UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA Y MODO DE ACCIÓN DE *Haplophyton sp.* Y *Tephrosia sp.* SOBRE UN INSECTO GENERALISTA, *Spodoptera frugiperda* J.E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

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

ROBERTO ENRIQUE LLANOS ROMERO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

COMITÉ TUTOR: **DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**
M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

MÉXICO, D.F. **FEBRERO, 2012**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA Y MODO DE ACCIÓN DE *Haplophyton sp.* Y *Tephrosia sp.* SOBRE UN INSECTO GENERALISTA, *Spodoptera frugiperda* J.E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

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

ROBERTO ENRIQUE LLANOS ROMERO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

COMITÉ TUTOR: **DR. MANUEL MIRANDA ANAYA**
M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

MÉXICO, D.F. **FEBRERO, 2012**

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/080/12

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **LLANOS ROMERO ROBERTO ENRIQUE** con número de cuenta **98547890** con la tesis titulada **"Actividad antialimentaria y modo de acción de *Haplophyton sp.* y *Tephrosia sp.* Sobre un insecto generalista, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)"**, realizada bajo la dirección del (la**) DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER:**

Presidente:	DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
Vocal:	DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Secretario:	DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Suplente:	DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Suplente:	M. EN C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de febrero de 2012

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MCAA/MJFM/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, y quienes en el laboran por hacer posible la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

A los miembros del comité tutoral por las observaciones y sugerencias:

Dr. Eduardo Aranda Escobar †

Dr. Manuel Miranda Anaya

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado por sus valiosas revisiones y comentarios.

Dra. Ana María García Bores,

Dra. Josefina Herrera Santoyo,

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo.

Al Ing. Heriberto Aguirre Díaz por las muestras iniciales y la información sobre el uso de los vegetales y el apoyo brindado para iniciar este trabajo.

A la M. en C. Laura Patricia Lina García del Laboratorio de Control Biológico CIEB, UAEM, por el apoyo en la crianza de insectos.

A la M. en C. Beatríz Zúñiga Ruíz del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, UNAM, por el apoyo técnico durante la ejecución de los ensayos.

A la Dra. María Eva González Trujano, del Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñíz, por el apoyo en la evaluación de toxicidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Guevara Fefer, por la paciencia que has tenido

A la Dra. Josefina Herrera Santoyo, Dra. Eva Aguirre Hernández y Q.A. Verónica Muñoz Ocotero

A mi familia,

amigos,

los que están y los que no.

The first principle is that you must not fool yourself, and you are the easiest person to fool.

Richard P. Feynman

For instance, on the planet Earth, man had always assumed that he was more intelligent than dolphins because he had achieved so much—the wheel, New York, wars and so on—whilst all the dolphins had ever done was muck about in the water having a good time. But conversely, the dolphins had always believed that they were far more intelligent than man—for precisely the same reasons.

Douglas Adams, The Hitchhiker's Guide to the Galaxy

It has yet to be proven that intelligence has any survival value.

Arthur C. Clarke

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS VII

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

1. INTRODUCCIÓN 5

2. ANTECEDENTES 7

2.1. METABOLISMO SECUNDARIO E INTERACCIONES ENTRE ORGANISMOS 7
2.1.1. DEFENSAS QUÍMICAS DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS Y HERBÍVOROS 7
2.1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS INVOLUCRADOS EN INTERACCIONES ECOLÓGICAS 8
2.1.3. EFECTOS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL DESARROLLO DE LOS INSECTOS 11
2.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA INSECTICIDA 12
2.2.1. PLANTAS EMPLEADAS EN EL COMBATE A INSECTOS 12
2.2.2. PRINCIPIOS ACTIVOS AISLADOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA 13
2.2.3. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA 15
2.3. GÉNEROS ESTUDIADOS 17
2.3.1. DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *HAPLOPHYTON* 17
2.3.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DEL GÉNERO *HAPLOPHYTON* 20
2.4.1. DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *TEPHROSIA* 23
2.4.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GÉNERO *TEPHROSIA.* 24
2.4.3. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE ESPECIES MEXICANAS DEL GÉNERO *TEPHROSIA*. 27
2.5 TOXICIDAD DE COMPUESTOS QUÍMICOS 30

3. JUSTIFICACIÓN 34

4. HIPÓTESIS 35

5. OBJETIVOS 35

6. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *H. cimicidum* Y *Tephrosia sp.* 36

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS 36
6.1.1. COLECTA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL 36
6.1.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS 36
6.1.3. DETECCIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS. 38
6.1.4. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS 38
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40

6.2.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS 40
6.2.2. DETECCIÓN CUALITATIVA DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS. 40
6.2.3. CCF DE EXTRACTOS DE *H. CIMICIDUM* 41
6.2.4. CCF DE EXTRACTOS DE *TEPHROSIA SP.* 44

7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *H cimicidum* Y *Tephrosia sp*. SOBRE EL DESARROLLO DEL GUSANO COGOLLERO, *Spodoptera frugiperda* 49

7.1. MATERIAL Y MÉTODO 49
7.1.1. INSECTOS UTILIZADOS 49
7.1.2. ENSAYO BIOLÓGICO 49
7.5. RESULTADOS: EFECTO DE EXTRACTOS EN EL DESARROLLO LARVAL 50
7.5.1. EXTRACTOS HEXÁNICOS 50
7.5.2. EXTRACTOS DE ACETATO DE ETILO 53
7.5.3. EXTRACTOS METANÓLICOS 57
7.6. DISCUSIÓN 61

8. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA EN RATÓN DE EXTRACTOS DE *H. cimicidum* Y *Tephrosia sp.* 69

8.2. ORGANISMOS UTILIZADOS 69
8.3. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS 69
8.4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA (DL_{50}) 69
8.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 70

9. CONCLUSIONES GENERALES 73

LITERATURA CITADA 74

ANEXO A. REVELADORES 83

A1. REVELADOR DE ANISALDEHÍDO 83
A2. REACTIVO DE DRAGENDORFF 83
A3. REVELADOR DE LIEBERMANN – BURCHARD 83
A4. REVELADOR DE VAN URK 83
A5. REVELADOR DE PRODUCTOS NATURALES/POLIETILENGLICOL (RPN/PEG) 83

ANEXO B. PREPARACIÓN DE LA DIETA PARA SPODOPTERA 84

ANEXO C. REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS 84

C1. LIEBERMANN – BURCHARD 85
C2. SHINODA 85
C3. DRAGENDORFF 85

C4. ÁCIDO SILICOTÚNGSTICO **85**
C5. MOLISCH **85**

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Vías del metabolismo secundario de las plantas para compuestos: nitrogenados, fenólicos, y terpenoides. **8**
Figura 2. Mapa de distribución de las especies de *Haplophyton* en México. **18**
Figura 3. *Haplophyton cimicidum*. –a. Rama con frutos. –b. Inflorescencia. –c. Corte de la flor. –d. Semilla. **19**
Figura 4. Dibujo de un ejemplar del género *Tephrosia*. *Tephrosia nitens* Seem. a. Hábito.-b. Flor. **23**
Figura 5. Mapa de distribución de las especies de *Tephrosia* en México. Los círculos indican áreas con mayor concentración de especies de *Tephrosia* en el país y/o especies con particular importancia (*e.g*. endemismo). **24**
Figura 6. Diagrama general de trabajo..... **37**
Figura 7. CCF del extracto hexánico de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 8:2. a: revelador de anisaldehído (vis). b: revelador de Liebermann (vis) **42**
Figura 8. CCF del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 6:4. a: Revelador de anisaldehído (vis). b: RPN (254 nm). **42**
Figura 9. CCF del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 6:4. a: Reactivo de van Urk (vis). b: Reactivo de Dragendorff (vis). **43**
Figura 10. CCF del extracto metanólico de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Eluyente: acetato de etilo:metanol 3:7. RPN (254 nm). **43**
Figura 11. CCF de extracto hexánico de raíz de *Tephrosia sp.* se utilizó hexano:acetato de etilo 6:4 como eluyente. a: revelada con anisaldehído (vis). b: revelada con reactivo de Liebermann (vis).. ..... **45**
Figura 12. CCF del extracto de acetato de etilo de raíz de *Tephrosia sp.* Se utilizó hexano:acetato de etilo 6:4 como eluyente. a: revelada con anisaldehido (vis), b: revelada con RPN (UV 254 nm) c: sin revelar (UV 254 nm). **46**
Figura 13. CCF del extracto metanólico de raíz de *Tephrosia sp.* Se utilizó acetato de etilo como eluyente. a: revelada con RPN (UV 254 nm) b: sin revelador (UV 254 nm). **46**
Figura 14. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos hexánicos: A, hojas de *Haplophyton c.*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.. ..... **50**
Figura 15. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas para tratamientos con extractos héxanicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. **52**
Figura 16. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos héxanicos: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.. ..... **53**

Figura 17. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas en los tratamientos con extractos de acetato de etilo. A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.... .....**54**
Figura 18. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.....**56**
Figura 19. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.....**57**
Figura 20. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.. .....**58**
Figura 21. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.. .....**60**
Figura 22. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.. .....**61**

Cuadro 1. Principales grupos de metabolitos secundarios involucrados en interacciones planta-animal **10**
Cuadro 2. Familias de plantas con especies que poseen actividad insecticida.....**14**
Cuadro 3. Estructuras de alcaloides y triterpenos aislados de *Haplophyton*.....**22**
Cuadro 4. Especies de *Tephrosia* con actividad en contra de organismos plaga.....**28**
Cuadro 5. Estructuras de los compuestos aislados de especies mexicanas del género *Tephrosia* **31**
Cuadro 6. Sistemas de elución y reveladores empleados para la cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos.....**39**
Cuadro 7. Rendimientos de los extractos de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp*.....**40**
Cuadro 8. Pruebas de detección de grupos de MS realizadas con los extractos de hoja y tallo de *H. cimicidum* y raíz de *Tephrosia* sp.....**41**
Cuadro 9. Interpretación de las coloraciones típicas de flavonoides en CCF sin derivatizar y derivatizadas.....**47**
Cuadro 10. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos hexánicos: A, hojas de *H. cimicidum.*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. **50**
Cuadro 11. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.**55**
Cuadro 12. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos de metanol: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. **59**
Cuadro 13. Determinación de la DL_{50} de los extractos hexánico y metanólico de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp.* administrados por vía intraperitoneal **71**

RESUMEN

En el estado de Oaxaca se utiliza una mezcla acuosa de hojas de *Haplophyton* y raíces de *Tephrosia* en el combate de plagas del ganado. A pesar de este uso, poco se sabe acerca de la causa de la actividad biológica de estas plantas y los efectos que tienen en otros organismos: como pueden ser insectos e incluso mamíferos. La evaluación de extractos o compuestos en distintos modelos biológicos es necesaria para definir su actividad y las perspectivas que tomaría su aplicación *e.g.* farmacológica, alimentaria o agronómica. Se estudiaron especies de los géneros *Haplophyton* y *Tephrosia*. La literatura informa que *Haplophyton* contiene principalmente alcaloides como compuestos activos. Aunado a lo anterior, a partir de la decocción de hojas se fabrica un ungüento repelente de insectos y una pasta para combatir las cucarachas. De manera similar, en el género *Tephrosia* es característica la presencia de rotenoides y flavonoides, además varias especies son usadas como piscicidas, raticidas e insecticidas.

Los extractos de hojas y tallos de *Haplophyton cimicidum* y de raíces de *Tephrosia sp.* se obtuvieron utilizando hexano, acetato de etilo y metanol como disolventes. Los extractos se examinaron con pruebas químicas para detectar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios. Asimismo, se evaluó la actividad biológica de los extractos en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* mediante ensayos con dieta artificial y se determinó su toxicidad en un modelo murino administrándolos por vía intraperitoneal.

Los resultados de las pruebas con reveladores en los perfiles cromatográficos tanto de tallo como de hoja de *H. cimicidum* indicaron la presencia de terpenoides en los extractos de hexano y acetato de etilo. Los extractos de éste último disolvente tambien mostraron resultados positivos para alcaloides. Para *Tephrosia sp.*, las placas cromatográficas reveladas de los extractos hexánicos y de acetato de etilo evidenciaron la presencia de terpenoides. Los flavonoides se detectaron en los extractos de acetato de etilo y metanol. Ambos grupos fueron más notorios en el extracto de acetato de etilo.

Respecto a la evaluación del efecto sobre el desarrollo de *S. frugiperda,* se encontró que los extractos hexánicos en general causaron el mayor porcentaje de mortandad, siendo el extracto obtenido de hoja el más activo. Además, los extractos de tallo de *H. cimicidum* y raíz de *Tephrosia sp* provocaron un incremento en la duración de los períodos de larva y pupa. La viabilidad de los insectos fue baja en todos los tratamientos, los organismos tratados con extracto de raíz tuvieron el menor aumento en peso y en la evaluación de la talla, el menor valor lo presentaron los tratamientos con extracto de hoja.

Para los extractos de acetato de etilo, la mortandad más alta en los insectos se detectó con los tallos y hojas de *H cimicidum*. El extracto de raíz de *Tephrosia sp.* prolongó el tiempo en estado larval y redujo el pupal. Todos los tratamientos redujeron la viabilidad larval pero la viabilidad de pupa solamente fue afectada

por el extracto de raíz de *Tephrosia sp.* La mayor disminución de peso y talla se obtuvo en el tratamiento que usó extracto de hojas.

Los extractos metanólicos no tuvieron efecto en la mortandad de los insectos. Los tiempos de desarrollo larval y de pupación se prolongaron en los tratamientos con los extractos de hojas y tallos. La viabilidad larval con los extractos de raiz fue baja, por otro lado el tratamiento con extracto de hojas tuvo los menores valores de peso y talla.

En las pruebas con ratones para evaluar la DL_{50}, los extractos de *Haplophyton* no resultaron tóxicos, a diferencia de los extractos hexánicos de raíz de *Tephrosia* que fueron tóxicos.

Palabras clave: *Haplophyton*, *Tephrosia*, *Spodoptera*, metabolitos secundarios, actividad biológica.

ABSTRACT

Species from the genera *Haplophyton* and *Tephrosia* were studied. An aqueous mixture of *Haplophyton* leaves and *Tephrosia* roots is applied to combat cattle ectoparasites in the state of Oaxaca. Albeit this acknowledged use of the plants, little is known about the cause of its biological activities or its effects exerted on other organisms such as insects or even mammals. The extracts or compounds evaluation over different biological models is necessary to determine the types of activities and define its utilization perspectives, *e.g.* pharmacological, nutritional or agronomical. The literature reviewed mentions alkaloids as the principal active components found in *Haplophyton*. Furthermore, the leaves decoction is used to prepare an insect repellent ointment as well as a dough bait to kill cockroaches. As regards to the genus *Tephrosia* is characteristic the presence of flavonoids and rotenoids, and some species are used as piscicides, raticides and insecticides.

Leaves and stems of *Haplophyton cimicidum* and roots of *Tephrosia sp.* were extracted successively with hexane, ethyl acetate and methanol. Chemical qualitative tests were performed on the resulting extracts to search for the presence of the main groups of secondary metabolites. The extracts were also evaluated by means of artificial diet assays for its biological activity on the development of *Spodoptera frugiperda*. Toxicity were assessed on a murine model intraperitoneally administered.

Chromatographic plates of *H. cimicidum* leaves and stems extracts were sprayed with specific reagents, the results revealed the presence of terpenoids in the hexane and ethyl acetate extracts. The latter were also positive in the alkaloids test. *Tephrosia sp.* chromatographic plates showed terpenoids presence in the hexane and ethyl acetate extracts. Flavonoids were detected on the ethyl acetate and methanol extracts of *Tephrosia sp.* Both metabolite groups were more evident in ethyl acetate extract of the roots.

The evaluation results of the effect on the development of *S. frugiperda* showed that the higher mortality percentage was caused by the hexane extracts, being the most active the leaf extract of *H. cimicidum*. The extracts of *H. cimicidum* stems and *Tephrosia sp.* roots prolonged pupal and larval periods. Insect viability were found low in all treatments, individuals treated with root extract had the lowest weight gain, the minimal size corresponded to *H. cimicidum* leaf extract treatments.

The ethyl acetate extracts of *H. cimicidum* caused the highest percentage of insect mortality. *Tephrosia sp.* root extract prolonged the larval stage and reduced the pupal stage developmental times. All treated groups had reduced larval viability but the same pupal variable were only affected by *Tephrosia sp.* extracts. Leaves extract of *H. cimicidum* caused maximum weight and size reduction.

Methanolic extracts had no effect on insect mortality. Larval and pupal stage developmental times were prolonged by *H. cimicidum* extracts. Larval viability were diminished in the roots extract treatment.

Weight and size values were low in organisms treated with leaves extract.

The outcome of the toxicity tests on mice to determine LD_{50} showed non toxic *H. cimicidum* extracts, whereas *Tephrosia sp.* resulted toxic.

Keywords: *Haplophyton*, *Tephrosia*, *Spodoptera*, secondary metabolites, biological activity.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos que se clasifican en metabolitos primarios y secundarios en función de que formen parte del metabolismo necesario para sustentar la vida de la planta o que se produzcan como respuesta a condiciones de estrés (Anaya, 2003). Aún cuando la función de la mayoría de los metabolitos secundarios (MS) no ha sido totalmente establecida, se considera que desempeñan funciones importantes en la supervivencia y adaptación de los vegetales participando en interacciones bióticas que abarcan desde las relaciones benéficas hasta las perjudiciales, para uno o ambos de los participantes (Wink, 1993). Estos MS, poseen una diversidad de actividades biológicas que ofrece múltiples oportunidades de aplicaciones prácticas desde las perspectivas farmacológica, alimentaria y agronómica (Cuadro 1). La presencia de MS en las especies vegetales afecta de distintas maneras a los herbívoros que las consumen, cuya mayoría son insectos – lepidópteros, coleópteros y ortópteros - pudiendo tener órganos o funciones como blancos específicos dentro de sus sistemas: nervioso, digestivo y endocrino (Schoonhoven, 1993). Los distintos modos de acción que involucran las interacciones de los compuestos químicos con dichos blancos pueden ser aprovechados para reducir el riesgo de formación de resistencia a insecticidas en poblaciones de plagas insectiles (Arnason *et al.*, 1993).

En comunidades del estado de Oaxaca son utilizadas plantas de los géneros *Haplophyton* y *Tephrosia* en el combate de plagas. La decocción de hojas de *Haplophyton sp.* combinada con manteca se usa como ungüento repelente. También se prepara en México una mezcla de masa[1] con hojas de *Haplophyton sp.* machacadas para combatir las cucarachas (Martínez y Matuda, 1979; Standley, 1924). Por su parte, varias especies de *Tephrosia* son usadas alrededor del mundo como piscicidas, raticidas e insecticidas (Grainge y Ahmed, 1988; Fagerström *et al.*, 2002; Amede *et al.*, 2006).

[1] En las fuentes no se especifica si la masa es de maíz, trigo o alguna otra semilla.

En esta investigación se realizó un estudio químico preliminar para determinar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Haplophyton cimicidum* y las raíces de *Tephrosia* sp. Asimismo se evaluó la influencia de los extractos orgánicos de ambas especies en el desarrollo de *S. frugiperda*, mediante ensayos con dieta artificial y se determinó la DL_{50} en ratones de los extractos.

La estructura del escrito agrupa cada una de las partes de la investigación, con su discusión correspondiente.

2. ANTECEDENTES

2.1. Metabolismo secundario e interacciones entre organismos

2.1.1. Defensas químicas de las plantas contra patógenos y herbívoros

Las plantas están sometidas de manera natural por diversas condiciones externas a situaciones de estrés, que como respuesta producen cambios en su metabolismo. El estrés vegetal es definido como cualquier factor biótico o abiótico que reduce o aumenta significativamente algún proceso fisiológico como el crecimiento o la fotosíntesis. Dentro de los factores abióticos se encuentran la temperatura, sequía, luz; y dentro de los bióticos, organismos patógenos o herbívoros, entre otros. Se ha propuesto que la presión de selección que causan los herbívoros, principalmente los insectos, sobre las poblaciones de especies vegetales, es responsable de la aparición de defensas de tipo físico (tejidos lignificados, tricomas, espinas) y químico (toxinas). El efecto a corto plazo que la mencionada presión tendrá sobre la planta dependerá del estado fisiológico de ésta, su edad y el nivel de daño causado (Dirzo, 1984).

La composición química de la planta, además de algunas características físicas, le permite a un insecto identificarla como alimento, sitio idóneo para ovipositar o por el contrario lo disuaden de consumirla o lo repelen (Anaya, 2003). Se han caracterizado numerosos compuestos químicos aislados de las plantas que actúan como estimulantes o tóxicos para los insectos, estas sustancias varían en su origen y estructura y son producto del metabolismo secundario. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por la célula vegetal, que no participan directamente en el metabolismo básico que la mantiene con vida, i.e. fotosíntesis y respiración. Tienen una distribución que se restringe a algunas especies o familias vegetales, y en ocasiones a un órgano o tejido dentro de la planta por lo que pueden ser utilizados como marcadores taxonómicos (Berembaum y Rosenthal, 1992). La producción de losMS puede ser constitutiva o provocada como respuesta al ataque de un herbívoro. Los niveles de producción y acumulación varían con la etapa de desarrollo

de la planta, los estímulos ambientales como la luz y la disponibilidad de nutrientes o agua. Este amplio conjunto de compuestos tiene su origen en unas cuantas vías metabólicas que parten del metabolismo primario, y que en algún punto se diversifican y vuelven propias de una especie o grupo taxonómico (Fig. 1).

