subfracciones principales que corresponden a la fracción 4 (96 mg), 9 (216 mg) y 10 (52 mg). Dichas subfracciones fueron probadas nuevamente en los bioensayos de elección y se encontró que la subfracción 4, inhibe significativamente la alimentación de *S. frugiperda* (Figs. 11, 12 y 13 respectivamente).

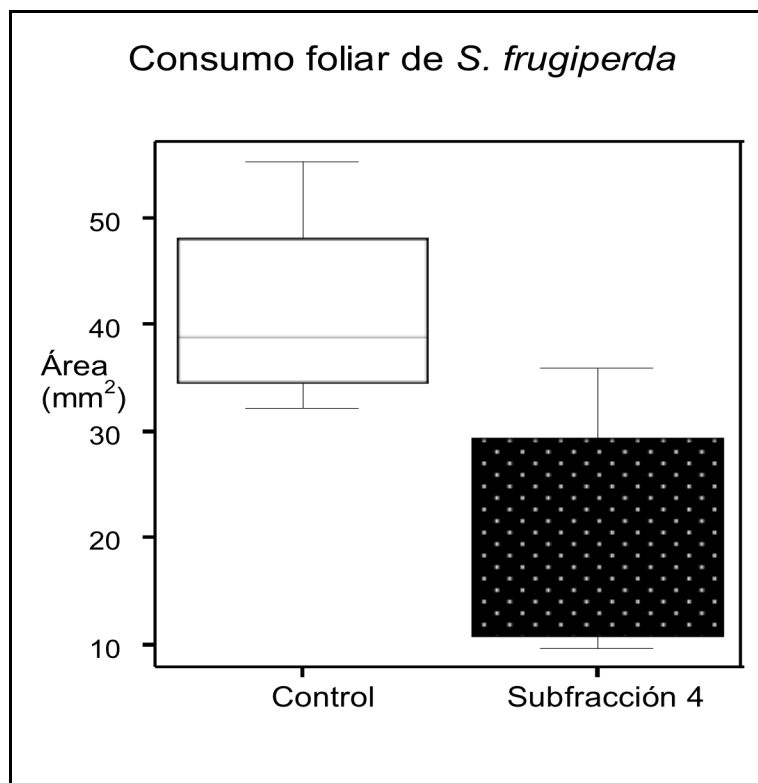


Figura 11.- Efecto de la subfracción 4 en el área foliar consumida por *S. frugiperda*. Existen diferencias significativas en el consumo ($t=3.641$, g.l. 3, $p=0.036$).

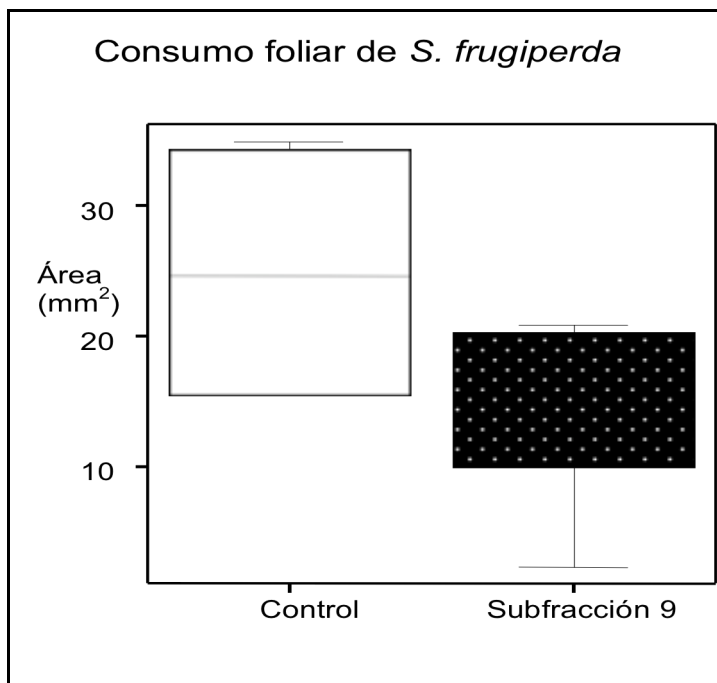


Figura 12.- Papel de la subfracción 9 en el área foliar consumida por *S. frugiperda*. Se muestra que no hay diferencias significativas en el consumo ($t=2.491, g.l.=3, p=0.08$).

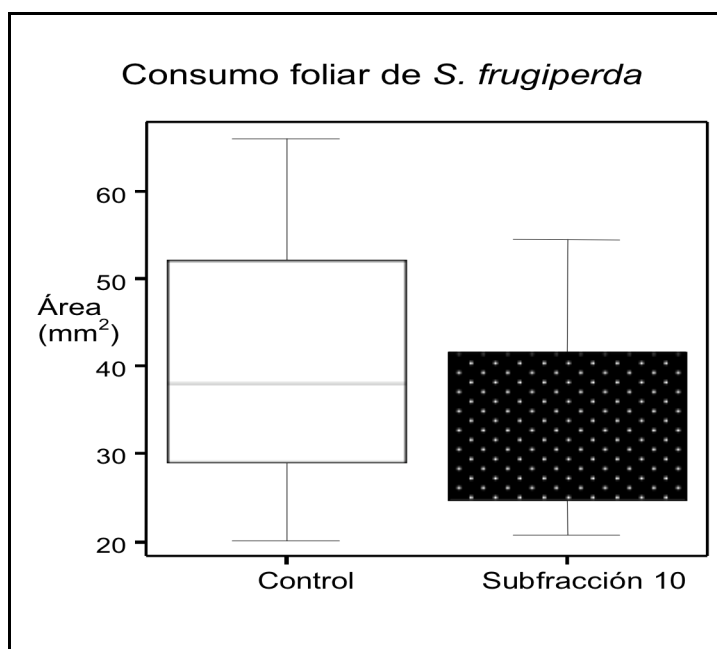


Figura 13.- Papel de la subfracción 10 en el área foliar consumida por *S. frugiperda*. Se muestra que no hay diferencias significativas en el consumo ($t=1.821, g.l.=2, p=0.210$).

5.3 La fracción etérea disminuye la alimentación de *S. frugiperda*

Se evaluó el efecto del extracto etéreo (fracción F5) en la alimentación de *S. frugiperda* y se obtuvo que disminuye significativamente la alimentación (figura 14).

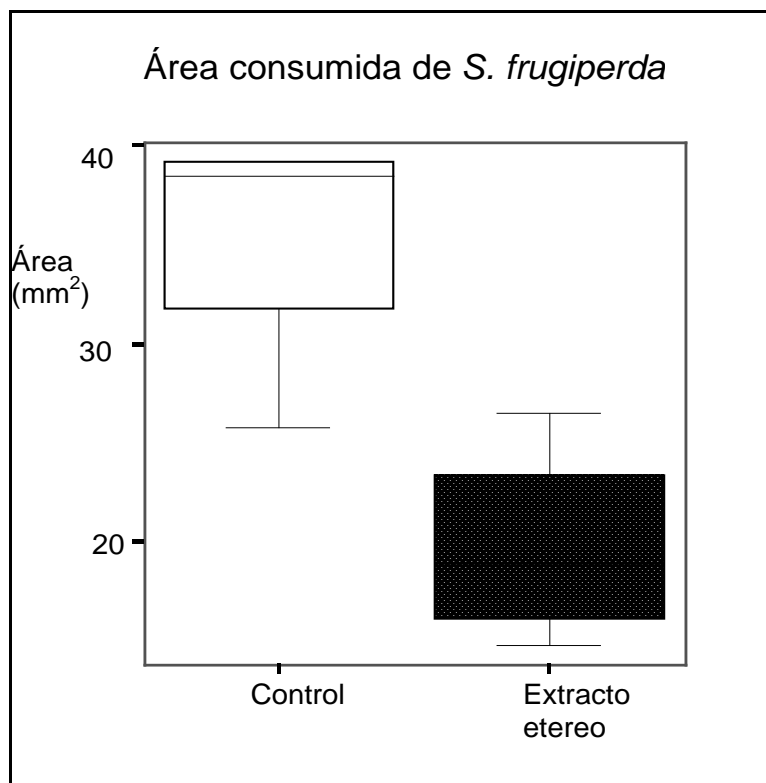


Figura 14.- Efecto del extracto etéreo en el consumo foliar de *S. frugiperda*. Existen diferencias significativas en el consumo ($t=6.930$, g.l. 3, $p=0.006$).

Fue evaluado el efecto en la alimentación de *S. frugiperda* de las fracciones F3 (extracto polar II), F4 (hexánico I) y F6 (polar I), y se observó que éstas fracciones no tienen un efecto en la alimentación de *S. frugiperda* (figuras 15, 16 y 17 respectivamente).

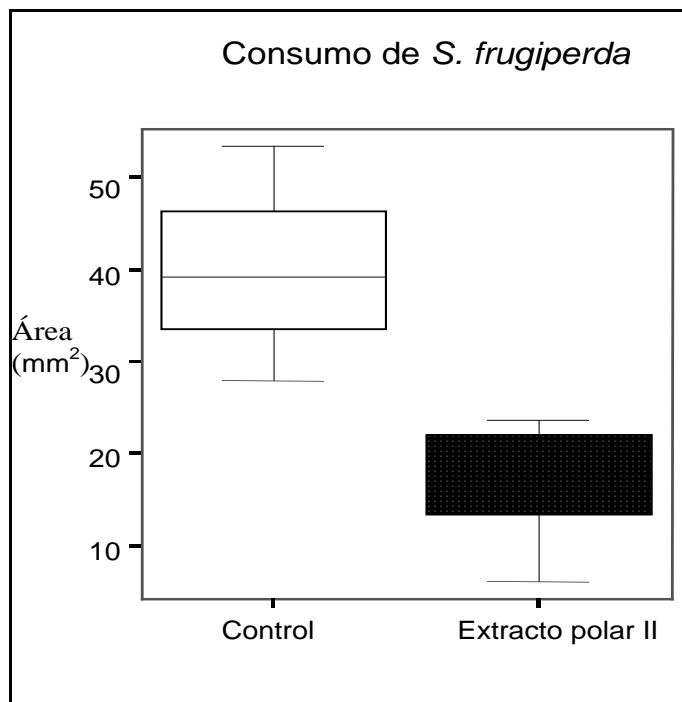


Figura 15.- Participación del extracto polar II (F3) en el área foliar consumida por *S. frugiperda*. No se observan diferencias significativas en el consumo ($t=1.848$, g.l. 2, $p=0.206$).

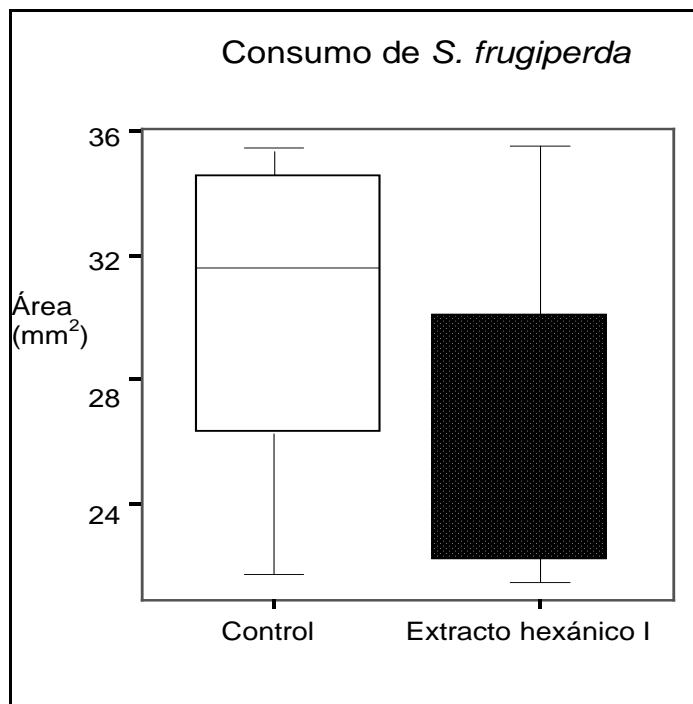


Figura 16.- Área foliar consumida por *S. frugiperda*, al probar el extracto hexánico I (F4). No se observan diferencias significativas en el consumo ($t=0.684$, g.l. 3, $p=0.543$).

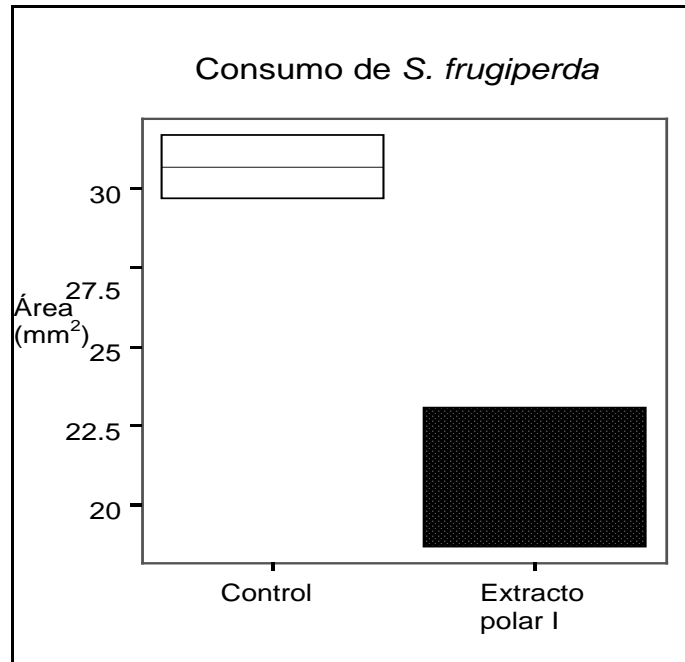


Figura 17.- Área foliar consumida por *S. frugiperda* por efecto del extracto polar I (F6). Se observan diferencias marginalmente significativas en el consumo ($t=8.304$, *g.l.* 1, $p=0.076$).