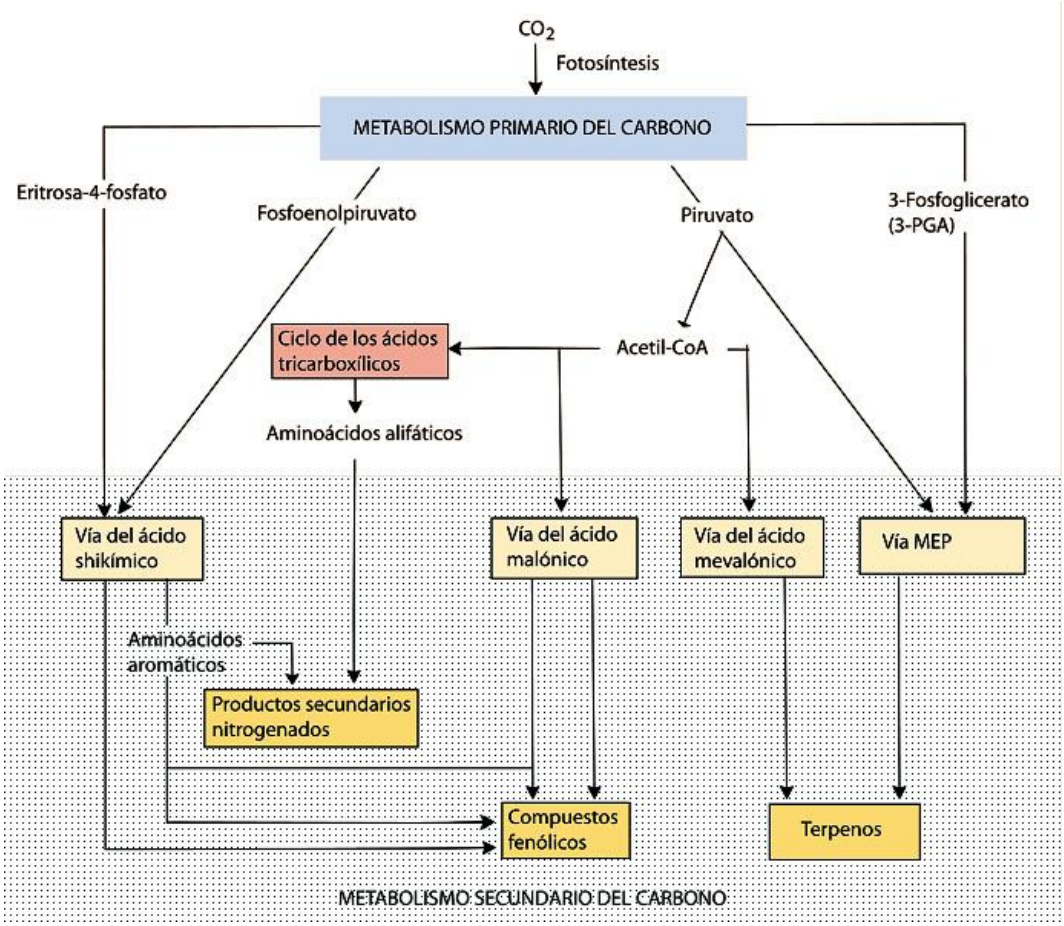


Figura 1. Vías del metabolismo secundario de las plantas para compuestos: nitrogenados, fenólicos, y terpenoides (Taiz *y* Zeiger, 2002).

2.1.2. Metabolitos secundarios involucrados en interacciones ecológicas

Se estima que solamente el 10% del número total de especies vegetales conocidas se ha estudiado con el fin de buscar compuestos que posean actividad biológica. Dichos estudios han permitido conocer las estructuras de más de 200 000 MS (Hartmann, 2007; Chinou, 2008) que contribuyen de distintas maneras a la supervivencia del organismo, funcionando como (Dixon, 2001):

- Atrayentes de polinizadores o dispersores de semillas
- Alelopáticos
- Mecanismo de respuesta ante daños físicos
- Protectores contra luz UV
- Defensa contra depredadores y patógenos

Los MS también pueden clasificarse en dos grupos desde el punto de vista funcional y adaptativo (Anaya, 2003):

1) Semioquímicos - Compuestos que intervienen en las relaciones entre organismos de la misma especie
    - Autotoxinas: son tóxicos para la misma especie
    - Autoinhibidores adaptativos: controlan el número de individuos en la población
    - Feromonas: actúan como mensajes en la comunicación entre organismos (reproducción, defensa, territorialidad)
2) Aleloquímicos - Compuestos que determinan la relación entre dos organismos de diferente especie
    - Alelomonas: dan ventaja al organismo que las produce
    - Kairomonas: dan ventajas al organismo que las recibe
    - Depresores: que no dan ventaja al organismo que las produce pero perjudican al que las recibe

Los MS que funcionan como defensas químicas contra insectos herbívoros también pueden agruparse en: repelentes, antialimentarios, reguladores del crecimiento y toxinas. Los repelentes evitan que los adultos o larvas se posen en la superficie vegetal para ovipositar o alimentarse. Los antialimentarios inhiben o disuaden la alimentación de los insectos. Los reguladores del crecimiento alteran procesos bioquímicos esenciales en el desarrollo del insecto. Las toxinas matan o inmovilizan a los organismos que las consumen (Arnason, 1993).

Cuadro 1. Principales grupos de metabolitos secundarios involucrados en interacciones planta-animal

Clase	Estructuras descritas *	Distribución	Actividad fisiológica
COMPUESTOS NITROGENADOS			
Alcaloides	6500	Amplia en angiospermas. Especialmente en raíz, hoja y fruto	Muchos tóxicos y de sabor amargo
Aminas	100	Amplia en angiospermas. Frecuentemente en flores	Muchas de olores repelentes, algunas alucinógenas.
Aminoácidos no proteínicos	400	Especialmente en leguminosas. Semillas.	Muchos son tóxicos
Glucósidos cianogénicos	30	Esporádicos. Especialmente en hoja y fruto	Venenosos (como HCN)
Glucosinolatos	75	Típicos en Brassicaceae (Cruciferae) y otras diez familias.	Sabor acre y amargo (como isotiocianatos)
TERPENOIDES			
Monoterpenos	1000	Amplia, en aceites esenciales.	Aromas agradables
Lactonas sesquiterpénicas	1500	Principalmente en Asteraceae (Compositae), pero tambien en otras angiospermas.	Algunas son amargas y tóxicas, también alergénicas
Diterpenoides	2000	Amplia, especialmente en látex y resinas	Algunos son tóxicos
Saponinas	600	En unas 70 familias.	Hemólisis
Limonoides	100	Principalmente en Rutaceae, Meliaceae y Simaroubiaceae.	Sabor amargo
Cucurbitacinas	50	Principalmente en Cucurbitaceae.	Sabor amargo y tóxicas
Cardenólidos	150	Especialmente comunes en Apocynaceae, Asclepiadaceae y Scrophulariaceae.	Tóxicas y amargas
Carotenoides	500	Universales. En hojas, con frecuencia en flor y fruto.	Coloridos
COMPUESTOS FENÓLICOS			
Fenoles simples	200	Universales. En hojas, con frecuencia en otros tejidos.	Antimicrobianos
Flavonoides	4000	Universales en angiospermas, gimnospermas y helechos.	Con frecuencia coloridos
Quinonas	800	Amplia, especialmente en Rhamnaceae.	Coloridos
OTROS			
Policétidos	650	Principalmente en Asteraceae (Compositae) y Umbeliferae.	Algunos son tóxicos

* Número aproximado. Adaptado de: Harborne, 1988.

2.1.3. Efectos de los metabolitos secundarios en el desarrollo de los insectos

La actividad que muestren los MS en insectos depende de: la especie que los consuma, estadio de desarrollo y su sensibilidad al compuesto. Resultan afectados de diversas formas:, modificación de la conducta de oviposición, activación o inhibición de quimiorreceptores dando por resultado atracción, disuasión, fagoestimulación o efecto antialimentario, pueden retardar o acelerar el crecimiento, alterar la replicación del ADN, reducir la digestibilidad de la planta, inhibir la actividad de enzimas hidrolíticas del proceso digestivo o interferir en su ciclo de vida o provocar muerte rápida a causa de la interrupción de las rutas bioquímicas principales. (Arnason, 1993).

Respecto a la efectividad, sólo algunas substancias vegetales tienen la rápida actividad letal que provocan los insecticidas sintéticos, muchos son insectistáticos, ocasionan efectos subletales que podrían aprovecharse para controlar la plaga modificando su alimentación, crecimiento, desarrollo u oviposición. Los MS son importantes en el reconocimiento y aceptación de la planta hospedera por parte de los insectos adultos; por ejemplo, cuando la mariposa o polilla hembra se posa sobre una planta, generalmente camina en la superficie de la hoja, la duración de esta caminata y el inicio de la siguiente pauta de comportamiento son dependientes de los estímulos que recibe de los compuestos en la superficie foliar. Algunas especies efectúan toques reiterados con las patas anteriores cuando entran en contacto con un hospedero potencial, otras sondean la superficie con las antenas. Estos comportamientos provocan que los quimiorreceptores entren en contacto con sustancias que pueden estimularlos y si es el caso inducir a la oviposición (Simmonds, 2001).

Los extractos o compuestos aislados de plantas también pueden inhibir o regular las rutas bioquímicas o procesos esenciales para al crecimiento y desarrollo de los insectos. Cuando los efectos son nocivos, los organismos expuestos mueren a causa del término prematuro de las etapas de desarrollo, los compuestos alteran la metamorfosis o interfieren con la reproducción. Los efectos pueden incluir la inducción de anormalidades morfológicas y

genéticas que reduzcan el potencial reproductivo, los adultos emergen estériles o con deformidades que les impiden aparearse (Kubo, 1993).

Respecto a los compuestos con actividad reguladora del crecimiento, estos pueden dividirse de acuerdo a su modo de acción específica en inhibidores de la síntesis de quitina y sustancias que interfieren con la acción de hormonas. Los primeros funcionan mayormente como larvicidas, los organismos tratados se desarrollan hasta el tiempo de la muda pero no la completan a causa de la incapacidad para sintetizar la quitina de la nueva cutícula, y en consecuencia no llegan a la etapa de adultos. El segundo grupo es efectivo en las etapas iniciales de embriogénesis y metamorfosis, tales como el comienzo de la fase pupal y el huevo. Su acción resulta en estadios supernumerarios, pupación anormal y formación de organismos con características mezcladas de larva y pupa (Ishaaya, 2001; Tunaz y Uygun, 2004).

La alimentación del insecto puede alterarse a causa de inhibidores. Estos son compuestos que, luego de una prueba sensorial, provocan que el insecto deje de alimentarse y muera por inanición. Algunas plantas sintetizan proteínas que interfieren en la digestión del herbívoro impidiendo la acción de las enzimas degradadoras de carbohidratos (*e.g.* amilasas) o proteínas (*e.g.* tripsina). Existen además proteínas (*e.g.* ricina) que inactivan ribosomas y por tanto la producción de otras proteínas (Carlini y Grossi de Sá, 2002).

2.2. Actividad biológica insecticida

2.2.1. Plantas empleadas en el combate a insectos

Alrededor de 2000 especies vegetales pertenecen a sesenta familias que poseen propiedades insecticidas (Cuadro 2). De éstas, las familias Compositae, Flacourtiaceae, Leguminosae, Liliaceae y Solanaceae han presentado especies de valor comercial tanto en el pasado como en el presente. El conocimiento empírico de las plantas útiles para combatir plagas de insectos ha sido acumulado durante un largo tiempo por diferentes culturas en diversas

partes del mundo. Por ejemplo, desde tiempos védicos (1500 años A.C.) se emplea en la India y países vecinos el neem (*Azadirachta indica*) para el control de infestaciones por insectos en granos, vestimenta, etc. En Irán y Yugoslavia las cabezas de la flor de crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) han sido usadas como producto insecticida desde el siglo XVIII. Las propiedades insecticidas del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) fueron conocidas por los nativos americanos y posteriormente en el siglo XVII los granjeros europeos comenzaron a usar sus extractos (Dev y Koul, 1997).

A partir de 1940 comenzaron a utilizarse en mayor escala los plaguicidas sintéticos, fue hasta entonces que se desplazaron con efectividad las sustancias insecticidas en uso, que incluían las preparaciones botánicas. (Isman, 2006) Estos productos se mostraron eficaces para controlar las poblaciones plaga, su aceptación fue rápida y permitió el crecimiento de la industria. Sin embargo, la aplicación fue indiscriminada y se hizo sin tomar en cuenta la posibilidad de un efecto nocivo a largo plazo en el ambiente y para la salud humana. La selección de insectos resistentes y la persistencia de residuos tóxicos en los alimentos son algunos de los efectos no deseados, otros son los daños a la salud de quienes los aplican, la acumulación de compuestos tóxicos en las cadenas tróficas y la mortandad de parásitos, depredadores y polinizadores (Pimentel, 2005).

2.2.2. Principios activos aislados de plantas con actividad insecticida

Diversos compuestos de origen vegetal han sido aislados y sus derivados sintéticos se emplean con éxito, tal es el caso de los piretroides y carbamatos (Khambay *et al.*, 1997), que comparten con los insecticidas organofosforados y organoclorados un modo de acción general neurotóxico, rápido y eficaz. La búsqueda de compuestos se ha acentuado en aquellos que tienen distinto modo de acción, tales como los disuasivos, los inhibidores de la muda, los reductores del crecimiento o la fecundidad y los inhibidores respiratorios (Arnason, 1993). Es importante mencionar que debido los efectos anteriores la mayoría son insectistáticos y no insecticidas.

Cuadro 2. Familias de plantas con especies que poseen actividad insecticida

- Acanthaceae
- Agavaceae
- Annonaceae
- Apocynaceae
- Araceae
- Aristolochiaceae
- Asclepiadaceae
- Balanitaceae
- Berberidaceae
- Boraginaceae
- Brassicaceae
- Burseraceae
- Capparidaceae
- Celastraceae
- Chenopodiaceae
- Compositae (Asteraceae)
- Convulvulaceae
- Cucurbitaceae
- Dioscoreaceae
- Ebenaceae
- Ericaceae
- Euphorbiaceae
- Flacourtiaceae
- Guttiferae
- Helleboraceae
- Hippocastanaceae
- Hypericaceae
- Illiaceae
- Juglandaceae
- Labiatae
- Lamiaceae
- Lauraceae
- Leguminosae (Fabaceae)
- Liliaceae
- Loganiaceae
- Lycopodiaceae
- Magnoliaceae
- Malvaceae
- Meliaceae
- Menispermaceae
- Myristicaceae
- Myrtaceae
- Papaveraceae
- Piperaceae
- Poaceae
- Polygonaceae
- Polypodiaceae
- Ranunculaceae
- Rosaceae
- Rubiaceae
- Rutaceae
- Sapindaceae
- Sapotaceae
- Simaroubaceae
- Solanaceae
- Stemonaceae
- Taxaceae
- Theaceae
- Umbelliferae (Apiaceae)
- Verbenaceae

(Dev y Koul, 1997).

De algunas especies de la familia Meliaceae se extraen limonoides como nimbina, nimbidina, salanina y azadiractina, que tienen principalmente efecto antialimentario, ovicida, larvicida y regulador del crecimiento. La azadiractina reduce el nivel de ecdisona y hormona juvenil en los insectos holometábolos y hemimetábolos, provocando en los juveniles reducción de la movilidad y extensión del tiempo en fase larval, muchas veces ocurren deformidades o la muda es imperfecta (Kubo, 1993). La familia Piperaceae es fuente de piperamidas, lignanos y derivados del ácido benzóico. Las piperamidas tienen actividad neurotóxica e inhibidora del

citocromo P450 (Scott *et al*., 2008). El crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium)* pertenece a la familia Asteraceae, su principio activo son las piretrinas y su acción insecticida, característica por su rapidez, es resultado de su neurotoxicidad. Estos compuestos bloquean los canales de sodio activados por voltaje presentes en los axones neuronales. Su labilidad frente a los rayos UV motivó el desarrollo de derivados sintéticos más estables, los piretroides (Isman, 2006).

Otro producto botánico con un modo de acción parecido al de los piretroides, a pesar de no tener similitud estructural, es la sabadilla, que se obtiene de las semillas de la planta *Schoenocaulon officinale* Gray. (Liliaceae), la cual se distribuye en centro y sudamérica (Frame, 2001). Las semillas contienen 2-4% de veratrina, la mezcla biológicamente activa de alcaloides; uno de ellos, la cevadina, es muy tóxico para mamíferos (la DL_{50} para ratones es 3.5 mg/Kg) sin embargo, las preparaciones comerciales dan un margen de seguridad ya que contienen menos de 1% de ingredientes activos (Ujváry, 2001).

Se obtiene a partir de la madera pulverizada de *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae) cuyo alcaloide activo es la rianodina, presente en una cantidad menor al 1%. Este compuesto interfiere notablemente en el proceso de liberación del calcio intracelular, necesario para el funcionamiento del tejido muscular estriado (Isman, 2006).

2.2.3. Modelos para el estudio de la actividad insecticida

Numerosos vegetales contienen compuestos con actividad biológica susceptible de ser evaluada utilizando modelos. Estos consisten en un sistema biológico bajo condiciones estandarizadas y sirven para determinar, entre otras, la concentración efectiva, la letalidad o el modo de acción. El gran número de resultados positivos obtenidos con diversos modelos, es indicativo de una amplia diversidad de metabolitos secundarios de plantas que tienen utilidad potencial como "insecticidas", por ejemplo, por ser tóxicos, disuasorios, inhibidores o estimulantes, etc.

Al realizar bioensayos es importante la selección de las especies de insectos. La elección del modelo escogido tendrá influencia sobre los resultados debido a la variedad de posibles respuestas que se presentan incluso intraespecíficamente; el efecto de un compuesto sobre una especie de insecto no es necesariamente el mismo para otra (Bellés, 1988). Los hábitos alimentarios influyen en la sensibilidad a sustancias químicas por tanto en el resultado de la prueba, los insectos generalistas son usualmente menos sensibles a los compuestos mientras que lo contrario ocurre con los especialistas (Cole, 1994). Otros factores a considerar en la selección son importancia económica, facilidad de crianza (Kubo, 1993) y etapa de desarrollo en que se halla el insecto, se sabe que larvas neonatas o en los primeros estadios son más susceptibles al efecto de compuestos que aquellas más desarrolladas (López *et al.*, 2003).

La necesidad de protegerse de algunos compuestos en el ambiente sería responsable de la expresión de algunos genes que ocurre exclusivamente durante las etapas larvales y no en las de huevo, pupa o adulto. Estos genes corresponden a enzimas de detoxificación, pertenecientes al grupo de los citocromos P450, cumplen entre otras, la función de metabolizar xenobióticos tales como drogas, pesticidas y toxinas vegetales, su presencia puede estar restringida al tejido de un órgano (Berenbaum, 2002). Los mecanismos de detoxificación principalmente glutatión s-transferasas y citocromos P450 permiten que los insectos sobrevivan cuando se especializan en consumir determinada familia o especie, esta puede ser causa de que los organismos polífagos respondan de manera distinta que los oligófagos cuando son sometidos a un mismo tratamiento (Li, 2007).

Un aspecto importante a considerar durante la evaluación del desarrollo de los insectos es el tiempo transcurrido en cada etapa, ya que en ocasiones el efecto del tratamiento se ve reflejado en la duración de los lapsos entre mudas, el tiempo que toma el paso de larva a pupa y aquel desde la eclosión hasta inclusive la emergencia de los adultos (Kubo, 1993; Wheeler *et al.*, 2001).

Existen alrededor de 70 000 especies plaga en el mundo, y de éstas sólo el 10% se consideran de importancia económica a causa de las pérdidas que ocasionan (Pimentel, 2005). Dentro de

los géneros de insectos modelo en bioensayos, *Spodoptera* es uno del cual se emplean las especies *S. exigua* Hübner, *S. littoralis* Boisduval, *S. litura* Fabricius, *S. eridania* Stoll, *S. exempta* Walker y *S. frugiperda* JE Smith. La última es conocida comúnmente como "gusano cogollero" por su hábito de comer las hojas dobladas en desarrollo temprano, los meristemos y las espigas inmaduras. Es una especie generalista holometábola que generalmente presenta 6 instares o estadios larvales y que ataca cultivos de alfalfa, frijol, papa, tomate, sorgo y soya, teniendo preferencia por los de maíz, con las repercusiones económicas que eso implica. Esta especie presenta una distribución amplia en América, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales. En México es la plaga más importante del maíz y puede encontrársele prácticamente en todas las regiones donde hay cultivos (Casmuz *et al*., 2010).

2.3. Géneros estudiados

2.3.1. Descripción y distribución del género *Haplophyton*

El género *Haplophyton* pertenece a la familia Apocynaceae y orden Gentianales, se le incluye dentro de la subfamilia Plumeriodeiae debido a sus anteras no diferenciadas y la presencia característica de alcaloides indólicos. *Haplophyton* tiene una distribución exclusivamente americana que abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta Guatemala. Posee solo dos especies, ambas presentes en México (Fig. 2), estas son *Haplophyton crooksii* L. Bent al norte en los estados Sonora, Chihuahua y Coahuila en tanto que *Haplophyton cimicidum* A. DC. (Fig. 3) se encuentra al sur del país en Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Chiapas (Williams, 1995). Ambas especies son plantas arbustivas perennes.

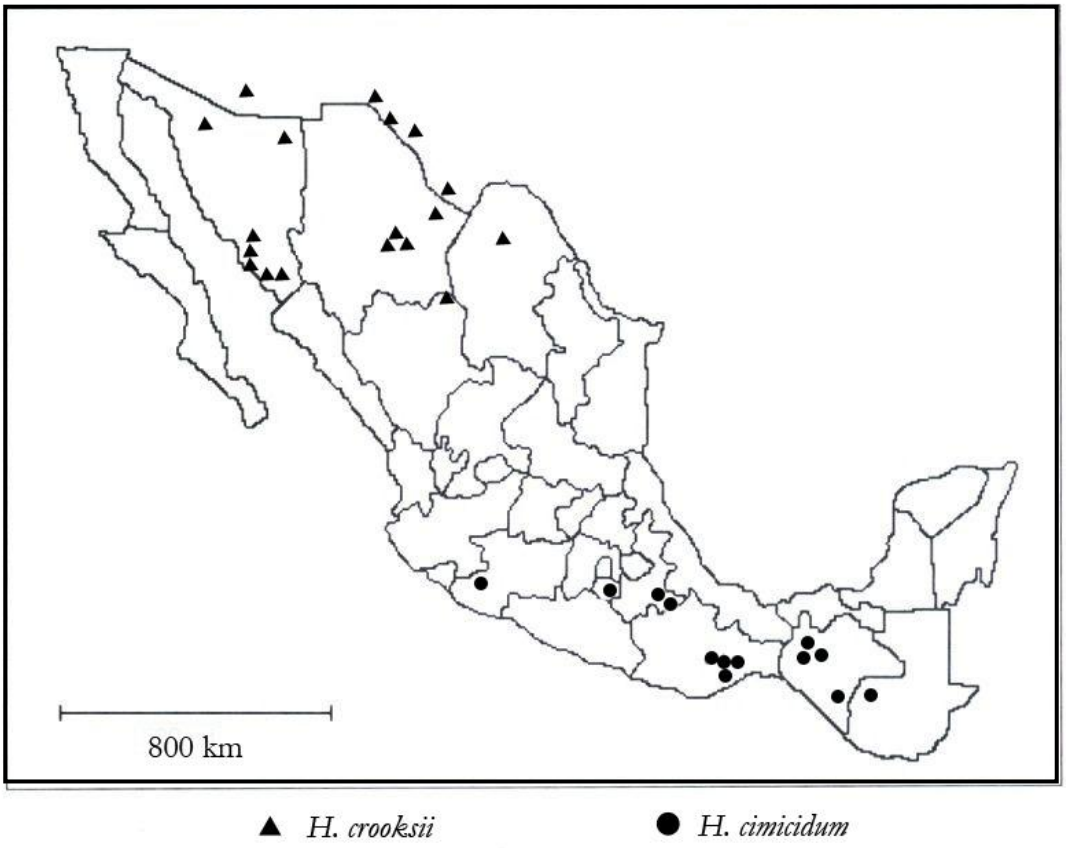


Figura 2. Mapa de distribución de las especies de *Haplophyton* en México (modificado de Williams, 1995).