5.4 Efecto en la alimentación de *S. frugiperda* de las fracciones obtenidas a partir del látex

Se muestra el consumo foliar promedio de *S. frugiperda* por efecto del látex, fracciones y subfracciones obtenidas a partir del látex (figura 18 y tabla 5.1).

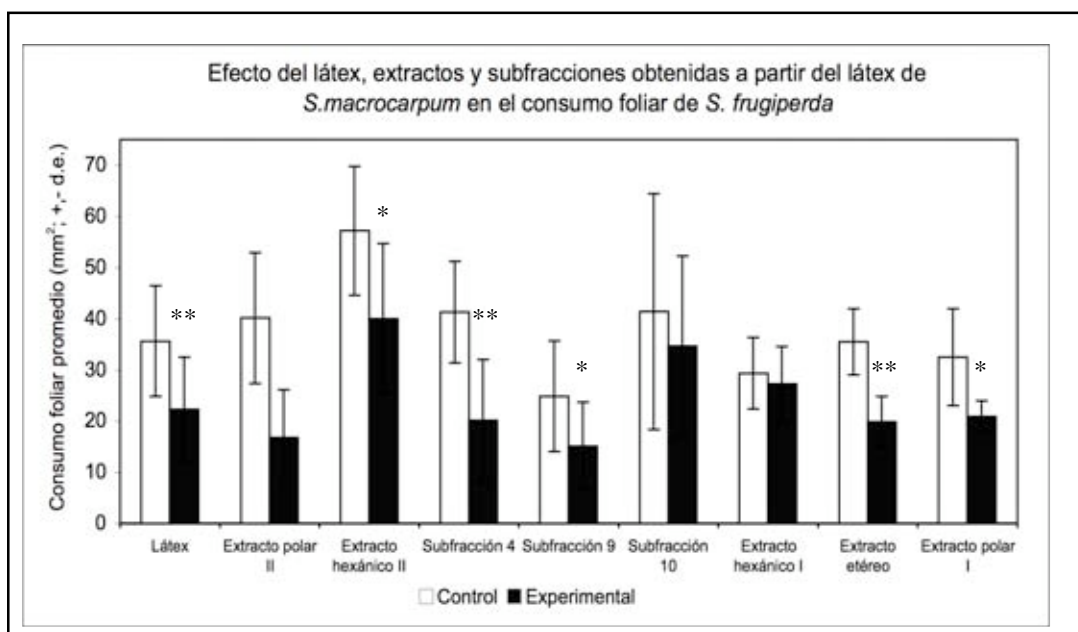


Figura 18.- Consumo foliar promedio de *S. frugiperda* por efecto del látex, extractos y subfracciones obtenidas a partir del látex. Se muestra el consumo promedio de al menos tres bioensayos realizados de forma independiente (mm^2 , \pm d.e). Se marcan con dos asteriscos los extractos en donde se encontraron diferencias significativas en el consumo ($p < 0.05$) y con un asterisco aquellos compuestos donde se mantiene una tendencia a disminuir la alimentación ($p \approx 0.05$).

Tabla 5.1 Índice porcentual de consumo foliar respecto al control, obtenido a partir de bioensayos de elección.

Extracto	Consumo en control (mm^2)	Consumo en experimental (mm^2)	Porcentaje de consumo respecto al control	Índice antialimentario	p
Látex	35.62	22.32	62.66	22.55	0.004
Extracto polar II	40.13	16.73	41.7	50.48	0.206
Extracto hexánico II	57.2	39.98	69.89	45.20	0.054
Subfracción 4	41.32	20.11	48.68	64.29	0.036
Subfracción 9	24.86	15.09	60.76	38.51	0.080
Subfracción 10	41.39	34.62	83.63	0.81	0.210
Extracto hexánico I	29.32	27.23	92.87	6.85	0.543
Extracto etéreo	35.47	19.81	55.85	46.69	0.006
Extracto polar I	32.49	20.90	64.32	32.07	0.076

5.5 Índice antialimentario

El índice antialimentario varió de 0.81 a 64.29 en las subfracciones 10 y 4 respectivamente (tabla 5.1). Valores ≥ 50 se consideran de mas actividad antialimentaria.

Tabla 5.2 Índices antialimentarios de extractos del látex de *S. macrocarpum*.

Extracto	Índice antialimentario
Látex	22.55**
Extracto polar II	50.48
Extracto hexánico II	45.20*
Subfracción 4	64.29**
Subfracción 9	38.51*
Subfracción 10	0.81
Extracto hexánico I	6.85
Extracto etéreo	46.69**
Extracto polar I	32.07*

Un asterisco indica el extracto ó fracción que muestra una tendencia a disminuir la alimentación y dos asteriscos indican diferencias significativas en el consumo foliar de *S. frugiperda*.

5.6 Composición química de la subfracción 4.

Al observar en cromatografía en placa fina que la subfracción 4 parecía no contener más de cinco componentes y dada la pequeña cantidad con que de ella se contaba, se decidió analizar ésta subfracción por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (gases-masas). El cromatograma de la subfracción 4, indicó que realmente estaba conformada por nueve compuestos derivados de ácidos grasos (fig. 19). En la tabla 5.3 se muestran

los nombres y formulas químicas de los compuestos pertenecientes a dicha subfracción.

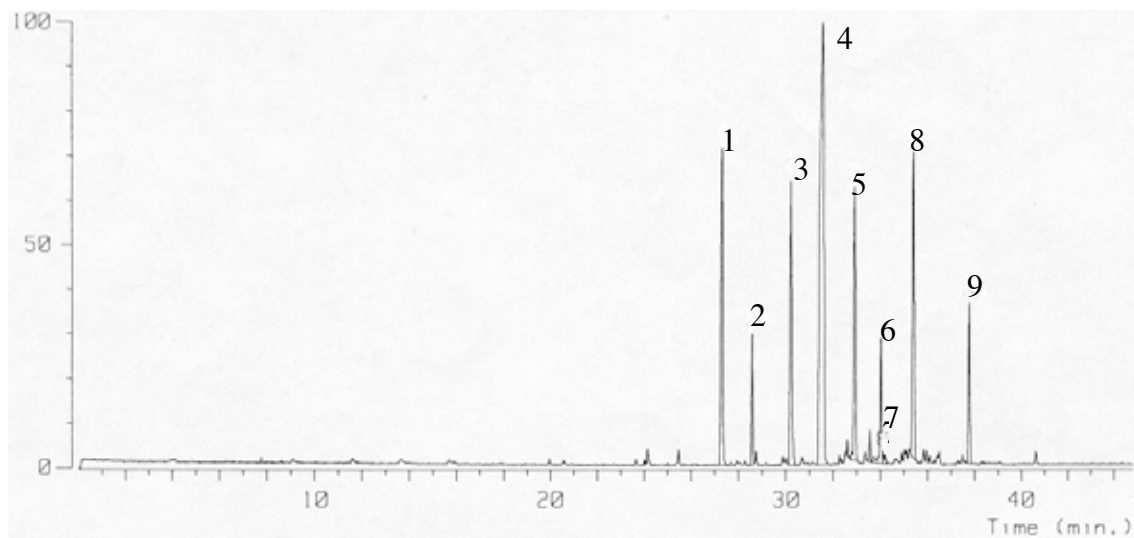
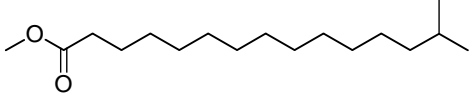
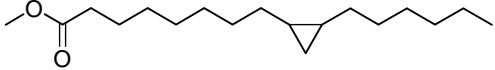
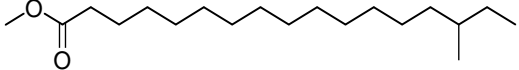
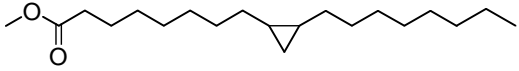
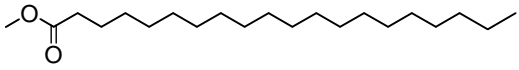
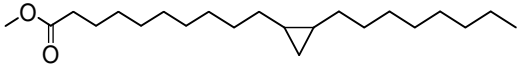
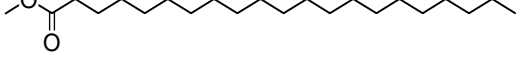
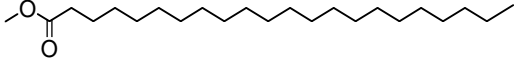
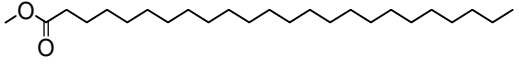


Figura 19.- Cromatograma correspondiente a la subfracción 4, en el cual se muestra que está compuesta por nueve compuestos.

Tabla 5.3 Ácidos grasos aislados de la subfracción 4

	Nombre	Fórmula	tr
I	14-metilpentadecanoato de metilo		27.34
II	8-(2-hexil-ciclopropil) octanoato de metilo		28.60
III	15-metilheptadecanoato de metilo		30.25
IV	8-(2-octilciclopropil) octanoato de metilo		31.60
V	icosanoato de metilo		32.94
VI	10-(2-octilciclopropil) decanoato de metilo		34.04
VII	heneicosanoato de metilo		34.13
VIII	docosanoato de metilo		35.43
IX	tetracosanoato de metilo		37.79

6 Discusión y conclusiones

La herbivoría es considerada una interacción antagónica entre plantas y herbívoros (Crawley, 1983; Begon, 1988). En este fenómeno se desencadenan relevantes repercusiones ecológicas y evolutivas tanto para la planta como para el organismo herbívoro (Ehrlich y Raven, 1964). Diversos caracteres físicos y químicos presentes en las plantas, se han interpretado como resultado de un mecanismo de defensa al daño causado por los herbívoros. Dentro de los caracteres químicos se incluye una gama de sustancias que poseen propiedades tóxicas o disuasivas, de tal forma que los tejidos de las plantas no son digeribles para los animales (Becerra *et al.*, 2001; Mello y Silva-Filho, 2002).

Ciertas especies de plantas pueden secretar diferentes tipos de sustancias como resinas, gomas, mucílago y látex, las cuales pueden almacenarse en una compleja red de canales y participar en el mecanismo de defensa contra la herbivoría (Fahn, 1979; Metcalfe y Chalk, 1988; Dussourd y Denno, 1991; Farrell *et al.*, 1991; Dussourd, 1999; Becerra *et al.*, 2001; Helmus y Dussourd, 2005). Por ejemplo, en algunas especies de Apiaceae, los canales almacenan cumarinas (Berenbaum, 1991); en especies de la familia Pinaceae y del género *Bursera*, los canales de resina presentes contienen terpenos (Raffa, 1991; Evans *et al.*, 2000); en la familia Anacardiaceae poseen catecoles y flavonoides, (Joel, 1980; Furth y Young, 1988; Vencel y Morton, 1998); en la familia Asclepiadaceae, los canales poseen cardenólidos y glucósidos cardiacos; en la familia Euphorbiaceae, almacenan diterpenos (Seigler, 1994), y en el caso

de las familias Apocinaceae y Papaveraceae, contienen alcaloides (Sacchetti *et al.*, 1999).

En el caso particular de plantas que secretan resina y látex, se ha determinado su presencia en alrededor de 20,000 a 35,000 especies, de manera que cuando se presenta un daño ocasionado por un organismo herbívoro, casi de forma inmediata se presenta una liberación de fluidos en los tejidos afectados (Dussourd y Denno, 1991; Farrell *et al.*, 1991; Lewinsohn, 1991; Dussourd, 1999; Becerra *et al.*, 2001; Konno *et al.*, 2004). A este último grupo pertenece *S. macrocarpum*, quien pertenece a la familia Euphorbiaceae y se encuentra representada en el bosque tropical caducifolio de "Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla". *S. macrocarpum* es una especie perennifolia y en estudios de campo se ha observado que la tasa de herbivoría que presenta es mínima (Carrasco, 2002). Con base en lo anterior y en observaciones personales en el campo, donde apreciamos que el látex secretado por *S. macrocarpum* posee propiedades irritantes ó tóxicas, nos planteamos la siguiente pregunta: 1) ¿puede el látex de *S. macrocarpum* inducir mortalidad y disminuir el peso de un organismo polífago como lo es *S. frugiperda*?. En lo que respecta a la mortalidad, el látex durante la primera semana del bioensayo, indujo el 70% de mortalidad en *S. frugiperda*, la cual se mantuvo a lo largo de todo el bioensayo y resultó ser significativa (ver figura 6). En algunos casos se alcanzó a registrar una mortalidad del 90%, sobreviviendo de dos a cuatro larvas de un total de 24. Se observó que las larvas sobrevivientes, se colocaban en el fondo de cada pozo, ó se enterraban en la dieta, haciendo una digestión rápida de una parte de

la dieta para poder evitar el látex. La mayoría de las larvas muertas durante la primera semana e incluso durante el primer día de iniciado el bioensayo, se mantenían adheridas el látex sobre la parte superior de la dieta, lo cual concuerda con reportes donde se indica que aunado a las propiedades tóxicas, el látex posee propiedades de tipo mecánico contra los insectos herbívoros, debido a que al tener exposición al aire, se solidifica e impide el movimiento de los insectos. Inclusive cuando es secretado en cantidades abundantes, engloba a los insectos y los mata por asfixia (Dussourd y Denno, 1991; Farrel *et al.*, 1991; Dussourd, 1999; Becerra *et al.*, 2001). La muerte causada por asfixia se puede descartar en este caso, debido a que fueron agregados sólo 35 µl de látex, los cuales se depositaban sobre la superficie de la dieta de forma homogénea. Se considera conveniente realizar el bioensayo utilizando un sistema de video para definir si la muerte de las larvas se debe a que éstas quedan adheridas al látex, lo cual limita sus movimientos y les impide alimentarse, o bien, si su muerte se debe a la toxicidad exhibida por el látex después de que este es ingerido por las larvas, sin descartar la posibilidad de una combinación de ambas causas, lo que conlleva a registrar porcentajes de muerte significativos.