El nombre *Haplophyton* deriva del griego ἁπλοῦς (sencillo, simple) y φυτόν (planta), por otra parte *cimicidum* proviene del latín *cimex* (chinche) y *caedere* (cortar, matar). El uso anti-insectos tradicional consiste en obtener una decocción de las hojas que se mezcla con manteca para aplicarse como ungüento repelente, así como una combinación de hojas machacadas con masa que es empleada en el combate contra las cucarachas, a partir de lo cual toma su nombre popular de "hierba de la cucaracha" (Standley, 1924; Martínez y Matuda, 1979).

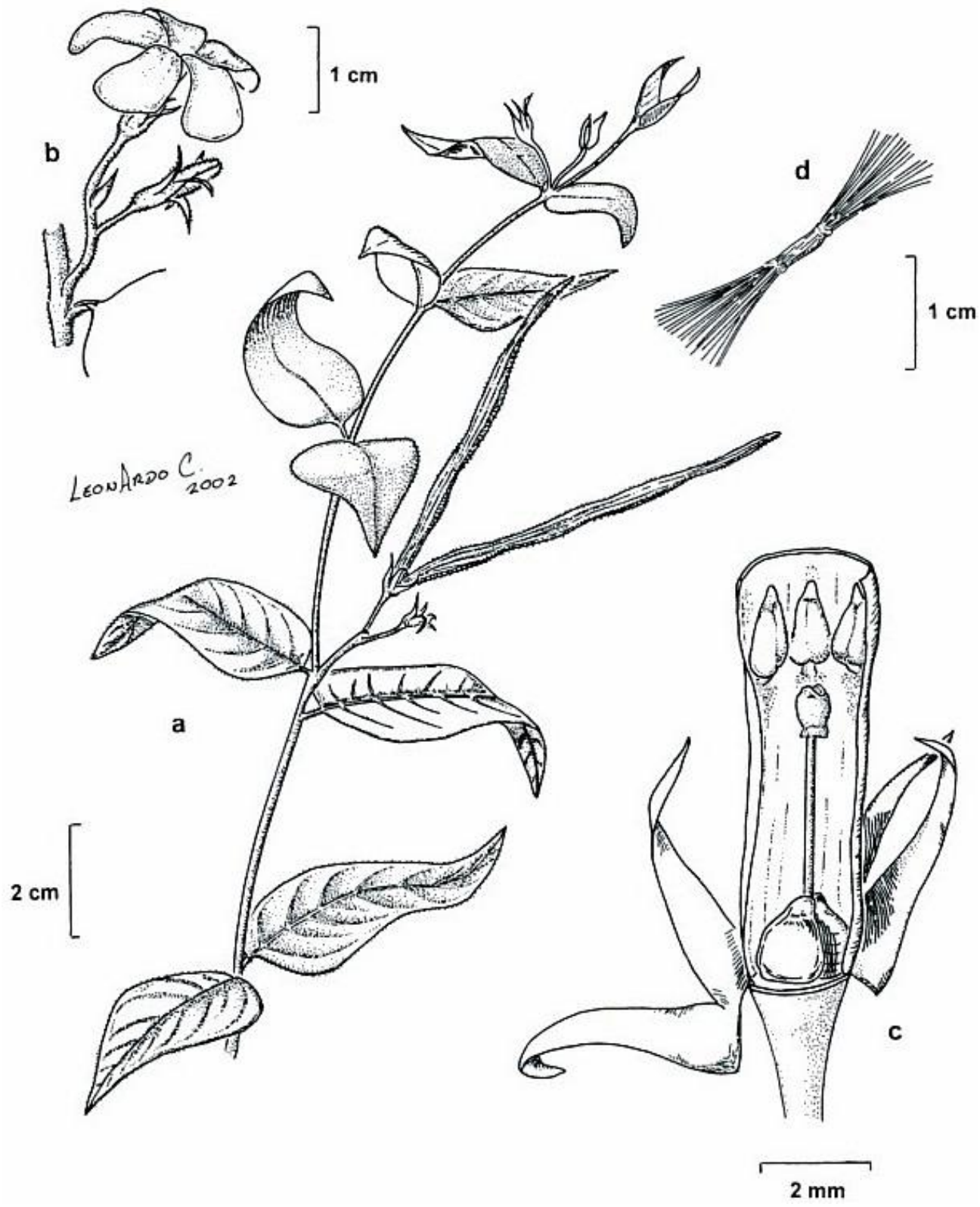


Figura 3. *Haplophyton cimicidum*. –a. Rama con frutos. –b. Inflorescencia. –c. Corte de la flor. –d. Semilla (Alvarado-Cárdenas, 2004).

2.3.2. Actividad biológica y metabolitos secundarios aislados del género *Haplophyton*

La monografía de Grainge y Ahmed (1988) informa acerca de *Haplophyton* que la actividad anti insectos *s.l.*[2] de sus hojas, tallos o raíces ha sido evaluada en *Autographa sp.* (Lepidoptera: Noctuidae), *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Udea rubigalis* (Lepidoptera: Crambidae). Aunado a lo anterior, se ha probado la actividad insecticida del género *Haplophyton* en *Anasa tristis* (Hemiptera: Coreidae), *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), *Blatella germanica* (Blattaria: Blattellidae), *Epicauta vittata* (Coleoptera: Meloidae), *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae), *Gargaphia solani* (Hemiptera: Tingidae), *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) y *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae).

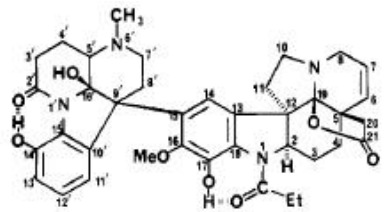
Las publicaciones de los estudios fitoquímicos del género, efectuados hace ya más de 50 años (Rogers *et al*., 1952; Snyder *et al*., 1954a; Snyder *et a.,* 1954b; Saxton, 1965), mencionan principalmente la presencia de alcaloides. De *H. cimicidum* se han aislado los alcaloides haplofitina y cimicidina (Cuadro 3), estos compuestos presentan toxicidad por ingestión y por contacto para la cucaracha, el barrenador europeo y otros insectos. Aunque en la literatura consultada se indica que la DL_{50} de la haplofitina es comparable con la de varios insecticidas de uso común, no se menciona la dosis ni cuales son esos insecticidas. Otros estudios acerca de la especie establecieron la presencia y estructura de más alcaloides considerados exclusivos del género (Cuadro 3), estos son: haplocina, haplocidina (Cava *et al*., 1963a), cimicina, cimicidina (Cava *et al*., 1963b) haplocidifitina, norisohaplofitina (Adesomoju *et al*., 1983a) y cimilofitina (Adesomoju *et al*., 1983b). También se registraron los alcaloides eburnamina, isoeburnamina y O-metil eburnamina previamente descubiertos en otros

[2] Modo de acción no definido; a diferencia del "insecticida", que es letal

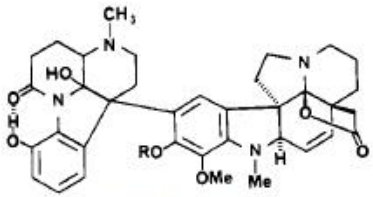
géneros de Apocinaceas (Cava *et al.*, 1963a), así como los compuestos de tipo triterpénico: bauerenol, monoestearato de eritrodiol, betulina y β sitosterol (Cava *et al.*, 1967).

De la especie *H. crooksii* se han aislado y caracterizado estructuralmente los alcaloides crooksiina, crookisidina, metoxitetrahidrosecodina, 10-metoxi-*N1*-metilpericiclivina, 16-decarbometoxivinervinina, yohimbina, β yohimbina, akuammicina, akuammidina, decarbometoxitetrahidrosecodina, tubotaiwina, lanceomigina, *N*-óxido de lanceomigina, haplofitina, cimicina y cimicidina (Cuadro 3); todos muestran actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa *in vitro* y se les atribuyen en conjunto los efectos tóxicos de la planta, aunque no se descartan otros modos de neurotoxicidad (Mroue y Alam, 1991; Mroue *et al.*, 1993; Mroue *et al.*, 1996).

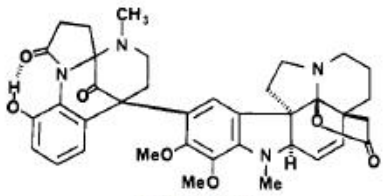
Cuadro 3. Estructuras de alcaloides y triterpenos aislados de *Haplophyton* (Adesomoju *et al.*, 1983a, 1983b; Cava *et al.*, 1963a, 1967; Mroue y Alam, 1991; Mroue ***et al.***, 1993, 1996).



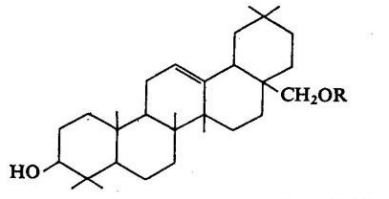
cimilofitina



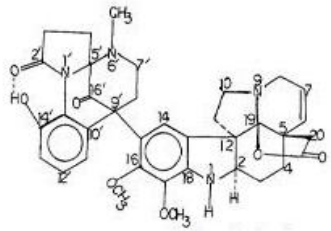
cimicifitina R=CH_3
norcimicifitina R=H



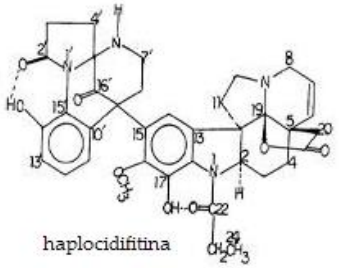
haplofitina



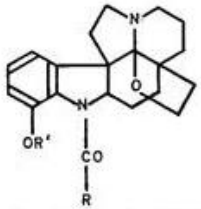
monoestearato de eritrodiol R=CO—$C_{17}H_{35}$



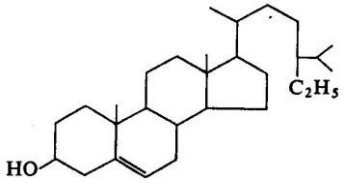
norisohaplofitina



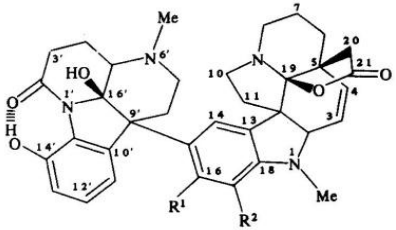
haplocidifitina



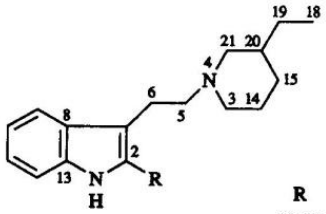
haplocina R=Et; R'=H
haplocidina R=Me; R'=H



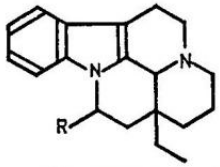
beta sitosterol



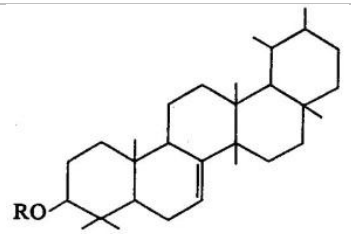
R^1 = OMe, R^2 = OH
crooksina



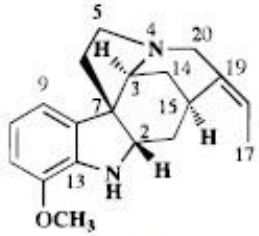
crooksidina-CO-CH_3
metoxitetrahidrosecodina-CH_2-CH_3



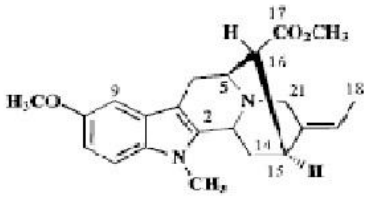
eburnamina R = OH, α
isoeburnamina R = OH, β
O-metil eburnamina R=OMe, α



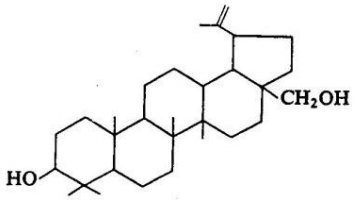
bauerenol R=H



16-decarbometoxivinervinina



10-metoxi-*N1*-metilpericiclivina



betulina

2.4.1. Descripción y distribución del género *Tephrosia*

El género *Tephrosia* pertenece a la familia Fabaceae (sinónimo: Leguminosae), la tercera más diversa dentro de las angiospermas, que agrupa entre 12 000 a 17 000 especies clasificadas en 590 a 690 géneros, algunos de los cuales como *Lonchocarpus*, *Derris*, *Mundulea* y *Tephrosia*, de la subfamilia Papilionoideae, se consideran relacionados entre sí a causa de los compuestos flavonoides y rotenoides aislados de sus especies (White, 1980).

El género *Tephrosia* comprende unas 250-400 especies (White, 1980), las cuales se distribuyen en América, África, el sureste asiático y Australia con preferencia hacia el clima tropical y subtropical; alcanza su mayor diversidad en México, donde existen alrededor de 50 especies endémicas (Fig. 4) que se pueden encontrar desde los 0 hasta 2700 metros de altitud, proliferando entre los 300 y 1500 metros. Las especies se localizan en las regiones lluviosas subtropicales de Oaxaca (la costa y el Istmo), Jalisco, Guerrero (Sierra Madre Occidental) y Nayarit (Fig. 5). Las plantas tienen hábito herbáceo o arbustivo, hojas alternas, pinadas y comúnmente pilosas (Fig. 4) (White, 1980, Domínguez *et al*., 1983; Gómez-Garibay *et al*., 1991; Gómez-Garibay *et al*., 1999; Gómez-Garibay *et al*., 2001).

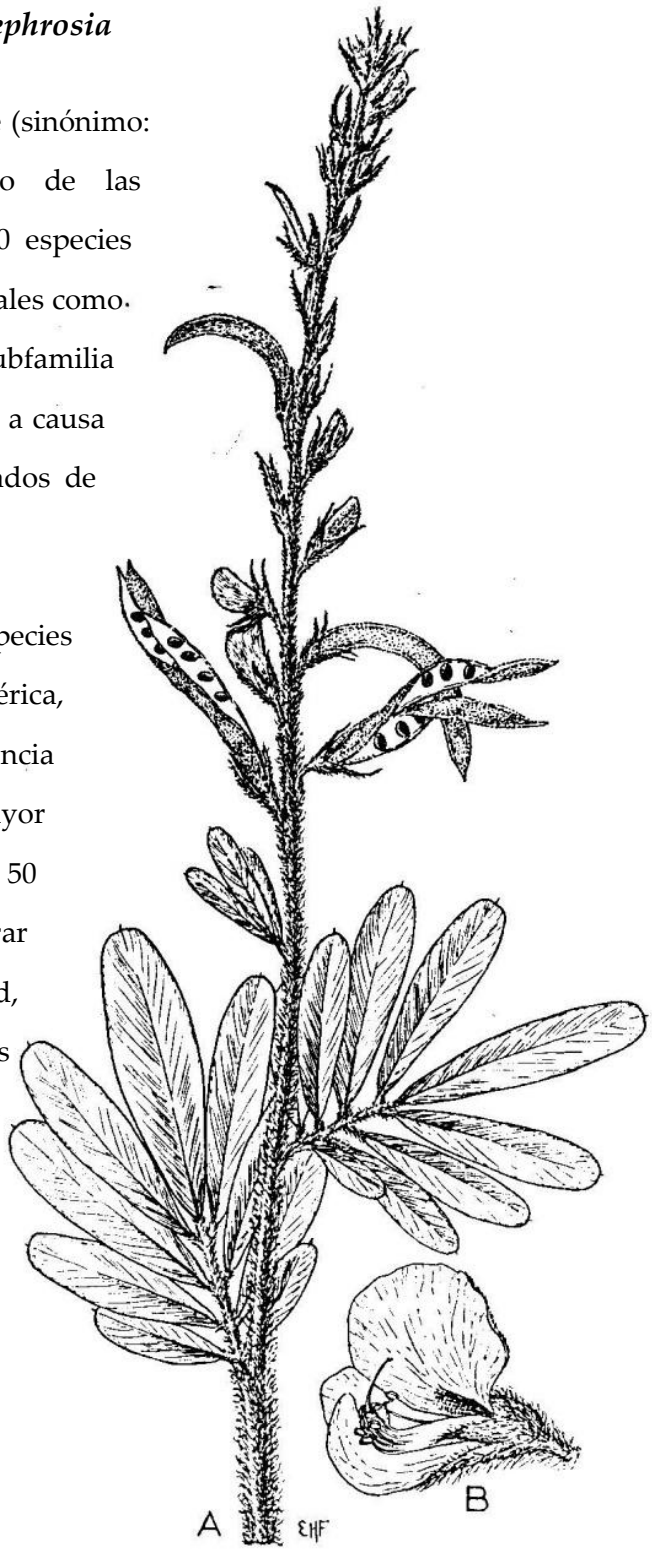


Figura 4. Dibujo de un ejemplar del género *Tephrosia*. *Tephrosia nitens* Seem. a. Hábito.-b. Flor (White, 1980).

2.4.2. Actividad biológica y metabolitos secundarios del género *Tephrosia*.

El género *Tephrosia* contiene un grupo de compuestos llamados rotenoides, también presentes en *Lonchocarpus* y *Derris*, motivo por el cual han sido usados en el control de plagas desde hace más de un siglo (Wink, 1993; Khambay y O'Connor, 1993; Khambay *et al.*, 1997). Los rotenoides tienen actividad insecticida y son tóxicos para otros animales por lo cual los "preparados" con raíces que los contienen son usados como piscicidas en Sudamérica. Del rotenoide característico, la isoflavanona rotenona, no se ha reportado formación de resistencia aun cuando fue un insecticida de uso mundial desde mediados del siglo XIX hasta antes de la utilización del DDT (Wink, 1993).

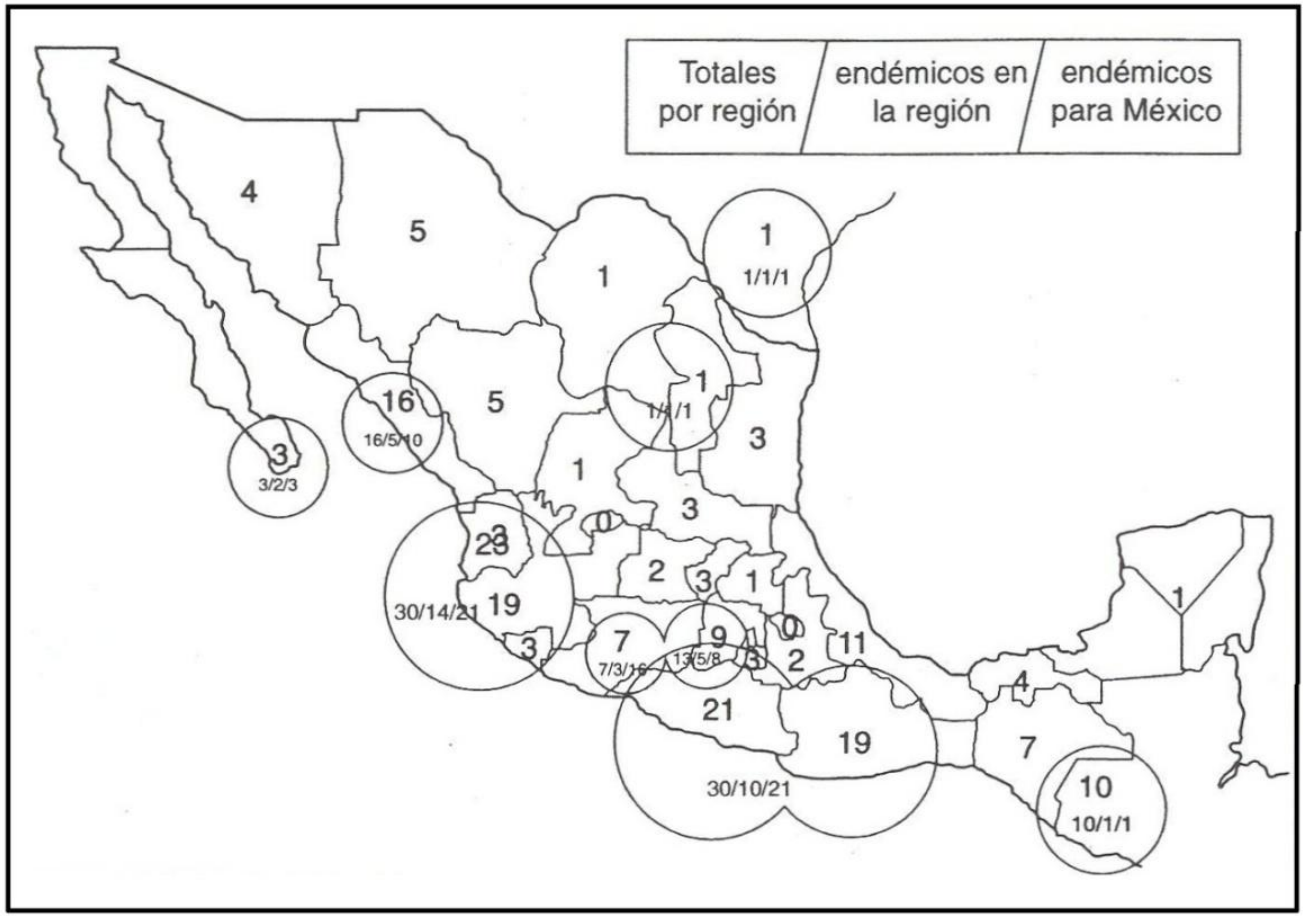


Figura 5. Mapa de distribución de las especies de *Tephrosia* en México. Los círculos indican áreas con mayor concentración de especies de *Tephrosia* en el país y/o especies con particular importancia (*e.g.* endemismo) (Gómez-Garibay *et al.*, 2001).

El uso de la rotenona fue retirado del mercado en la unión europea en 2007 (Schapira, 2010) y posteriormente la mayoría de sus usos domésticos fueron voluntariamente cancelados en los Estados Unidos, aunque continúa disponible como piscicida (U.S. EPA, 2007)

La rotenona es un potente inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, actúa sobre el complejo NADH reducido: ubiquinona óxidoreductasa (Complejo I) cuya inactivación resulta en la pérdida de la fosforilación oxidativa por lo cual los niveles de ATP caen y la célula muere (Lümmen, 1998). Otro efecto de esta inhibición es el estrés oxidativo, *i.e.* el incremento en especies reactivas de oxígeno y óxido de nitrógeno, producción de radicales libres y la consecuente peroxidación de lípidos en mitocondrias y organelos que finalmente lleva a la apoptosis (Simmonds *et al*., 1990; Ujváry, 2001).

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo se asocian, entre otros factores genéticos y ambientales, a la patogénesis del síndrome de Parkinson (Schapira, 2010, Tanner *et al*., 2011), por lo cual se han hecho estudios para evaluar la relacion entre la exposición a la rotenona y la aparición de síntomas y signos del la enfermedad. Por una parte se observó en ratones que la exposición aguda a la rotenona causó lesiones cerebrales similares a las presentes en el síndrome, situación que se aprovechó para obtener un modelo del de la dolencia con base en la administración del compuesto. Por otro lado, se observó una asociación entre la presencia de parkinsonismo en gente expuesta de forma crónica a la rotenona a causa de su actividad laboral (Greenamyre *et al*., 2010; Tanner *et al*., 2011).

Como se mencionó, varias especies de *Tephrosia* producen rotenona y otros flavonoides usados como piscicidas e insecticidas y con tales fines han sido cultivadas, su potencial plaguicida y mejorador de suelos es promovido como parte de programas de desarrollo en algunos países de África y Asia (Amede *et al*., 2006; Fagerström *et al*., 2002). Algunas especies se han empleado como febrífugas, purgantes, contra afecciones: nerviosas, cutáneas, renales, hepáticas y en el tratamiento de parasitosis dérmicas producidas por piojos, ácaros, pulgas y chinches (Gomez-Garibay, 2001).

Céspedes y colaboradores (2001) en México, evaluaron la influencia de flavonoides obtenidos de especies endémicas de *Tephrosia* sobre la fotofosforilación y la transferencia de electrones. El estudio se basa en informes previos acerca de la mencionada actividad desacoplante sobre los procesos de transporte de electrones que ocurren en cloroplasto y mitocondria. Efectuaron ensayos *in vitro* sobre cloroplastos de espinaca con sustancias aisladas principalmente de las raíces de plantas colectadas en Jalisco (*T. leiocarpa, T. major, T. tepicana, T. viridifolia),* Nayarit *(T. crassifolia)* y Oaxaca *(T. abottiae)*. Se evaluaron los biflavonoides: tepicanol y crasifolina, y los flavonoides: elongatina, tephrobotina, tephroleocarpina, glabranina y metilglabranina. Todos los compuestos mostraron, dependiendo de la concentración, algún grado de actividad inhibitoria del metabolismo energético de la planta en el nivel fotosintético.

En otro tipo de estudios, Muiva *et al.* (2009) evaluaron, con resultados positivos, la actividad antiplasmódica de la (S)-elatadihidrochalcona, obovatachalcona, obovatina, éter metílico de obovatina, deguelina, y el extracto crudo ($MeOH/CH_2Cl_2$, 1:1) de vainas de *T. elata*, una especie africana.

Ganapaty *et al.* (2008) utilizaron *T. pumila,* una especie colectada en India, aislando de sus raíces dos flavonoides conocidos, tephrinona y rotenona, un nuevo isoflavan-4-ol (pumilanol) así como lupeol y estigmasterol. El pumilanol mostró actividad antiprotozoica significativa en contra de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani* con una CI_{50} de 3.7, 3.5 y 12.2 μg/mL, respectivamente. El pumilanol mostró además una alta toxicidad (CI_{50} de 17.12 μg/mL) hacia mioblastos esqueléticos L-6 de rata.

En una investigación posterior con raíces de *T. calophylla*, también colectada en India, Ganapaty *et al.* (2009) obtuvieron un derivado de benzil, calofiona A, y tres derivados de cumestan, tephcalostan B, C y D. Los compuestos fueron evaluados en búsqueda de actividad citotóxica con células macrófagas de ratón (RAW) y células de cáncer de colon (HT-29) así como de actividad antiprotozoarios con *T. b rhodesiense, T. cruzi, L. donovani y*

Plasmodium falciparum. En las pruebas con RAW y HT-29, el compuesto calofiona A tuvo el doble de efecto en comparación con el control, hidrocloruro de amrubicina.

Con respecto a las pruebas biológicas, muchas especies del género *Tephrosia* han mostrado algún tipo de actividad en contra de diversas plagas (Cuadro 4). Otros ensayos han evaluado la actividad antialimentaria de los compuestos aislados: metilhidgartdol A, metilhildgartol B, 5-hidroxi-isoderricina (7-metil-glabranina), 7-O-metil-8-(3-metilbutadienil) flavanona y 5-metoxi-isolonchocarpina, los dos primeros flavanos y las restantes flavanonas, fueron aislados de *T. hildebrandtii* Vatke, *T villosa*, *T. purpurea* y *T. vogelii*. Todos mostraron actividad antialimentaria estadísticamente significativa en un ensayo de preferencia con discos de fibra de vidrio y larvas de *S. exempta* y *S. littoralis* (Simmonds *et al.* 1990).

Tres flavonoides: emoroidenona, emoroidona y emoroidocarpano se obtuvieron a partir de las raíces de *T. emoroides*, de origen africano. La prueba con discos de maíz y larvas de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) mostró una fuerte actividad antialimentaria de la flavanona emoroidenona (Machocho *et al*., 1995).

Extractos de la raíz de *T. hildebrandtii* permitieron aislar un pterocarpano, la hildecarpina, que exhibió actividad antialimentaria en un bioensayo con *Maruca testulalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Lwande *et al*., 1986). Lapointe *et al.* (2003) evaluaron el potencial antialimentario de *T. candida* DC para el gorgojo *Diaprepes abbreviatus* L (Coleoptera: Chrysomelidae) con resultados positivos estadísticamente significativos.

2.4.3. Metabolitos secundarios aislados de especies mexicanas del género *Tephrosia*.

Los estudios químicos de algunas especies mexicanas de *Tephrosia* han revelado la presencia de terpenos y diversos tipos de flavonoides, entre los que destacan: flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y chalconas (Cuadro 5) (Domínguez *et al*., 1983; Gómez Garibay *et al*., 1991; Gómez Garibay *et al*., 1997; Gómez Garibay *et al*., 1999; Calderón *et al*., 2001).

Cuadro 4. Especies de *Tephrosia* con actividad en contra de organismos plaga

Especie	Parte	Disolvente de extracción	Organismo plaga	Actividad
T. candida	Raíz, madera, semilla, hoja, vaina	alcohol	Áfidos, *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae), *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae), *Crocidolomia binotalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Epacromia tamulus* (Orthoptera: Acrididae), *Epilachna viginti-octopuntata*, *Euproctis fraterna* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), *Toxoptera aurantii* (Hemiptera: Aphididae)	Anti-insectos[2], insecticida
T. diffusa	Raíz	ND[1]	*Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae)	Insecticida
T. grandiflora	Raíz	ND	ND	Insecticida
T. heckmannia	Hoja	ND	*Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae), *Papaipema nebris* (Lepidoptera: Noctuidae)	Insecticida
T. latidens	Raíz	ND	*Musca domestica*	Insecticida
T. lindheimeri	Semilla	ND	*Musca domestica*	Insecticida
T. macropoda	Raíz, tallo	alcohol	Áfidos, *Aphis fabae*, *Cheimatobia brumata* (Lepidoptera: Geometridae), polillas, *Orgyia antiqua* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Pediculus humanus capitis*, *Selenia tetralunaria* (Lepidoptera: Geometridae)	Anti-insectos, insecticida
T. nyikensis	ND	ND	*Toxoptera aurantii*	Anti-insectos
T. purpurea	Hoja	Agua, éter	Orugas, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)	
T. repentina	ND	ND	ND	Insecticida
T. toxicaria	Raíz	Agua, alcohol, éter de petroleo	Áfidos, *Attagenus piceus* (Coleoptera: Dermestidae), *Cheimatobia brumata*, *Musca domestica*, *Oncopeltus fasciatus*, *Tineola bisselliella* (Lepidoptera: Tineidae), *Toxoptera aurantii*	Anti-insectos, insecticida, antialimentario

Cuadro 4 (*Continuación*). Especies de *Tephrosia* con actividad en contra de organismos plaga

Especie	Parte	Disolvente	Organismo plaga	Actividad
T. villosa	Hoja, semilla	Éter de petroleo	*Callosobruchus chilensis* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Coccus viridis*, *Crocidolomia binotalis*, *Dactynotus carthani (Hemiptera: Aphididae)*, *Dysdercus koenigii* (Hemiptera: Phyrrocoridae), *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae), *Spodoptera litura*	Anti-insectos, insecticida
T. virginiana	Raíz, hoja	Agua	*Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae), *Busseola fusca*(Lepidoptera: Noctuidae), *Ctenocephalus felis* (Siphonaptera: Pulicidae), *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Datana ministra* (Lepidoptera: Notodontidae), *Echidnophaga gallinaceae* (Siphonaptera: Pulicidae), *Epilachna varivestis*, moscas, *Goniocotes gigas* (Phthiraptera: Philopteridae), *Goniocotes hologaster*, *Holopsyllus affinis* (Siphonaptera: Pulicidae), *Hypoderma lineata* (Diptera: Oestridae), *Leptinotarsa decemlineata*, *Malacosoma americana* (Lepidoptera: Lasiocampidae), *Musca domestica*, *Myzus rosarum* (Hemiptera: Aphididae), *Phtirius pubis* (Phthiraptera: Pthiridae), *Pulex irritans* (Siphonaptera: Pulicidae), *Rhopalosiphum rufomaculata* (Hemiptera: Aphididae), *Tricodectus canis*	Anti-insectos, insecticida
T. vogelii	Hoja, semilla, vaina	Agua	*Aphis citri, Aphis fabae*, *Cheimatobia brumata*, *Crocidolomia binotalis*, *Epilachna varivestis*, *Henosepilachna sparsa* (Coleoptera: Coccinellidae), *Orgyia antiqua*, *Pediculus humanus capitis*, *Plutella xylostella*, ratas, *Selenia tetralunaria*, *thrips*, *Toxoptera aurantii*	Anti-insectos, insecticida, rodenticida
T. wallichii	ND	ND	ND	Insecticida

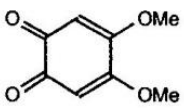
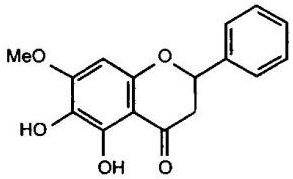
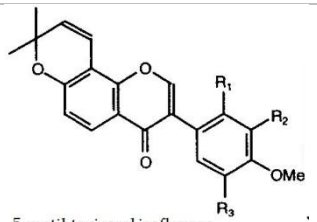
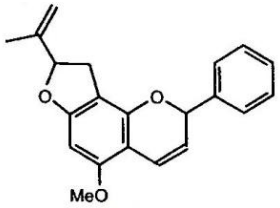
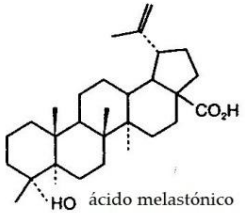
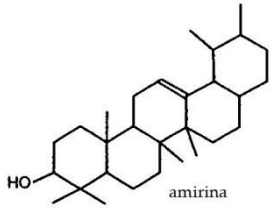
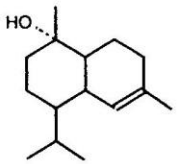
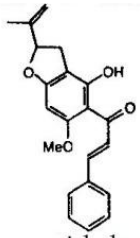
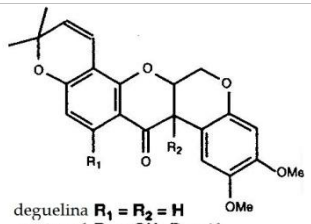
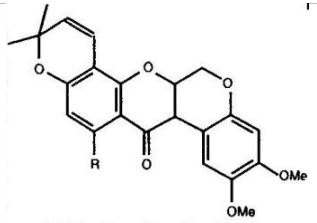
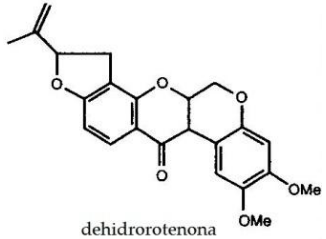
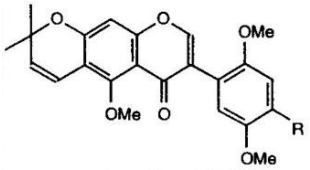
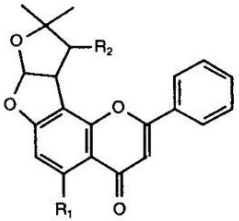
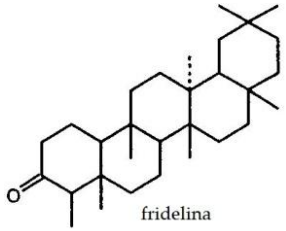
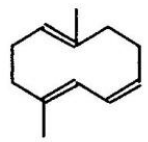
1. ND, Información no disponible. 2 Modo de acción no definido, a diferencia del "insecticida", que es letal. (Grainge y Ahmed, 1988)

2.5 Toxicidad de compuestos químicos

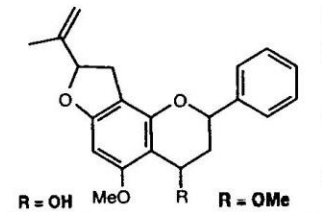
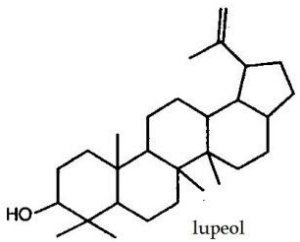
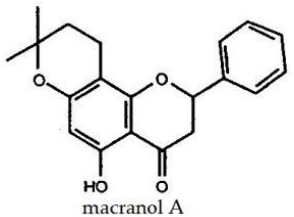
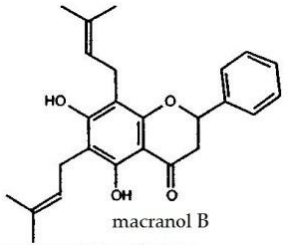
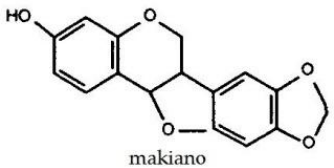
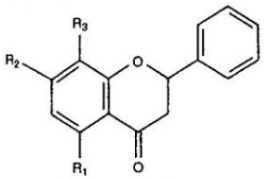
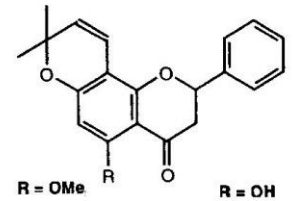
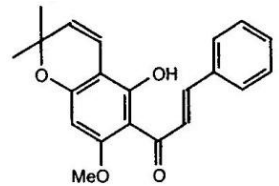
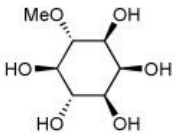
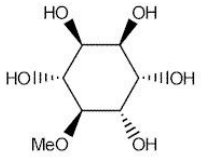
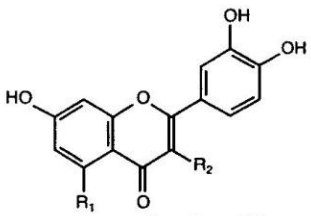
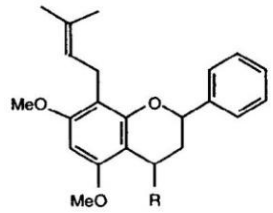
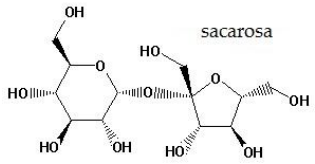
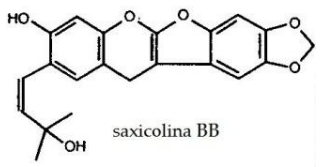
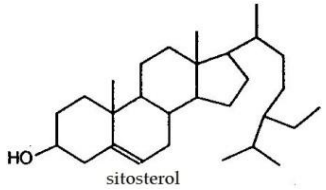
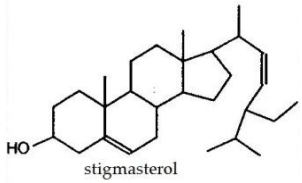
Dado que los sitios blanco de los plaguicidas pueden ser similares en insectos y mamíferos, es deseable la búsqueda de productos que sean selectivos y no tóxicos para los segundos. Se define la toxicidad como la acumulación de un daño, a lo largo de periodos cortos o largos de tiempo, que provoca que un organismo sea incapaz de funcionar dentro de los límites de su adaptación (Rozman *et al.*, 2001). De lo anterior puede inferirse que para cuantificar los riesgos asociados con el uso de plaguicidas es necesario conocer no solamente los compuestos activos, también la magnitud de la exposición y de esta manera establecer las dosis en las cuales se obtengan los efectos deseados sin producir daños colaterales y establecer un margen de seguridad de su uso. Las personas que trabajan aplicando y manipulando pesticidas rutinariamente tienen contacto dérmico o por inhalación, siendo los valores de las dosis son generalmente más elevados que los que arrojan otras vías de administración.

La toxicidad de los compuestos depende, entre otros factores, de las dosis empleadas. La medición de los efectos en los organismos involucra entonces la cantidad del agente en relación con el peso del organismo, así la susceptibilidad de distintas especies o individuos puede ser comparada con esta relación expresada en términos de miligramos del agente por kilogramo de peso corporal. La dosis efectiva 50 (ED_{50}) es un estimado estadístico de la dosis en la cual una sustancia produce un efecto específico en el 50% de una población bajo condiciones experimentales definidas. Éste parámetro es útil para determinar el límite inferior de concentración en la que no se produzca un efecto observable bajo las condiciones del ensayo. La dosis letal 50 (DL_{50}) es un tipo de ED_{50} en el que el efecto medido es la muerte.