Se ha determinado en los insectos que la susceptibilidad a un compuesto con propiedades insecticidas, se relaciona directamente con el estadio larvario en que se encuentra. Por ejemplo, durante los primeros estadios larvarios de *Danaus plexippus* (Nymphalidae) y *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae), existe una mayor propensión a compuestos insecticidas (Ghidiu y Andaloro, 1993) y

látex (Zalucki *et al.*, 2001), respectivamente. En nuestro caso, la mayor mortalidad se alcanzó durante un periodo de tres días a una semana de realizado el bioensayo, tiempo en el cual, *S. frugiperda* alcanza un desarrollo de primer a tercer estadio (Sparks, 1979; Capinera, 1999).

En lo que respecta al efecto del látex sobre el peso de *S. frugiperda*, se encontró que las larvas sobrevivientes muestran una tendencia a alcanzar menor peso, aunque las diferencias no son significativas (ver figura 8). Quizás esto se deriva del hecho de que sobreviven entre dos y cuatro larvas, las cuales son utilizadas para evaluar el efecto del látex sobre el peso de *S. frugiperda*, lo que constituye un número de larvas muy pequeño, por lo que para concluir si las diferencias en peso se deban al efecto del látex, es necesario aumentar el número de larvas para tener resultados más representativos.

Además, es conveniente determinar si la muerte del insecto o la disminución en el peso se debe a que una vez que el látex es ingerido, éste desencadena procesos tóxicos en el tracto digestivo de *S. frugiperda* y no se debe a la participación de las propiedades abrasivas del látex que en un momento determinado dificultarían la movilidad de insecto. Para esto, considero necesario administrar al látex de forma más directa a las larvas. Una forma de llevar a cabo lo anterior, es utilizando la técnica reportada por González-Coloma *et al.*, (2006), en la cual, se logra introducir el compuesto a probar directamente en la cavidad intestinal de los insectos, mediante el proceso de canulación.

Con base en la tendencia observada en la disminución de peso durante el estadio larvario de *S. frugiperda* inducido por el látex de *S. macrocarpum*,

traducido en un menor desempeño en la vida del insecto, se propuso evaluar el papel del látex en la alimentación de *S. frugiperda*. Para ello se realizaron bioensayos de elección, los cuales consideramos complementarios a los primeros bioensayos realizados, permitiéndonos vislumbrar el papel del látex en la alimentación de *S. frugiperda*. Los resultados muestran diferencias significativas en el consumo foliar de *S. frugiperda* (ver Fig. 9). Es decir, el látex de *S. macrocarpum* inhibe la capacidad de alimentación de *S. frugiperda*, lo cual apoya lo reportado por Data *et al*, (1996), quienes observan que el látex que secreta el camote *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae), inhibe la alimentación y sitios de oviposición del gorgojo *Cylas formicarius* (Coleoptera: Curculionidae). Asimismo, Zalucki *et al*, (2001), reportan que el látex secretado por *Asclepias humistrata* reduce la tasa de crecimiento e incrementa la mortalidad durante el desarrollo larvario de la mariposa *Danaus plexippus*.

Para determinar qué componentes del látex inhiben la alimentación de *S. frugiperda*, se realizó la extracción y fraccionamiento del mismo. Primero se obtuvieron seis fracciones principales, las cuales fueron denominadas F1 a F6. Cada una de estas fracciones fue evaluada para ver su posible papel en la alimentación de *S. frugiperda*, excepto la fracción F1, dado que corresponde a una fracción sólida. La fracción F5 (extracto etéreo) mostró un efecto inhibitorio de la alimentación de *S. frugiperda* significativo.

Al probar la fracción hexánica II (F2), se observa que la alimentación de *S. frugiperda* tiende a disminuir notoriamente, lo que nos muestra que el látex de *S. macrocarpum* posee componentes no polares responsables de tal efecto, lo

cual concuerda con reportes de euforbiáceas donde se han aislado e identificado componentes de igual naturaleza que muestran bioactividad (Giner *et al.*, 2000). En base a esto, el extracto hexánico II fue fraccionado y se obtuvieron 54 fracciones, de las cuales se obtuvieron en mayor cantidad las subfracciones f4, f9 y f10. Al evaluar la actividad de estas subfracciones sobre la alimentación de *S. frugiperda*, se encontró que la subfracción f4 inhibe la alimentación de forma significativa.

Al calcular el índice antialimentario inducido en cada bioensayo, se obtuvieron valores para el látex, fracción hexánica 2 (F2), subfracción 4 y extracto etéreo (F5) de 22.5, 45.20, 64.29 y 46.69 respectivamente. Tomando en cuenta que valores mayores a 50 son considerados con propiedades antialimentarias se puede decir que en el látex existen componentes que inhiben la alimentación de *S. frugiperda*, sólo que sus propiedades antialimentarias se vuelven notorias cuando el látex se fracciona y se encuentra cada vez un menor número de componentes, como puede ser el caso de la subfracción 4. Con base en esto, las interrogantes que se generan son ¿cuál es la naturaleza química de las sustancias que inhiben la alimentación?, ¿qué características poseen los compuestos activos que inhiben la alimentación en *S. frugiperda*?, ¿es el responsable sólo un compuesto o el efecto inhibitorio es resultado de sinergismo?, es por ello que la subfracción f4 fue analizada utilizando la técnica gases-masas, donde se obtuvo que ésta subfracción está conformada por nueve compuestos pertenecientes a los ésteres metílicos del grupo de los ácidos grasos. De los nueve compuestos identificados, los marcados con los números

2, 4 y 6 pertenecen a los denominados ácidos grasos carbocíclicos de naturaleza ciclopropanoide, que de forma específica reciben el nombre de 8-(2-hexil-ciclopropil) octanoato de metilo, 8-(2-octilciclopropil) octanoato de metilo y 10-(2-octilciclopropil) decanoato de metilo, respectivamente. De estos tres compuestos, el 4 es quién se encuentra en mayor proporción y a su vez recibe el nombre de ácido dihidrostercúlico. Los compuestos restantes de la subfracción 4 naturalmente son el 1,3,5,7-9, los cuales dada su estructura química son denominados ácidos grasos inusuales o poco comunes (Spitzer, 1999). Los ácidos grasos metílicos son compuestos que han sido aislados principalmente de aceites esenciales obtenidos a partir de semillas de especies pertenecientes a las familias Bombacaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Sapotaceae, Ebenaceae y Anacardiaceae (Ralaimanarivo *et al.*, 1982). Se ha visto que algunos ácidos grasos que contienen grupos funcionales ciclopropilos o ciclopropenilos pueden modificar el metabolismo de insectos, como es el caso particular de las piretrinas y los piretroides sintéticos que actúan como potentes insecticidas (Binder y Chan, 1982). A su vez, los componentes de la subfracción 4 inhiben la alimentación de *S. frugiperda*. La principal pregunta que subyace aquí es saber cuáles de los compuestos son los responsables de esto. Posiblemente el hecho de que el compuesto 4 que tiene una mayor abundancia en la fracción juegue un papel protagónico; o quizás se encuentren involucrados más de un compuesto. Suponiendo que se encuentren implicados más de un compuesto, me atrevo a hipotetizar que los compuestos 2, 4 y 6 sean los responsables de la disminución de la alimentación de *S. frugiperda*. La lógica de éste argumento tiene su

fundamento en que los compuestos 2, 4 y 6 son cilopropanoides y se encuentran sumamente relacionados con los ácidos grasos carbocíclicos de naturaleza ciclopropenoide, a los cuales se les ha comprobado propiedades tóxicas, promotores de hepatocarcinomas en ratón rata y trucha arcoiris (Pawlowski *et al.*, 1985), además de inducir esterilidad, disminución de la producción de huevos, reducción del porcentaje, peso y emergencia de pupas, en las moscas *Musca autumnales* y *M. domestica* (Binder y Chan, 1982). Aunque ésta hipótesis requiere comprobación, considero que lo más adecuado es obtener suficiente cantidad, ya sea colectando tres ó cuatro veces la cantidad original de látex con que se partió, o ver la manera de conseguir los compuestos de forma comercial y una vez logrado esto, realizar los bioensayos probando cada compuesto con los restantes, tomando en cuenta la proporción de cada uno obtenida experimentalmente.

Previamente se han aislado esterés metílicos similares a los encontrados en la subfracción 4 de *Euphorbia kansui*, y al evaluar su actividad, se ha encontrado que este tipo de compuestos inhiben la proliferación celular e incrementan el nivel de apoptosis en la línea celular de cáncer gástrico SGC-7901 (Fa-Rong *et al.*, 2005). Lo anterior permite suponer una actividad inhibitoria de la alimentación en *S. frugiperda* inducida por los compuestos que forman la subfracción 4, aunque sólo falta saber cuál de ellos es el responsable de este comportamiento, o determinar un posible sinergismo entre los compuestos. Por ejemplo, se ha determinado una actividad sinergista entre los glicoalcaloides solanina y chaconina al inhibir la alimentación en el caracol *Helix aspersa* (Smith

et al., 2001). En el caso particular de los ácidos grasos carbocíclicos, aunque existen reportes muy limitados respecto a su posible actividad biológica, se ha determinado que en la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), los ácidos grasos de naturaleza ciclopropenoide incrementan la incidencia de hepatomas, además de promover el aumento en el número de tumores, después de haber suministrado la aflatoxina B₁ (Lee *et al.*, 1968).

Otro aspecto importante que surge con la interacción insecto-látex es la variabilidad conductual de los insectos para hacer frente al látex que secretan las plantas, y que constituye una forma efectiva como mecanismo de defensa (Lewinsohn, 1991). Durante los bioensayos se observó que generalmente las larvas que sobrevivían eran aquellas que lograban alejarse del contacto con el látex, ya sea que se alimentaban rápidamente y se localizaban debajo de la dieta que contenía látex, o simplemente se mantenían adheridas a las paredes de la caja sin llegar a alimentarse y por ende morían posteriormente. Existen reportes que demuestran como los insectos succionadores de floema, al enfrentarse al látex que secretan ciertas plantas, son capaces de dirigir su órgano alimentador directamente hacia el floema y evitar los canales secretores de látex (Johnson, 1992). A su vez, los insectos especialistas pueden drenar los canales secretores de látex cortando las hojas en un lugar distinto al sitio de donde se alimentan (Zalucki y Malcolm, 1999; Becerra *et al.*, 2001). Se asume que *S. frugiperda* despliega variabilidad conductual al tener contacto con el látex. Jermy (1993) reporta que los insectos utilizan receptores específicos que les confieren capacidad de localizar a una planta o un grupo determinad de plantas,

por ello, considero conveniente evaluar de que forma *S. frugiperda* responde al látex, lo cual podría utilizarse para controlar las poblaciones de *S. frugiperda* y minimizar los posibles daños a los cultivos de maíz.

Se ha observado que los compuestos que actúan como antialimentarios, además de inducir cambios conductuales en los insectos, también promueven cambios fisiológicos en los mismos, los cuales son representados por un alejamiento del sitio de alimentación, desplazamiento lento y vómito (Szentesi, 2002). En el caso específico de *S. frugiperda*, puede decirse que los componentes del látex modifican de forma negativa su desempeño, reflejándose en un aumento de mortalidad, disminución de su peso y disminución de su alimentación.

Aunque hay reportes donde se menciona que los herbívoros pueden llegar a presentar un proceso adaptativo frente a los compuestos antialimentarios, en este caso puede descartarse tal proceso, dado que la duración del bioensayo es por un periodo relativamente corto. Es importante considerar que un compuesto se puede catalogar como antialimentario para unas especies de insectos, aunque no necesariamente lo sea para otras especies, además de que el resultado antialimentario puede variar con el método utilizado y sólo se puede catalogar un compuesto como buen antialimentario cuando alcanza niveles de 95% de inhibición de la alimentación, lo cual aquí no se cumple.

Al observar los resultados de los bioensayos de no elección mortalidad y los bioensayos de elección, estos últimos resumidos en la tabla 5.1, se aprecia una

dispersión muy marcada en ellos. Pensamos que esto se pueda deber al hecho de que las larvas utilizadas en cada bioensayo, quizás hayan presentado ligeras diferencias entre sí, aunque en estudios similares, los resultados guardan cierta concordancia con los nuestros (González-Coloma *et al.*, 2006). Por ello, para disminuir la dispersión en los resultados, consideramos conveniente efectuar un número mayor de repeticiones. El hecho de aumentar el tamaño de muestra, permite tener un análisis estadístico más robusto y ayuda a definir el efecto en la alimentación, de las fracciones que tienden a mostrar disminución en la misma, como es el caso del extracto hexánico II, subfracción 9 y el extracto polar I.