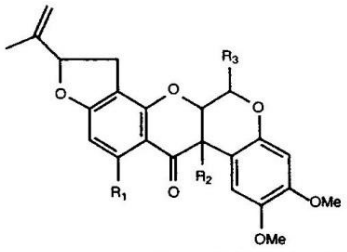
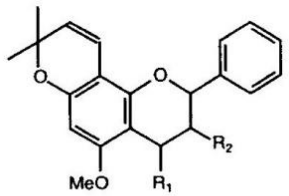
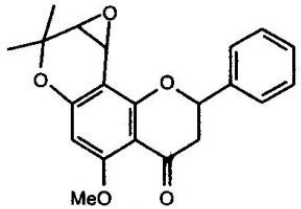
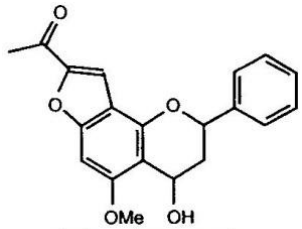
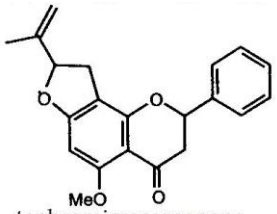
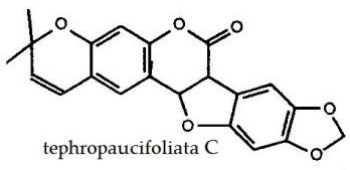
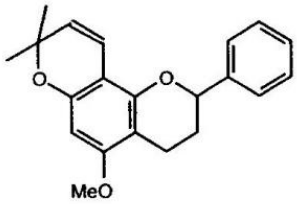
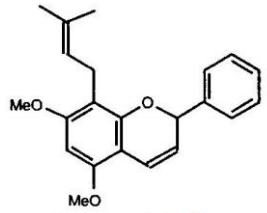
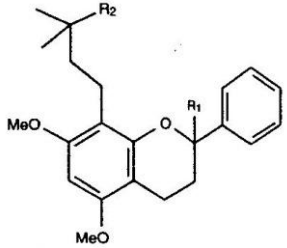
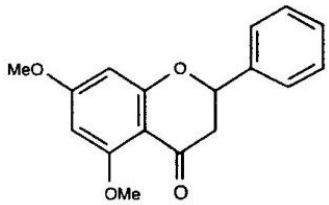
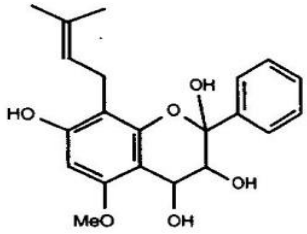
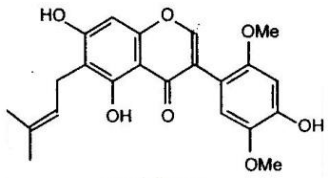
Cuadro 5. Estructuras de compuestos aislados de especies mexicanas del género *Tephrosia.*

 4,5-dimetoxi-1,2-benzoquinona	 5,6-dihidroxi-7-metoxi flavanona	 5-metil toxicarol isoflavona **$R_1 = R_3 = OMe$; $R_2 = H$** tephropaucifoliata B **$R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OMe$**	 5-metoxi-furfuraldehído
 abbotina	 ácido melastónico	 amirina	 cadinol
 crassichalcona	 deguelina **$R_1 = R_2 = H$** toxicarol **$R_1 = OH$; $R_2 = H$** tephrosina **$R_1 = H$; $R_2 = OH$**	 dehidrodeguelina **R = H** hidroxitoxicarol **R = OH**	 dehidrorotenona
 elongatina **R = OH** 4-metil elongatina **R = OMe**	 enantiomultijuguina **$R_1 = OMe$; $R_2 = OAc$** enantiomultijuguinol **$R_1 = OMe$; $R_2 = OH$**	 fridelina	 gueijereno

Cuadro 5 (*Continuación*). Estructuras de compuestos aislados de especies mexicanas del género *Tephrosia.*

 **R = OH** MeO R **R = OMe** hildgartol metil hildgartol	 lupeol	 macranol A	 macranol B
 makiano	 metil glabranina **21) R_1 = OH; R_2 = OMe; R_3 = $CH_2CH = C(Me)_2$** glabranina **22) $R_1 = R_2$ = OH; R_3 = $CH_2CH = C(Me)_2$** dimetilglabranina **23) $R_1 = R_2$ = OMe; R_3 = $CH_2CH = C(Me)_2$** **24) R_1 = OH; R_2 = OMe; R_3 = $CH_2CH_2C(Me)_2OH$** quercetol C **25) R_1 = H; R_2 = OMe; R_3 = $CH = CH - CH = C(CH_3)_2$** tephroleiocarpina A **26) R_1 = OH; R_2 = OMe; R_3 = $CH = CHC = CHMe$** tephroleiocarpina B **27) $R_1 = R_2$ = OMe; R_3 = $CH_2 - CH = C(CH_3)CH_2OH$** tephroleiocarpina C **28) $R_1 = R_2$ = OMe; R_3 = $CH = CH - C(CH_3)_2OH$**	 **R = OMe** **R = OH** metil obovatina obovatina	 oaxacacina
 onónitol	 pinitol	 quercetina **$R_1 = R_2$ = OH** metilquercetina **R_1 = OMe; R_2 = H**	 quercetol B R= OMe tephrowatsina A R= OH dimetilprenilflavano R= H
 sacarosa	 saxicolina BB	 sitosterol	 stigmasterol

Cuadro 5 (*Continuación*). Estructuras de compuestos aislados de especies mexicanas del género *Tephrosia.*

 sumatrol **R_1 = OH; R_2 = R_3 = H** rotenona **R_1 = R_2 = R_3 = H** villosina **R_1 = R_3 = OH; R_2 = H** villosinol **R_1 = R_2 = OH; R_3 = H** villol **R_1 = R_2 = R_3 = OH** 12-cis-hidroxirotenona **R_1 = R_3 = H; R_2 = OH** 6-hidroxirotenona **R_1 = R_2 = H; R_3 = OH**	 tephrobbottina R1=OH; R2=H metiltephrobbottina R1=OMe; R2=H quercetol A R1=R2=OH	 tephromexicanina	 tephromicrocarpanol
 tephromicrocarpanona	 tephropaucifoliata C	 tephropaucifoliata A	 tephrowatsina B
 tephrowatsina D **R_1 = OMe; R_2 = H** nitenina **R_1 = H; R_2 = OH**	 tephrowatsina E	 tepicanol	 viridiflorina

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la actividad biológica de los MS que los vegetales producen ayuda a comprender las relaciones ecológicas y taxonómicas. Además puede servir para el desarrollo de nuevos productos útiles para el hombre. Es el caso de aquellos MS que cumplen en las plantas aparentes funciones de defensa química contra herbívoros y patógenos, toman relevancia en la búsqueda de compuestos que se integren a una estrategia de control biológico.

En el estado de Oaxaca, una mezcla acuosa de hojas de *H. cimicidum* y raíces de *Tephrosia sp.* es conocida como garrapaticida para ganado. A pesar de este uso, poco se sabe acerca de la causa de la actividad biológica y los efectos que tiene en otros organismos: como pueden ser insectos e incluso mamíferos. Salvo la investigación de Simmonds *et al.* (1990) y la información de Grainge y Ahmed (1988) respecto a *T. vogelii*, no se han encontrado referencias acerca de estudios sobre la actividad en insectos para extractos o compuestos obtenidos de las especies de *Tephrosia* distribuidas en nuestro país, a pesar de los registros de la presencia de rotenoides y flavonoides relacionados en especies como *T. carrolli, T. cinerea, T multifolia, T. abbotiae, T. pringlei, T. nitens, T. watsoniana y T. sinapou*.

Es por ello que en este trabajo se planteó llevar a cabo una evaluación de los extractos orgánicos de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp.* con el fin de valorar su actividad biológica en dos organismos (*S. frugiperda* y *Mus musculus*) iniciando la búsqueda del modo de acción con miras a un posterior análisis fitoquímico biodirigido.Debido a que la cantidad de los extractos obtenidos es limitada se decidió emplear los extractos de mayor y menor polaridad así como la vía intraperitoneal en el ensayo con ratones.

4. HIPÓTESIS

Considerando acerca de los géneros: el tipo de compuestos reportados, los informes de actividad insecticida, así como el uso tradicional conocido, se espera que los extractos orgánicos presenten una actividad diferencial en los modelos utilizados. Siendo en general nocivos para insectos y tóxicos para los ratones

5. OBJETIVOS

General

Contribuir al conocimiento de la actividad biológica de los géneros *Haplophyton* y *Tephrosia*, utilizadas de manera tradicional en el control de plagas en Oaxaca.

Particulares

Determinar los principales grupos de MS presentes en los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de hojas y tallos de *H. cimicidum* y de raíz de *Tephrosia* sp.

Evaluar el efecto sobre el desarrollo larval en los parámetros de mortandad, talla, peso y tiempo de desarrollo de *S. frugiperda* posterior a la administración de dichos extractos en el alimento que consumen.

Determinar la DL_{50} producida por la administración vía intraperitoneal (i.p.) en ratón (*Mus musculus*), de los extractos hexánico y metanólico de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp*.

6. ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE H. cimicidum Y Tephrosia sp.

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Colecta y preparación del material vegetal

La colecta del material vegetal se realizó en el municipio de Etla, Oaxaca, en el año 2006, se obtuvieron diferentes partes de *Haplophyton cimicidum* (hoja y tallo) y de *Tephrosia sp.* (raíz). Dos ejemplares de cada especie fueron preparados como material de herbario para su posterior determinación taxonómica. El material fue trasladado al laboratorio, y secado en una cámara de ambiente controlado (30 ± 2ºC). Una vez secas, las diferentes partes de cada planta (hojas y tallos de *H. cimicidum* y raíces de *Tephrosia sp.*) se trituraron utilizando un molino (Retsch SM 2000).

6.1.2. Obtención de los extractos

La extracción en frío de 170 g de hojas y 400 g de tallos de *H. cimicidum* y 2000 g de raíces de *Tephrosia sp*, se efectuó empleando consecutivamente disolventes orgánicos de diferente polaridad: hexano, acetato de etilo y metanol, que fueron renovados cada 48 horas durante una semana cada uno (Figura 6). El disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor (Büchi R205). Obtenidos los extractos se calculó el porcentaje de rendimiento para cada uno (Cuadro 7).

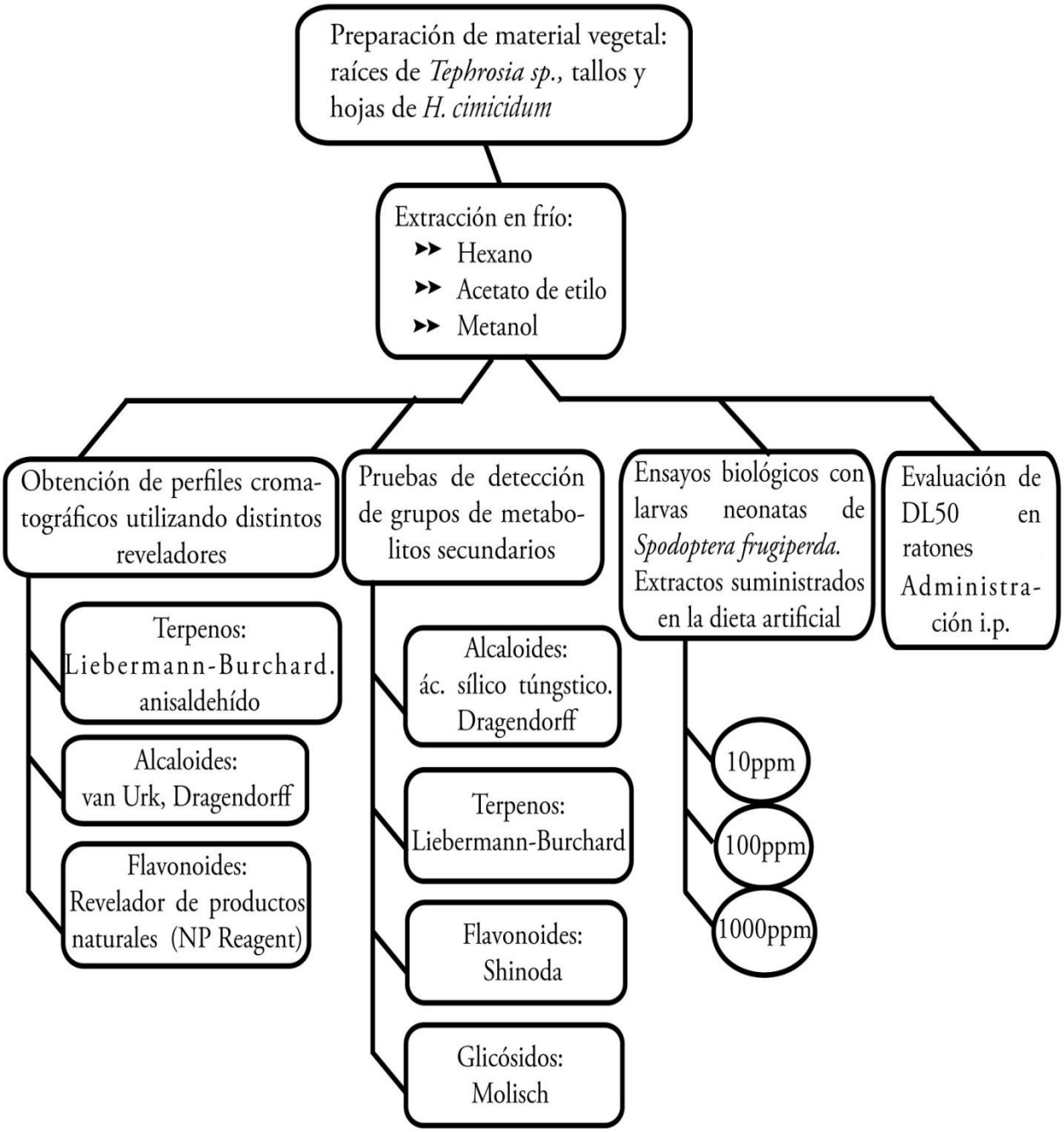


Figura 6. Diagrama general de trabajo

6.1.3. Detección de grupos de metabolitos secundarios.

El análisis preliminar de la composición química permitió conocer de manera cualitativa los grupos de metabolitos secundarios presentes en las especies estudiadas utilizando las técnicas descritas por Domínguez (1985). Las pruebas se efectuaron con soluciones de 5 mg/mL de los tres tipos de extractos (hexano, acetato de etilo y metanol) obtenidos de las dos especies. Se utilizaron: la prueba de Liebermann – Burchard, que detecta estructuras esteroidales que pueden ser del tipo terpénico, la prueba de Dragendorff y del ácido silicotúngstico para detectar alcaloides, la prueba de Shinoda para flavonoides y la de Molisch para glicósidos. (Anexo B). Los resultados se muestran en el cuadro 8.

6.1.4. Análisis por cromatografía en capa fina de los extractos

Los extractos de ambas especies se separaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y sus principales grupos de metabolitos secundarios presentes se evidenciaron usando reveladores.

Las placas de vidrio precubiertas de sílica gel con indicador de fluorescencia UV 254 nm (Macherey-Nagel, Art. No. 809 023) de 10 x 10 cm y 0.25 mm de espesor, fueron pre eluídas con metanol y activadas a 100 °C durante 60 min antes de su uso. Las soluciones de cada uno de los extractos se prepararon a una concentración de 5 mg/mL (usando el disolvente en el que fueron extraídos o algún otro que asegurara su total disolución). Mediante un aparato TLC4S (CAMAG) se aplicaron 10 μL (50 μg) de cada extracto en bandas de 5 mm espaciadas por 1 cm. El desarrollo de las placas se efectuó en una cámara (CAMAG) que se dejó saturar por los vapores de la fase móvil durante 30 min, la distancia de desarrollo del cromatograma fue de 9 cm. La placa se trasladó a una campana de extracción donde el disolvente se dejó evaporar por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se observó en un gabinete con una lámpara de luz UV a 365 y 254 nm. A continuación las placas fueron reveladas con diferentes reactivos específicos para grupos de metabolitos secundarios (Anexo A): Anisaldehído y

Liebermann - Burchard para terpenos, revelador de productos naturales (RPN) para flavonoides, Dragendorff y van Urk para alcaloides (Cuadro 6). Las placas fueron fotografiadas con una cámara digital (Canon A206) antes y después del revelado, se empleó el balance de blancos automático y un tiempo de exposición de 3 segundos para UV y 1/125 de segundo para VIS. Los resultados se muestran en las figuras 8 a 13.

Cuadro 6. Sistemas de elución y reveladores empleados para la cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos.

Especie	Extracto	Sistema de elución (v:v)	Revelador
H. cimicidum	Hexano	Hexano: acetato de etilo 8:2	Anisaldehído (fig 7) Liebermann (fig 7)
Hojas	Acetato de etilo	Hexano: acetato de etilo 6:4	Anisaldehído (fig 8) RPN
	Metanol	Acetato de etilo: metanol 3:7	RPN (fig 10)
	Hexano	Hexano: acetato de etilo 8:2	Anisaldehído (fig 7) Liebermann (fig 7)
Tallos	Acetato de etilo	Hexano: acetato de etilo 6:4	Anisaldehído (fig 8) RPN (fig 9) Dragendorff van Urk
	Metanol	Acetato de etilo: metanol 3:7	RPN (fig 10) Dragendorff van Urk
Tephrosia sp.	Hexano	Hexano: acetato de etilo 6:4	Anisaldehído (fig 11) Liebermann (fig 11)
	Acetato de etilo	Hexano: acetato de etilo 6:4	Anisaldehído (fig 12) RPN (fig 12)
	Metanol	Acetato de etilo	RPN (fig 13)

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Rendimiento de los extractos

Los rendimientos de las extracciones realizadas se muestran a continuación. El asterisco indica las extracciones con mayor porcentaje de rendimiento de acuerdo con el material vegetal del que se obtuvieron.

Cuadro 7. Rendimientos de los extractos de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp*.

Material vegetal (peso seco)	**Hexano**		**Acetato de etilo**		**Metanol**	
	Peso (g)	**(%)**	**Peso (g)**	**(%)**	**Peso (g)**	**(%)**
Hojas de *H. cimicidum* 170 g	11.19	6.58 *	4.39	2.58	14.4	8.47
Tallos de *H. cimicidum* 400 g	12.31	3.08	10.2	2.55	38.35	9.59 *
Raíces de *Tephrosia sp.* 2000 g	16.0	0.80	59.0	2.95 *	108.4	5.42

6.2.2. Detección cualitativa de grupos de metabolitos secundarios.

Las pruebas cromogénicas confirmaron la presencia de alcaloides e indicaron la de terpenos en *H. cimicidum*, siendo más notable la intensidad de la reacción en el extracto metanólico, seguido de los de acetato de etilo y hexano. El resultado de la prueba para glicósidos en el extracto hexánico de *H. cimicidum* es probablemente un falso positivo. Con respecto a *Tephrosia*, las reacciones positivas más intensas resultaron para flavonoides y glicósidos en el extracto metanólico (Cuadro 8).

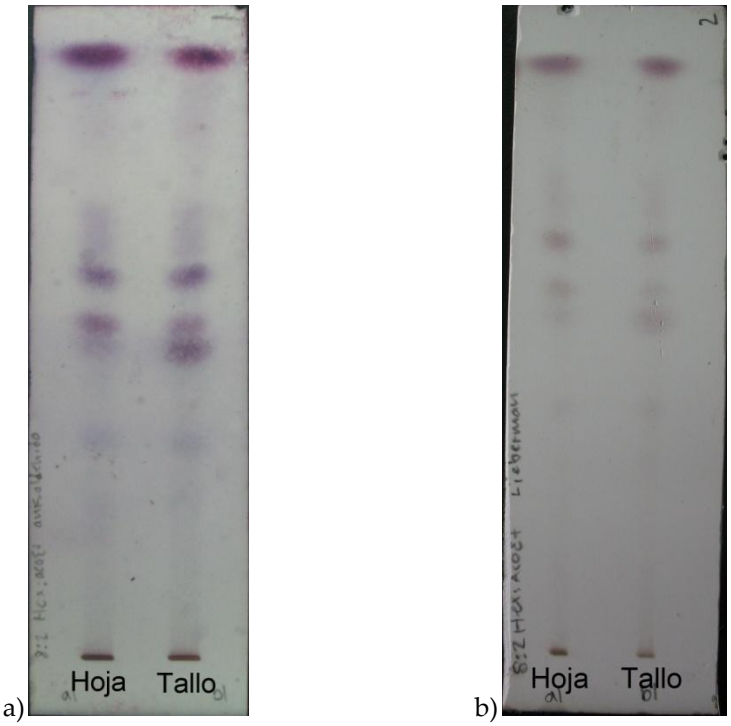
Cuadro 8. Pruebas de detección de grupos de MS realizadas con los extractos de hoja y tallo de *H. cimicidum* y raíz de *Tephrosia* sp.

Especie	Extracto	Prueba				
		Terpenos (Liebermann -Burchard	Alcaloides (Dragendorff)	Alcaloides (ác. silicotúngstico)	Flavonoides (Shinoda)	Glicósidos (Molisch)
H. cimicidum (Hoja)	Hexano					++
H. cimicidum (Tallo)	Hexano	++			+	
Tephrosia sp. (Raíz)	Hexano	+				
H. cimicidum (Hoja)	Acetato de etilo		+	+		
H. cimicidum (Tallo)	Acetato de etilo	++	+	+	++	
Tephrosia sp. (Raíz)	Acetato de etilo				+	
H. cimicidum (Hoja)	Metanol	+++	+++	+++	+	
H. cimicidum (Tallo)	Metanol		+	++		+
Tephrosia sp. (Raíz)	Metanol		++	++	+++	+++

+ indican la intensidad de la coloración en la prueba: + baja, ++ media, +++ alta. La ausencia de símbolo implica resultado negativo.

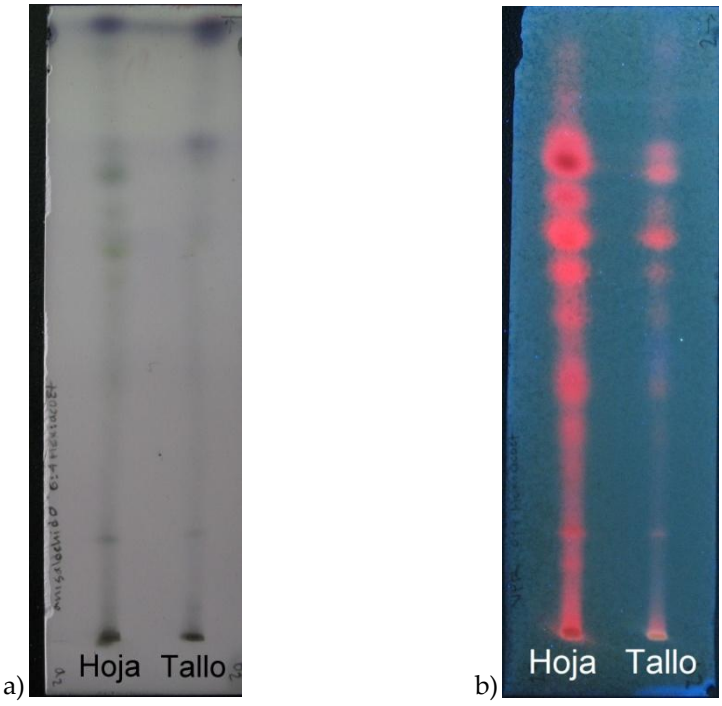
6.2.3. CCF de extractos de *H. cimicidum*

Los cromatogramas hicieron evidente la presencia de terpenoides en los extractos de hexano y acetato de etilo tanto de tallo como de hoja. Los perfiles cromatográficos de extractos de acetato de etilo mostraron diferencias, el de hoja presenta un mayor número de manchas con una mayor intensidad en comparación con el de tallo. La aplicación de reveladores específicos para alcaloides dio resultados positivos en los extractos de hoja y tallo de acetato de etilo, siendo mayor la intensidad de la mancha en el de hoja. El resultado apoya la composición química de *Haplophyton* descrita en la literatura, que menciona alcaloides y triterpenos (Rogers *et al.,* 1952; Snyder *et al.,* 1954a; Snyder *et al.,* 1954b; Cava *et al.* 1963a; Cava *et al.* 1963b; Cava *et al.* 1967).



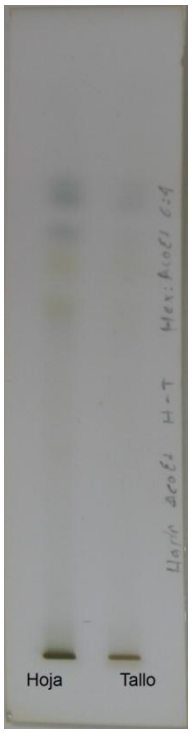
a) b)

Figura 7. CCF del extracto hexánico de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 8:2. a: revelador de anisaldehído (vis). b: revelador de Liebermann (vis).



a) b)

Figura 8. CCF del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 6:4. a: Revelador de anisaldehído (vis). b: RPN (254 nm).

a) 

b)

Figura 9. CCF del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Sistema de elución: hexano:acetato de etilo 6:4. a: Reactivo de van Urk (vis). b: Reactivo de Dragendorff (vis).