En lo que respecta a los resultados mostrados en la tabla 5.1, aunque se observan diferencias significativas en la disminución de la alimentación de *S. frugiperda* por efecto del látex, el valor correspondiente al índice antialimentario es de 22.55, el cual no lo considera buen antialimentario. Esto, quizás nos estaría mostrando un efecto diferente del látex sobre las larvas. Caso contrario ocurre en la subfracción 4, donde se inhibe la alimentación significativamente y el índice antialimentario es de 64.29. A su vez, al sacar el porcentaje de consumo del experimental con respecto al control, se observa que por efecto de la subfracción 4 se alimentan en menor proporción, es decir, existe una concordancia entre ambos resultados y esto refuerza la idea de que los componentes de la subfracción 4 inhiben la alimentación de *S. frugiperda*. Es importante dejar en claro, que a pesar de que a valores de índice antialimentario mayores a 50 se considera un producto como antialimentario, los valores

obtenidos de índice antialimentario, se han fijado de una forma un tanto subjetiva, lo que conllevaría a efectuar conclusiones de forma cautelosa.

Finalmente, la presente investigación permitió averiguar que el látex induce mortalidad e inhibe la alimentación de *S. frugiperda*. Asimismo, se logró fraccionar el látex de forma biodirigida con respecto a la tendencia mostrada por el extracto hexánico y actividad de la subfracción 4. En base a ello, se identificaron 9 componentes de la subfracción 4 que inhiben la alimentación significativamente, los cuales pertenecen a los ácidos grasos, aunque falta determinar el papel de cada uno de ellos en la alimentación de *S. frugiperda*. Lo anterior permite vislumbrar una aplicación potencial de los componentes presentes en el látex en el control poblacional de especies de insectos que son plagas agrícolas, disminuyendo los daños a los cultivos.

7 APÉNDICES

Apéndice I Modelo experimental

Generalmente para probar los efectos tóxicos de los productos naturales aislados de plantas, son utilizados organismos que adquieren importancia comercial al dañar cultivos de interés agrícola como maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y sorgo (*Sorghum bicolor*), y entre ellos se ha utilizado orugas de gusano bellotero (*Helicoverpa zea*), barrenador del fruto del tomate (*Heliothis virescens*) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) (Klocke y Kubo, 1991; Usmani y Knowles, 2001). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) representa una plaga agrícola en países de regiones tropicales y subtropicales del hemisferio occidental. Dado que no posee un mecanismo de diapausa, tiende a pasar la estación de invierno en climas templados (Capinera, 1999). *S. frugiperda* es un organismo polífago y aunque puede tener cerca de 60 especies de plantas como hospedero, en su estadio larvario tiende a poseer una cierta preferencia por plantas de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), pasto (*Cynodon dactylon*) y cacahuate (*Arachis hypogaea*) (Sparks, 1979; Ashley *et al.*, 1989). Posee hábitos nocturnos en su proceso de apareamiento y alimentación (Capinera, 1999). Las hembras pueden aparearse varias veces y utilizan sus feromonas para atraer a los machos, generalmente exhiben seis estadios larvarios y su periodo de pupa lo desarrollan enterradas en el suelo (Sparks, 1979). Se eligió esta especie porque daña cultivos de importancia comercial, su ciclo biológico es conocido y es relativamente fácil de mantener viva alimentándola con dieta artificial. Además

de que ha sido manejada con anterioridad y ha demostrado ser un buen modelo experimental en este tipo de bioensayos (Ashley *et al.*, 1989; Klocke y Kubo, 1991; Cibrián, 1994; Usmani y Knowles, 2001).

Apéndice II Lugar de colecta

El látex de *Sapium macrocarpum* fue colectado en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, ubicada en el Estado de Morelos (REBIOSH). La REBIOSH se ubica en la región sur del Estado de Morelos, entre los 18° 20'10'' y 18° 34'20'' norte y los 98° 51'20'' y 99° 08'15'' oeste (Valdespino, 2005). Comprende parte de los Municipios de Amacuzac, Jojutla, Puente de Ixtla, Tepalcingo y Tlalquitenango. Cubre un área de de 59,030-94-15.9 ha y tiene un intervalo altitudinal que va de los 700 a los 2,200 m.s.n.m. Fue declarada área natural protegida en 1999 y es considerada como área prioritaria para la conservación (DOF, 1999; Arias *et al.*, 2002; Dorado, 2004) (ver apéndice II) . La REBIOSH está comprendida en dos provincias fisiográficas. La primera comprende el Eje Neovolcánico e incluye la subprovincia del Sur de Puebla, la segunda provincia pertenece a la Sierra Madre del Sur y está representada por la subprovincia de los Lagos y Volcanes de la región de Anáhuac (INEGI, 1981). El tipo de suelo que predomina es de tipo feozem háplico, aunque también se registran leptosol y regosol (en términos comunes comprenden suelos rocosos y delgados) (Ávalos, 2007).

El tipo de clima de la Reserva corresponde a un clima cálido subhúmedo (Awo''(w)(i')g) el más seco de los subhúmedos con régimen de lluvias en verano, un cociente P/T menor de 43.2 y un porcentaje de lluvia invernal menor de 5 %,,. La temperatura media varia entre los 20 y los 29°C, siendo mayo el mes más caluroso y diciembre y enero los menos calurosos. La precipitación media anual

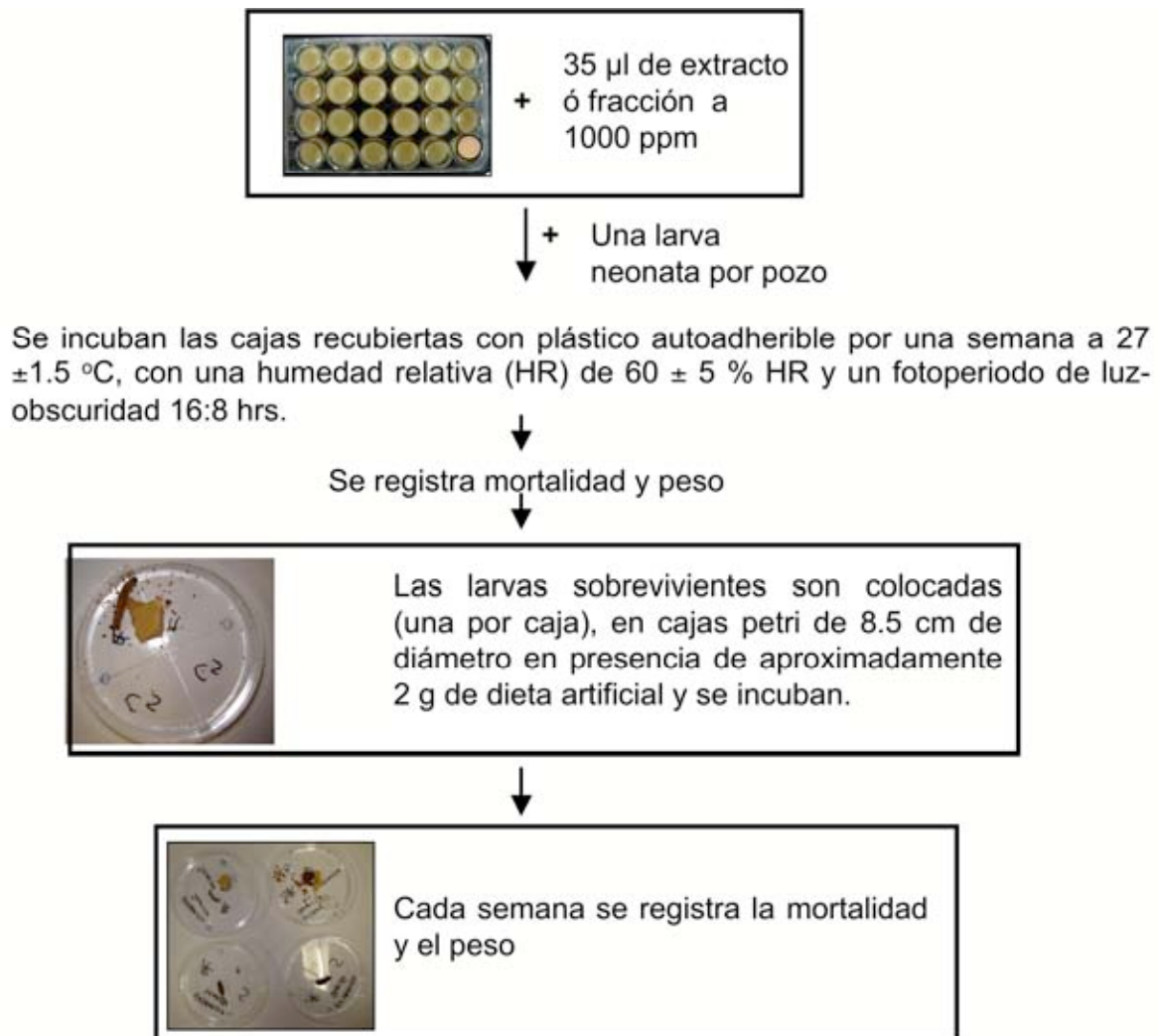
es de 600 a 1200 mm y el periodo de secas acontece en los meses de noviembre a abril (Rzedowski, 1978).

En lo que respecta a la flora, se han descrito 967 especies de plantas vasculares (se calcula que posiblemente existen alrededor de 1 250), incluidas en 469 géneros y 130 familias. Las familias más abundantes en cuanto a número de especies son Fabaceae, Poaceae y Asteracea. Las especies más representativas son: copal (Burseraceae: *Bursera copallifera*), guayacan (Zygophyllaceae: *Guaiacum coulteri*), bonete (Caricaceae: *Jacaratia mexicana*), cazahuate (Convolvulaceae: *Ipomoea arborescens*), cubata (Fabaceae: *Acacia cochliacantha*), cuajilotes (Bignonaceae: *Parmentiera edulis*), mezquite (Fabaceae: *Prosopis laevigata*), nopal (Cactaceae: *Opuntia atropes*), ceiba (Bignonaceae: *Ceiba aesculifolia*), guamúchil (Fabaceae: *Pithecellobium dulce*), amate (Moraceae: *Ficus sp.*), cuachalalate (Julianaceae: *Amphipterygium adstringens*), guaje (Fabaceae: *Leucaena sp.*), entre otras. De la familia Euphorbiaceae se encuentran reportadas 133 especies y 26 géneros, encontrándose principalmente: hierba del cáncer (*Acalypha arvensis*), chaya (*Cnidocolus chayamansa*), duraznillo ó mala mujer (*Croton ciliato-glandulosus*), palo de oro (*Euphorbia fulva*), piñoncillo (*Jatropha curcas*), higuerrillo (*Ricinus communis*) y venenillo (*Sapium macrocarpum*) (Arias et al, 2002; Carrasco, 2002).

Apéndice III Mapa de localización REBIOSH

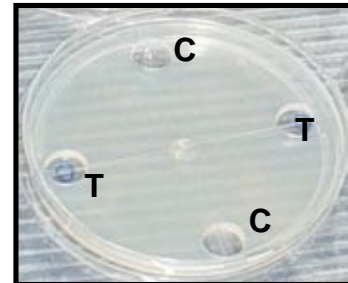


Apéndice IV Bioensayos de no elección y mortalidad

(Hernández *et al.*, 1999)

Apéndice V Bioensayo de elección

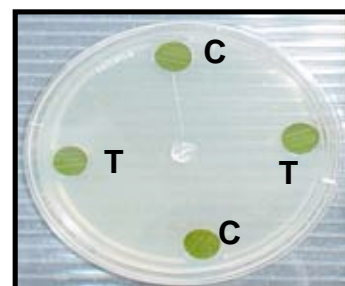
Se vierten aproximadamente 2 mm de altura de agar al 3% en cajas petri de 8.5 cm de diámetro y se deja enfriar



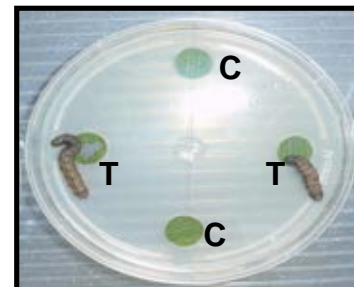
Se hacen cuatro perforaciones en el agar en forma de cruz y en cada perforación se inserta un fragmento de hoja de espinaca comestible con el envés hacia arriba

+

Después de esto, se coloca en dos de los cuatro fragmentos 10 μ l del extracto ó fracción a probar, a 1000 ppm, y se deja evaporar el disolvente



Se colocan dos larvas del quinto estadio en cada caja, realizándose cinco repeticiones por extracto



Se detiene el ensayo cuando las larvas han comido el 75% de las hojas control o cuando consumen 100% de las hojas tratadas (deben consumir las dos hojas de una misma condición); (González-Coloma, *et al.*, 1995 y Valencia *et al.*, 2000).

Apéndice VI Preparación de la dieta

En la preparación de la dieta, se siguió el método descrito por Toledo (2001). En un recipiente de 1l se disuelve agar en 500 mL de agua destilada caliente y se agita para evitar que se formen grumos. Se hierve a fuego lento durante 10 min y se le adicionan los componentes señalados en el apéndice IV (excepto la solución vitamínica) y se licua. Posteriormente, se agregan 600 mL de agua destilada fría y se adiciona la solución vitamínica descrita en el apéndice V. De forma inmediata, la dieta es puesta en un vaso de precipitados para que enfríe un poco y antes de que solidifique, se adicionan aproximadamente 2 mL de dieta en cada pozo de placas de 24 pozos (sin que se formen burbujas). Las placas se colocan sobre una superficie plana para que la dieta solidifique de forma homogénea y posterior a esto, se mantienen en refrigeración hasta su uso (Singh, 1977; Carson, 2001).

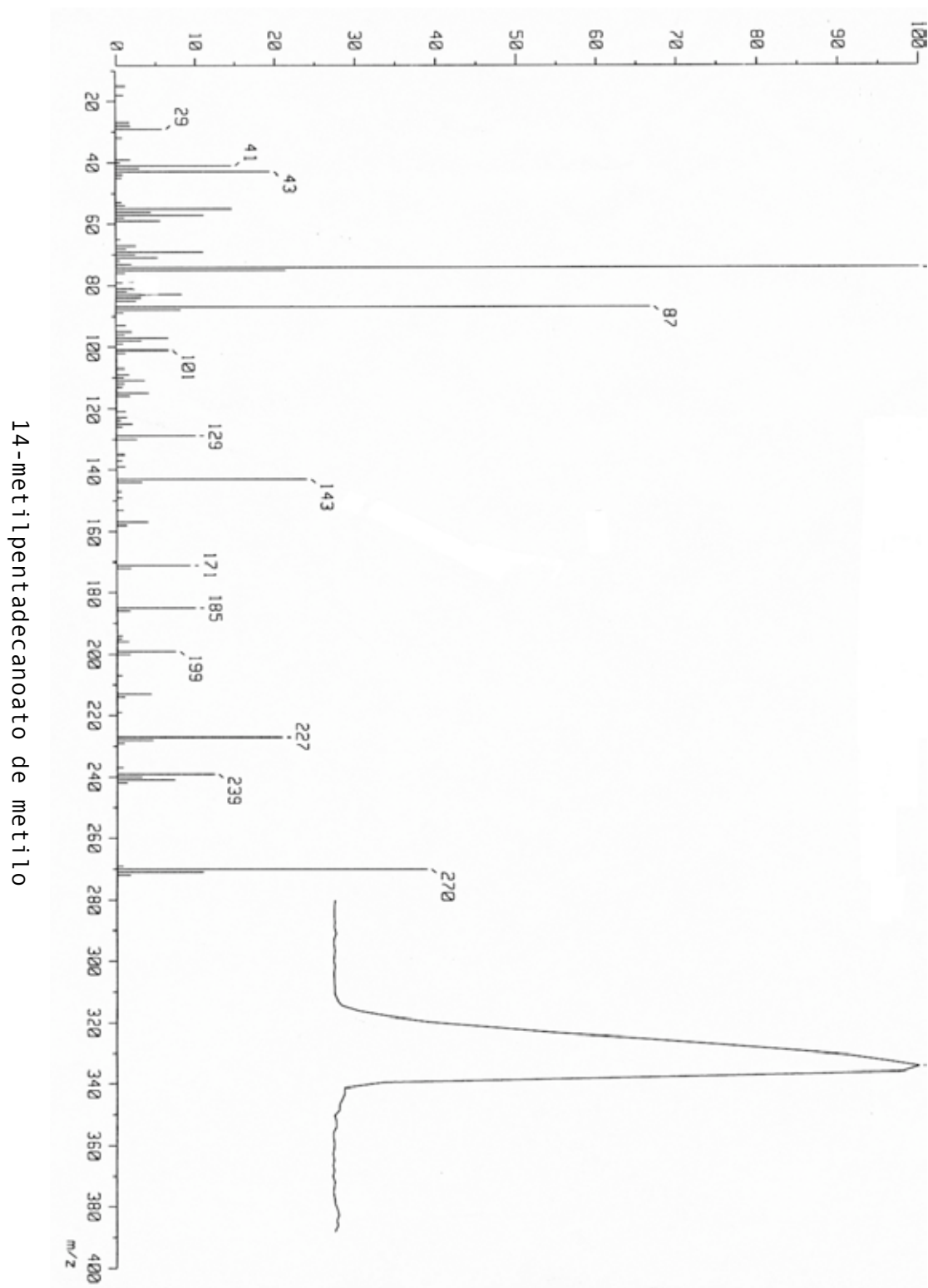
Apéndice VII Ingredientes de la dieta artificial

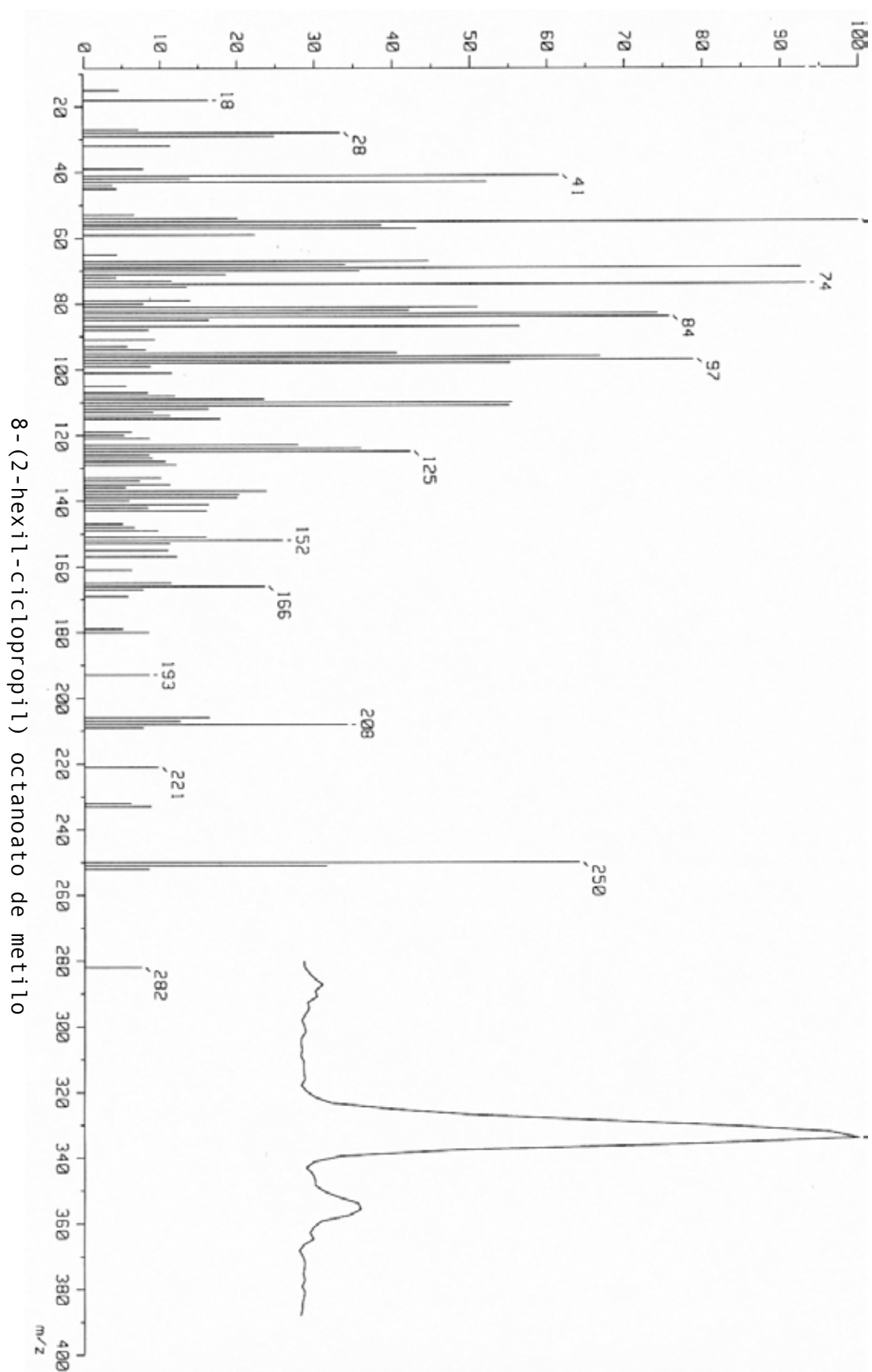
Componente	Cantidad
Ácido acético (25%)	12 mL
Ácido ascórbico	4.3 g
Ácido sórbico	1 g
Aureomicina (14%)	1.2 mL
Agar	14 g
Cloruro de colina (15%)	7.3 mL
Formalina (10%)	4.4 mL
Germen de trigo	31.7 g
Harina de soya	71.1 g
Metilparabén	1.6 g
Sacarosa	13 g
Sales Wesson	10.6 g
Solución vitamínica	3.5 mL

Apéndice VIII Componentes de la solución vitamínica

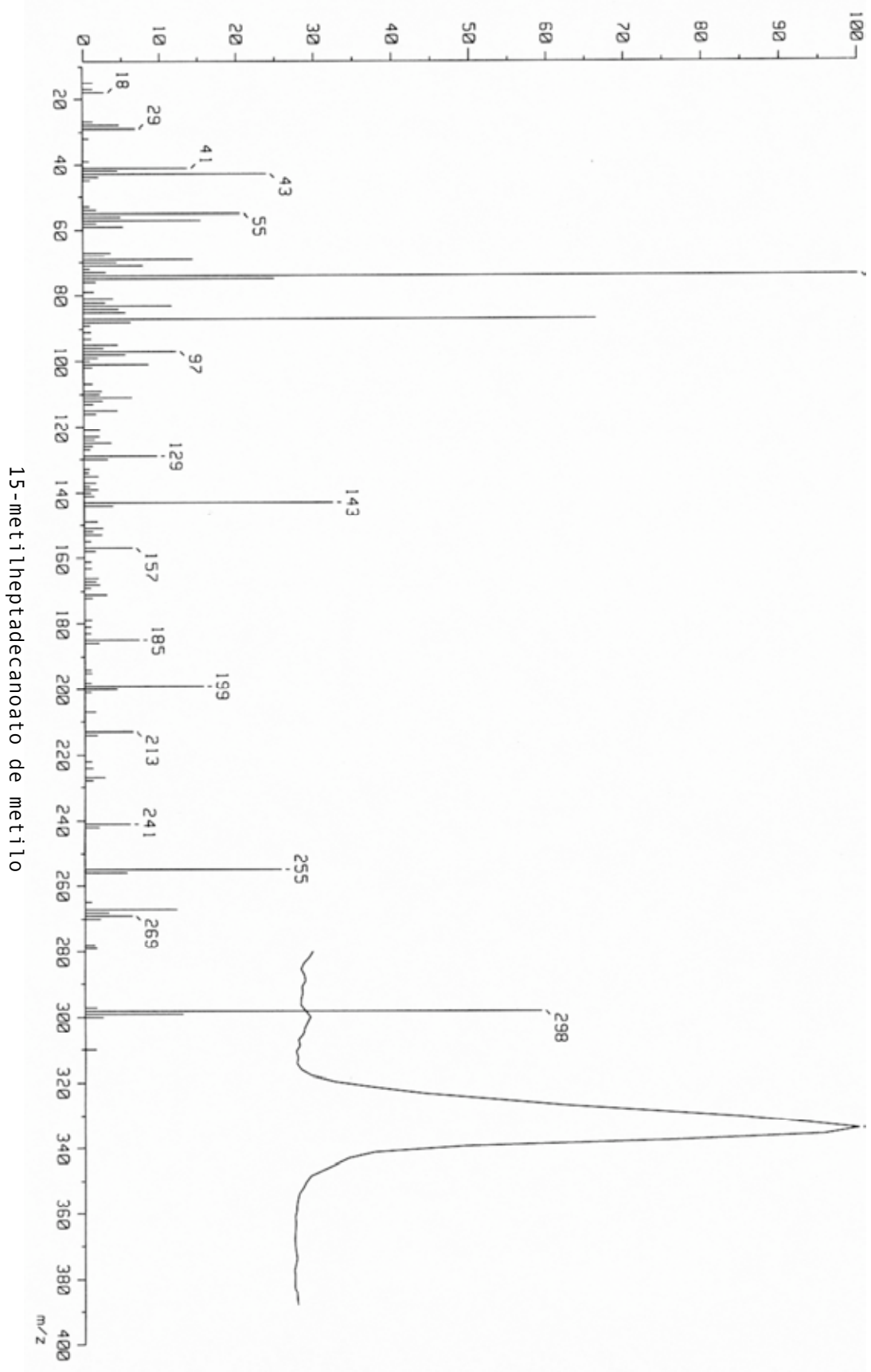
Componente	Cantidad
Ácido fólico	0.525 g/35 mL
Biotina	0.0042 g/35 mL
Complejo B12	0.875 mL
Niacimida	2.31 g/35 mL
Pantotenato de calcio	0.42 mg/35 mL
Riboflavina	0.1057 g /35 mL
Tiamina	0.0525 g/35 mL