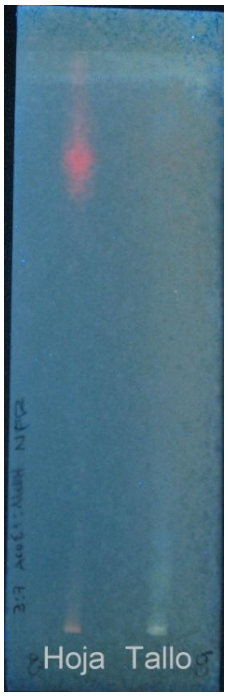


Figura 10. CCF del extracto metanólico de hojas y tallos de *H. cimicidum*. Eluyente: acetato de etilo:metanol 3:7. RPN (254 nm).

Los perfiles cromatográficos y las pruebas cromogénicas de *H. cimicidum* revelaron la presencia de alcaloides. La producción de alcaloides indólicos es característica de la familia *Apocynaceae*, muchos de ellos actúan sobre los sistemas neurotransmisores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos. Destacan en la familia los grupos estructurales del tipo eburnamina-vincamina, aspidospermina y ajmalina-sarpagina (Cordell, 1979; Saxton, 1998; Pereira *et al.*, 2007, Loizzo *et al.*, 2008).

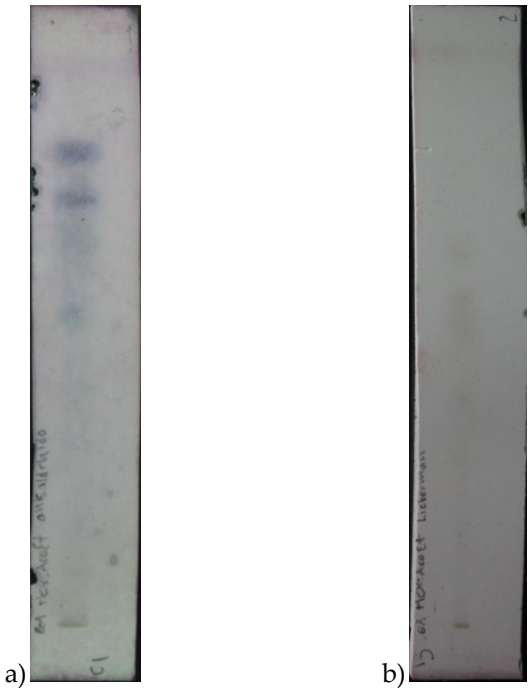
Los alcaloides del tipo eburnamina-vincamina tienen efectos sobre el sistema circulatorio, antitumorales, y neuroprotectores entre otros, debido a lo cual se han sintetizado derivados con el fin de caracterizar mejor los mecanismos responsables de su actividad y obtener compuestos mas seguros al administrarse (Vas y Gulyás, 2005). Dentro del tipo aspidospermina, las actividades son antiplasmódica y de bloqueo de la actividad adrenérgica (Saxton, 1998), finalmente en los alcaloides del tipo ajmalina-sarpagina algunas actividades biológicas registradas son de dilatación de la coronaria y antiarrítmicas (Seigler, 1998). Muchos alcaloides indólicos han mostrado actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa (AChE) (Houghton *et al.,* 2006; Mukherjee *et al.,* 2007) la cual se ha demostrado también en el género *Haplophyton*, con la especie *H. crooksii* (Mroue y Alam, 1991; Mroue *et al.*, 1993; Mroue *et al.,* 1996).

6.2.4. CCF de extractos de *Tephrosia sp.*

Las placas cromatográficas de los extractos hexánicos y de acetato de etilo evidenciaron la presencia de terpenoides, observándose mayor número de manchas e intensidad en el extracto de acetato de etilo (Figuras 11 y 12).

El resultado de la CCF de *Tephrosia sp.* puso de manifiesto la presencia de flavonoides en los extractos de acetato de etilo y metanol, los perfiles exhiben diferencias en cuanto a número de manchas y coloración, siendo mayores en el extracto de acetato de etilo (Figuras 12 y 13). Los colores observados indicaron presencia de flavonoles y flavonas. Es importante

considerar la detección previa de glicósidos, lo que sugiere un estudio posterior donde se efectúe una hidrólisis de los extractos con el fin de obtener las agliconas y facilitar la identificación de los compuestos.



a) b)

Figura 11. CCF de extracto hexánico de raíz de *Tephrosia sp.* se utilizó hexano:acetato de etilo 6:4 como eluyente. a: revelada con anisaldehído (vis). b: revelada con reactivo de Liebermann (vis)

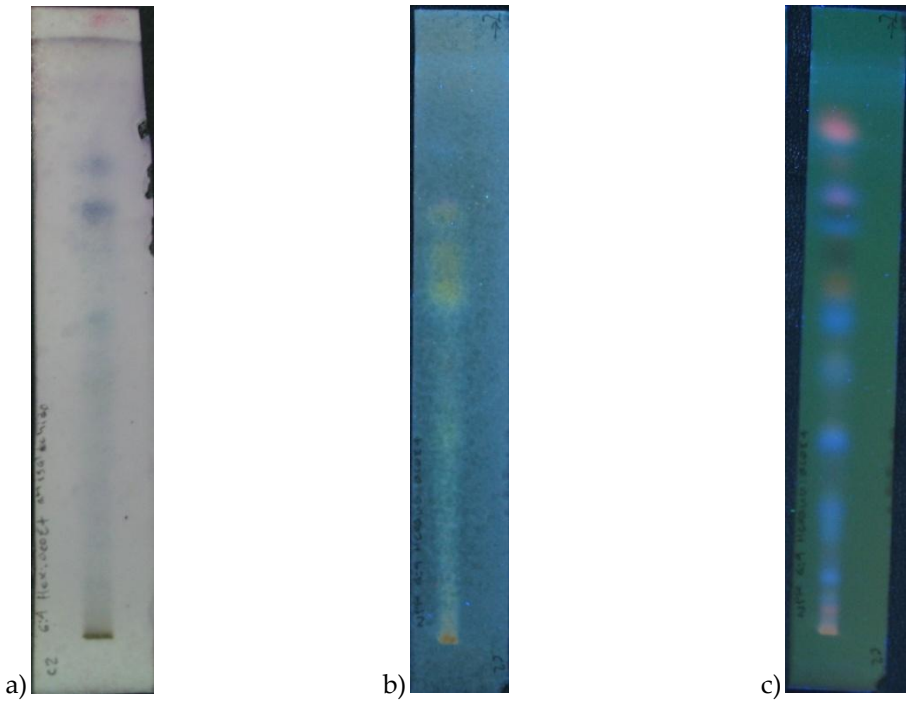


Figura 12. CCF del extracto de acetato de etilo de raíz de *Tephrosia sp.* Se utilizó hexano:acetato de etilo 6:4 como eluyente. a: revelada con anisaldehido (vis), b: revelada con RPN (UV 254 nm) c: sin revelar (UV 254 nm).

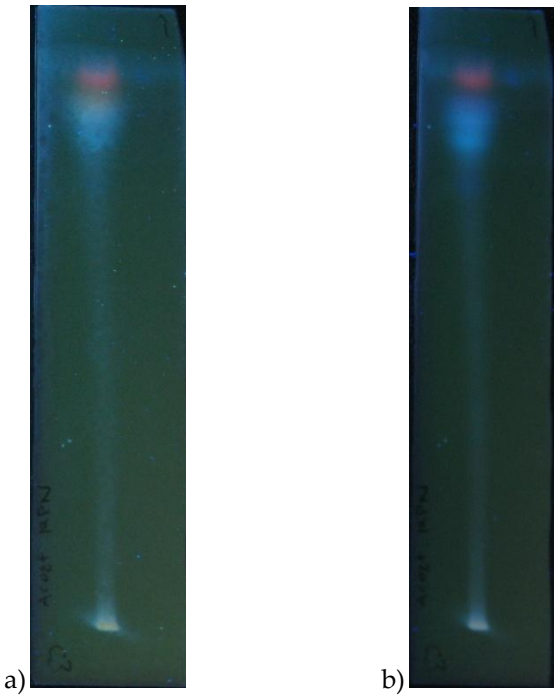


Figura 13. CCF del extracto metanólico de raíz de *Tephrosia sp.* Se utilizó acetato de etilo como eluyente. a: revelada con RPN (UV 254 nm) b: sin revelador (UV 254 nm).

El cambio de coloración de las manchas al aplicar el RPN y observar en UV-365 nm proporciona información sobre la estructura de los compuestos. Los flavonoles quercetina, miricetina y sus glicósidos fluorescen en amarillo-naranja, el kaempferol, isorhamnetina y sus glicósidos en amarillo-verde; las flavonas luteolina y sus glicósidos en naranja, la apigenina y sus glucósidos en amarillo-verde. Las manchas con fluorescencia azulada pueden deberse a ácidos carboxílicos fenólicos (*e.g.* ácido caféico, ácido clorogénico) y cumarinas (*e.g.* escopoletina) (Liu *et al.*, 1989; Wagner y Bladt, 1996).

Cuadro 9. Interpretación de las coloraciones típicas de flavonoides en CCF sin derivatizar y derivatizadas.

Color de la mancha		
Luz UV[a]	RPN	Posible tipo estructural
Púrpura oscuro	Amarillo	a) Flavonas (5-OH y 4'OH)
	Amarillo	b) Flavonoles (5-OH y '-OH)
	Naranja	c) Flavonas (5-OH y 3'4'-OH)
	Naranja	d) Flavonoles (5-OH y 3'4'-OH, 3-OH sustituído)
Púrpura oscuro	Púrpura - café	a) Flavanonas (5-OH, 4'-OH ausente o sustituido)
	Púrpura - café	b) Flavonoles (5-OH , 4'-OH ausente o sustituido, 3-OH sustituido)
	Púrpura	c) Flavonoles (5-OH y 4'-OH y 6-OH)
Amarillo pálido	Amarillo	a) Flavonoles (3-OH libre, con o sin un 5-OH libre)
Naranja	Naranja	a) Flavonoles (3-OH libre, 3', 4'-OH)
Azul pálido fluorescente	Amarillo verdoso	a) Flavonas (carentes de un 5-OH libre)
	Amarillo	b) Flavonoles (carentes de un 5-OH libre,3-OH sustituído)
	Naranja	c) Flavonoles (carentes de un 5-OH libre, 3', 4'-OH)

[a] λ=366 nm (Liu *et al.*, 1989)

La CCF mostró la presencia de flavonoides en los extractos de *Tephrosia*, la mayor cantidad de manchas se obtuvo con el extracto de acetato de etilo. El resultado concuerda con los obtenidos en otras especies del mismo género como *T. purpurea* (Gokhale y Saraf 2000), *T.*

pumila (Ganapaty *et al*., 2008) y *T. vogelii* (Dzenda *et al*., 2008). El contenido de MS reflejado en la CCF en el número y color de las manchas podría variar dependiendo, entre otros factores, del lugar, época, hora de colecta y tipo de extracción de las muestras vegetales (Salmore y Hunter, 2001; Lu *et al*., 2009; Douglas *et al*., 2010).

Algunos flavonoides con actividades insecticida y antialimentaria se conocen, así como las características moleculares necesarias para expresar dicha actividad (Ohmura *et al*., 2000; Morimoto *et al*., 2000; Duchowicz *et al*., 2009; Romanelli *et al*., 2010) pero respecto al mecanismo de acción en los insectos solamente se conoce el efecto inhibitoriode los rotenoides sobre el complejo I mitocondrial (Yamamoto, 1970), pues la mayoría de trabajos (e.g. Wang *et al*., 2005; Codorniu-Hernández *et al*., 2007) se enfocan en sitios de interacción de importancia mas bien médica, utilizando otros organismos modelo.

Por otra parte, algunos flavonoides tienen la capacidad de inhibir la AChE (Houghton *et al*., 2006; Loizzo *et al*., 2008; Khan *et al*., 2009), dicho efecto, junto a otros tales como neuroprotección, inhibición de la formación de fibrillas Aβ, reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno inducidas por H_2O_2, coloca a los flavonoides dentro de las moléculas de interés en la investigación de terapias y mecanismos de acción relacionados con la enfermedad de Alzheimer (Sheng *et al*., 2009).

Dado que en los extractos se detectó la presencia de flavonoides, así como a los informes sobre el tipo encontrado en el género, se propone debido a su relativa sencillez y bajo costo, utilizar la técnica de la CCF (Delfel, 1965; Delfel, 1966; Delfel y Tallent, 1969) para identificar y cuantificar la presencia de rotenoides en las muestras.

7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE H cimicidum **y** *Tephrosia sp. SOBRE EL DESARROLLO DEL GUSANO COGOLLERO, Spodoptera frugiperda*

7.1. Material y método

7.1.1. Insectos utilizados

En los ensayos se utilizaron larvas neonatas de *S. frugiperda* proporcionadas por el Laboratorio de Control biológico perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología, de Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

7.1.2. Ensayo biológico

En cada concentración y control se utilizaron 30 organismos. Cada ensayo tuvo tres réplicas no simultáneas. La dieta se preparó de acuerdo a lo indicado en el anexo C (Mihm, 1989). Las concentraciones de los extractos evaluados fueron 10, 100 y 1000 ppm. A 60 g de dieta preparada se agregaron 35 ◎L de las disoluciones con la concentración indicada de cada extracto, o del vehículo en el caso del control. El disolvente se dejó evaporar durante 24 horas, terminado ese lapso, se colocaron porciones de 4 g de la dieta tratada en vasos de poliestireno (Envases Cuevas®, Vaso No.0), en los cuales se introdujo posteriormente una larva de *S. frugiperda* en su primer estadio. Los vasos se cerraron con tapas perforadas, que permitieron el paso del aire pero no de larvas, y se colocaron aleatoriamente en charolas dentro de una cámara de crecimiento (LabLine, Biotronette Plant Grow Chamber) a 25 °C ±, 65% de humedad relativa y un fotoperiodo 16/8 h de luz/oscuridad.

El peso, talla, muerte y etapa de desarrollo de los individuos se registró semanalmente. El ensayo fue finalizado cuando más del 95% de los insectos del grupo control llegaron a la etapa de adulto. Los datos de días en etapa larval se compararon mediante análisis de

varianza (ANDEVA) y prueba *post hoc* de Dunnett para lo cual se utilizó el programa SigmaStat 3.5 (2006, Systat Software Inc.).

7.5. Resultados: Efecto de extractos en el desarrollo larval

7.5.1. Extractos hexánicos

Mortandad. En ambas especies, la concentración de 1000 ppm tuvo el mayor porcentaje de mortandad semanal, mientras que las concentraciones de 10 y 100 tuvieron un efecto menor y similares entre sí. Particularmente, el extracto de hoja de *H. cimicidum* fue el más activo, seguido del de raíz de *Tephrosia*, con porcentajes mayores en 100 y 1000 ppm (Fig. 14).

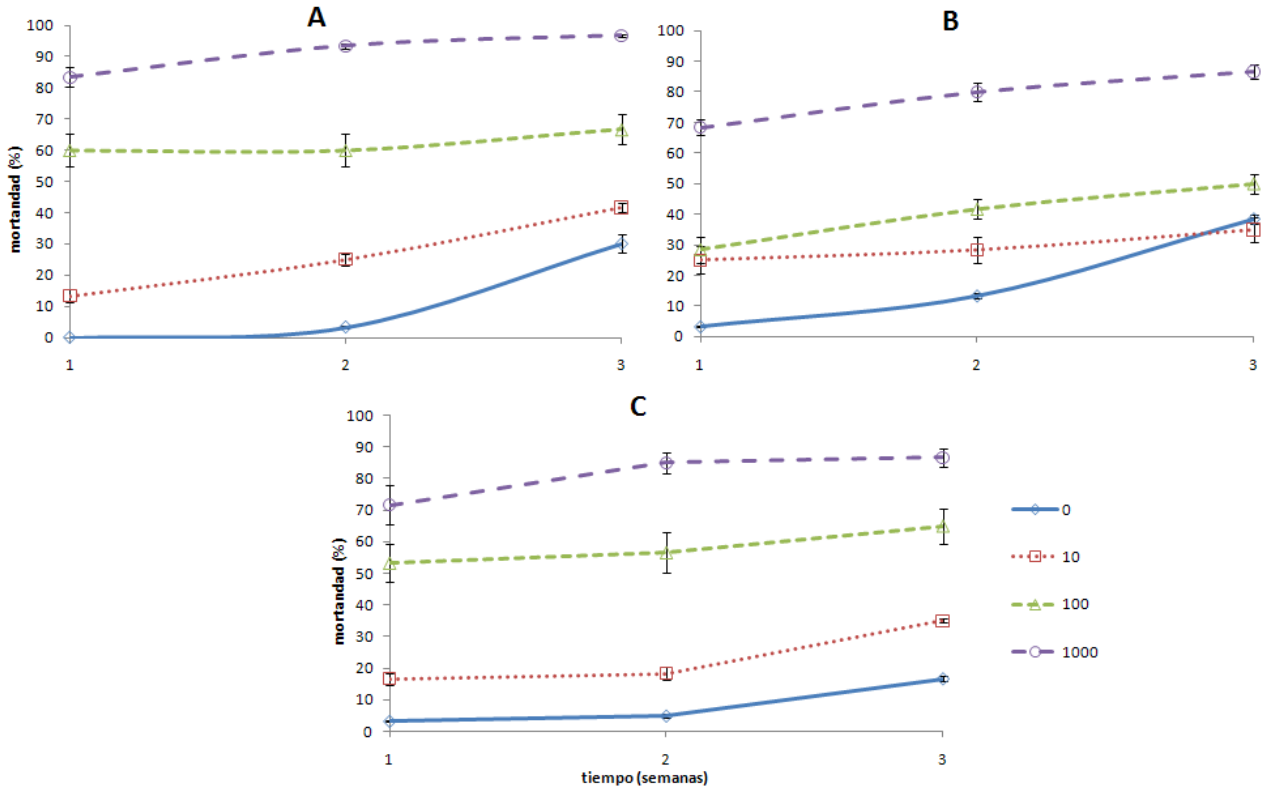


Figura 14. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos hexánicos: A, hojas de *Haplophyton c.*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican EEM.

Duración del desarrollo. El tratamiento con extractos de hojas presentó periodos de desarrollo más cortos que el grupo control, en cambio los de tallo y raíz fueron más largos.

Únicamente el tratamiento con extracto de *Tephrosia* a 1000 ppm presentó larvas que completaran su ciclo y su tiempo fue menor al del control (Cuadro 10).

Viabilidad de los organismos. La viabilidad fue menor a la del grupo control en todos los tratamientos excepto el de 10 ppm de raíz (Cuadro 10).

Cuadro 10. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos hexánicos: A, hojas de *H. cimicidum*.; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.

Concentración (ppm)	Duración de la etapa (días)		Viabilidad (%)	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa
A				
0	18.3 ± 0.2	10.0 ± 0.1	53 ± 2.6	54 ± 4.5
10	24.1 ± 0.8*	3.0 ± 0.7	17 ± 0.9	20 ± 4.5
100	18.5 ± 0.4*	5.9 ± 0.7	33 ± 4.9	38 ± 4.7
1000	0 [a]	0 [a]	0	0
B				
0	22.0 ± 0.49	13.3 ± 0.14	28 ± 2.3	63 ± 5.0
10	22.8 ± 0.82	7.7 ± 0.92	27 ± 3.3	29 ± 4.1
100	24.8 ± 0.82*	4.7 ± 1.04	15 ± 1.9	0
1000	0 [a]	0 [a]	0	0
C				
0	18.4 ± 0.34	11.1 ± 0.27	65 ± 4	27 ± 3
10	22.5 ± 0.65	9.1 ± 1.02	28 ± 1	34 ± 4
100	24.5 ± 0.72*	5.0 ± 1.12	10 ± 2	6 ± 1
1000	22.3 ± 2.54*	0 [a]	3 ± 0	0

Se presenta el valor de la media ± E.S. (N=3). [a] Dato no utilizado en la prueba estadística.* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a su grupo control, $p < 0.05$

Peso. Los resultados del tratamiento con extracto de hojas de *H. cimicidum* son menores al control, la concentración de 1000 ppm presentó un marcado efecto de disminución en la tercera semana. El extracto de tallos de *H. cimicidum* produjo valores cercanos a los del control en la primera semana, pero en la segunda los tratamientos con 100 y 1000 ppm estuvieron debajo del control.

Los organismos tratados con extracto de raíz de *Tephrosia* a 1000 ppm tuvieron el menor incremento en peso (Fig. 15).

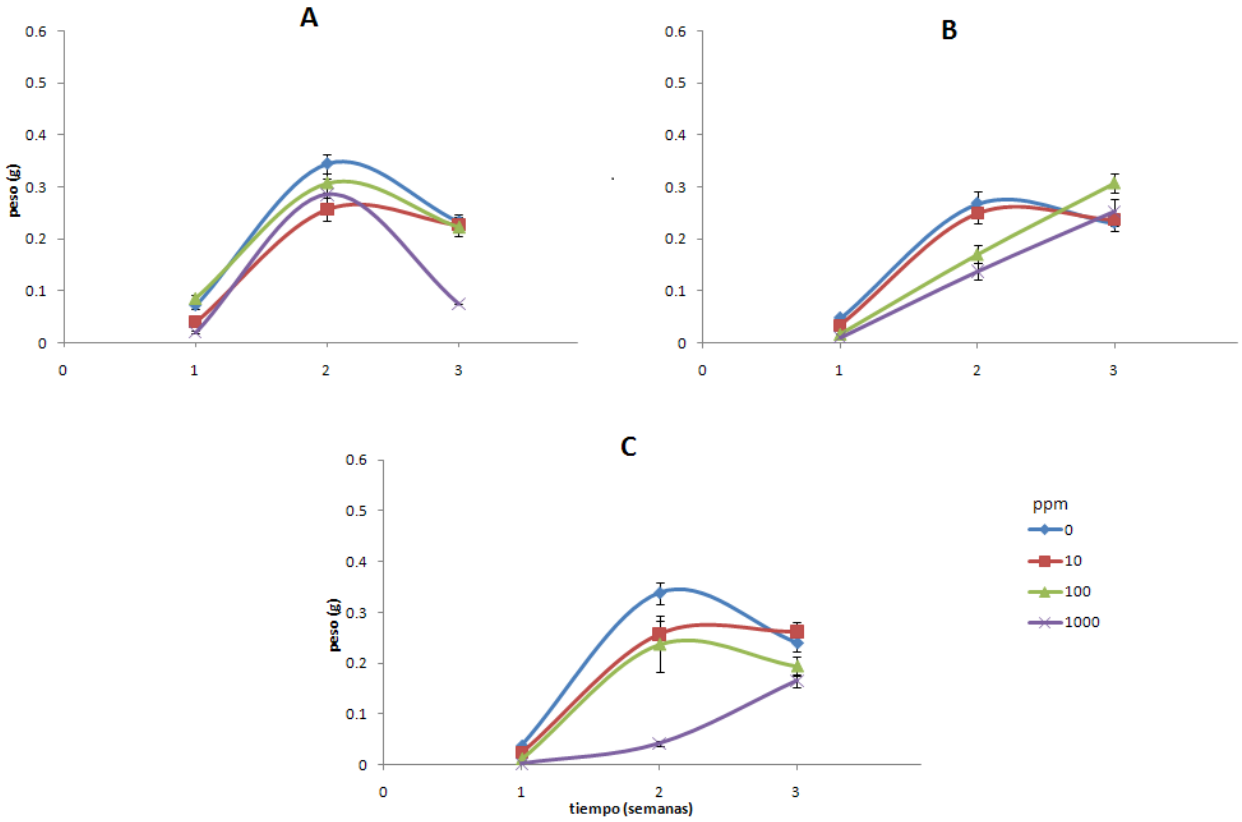


Figura 15. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas para tratamientos con extractos héxanicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

Talla. Los tratamientos con 1000 ppm tuvieron valores bajos de éste parámetro en ambas especies. La menor talla se registró con el extracto de hoja (Fig. 16).