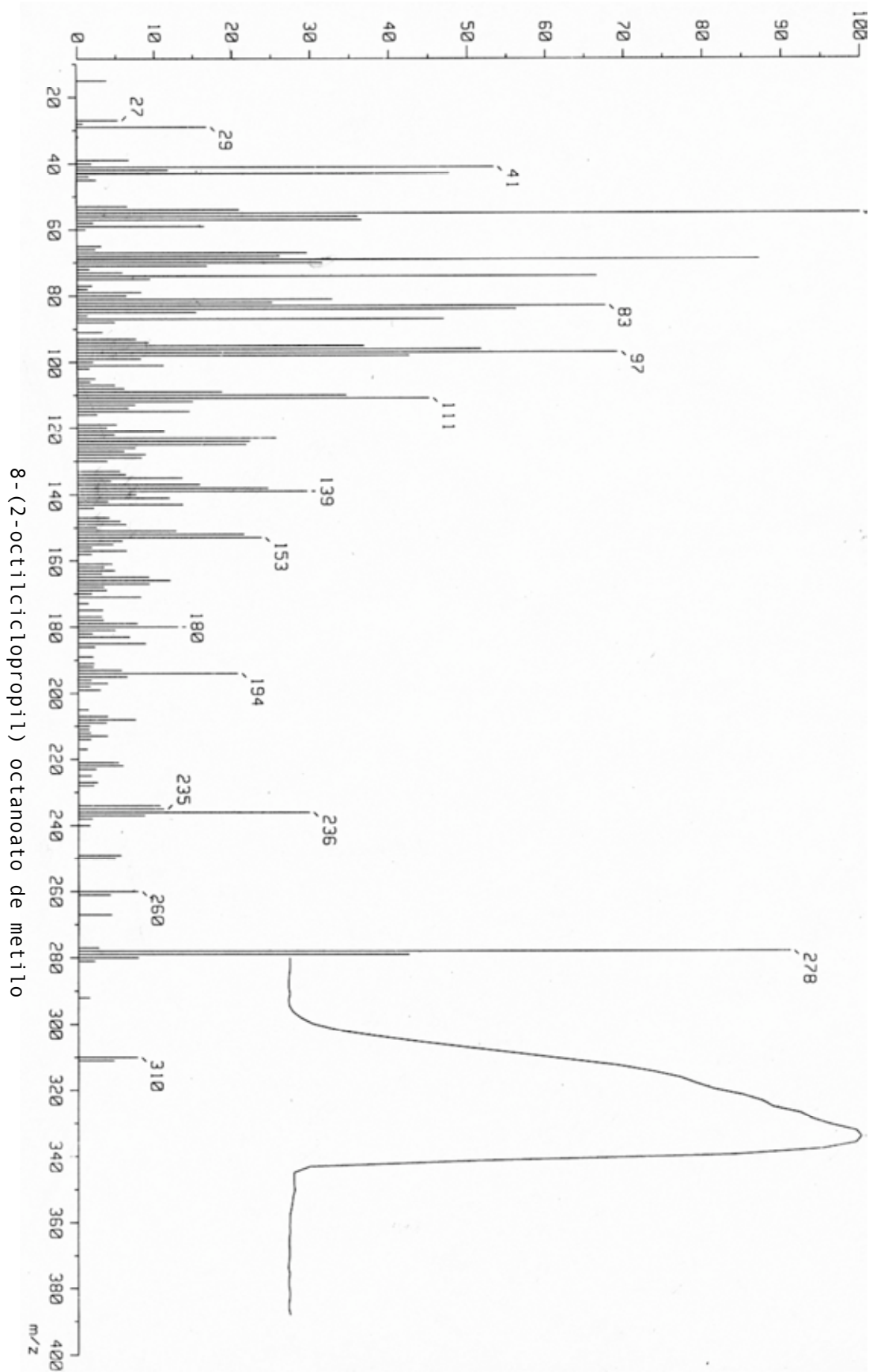
Apéndice IX Espectros de los ácidos grasos activos



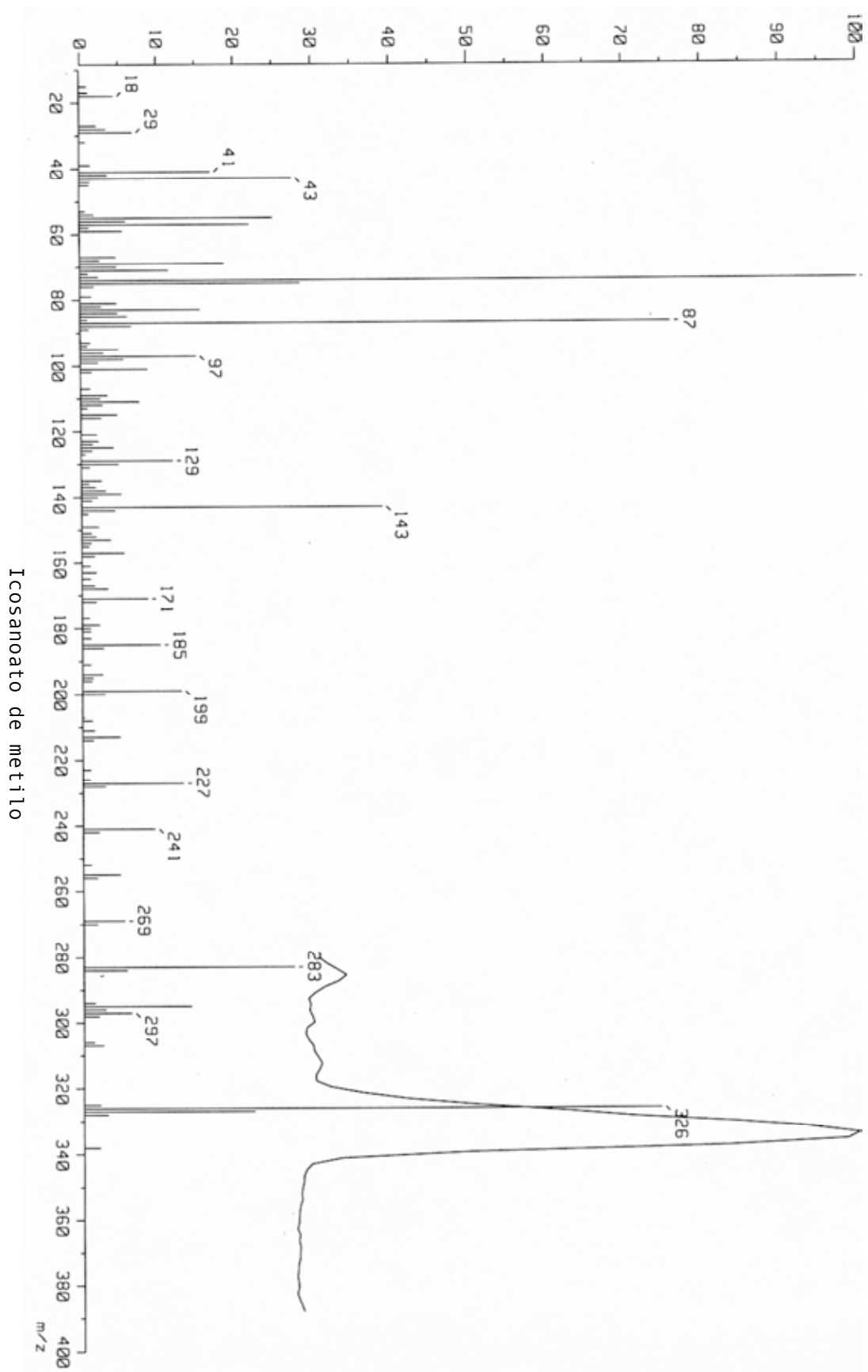


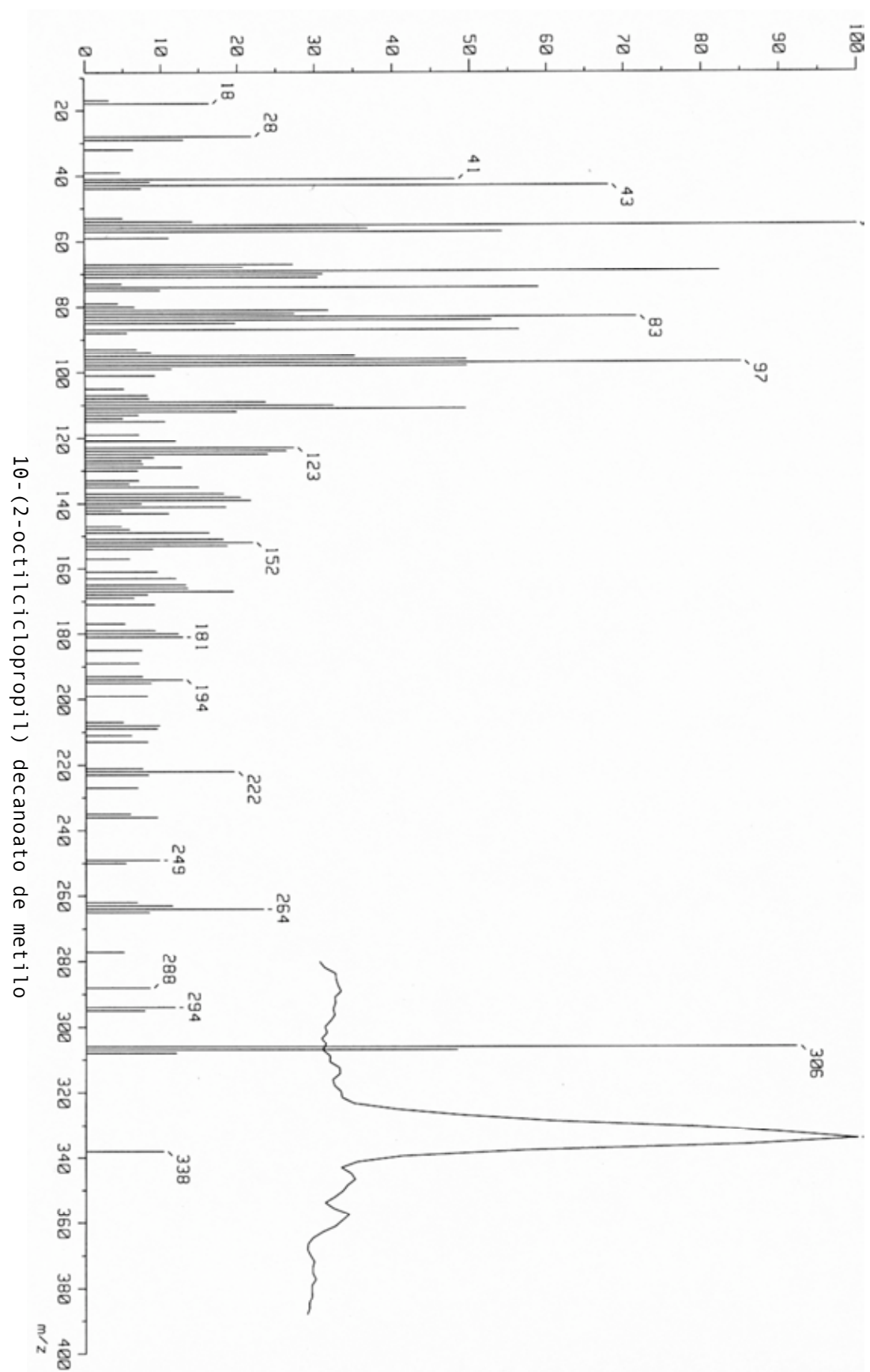
8-(2-hexil-ciclopopil) octanoato de metilo

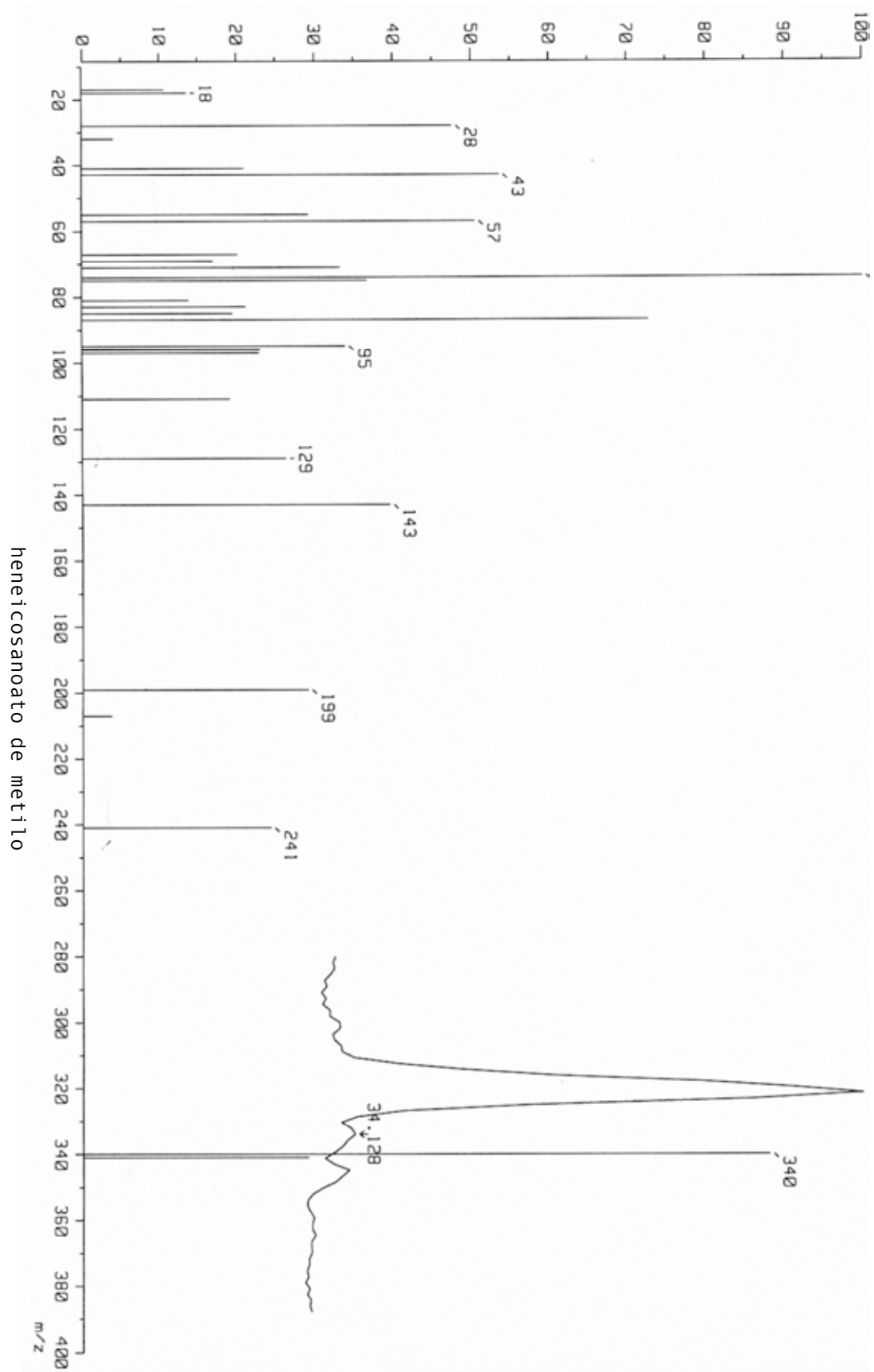


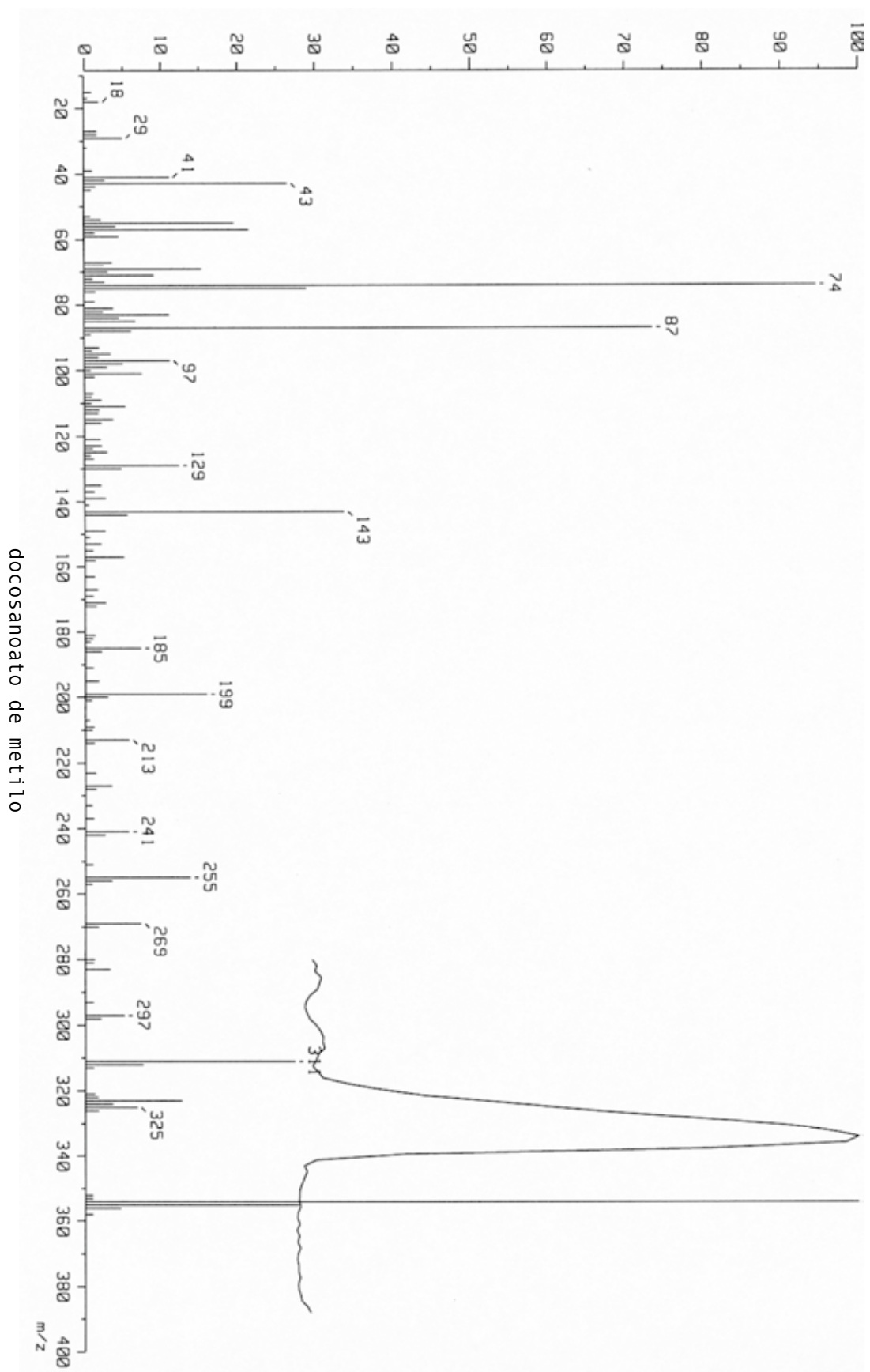


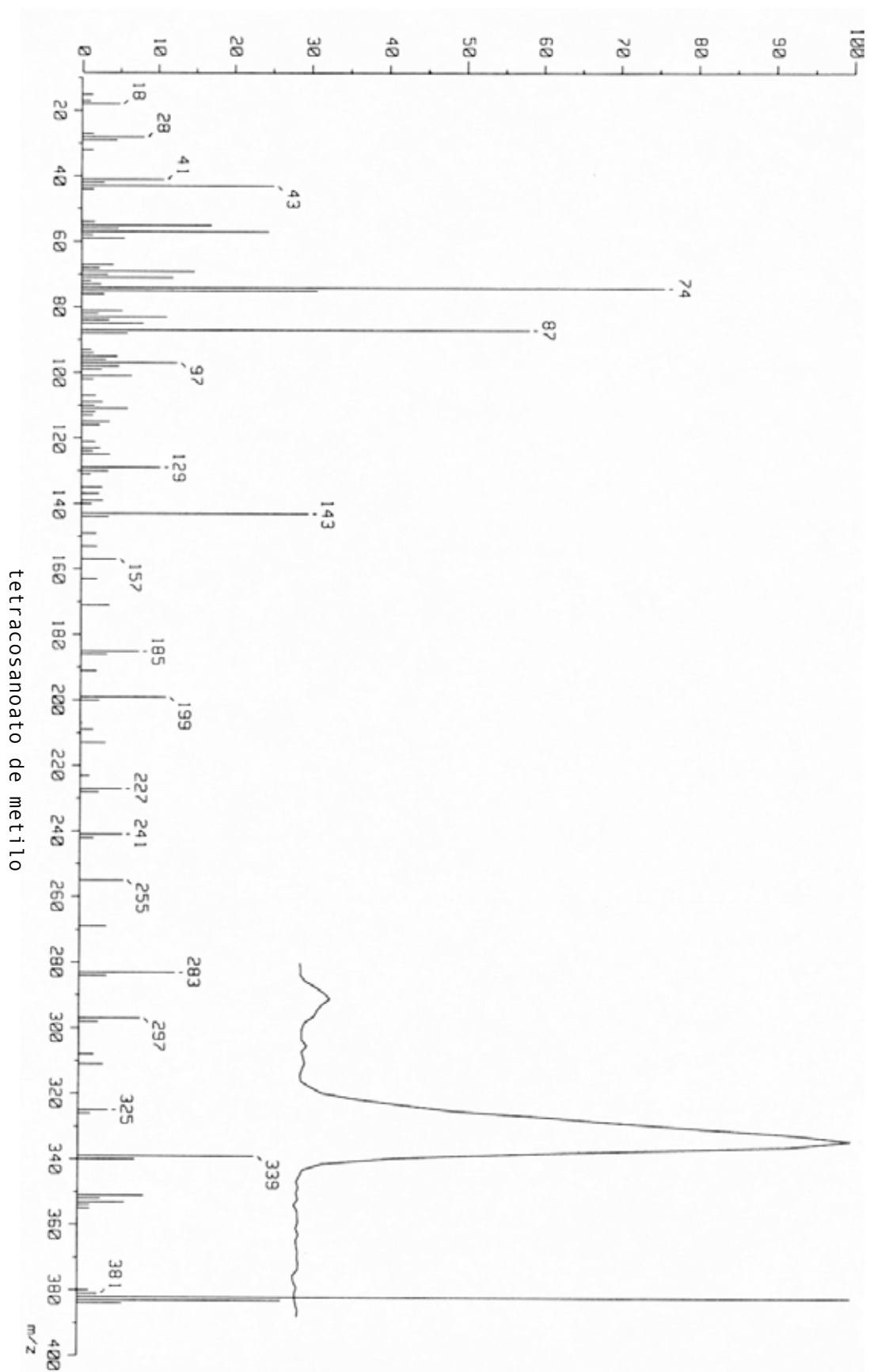
8-(2-octilciclopropil) octanoato de metilo











tetracosanoato de metilo

LITERATURA CITADA

Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265–267.

Abrams, P.A. 1987. On classifying interactions between populations. *Oecologia* **73**: 272-281.

Arias, D.M.; Dorado, O. y Maldonado, B. 2002. Biodiversidad e importancia de la selva baja caducifolia: la Reserva de la Biosfera sierra de Huautla. *Biodiversitas* No 45: 7-12.

Arima, K.; Uchikoba, T.; Yonezawa, H.; Shimada, M. y Kaneda, M. 2000. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* **53**: 639-44.

Ashley, T.R.; Wiseman, B.R.; Davis, F.M. y Andrews, K.L. 1989. The fall armyworm: a bibliography. *Florida Entomologist* **72**: 152–202.

Ávalos, H.O. 2007. Bombyliidae (Insecta): Diptera) de quilamula en el área de Reserva Sierra de Huautla, Morelos, México. *Acta Zoológica Mexicana* **23**: 139-169.

Becerra, J.X.; Venable, D.L.; Evans, P.H. y Bowers, W.S. 2001. Interactions Between Chemical and Mechanical Defenses in the Plant Genus *Bursera* and Their Implications for Herbivores. *American Zoologist* **41**: 865–876.

Begon, M.; Harper, J.L. y Townsend, C.R. 1988. Ecología: individuos, poblaciones y comunidades. Omega. Barcelona, 865 pp.

Bernays, E.A. y Chapman, R.F. 1994. *Host plant selection by phytophagous insects*. Chapman y Hall, Nueva York, 312 pp.

Berenbaum, M.R. 1991. Coumarins. En: Rosenthal, G.A. y Berenbaum, M.R. (eds.). *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, San Diego, pp. 221-244.

Binder, R.G. y Chan, B.G. 1982. Effects of cyclopropanoid and cyclopropenoid fatty acids on growth of pink bollworm, bollworm and tobacco budworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **31**: 291-295.

Brown, J.H.; Whitham, T.G.; Morgan, S.K. y Gehring, C.A. 2001. Interactions and the dynamics of ecological systems: long-term experiments. *Science* **293**: 643-650.

Bullock, S.H., Mooney, H.A. y Medina, E. (eds.) (1995). Seasonally dry tropical forest. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, 468 pp.

Burger, W. y Huft, M. 1995. Flora Costaricensis. *Fieldiana, Botanical Series* **36**: 1-169.

Capinera, J.L. 1999. *Fall Armyworm Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Florida cooperative extension service. *Institute of Food and Agricultural Sciences*. University of Florida Publication No EENY-98 9 pp.

Carrasco, C.V. 2002. *Variación interespecífica en la herbivoría en plantas de fenología contrastante en la selva baja de Huautla*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 76 pp.

Carson, C.A. 2001. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. *American Entomologist* **47**: 198-206.

Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C. y Chantrapomma, K. 2003. Antimycobacterial activity of phorbol esters from the fruits of *Sapium indicum*. *Journal of Natural Products* **66**: 540-543.

Cibrián, T.J. 1994. Factores que influyen en la cría de insectos en condiciones controladas. En Bautista, M., C. Vejar y J.L. Carrillo (eds.). *Técnicas para la cría de insectos*. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo México, pp.11-23.

Coats, J.R. 1994. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology* **39**: 489-515.

Coley, P.D. y Barone, J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 305–35.

Cordell, G.A. 2000. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry* **55**: 463-480.

Crawley, M.J. 1983. *The dynamics of animal-plant interactions*. University of California Press, Berkeley y los Angeles, 437 pp.

Data, E. S.; Nottingham, S.F. y Kays, S.J. 1996. Effect of sweetpotato latex on sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition. *Journal of Economic Entomology* **89**: 544–549.