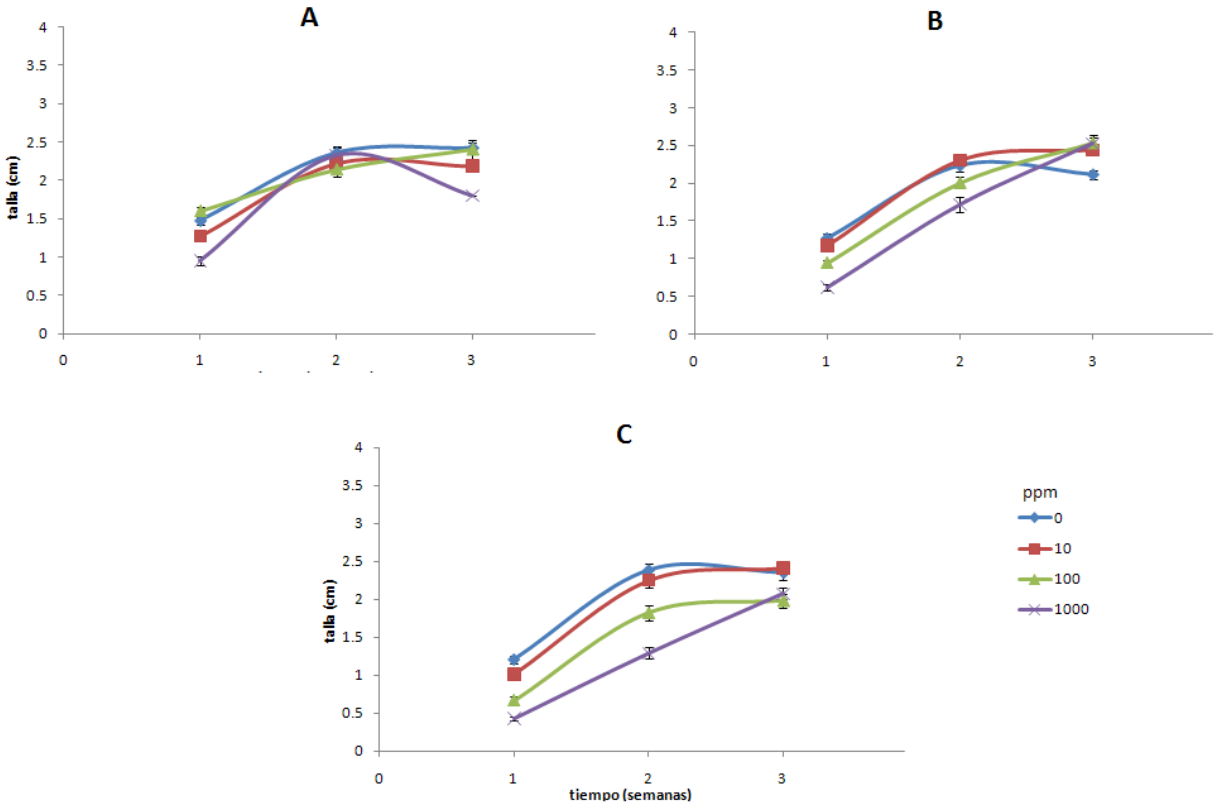


Figura 16. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos héxanicos: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

7.5.2. Extractos de acetato de etilo

Mortandad. A partir de la primera semana se observó mortandad entre los organismos tratados con extractos de hojas de *H. cimicidum* a 10 ppm (menor a 10%) y 1000 ppm (superior a 50%). En el tratamiento con 1000 ppm del extracto de tallos se observó una mortandad inicial, superior a 80% que aumenta poco durante las siguientes lecturas sin llegar a ser 100%. En cuanto a los extractos de raíz de *Tephrosia sp.*, la mortandad fue menor; los tratamientos de 10 ppm y 1000 ppm alcanzaron más del 25% hasta la tercera semana y el tratamiento intermedio (100 ppm) tuvo menos de 9% (Fig. 17).

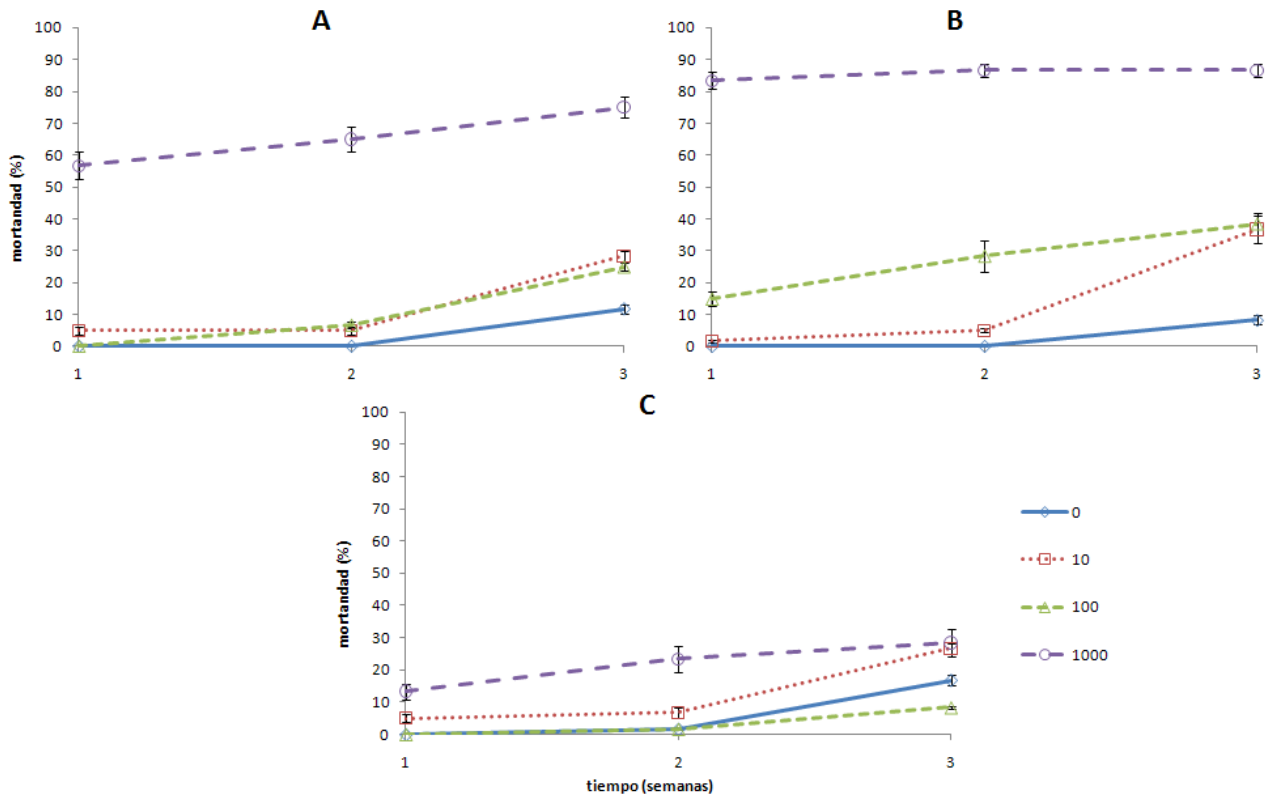


Figura 17. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas en los tratamientos con extractos de acetato de etilo. A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican EEM.

Duración del desarrollo. El tiempo en estado de larva de *S. frugiperda* se prolongó con el extracto de hoja y raíz, siendo mayor en el último a 1000 ppm. Los organismos bajo ese mismo tratamiento tuvieron el menor tiempo en estado de pupa, que fue menor a la mitad del que tuvo el control (Cuadro 11).

Viabilidad de los organismos. (Cuadro 11).

La concentración de 1000 no muestra resultados debido a la muerte de los organismos, exceptuando los tratamientos con raíces de Tephrosia, que tienen además el periodo más largo en estado larval.

Cuadro 11. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.

Concentración (ppm)	Duración de la etapa (días)		Viabilidad (%)	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa
A				
0	19.9 ± 0.2	11.6 ± 0.1	62 ± 0.9	62 ± 2.3
10	22.4 ± 0.8*	11.5 ± 0.2	53 ± 2.7	44 ± 2.3
100	22.3 ± 0.4*	8.9 ± 0.9	43 ± 4.4	32 ± 3.7
1000	0 [a]	0 [a]	0	0
B				
0	22.6 ± 0.52	11.4 ± 0.13	50.0 ± 2.33	50 ± 1.5
10	21.6 ± 0.34	12.1 ± 0.13	53.3 ± 2.61	45 ± 2.5
100	21.1 ± 0.18*	13.6 ± 0.12	48.3 ± 3.73	56 ± 4.9
1000	0 [a]	0 [a]	0	0
C				
0	19.3 ± 0.13	10.9 ± 0.25	76.7 ± 1.62	78 ± 3.5
10	20.5 ± 0.37*	11.9 ± 0.22	61.7 ± 2.91	37 ± 4.6
100	22.1 ± 0.32*	11.9 ± 0.22	68.3 ± 3.73	33 ± 0.9
1000	25.3 ± 0.19*	4.3 ± 0.97	56.7 ± 5.22	8.0 ± 1.9

Se presenta el valor de la media ± E.S. (N=3). [a] Valor no utilizado en la prueba estadística.* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a su grupo control, $p < 0.05$

Peso. Durante la primera lectura el peso de los insectos bajo los tratamientos mostró valores cercanos entre sí, sin embargo en la segunda aparecieron diferencias y todos los tratamientos de 1000 ppm provocaron valores bajos en las larvas (Fig. 18). El mínimo valor lo tuvo el extracto de hojas de *H. cimicidum* Con el extracto de raíz de *Tephrosia,* en las dos primeras semanas se observó una relación entre el peso y la dosis administrada en la cual el primero es menor en función del aumento de la concentración. En la tercera semana el valor del control disminuyó por debajo de los tratamientos debido a que los organismos entraron en la etapa de prepupa, caracterizada por una reducción de peso y talla, lo cual indicaría un desarrollo más rápido en comparación con los tratamientos que contienen extracto, tal hecho se refleja en el cuadro de duración del desarrollo (Cuadro 11).

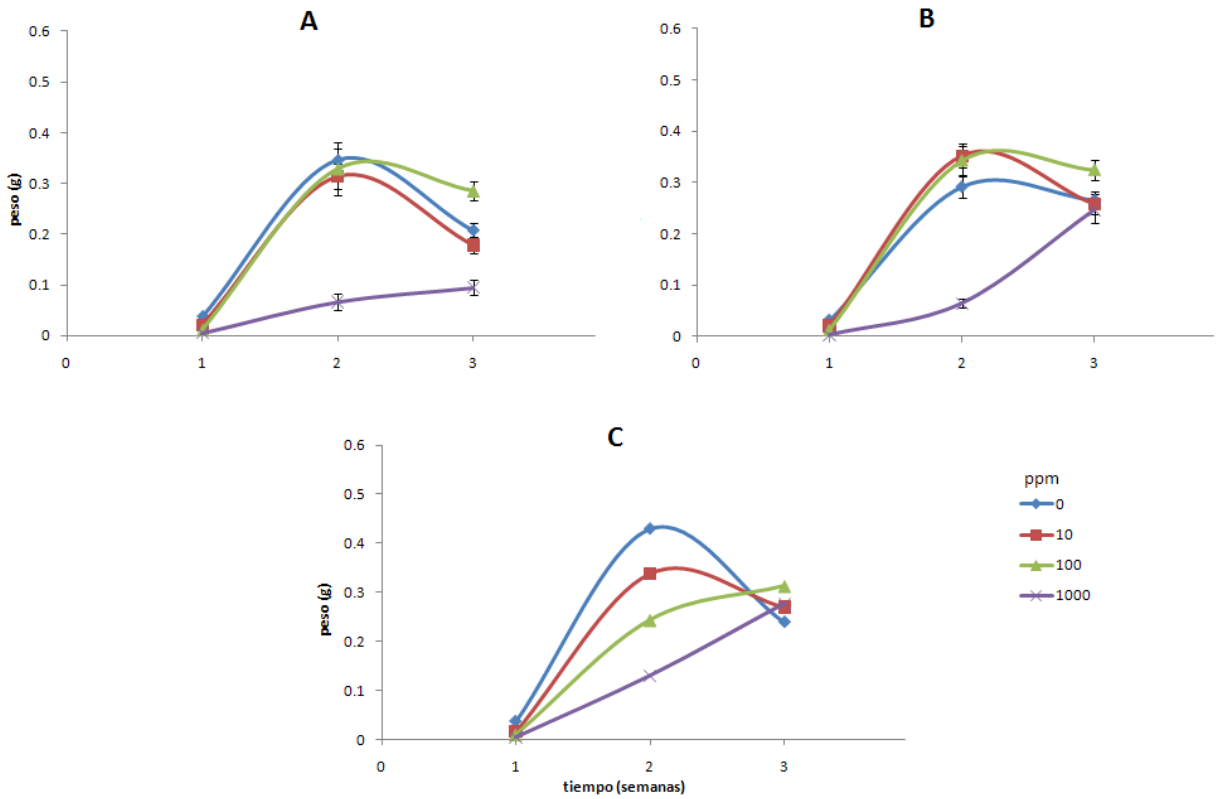


Figura 18. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

Talla. El tratamiento con hojas de *H. cimicidum* sometido a 1000 ppm presenta el valor más bajo entre todos. En las dos primeras semanas se observó una relación entre el peso y la dosis administrada de extracto de *Tephrosia*, en la cual el primero es menor en función del aumento de la concentración. En la tercera semana el valor del control se aproximó al de los tratamientos lo cual podría deberse a que los organismos entran en la etapa de prepupa, caracterizada por una reducción de peso y talla (Fig. 19).

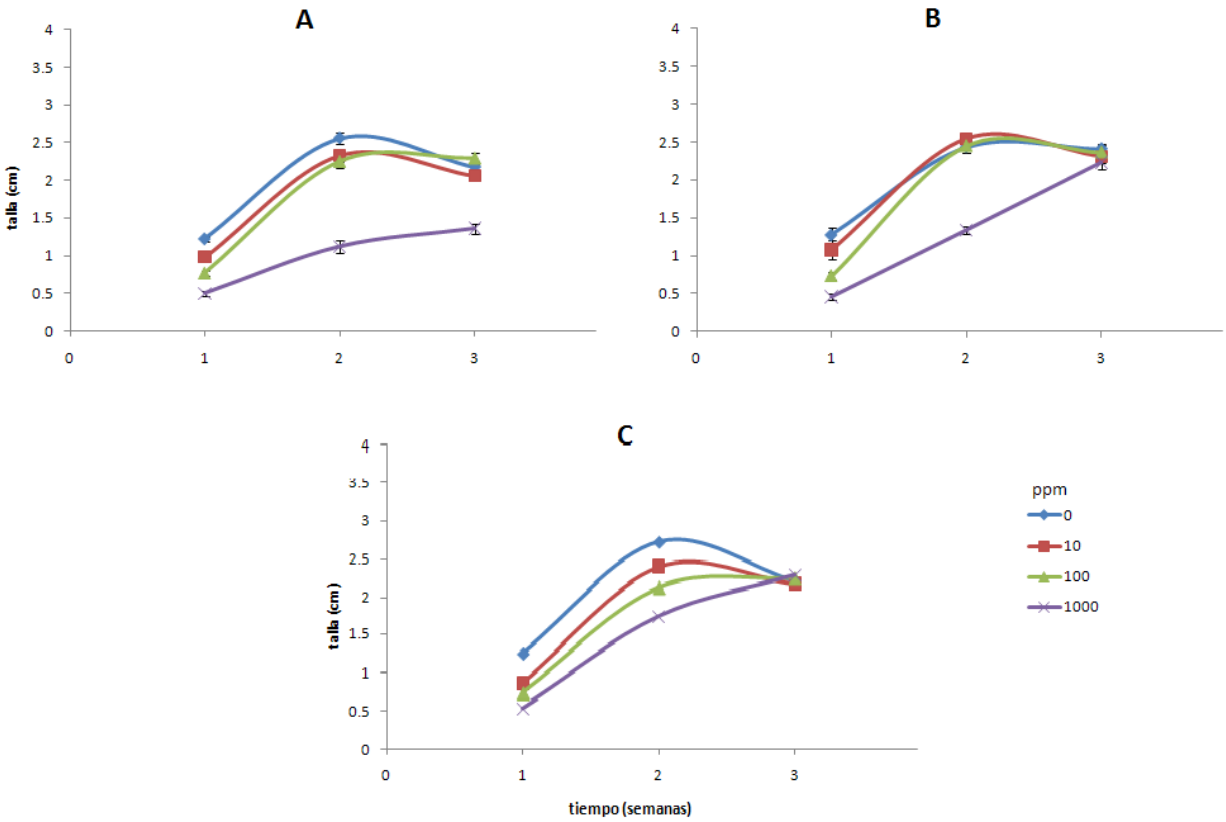


Figura 19. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas para los tratamientos con extractos de acetato de etilo: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

7.5.3. Extractos metanólicos

Mortandad. Los extractos metanólicos de ambas especies provocaron la menor mortandad de *S. frugiperda* entre todos los evaluados. Los extractos de *H. cimicidum* tuvieron valores muy bajos durante las dos primeras lecturas y mostraron un aumento notable en la tercera semana, con un porcentaje menor que el del control en la concentración de 1000 ppm. Con el extracto de raíz de *Tephrosia sp.* los valores también fueron bajos en la primera y segunda lectura pero la diferencia en la tercera no fue tan marcada. Ningún tratamiento supero el 25% (Fig. 20).

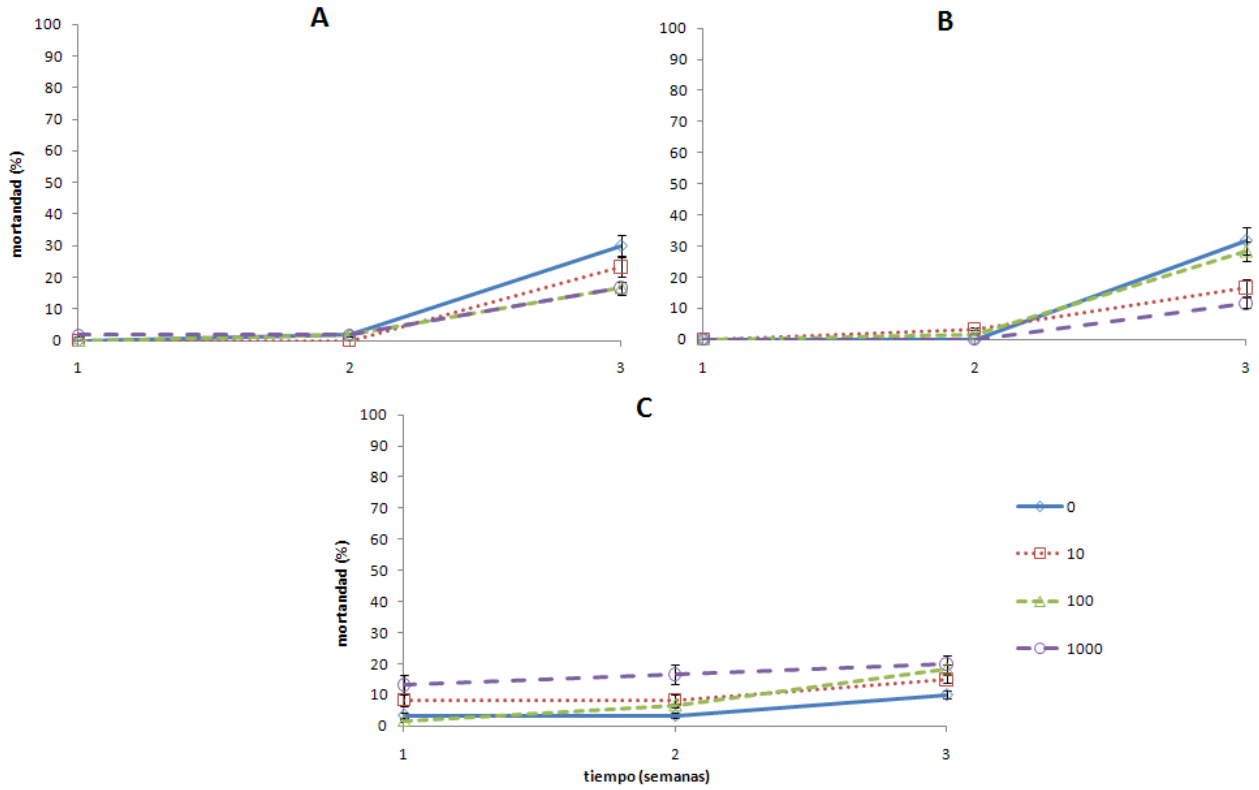


Figura 20. Mortandad acumulada durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican EEM.

Duración del desarrollo. Los extractos de hojas y tallos en concentración de 1000 ppm provocaron un ligero aumento en el tiempo de desarrollo larval. El extracto de raíz también tiene ese efecto pero es menor en comparación con los anteriores extractos. El desarrollo de las pupas fue más lento pero la diferencia con el control fue muy poca (Cuadro 12).