De Moraes, C.M.; Lewis, W.J.; Pare´, P.W.; Alborn, H.T. y Tumlinson, J.H. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**: 570-573.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 8 de septiembre de 1999. Decreto por el que se declara area natural protegida, con el carácter de reserva de la biosfera, la region denominada Sierra de Huautla, ubicada en los municipios de Amacuzac, Puente de Ixtla, Jojutla, Tlaquiltenango y Tepalcingo, en el Estado de Morelos, con una superficie total de 59, 030-94.15.9 hectáreas.

Dirzo, R. y Domínguez C.A. 1995. Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. En: Bullock S.H.; Mooney H.A. y Medina E. (eds.). *Seasonally dry tropical Forests*. Cambridge University Press, Londres, pp. 304-325.

Dorado, O.; Maldonado, B.; Arias, D.M.; Sorani, V.; Ramírez, R. y Leyva, E. 2004. *Plan de Conservación y Manejo de REBIOHS*. México: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP-SEMARNAT).

Drew, S.W. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Review of Microbiology* **31**: 343-356.

Dussourd, D.E. y Denno R.F. 1991. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. *Ecology* **72**: 1383–1396.

Dussourd, D.E. 1999. Behavioral sabotage of plant defense: do vein cuts and trenches reduce insect exposure to exudates?. *Journal of Insect Behavior* **12**: 501-515.

Edwards, P.J. y Wratten, S.D. 1980. *Ecology of insect-plant interactions*. Arnold, Londres, 60 pp.

Ehrlich, P.R. y Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.

Evans, F.J. y Schmidt, R.J. 1979. The succulent euphorbias of Nigeria III. Structure and potency of the aromatic ester diterpenes of *Euphorbia poissonii* Pax. *Acta Pharmacologia et Toxicología* **45**: 181-91.

Evans, P.H.; Becerra, J.X.; Venable, D.L. y Bowers, W.S. 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 745-754.

Fa-Rong, Y.; Xiu-Zhen, L.; Hong-Yun, G.; McGuire, P.M.; Ren-De, L.; Rui, W. y Fa-Hong, Y. 2005. Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **8**: 528-535.

Facchini, P. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 29-66.

Fahn, A. 1979. *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, Londres, 302 pp.

Farmer, E. 2001. Surface-to-air signals. *Nature* **411**: 854-856.

Farrell, B.D.; Dussourd, D.E. y Mitter, C. 1991. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification?. *The American Naturalist* **138**: 881–900.

Filip, V.; Dirzo, R.; Maass, J.M. y Sarukhán, J. 1995. Within and among year variation in the levels of herbivory on the foliage of trees from a Mexican tropical deciduous forest. *Biotropica* **27**: 78-86.

Flores, J.S.; Canto-Avilés, G.C.O. y Flores-Serrano, A.G. 2001. Plantas de la flora Yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano. *Revista biomédica* **12**: 86-96.

Furth, D. G. y Young, D.A. 1988. Relationships of herbivore feeding and plant flavonoids (Coleoptera: Crhysomelidae and Anacardiaceae: *Rhus*). *Oecologia* **74**: 496-500.

Ghidiu, G.M. y Andaloro, J.T. 1993. The relationship between fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) instar and susceptibility to insecticides applied to sweet corn. *Florida Entomologist* **76**: 549-555.

Giner, J.L; Berkowitz J.D. y Andersson, T. 2000. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplus*. *Journal of Natural Products* **63**: 267-269.

González, M.A., y V.R. López. 1983. Estudio preliminar y químico-biológico de *Sapium bioloculare* (*Euphorbiaceae*). Tesis Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 56 pp.

González-Coloma, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; Castañera, P. y Gutiérrez, C. 1995. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 1255–1270.

González-Coloma, A.; Martín-Benito, D.; Mohamed, N.; García-Vallejo, M.C y Soria, A.C. 2006. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* l. *Biochemical Systematics and Ecology* **34**: 609-616.

Helmus, M.R. y Dussourd, D.E. 2005. Glues or poisons: which triggers vein cutting by monarch caterpillars?. *Chemoecology* **15**: 45–49.

Hernández, M.M.; Heraso, C.; Villareal, M.L.; Vargas-Arispuro, I. y Aranda, E. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **67**: 37-44.

Hick, A.J.; Luszniak, M.C. y Pickett, J.A., 1999. Volatile isoprenoids that control insect behaviour and development. *Natural Product Reports* **16**: 39-54.

- Huft**, M.J. 1987. Four new species of *Sapium* (Euphorbiaceae) from Central and South America. *Phytologia* **63**: 441–448.
- Ignacimuthu**, S. 2004. Green pesticides for insect pest management. *Current Science* **86**: 1059-1060.
- INEGI**. 1981. *Síntesis geográfica del Estado de Morelos*. Secretaría de Programación y Presupuesto, Mexico.
- Isman**, M.B. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide Outlook* **13**: 152-157.
- Jablonsky**, E. 1968. Notes on neotropical Euphorbiaceae. Synopsis of Caribbean *Sapium*. *Phytologia* **16**: 393-448.
- Jain**, D.C. y Tripathi, A.K. 1993. Potential of natural products as insect antifeedants. *Phytotherapy Research* **7**: 327-334.
- Janzen**, D.H. 1980. When is it coevolution?. *Evolution* **34**: 611-612.
- Janzen**, D.H. 1981. Patterns of herbivory in a tropical deciduous forest. *Biotropica* **13**: 271-282.
- Jermey**, T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. *The American Naturalist* **124**: 609-630.
- Jermey**, T. 1993. Evolution of insect-plant relationships a devil's advocate approach. *Entomologia experimentalis et applicata* **66**: 3-12.
- Joel**, D.M. 1980. Resin ducts in the mango fruit: a defense system. *Journal of Experimental Botany* **31**: 1707–1718.
- Johnson**, M. B. 1992. The genus *Bursera* (Burseraceae) in Sonora, Mexico and Arizona, U.S.A. *Desert Plants* **10**: 126–143.
- Kennedy**, G.G. y Barbour, J.D. 1992. Resistense variation in natural and managed systems. En Fritz, R.S. y Simms, E.L. (eds.). *Plant resistense to herbivores and pathogens ecology, evolution and genetics*. The University of Chicago Press, Chicago, p. 13-41.
- Kessler**, A. y Baldwin, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 299–328.
- Klocke**, J.A. e Ikubo, I. 1991. Defense of plants through regulation of insect feeding behavior. *Florida Entomologist* **74**: 18-22.

Knipper, M. y Breer, H.B. 1987. Protein kinase C in the nervous system of insects: effects of phorbol esters on cholinergic synapses. *Neurochemistry International* **10**: 323-328.

Konno, K.; Hirayama, Ch.; Nakamura, M.; Tateishi, K.; Tamura, Y.; Hattori, M. y Cono, K. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant Journal* **37**: 370–378.

Koul, O. 2005. *Insect antifeedants*. CRC, Boca Ratón, 1005 pp.

Labandeira, C.C. 1998. Early history of arthropod and vascular plant associations. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **26**: 329–377.

Lee, D.J.; Wales, J.H.; Ayres, J.L. y Sinnhuber, R.O. 1968. Synergism between cyclopropanoid fatty acids and chemical carcinogens in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cancer Research* **28**: 2312-2318.

Lewinsohn, T.M. 1991. The geographical distribution of plant latex. *Chemoecology* **2**: 64-68.

Lowery, D.T. e Isman, M. 1993. Antifeedant activity of extracts from neem, *Azadirachta indica*, to strawberry aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 1761-1773.

McLafferty, F.W. y Stauffer, D.B. 1988. Interpretation of mass spectra *The Wiley/Nbs registry of mass spectral data*. Jhon Wiley, Nueva York, 371 pp.

Mann, J. 1987. *Secondary metabolism*. Oxford Chemistry Series, Nueva York, 374 pp.

Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. F.C.E., México D.F., 1247 pp.

Mello, M.O. y Silva-Filho, M.C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **14**: 71-81.

Metcalfe, C.R. y Chalk, L. 1988. *Anatomy of the dicotyledons* Vol. 2. Clarendon, Oxford, Nueva York, 297 pp.

Murphy, P.G. y Lugo, A.E. 1986. The ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 67-88.

Osborne, D.J. 1973. Mutual regulation of growth and development in plants and insects. En: van Emden, H.F. (ed.). *Insect/Plant Relationships*. Blackwell Scientific Publications, Londres, pp. 33-42.

- Otto**, S.P. y Nuismer, S.L. 2004. Species interactions and the evolution of sex. *Science* **304**: 1018-1020.
- Pawlowski**, N.E.; Hendricks, J.D.; Bailey, M.L.; Nixon, J.E. y Bailey, G.S. 1985. Structural-bioactivity relationship for tumor promotion by cyclopropenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**: 767-770.
- Perera**, D.R., Armstrong, G. y Senanayake, N. 2000. Effect of antifeedants on the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and its parasitoid (*Cotesia plutellae*). *Pest Management Science* **56**: 486-490.
- Raffa**, K.F. 1991. Induced defensive reactions in conifer-bark beetle systems. En: Tallamy, D.W. y Raupp, M.J. (eds.). *Phytochemical induction by herbivores*. John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 245-276.
- Ralaimanarivo**, A., Gaydou, E.M. y Bianchini, J. 1982. Fatty acid composition of seed oils from six *Adansonia* species with particular reference to cyclopropane and cyclopropene acids. *Lipids* **17**: 1-10.
- Rzedowski**, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México, D.F., 432 pp.
- Rizk**, A.M. 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* **94**: 293-326.
- Ruther**, J.; Meiners, T. y Steidle, J.L. 2002. Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* **12**: 161-167.
- Sacchetti**, G. ; Ballero, M. ; Serafini, M., ;Romagnoli, C. ; Bruni, A. y Poli, F. 1999. Laticifer tissue distribution and alkaloid location in (Stearn) Pign.(Apocynaceae) an endemic plant of Sardinia (Italy). *Phyt. Ann. Bot.* **39**: 265-275.
- Schoonhoven**, L.M., 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **31**: 57-69.
- Schoonhoven**, L.M.; Jermy, T. y van Loon, J.J.A. 1998. *Insect-plant biology. From physiology to evolution*. Chapman y Hall, Cambridge, 409 pp.
- Schwab**, W. 2003. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry* **62**: 837-849.
- Seigler**, D.S. 1994. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden* **81**: 380-401.
- Singh**, P. 1977. *Artificial diets for insects, mites, and spiders*. IFI/Plenum, Nueva York, 594 pp.

- Smith**, D.B.; Roddick, J.G. y Jones, J.L. 2001. Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry* **57**: 229-234.
- Sparks**, A. N. 1979. A review of the biology of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* **62**: 82-87.
- Spitzer**, V. 1999. Screening analysis of unknown seed oils. *Fett/Lipid*, 101: No. 1, 2-19.
- Stanton**, N. 1975. Herbivore pressure on two types of tropical forest. *Biotropica* **7**: 8-11.
- Stout**, M.J. y Bostock, R.M. 1999. Specificity of induced responses to arthropods and pathogens. En: Agrawal, A.A., Tuzun, S. y Bent, E. (eds.). *Induced plant defences against pathogens and herbivores. The American Phytopathological Society*, pp.183-209.
- Szentesi**, A. 2002. Insect-plant relationship-chance and necessity. *Acta Zoológica Academiae Scientiarum Hungaricae* **48**: 55-71.
- Toledo**, T.E. 2001. *Propiedades insecticidas de algunas especies de Ipomoea (Convolvulácea) del Estado de Morelos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla Edo. México, 50 pp.
- Thompson**, J.N. 1988. Coevolution and alternative hypotheses on insect/plant interactions. *Ecology* **69**: 893-895.
- Usmani**, K.A. y Knowles, C.O. 2001. Toxicity of pyrethroids and effect of synergists to larval and adult *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, and *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **94**: 868-873.
- Valdespino**, C.P.M. 2005. *Flujos de N y P asociados a la ojarasca de bosques tropicales secos primarios y secundarios en la sierra de Huautla, Morelos*. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México D.F., 68 pp.
- Valencia**, E.; Valenzuela, E.; Barros, E.; Hernández, M.; Lazo, C.; Gutiérrez, C.; González-Coloma, A.; González, A.G., y Bermejo, J. 2000. Estudio fitoquímico y actividad antialimentaria de *Senna stipulaceae*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **45**: 297-301.
- Van Emden**, H.F. y Way, M.J. 1973. Host plants in the population dynamics of insects. En: van Emden, H.F. (ed.). *Insect/Plant Relationships*. Blackwell Scientific Publications, Londres, pp. 181-199.

Vencl, F., y Morton, T.C. 1998. The shield defense of the sumac flea beetle, *Blepharida rhois* (Chrysomelidae: Alticinae). *Chemoecology* **8**:25-32.

Villegas, G.C. 2004. *Estudio fitoquímico y de la actividad insecticida de los metabolitos secundarios de Vitex hemsleyi*. Tesis de Maestría, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 145 pp.

Watson, L. y Dallwitz, M.J. 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Versión: 14 Diciembre 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta>.

Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**: 3–19.

Yoshida, T.; Amakura, Y.; Liu, Y.Z. y Okuda, T. 1994. Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants. XI. Three new hydrolyzable tannins and a polyphenol glucoside from *Euphorbia humifusa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **42**: 1803-1807.

Zalucki, M.P. y Malcolm, S.B. 1999. Plant latex and early stage monarch larval growth and survival on three North American milkweed species. *Journal of Chemical Ecology* **25**: 1827-1842.

Zalucki, M.P.; Brower, L.P. y Alonso-M, A. 2001. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology* **26**: 212-224.