Viabilidad de los organismos. La viabilidad de las larvas tratadas con extractos de hojas y tallos fue mayor que la del control. El tratamiento con *Tephrosia* tuvo los más altos porcentajes de viabilidad larval aunque menores a los del control, que fue el mayor comparando de manera general. La viabilidad de las pupas fue mayor a la del control en el tratamiento con extracto de hojas, en el de tallos solamente la concentración más baja tuvo ese comportamiento. Las concentraciones de 10 y 1000 ppm de extracto de raíz mostraron mayor viabilidad que el control (Cuadro. 12).

Cuadro 12. Duración y viabilidad de las etapas de larva y pupa de los insectos tratados con extractos de metanol: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*.

Concentración (ppm)	Duración de la etapa (días)		Viabilidad (%)	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa
A				
0	19.7 ± 0.4	12.7 ± 0.3	50 ± 5.28	55 ± 4.4
10	19.0 ± 0.1	12.6 ± 0.1	75 ± 2.96	64 ± 6.1
100	18.3 ± 0.1*	11.4 ± 0.1	77 ± 1.62	62 ± 5.2
1000	21.3 ± 0.1*	12.4 ± 0.1	73 ± 2.27	61 ± 4.7
B				
0	19.6 ± 0.30	11.4 ± 0.28	60.0 ± 4.23	67 ± 3.9
10	17.9 ± 0.07*	11.0 ± 0.15	75.0 ± 2.96	72 ± 3.6
100	20.6 ± 0.23*	8.1 ± 0.91	53.3 ± 4.15	30 ± 5.4
1000	21.9 ± 0.21*	11.1 ± 0.09	65.0 ± 2.96	54 ± 5.7
C				
0	18.8 ± 0.21 [a]	12.4 ± 0.09	86.7 ± 2.98	62 ± 4.5
10	18.9 ± 0.13 [a]	12.3 ± 0.13	81.7 ± 1.49	79 ± 1.5
100	19.3 ± 0.22 [a]	11.4 ± 0.16	76.7 ± 2.61	50 ± 4.6
1000	19.4 ± 0.19 [a]	11.9 ± 0.03	81.7 ± 2.98	81 ± 2.0

Se presenta el valor de la media ± E.S. (N=3). [a] Valor no utilizado en la prueba estadística.* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a su grupo control, $p < 0.05$

Peso. Los valores del registro inicial fueron muy cercanos entre todos los tratamientos. En la segunda lectura el valor obtenido con 1000 ppm estuvo por debajo del control. Con los extractos de *H. cimicidum*, las concentraciones de 10 ppm mostraron un peso superior al del control en la segunda semana, pero en la tercera quedaron debajo. Con el extracto de tallos el valor fue cero en la tercera semana, al relacionar ésto con las gráficas de viabilidad larval y mortandad puede inferirse que la totalidad de los organismos sobrevivientes habían completado el periodo larval (fig. 21).

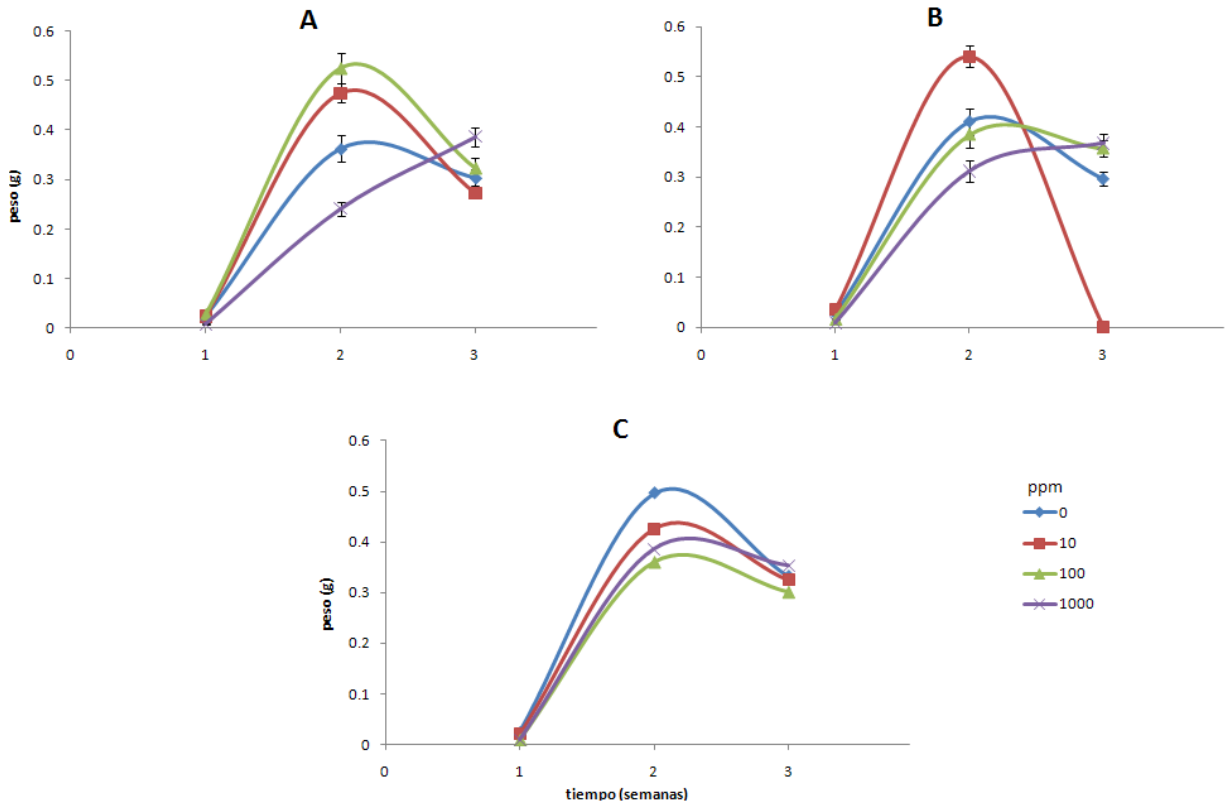


Figura 21. Comportamiento del peso durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos: A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

Talla. El tratamiento con extracto de tallos de *H. cimicidum* a 10 ppm incrementò la talla, provocando valores superiores a los demás tratamientos en las semanas 1 y 2, en la tercera cae debido a la misma razón mencionada en el peso. Los extractos de raíz de *Tephrosia sp.* no alteraron demasiado este parámetro pues los valores son cercanos a los de control en todas las lecturas (Fig. 22).

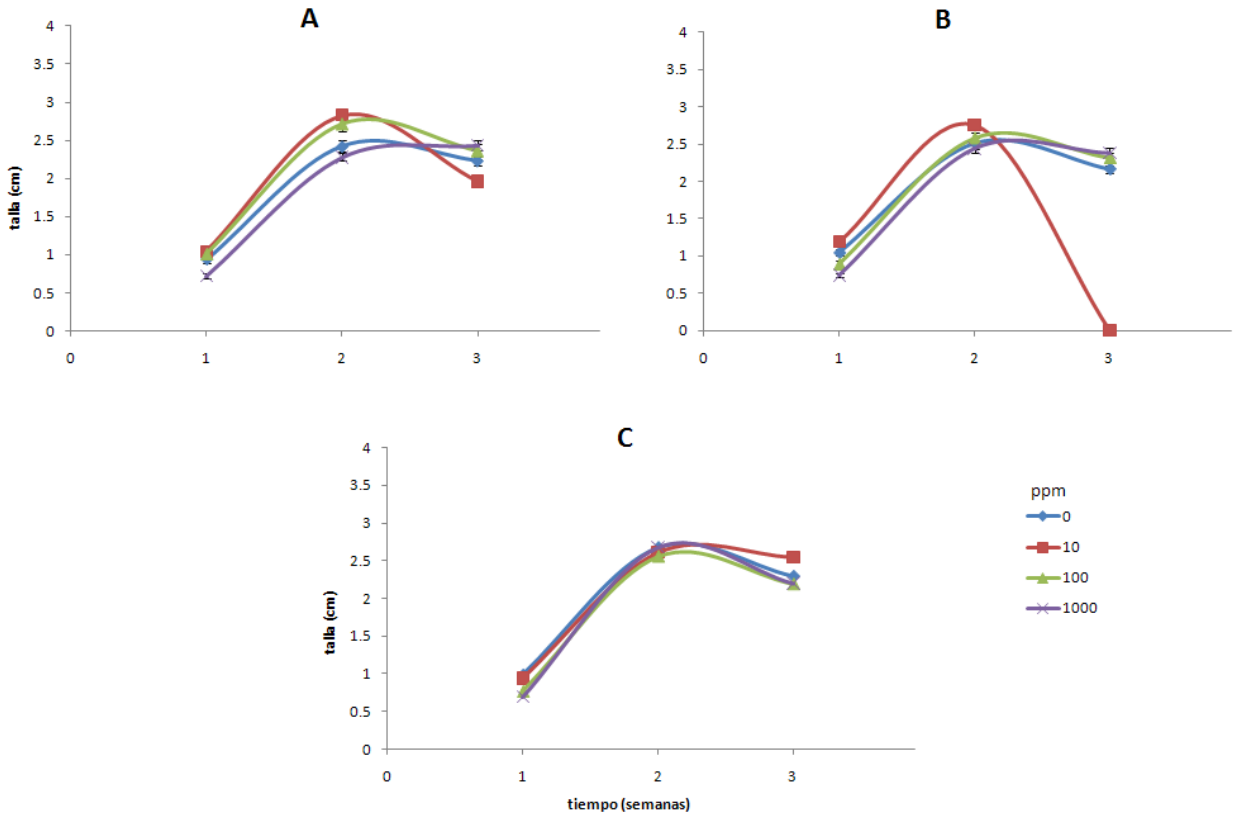


Figura 22. Comportamiento de la talla durante las 3 primeras semanas de los tratamientos con extractos metanólicos A, hojas de *H. cimicidum*; B, tallos de *H. cimicidum*; C, raíz de *Tephrosia sp*. Promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican EEM.

7.6. Discusión

Todos los extractos de ambas especies tuvieron algún efecto en desarrollo del insecto, no hubo alguno que causara respuestas consideradas como desfavorables para el insecto en todos los parámetros evaluados, esto es, que ocasionara viabilidad nula en larva/pupa + mortandad alta en primera lectura + tiempo largo de desarrollo + bajo peso, sin embargo, se presentaron combinaciones de tales respuestas.

Las mortalidades altas se observaron con los extractos héxanicos y de acetato de etilo. Los mayores porcentajes en la primera lectura se obtuvieron con los extractos hexánico de hojas y de acetato de etilo de tallos a 1000 ppm, lo que podría explicarse dado que las etapas

tempranas del desarrollo del insecto son más susceptibles a los efectos tóxicos de compuestos químicos (Ghidiou y Andaloro, 1993; Kubo, 1993; López *et al.* 2003), La fase del desarrollo influye en la respuesta a los compuestos dado que las enzimas o procesos sobre los que interfieren ocurren de forma puntual en el tiempo y en ocasiones no vuelven a aparecer (Gilbert, 2009; Tunaz y Uygun, 2004). En otros casos esto se debe a que los insectos en esas etapas comen más que una larva de mayor edad en proporción con su peso y así reciben una cantidad mayor de alimento y extractos. (Gilbert, 2009)

Aquellos casos (extractos hexánicos y de acetato de etilo de hojas) donde los valores del peso de los tratamientos descendieron en la tercera semana, los resultados podrían no necesariamente deberse a mortalidad sino al curso normal del desarrollo, que fisiológicamente corresponde para ese tiempo al estado de prepupa, y que metodológicamente implica no pesar al organismo, quedan entonces representadas en la medición las orugas restantes, que la mayoría de las veces tienen menor peso, o ninguna si es que el grupo completo logró llegar al estado de pupa. La tercera semana a partir de la eclosión, es el tiempo que se relaciona con el final del estado larval y comienzo de la pupación también llamado prepupa. En dicho estadio los insectos dejan de alimentarse del follaje y bajan al suelo, donde se entierran entre 3.5 a 7.5 cm aproximadamente, se vuelven sésiles y comienzan a formar el pupario (Sparks, 1979).

La duración del periodo larval se extendió en mayor grado con el extracto de acetato de etilo de *Tephrosia sp.* aunque otros extractos también tuvieron efecto. Se postula que las tasas de crecimiento lentas incrementan la probabilidad de muerte por enemigos naturales o condiciones climáticas adversas. (Benrey y Denno, 1997; Speight *et al.*, 2008). Además, la adaptabilidad de los insectos es altamente dependiente de la sincronización de los eventos del desarrollo, tales como oviposición y emergencia de adultos, que deben ajustarse en el tiempo para coincidir con condiciones climáticas favorables y disponibilidad de recursos. En poblaciones pequeñas por ejemplo, emerger con sincronía aumenta las probabilidades de apareamiento (Yurk y Powell, 2010).

La reducción del crecimiento y los tiempos extendidos de desarrollo obtenidos en los ensayos mencionados pueden atribuirse a la actividad antialimentaria, que causa una reducción en el consumo de alimentos, unida a la actividad crónica post-ingesta (Kubo, 1993), serían necesarias pruebas específicas posteriores para definir hasta qué punto es una u otra responsable de cada efecto. Wheeler y colaboradores (2001), en un ensayo con *S. litura* y extractos metanólicos de *Trichilia americana* obtuvieron una reducción del peso e incremento en el tiempo de pupación y eclosión. A partir de estos resultados sugieren dos posibles modos de acción, disuasorio de la alimentación y/o toxicidad crónica. En otro ensayo, con hojas de ajonjolí, Sintim y colaboradores (2009) encontraron efectos antialimentarios, reducción en el número de larvas supervivientes y selección del alimento, sugiriendo que los efectos son consecuencias, por una parte del rechazo del alimento sin ingesta substancial, o por otra, de la presencia de compuestos tóxicos.

Si bien el desarrollo lento del insecto puede atribuirse a algún componente del extracto, otra posibilidad sería la dieta, específicamente que fuera perecedera a corto plazo. En la revisión de la literatura no se encontró información sobre la estabilidad y caducidad del tipo de dieta utilizado o el momento aproximado en el que pierde las cualidades óptimas, sin embargo, las investigaciones han informado que el transcurrir del tiempo y las enzimas contenidas en las excretas de los insectos provocan la oxidación o hidrólisis de componentes. Los cambios en el pH, cantidad de agua, cantidad de nitrógeno y concentración de sales afectan cualidades como la palatabilidad, estabilidad, actividad de los conservadores, disponibilidad y solubilidad de nutrientes (Cohen, 2003; Davidowitz *et al.*, 2003; Weiss, 2006). Adicionalmente, las fluctuaciones en los factores mencionados son capaces de conducir a una respuesta diferencial dependiente de la variación genética en la población del insecto (Morehouse y Ritowski, 2010). Con miras a mejorar la estandarización de los ensayos de larga duración, es recomendable evaluar las características de la dieta a lo largo del tiempo que dura una prueba para saber el momento aproximado en el que pierde sus cualidades apropiadas; si este lapso fuera breve, alternativamente podría establecerse un protocolo que considere administrar dieta fresca, ya sea tratada o sin tratar, cada cierto número de días.

Los extractos vegetales son susceptibles de degradarse/transformarse por la acción del oxígeno atmosférico y la radiación luminosa y de esta forma perder la actividad de interés. La oxidación de los compuestos susceptibles podría retardarse con la incorporación de los extractos en la dieta al formarse una cubierta que los protege del oxígeno ambiental y la luz. La presencia de substancias antioxidantes en la composición de la dieta evitaría hasta cierto punto la degradación de los componentes del extracto. Dada la complejidad intrínseca de los extractos crudos no puede descartarse la ocurrencia de interacciones entre sus componentes y los de la dieta (Parmar y Walia, 2001; Cohen 2003). Si el propósito de posteriores investigaciones es la producción de un pesticida botánico será necesario tomar en cuenta la estabilidad de los compuestos activos en el tiempo y frente a variaciones en temperatura, radiación luminosa (UV y visible), pH y humedad, entre otros factores ambientales.

Es posible que la falta de diferencias pronunciadas en la talla y peso ocultara variaciones substanciales en la composición corporal de las subsecuentes pupas y adultos. La mortalidad de las larvas en los tratamientos podría haber sesgado la sobrevivencia hacia aquellos organismos que mejor metabolizaran los extractos o manejaran el estrés que suponen los tratamientos. La valoración el estado nutricional y enzimático de los organismos sería útil para esclarecer lo anterior. Cuando el desarrollo hasta la pupación es exitoso, los insectos holometábolos deben asignar los recursos adquiridos durante la etapa larval para obtener las características del adulto, dado que las presiones de selección y los fenotipos frecuentemente difieren entre sexos, los requerimientos nutricionales y costos relacionados también estarían vinculados al sexo (Morehouse y Ritowski, 2010).

La dispersión en los datos de la medición de la talla podría atribuirse también al comportamiento de cada organismo al ser medido pues algunos muestran gran movilidad, extendiéndose para desplazarse y en consecuencia su longitud es mayor, en el caso opuesto están las larvas aparentemente letárgicas que permanecen enroscadas en sí mismas y mantienen retraído el cuerpo al ser manipuladas dando como resultado longitudes cortas. A causa de lo anterior y con miras a homogeneizar el procedimiento de futuros ensayos, se

sugiere estandarizar las condiciones de los organismos en el momento de la toma de datos de manera tal que permanezcan inmóviles y en total extensión, si esto no es posible sería conveniente considerar otro parámetro de crecimiento menos susceptible de tener variaciones debidas a la manipulación de los insectos.

En la gran mayoría de los tratamientos, salvo los de extractos metanólicos, al contrastar los resultados de viabilidad con los de duración puede apreciarse que un mayor periodo larval coincide con una viabilidad menor y que aparente presteza en el desarrollo no coincide con una viabilidad superior. Los organismos que recibieron los extractos tuvieron viabilidades larvales menores que las del control. Podría esperarse que los extractos de la misma especie se comportaran de forma parecida, sin embargo, en los resultados es notorio que no ocurre así. Se observó que en algunos tratamientos (hexánico de hojas, acetato de etilo de tallos; 1000 ppm) las diferencias en los resultados de peso son poco definidas en la primera semana y comienzan a notarse a partir de la segunda, no obstante al revisar los resultados de mortandad puede apreciarse un efecto sobre los organismos desde la primera lectura. Aparentemente las diferencias en peso y talla en general son mas notables en la segunda lectura pues en la primera los valores son muy cercanos entre sí y en la tercera interfiere la entrada a la pupación de los organismos.

Los resultados de mortalidad acumulada complementan los de peso y talla puesto que pueden haber diferencias entre tratamientos respecto al número de muertes aunque aparentemente en talla y peso no existan o viceversa; algo similar ocurre con los resultados de viabilidad y los de duración de los periodos, la información que proporcionan unos puede ser contrastada o apoyarse con la de otros y redondea la imagen global del efecto que cada tratamiento ejerce sobre los insectos.

El análisis de los resultados podría agruparse con la utilización de índices de efectividad del compuesto sobre el desarrollo que relacionen los parámetros mencionados, a los cuales pueden añadirse otros como proporción de sexos de los adultos y número de huevos puestos. Existen índices ya publicados en la literatura, por ejemplo, Saxena y Sumithra (1985)

calcularon un Índice de crecimiento (GI) a partir de la fórmula GI= A_e/ P_x en donde A_e es el porcentaje de emergencia y P_x es el promedio del periodo de desarrollo. La revisión del tema hecha por Rodríguez (2003) y el trabajo de Shaalan *et al.* (2005) muestran fórmulas que toman en cuenta el peso, fase larval, tiempo, concentración, número de insectos, mortandad, porcentaje de eclosión, sin embargo, se encontró que los índices están enfocados a cuantificar la inhibición del crecimiento o la viabilidad por separado y no hubo alguno que relacionara ambos. Sería deseable la creación de un índice que simplifique la identificación y facilite la comparación de un compuesto fitoquímico con capacidad inhibitoria del crecimiento combinada con la propiedad de reducir la emergencia de los adultos y causar mortandad en fases tempranas del desarrollo, suponiendo la posibilidad de existencia de tal compuesto.

La mayoría de las especies de plantas que se utilizan en la protección de cultivos, exhiben un efecto insectistático más que insecticida, los MS que producen poseen efecto repelente, disuasivo de la alimentación, de la oviposición y regulador de crecimiento (Coats, 1994; Silva *et al.,* 2002; Rodríguez, 2003). Si bien los resultados de la actividad sobre *S. frugiperda.* con los ensayos y dosis probados son menos contundentes que los obtenidos con otros géneros vegetales e.g. *Azadirachta*, cabe la posibilidad de que los componentes de los extractos tengan algún tipo de actividad farmacológica de interés como es la de inhibición de la AChE, relevante en áreas de investigación de toxicología, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes. Actualmente la principal farmacoterapia de la enfermedad de Alzheimer se basa en el empleo de compuestos anti colinesterasa (Loizzo *et al*., 2008). Los inhibidores de la AChE participan tambien en el tratamiento de la *miastenia gravis*, causada por la insuficiencia de acetilcolina en la placa neuromuscular, y como antídotos de inhibidores competitivos de la acetilcolina, por ejemplo el alcaloide tropánico atropina (Houghton *et al.,* 2006).

Los extractos vegetales contienen numerosos compuestos que podrían tener efectos sinergísticos, aditivos o antagónicos. Bomford e Isman (1996) realizaron un ensayo con neem y azadiractina, ellos observaron que larvas de *S. litura* desarrollaban una disminución en la respuesta disuasoria a la azadiractina pero no al neem, el cual es una mezcla de compuestos entre los que se incluye la misma azadiractina. Respecto a los efectos de sinergismo entre

productos naturales e insecticidas sintéticos, Shaalan *et al.* (2005) listan algunos estudios y fórmulas para su evaluación, estos autores encuentran que es más común entre combinaciones de los dos grupos que entre solamente productos naturales, no obstante hay que tomar en cuenta que fueron realizados con distintas especies de mosquitos, cuyas características larvales y alimentarias son distintas a las de los modelos usados en el área de los plaguicidas de uso agrícola. Savelev *et al.* (2003) evaluaron *in vitro* la inhibición de la AChE de constituyentes de *Salvia lavandulaefolia* y encontraron respuestas sinérgicas y antagónicas dependiendo de la combinación de compuestos y su concentración.

Pueden haber respuestas diferenciales debidas a la combinación de componentes en una mezcla, ya sea de extractos o de sus componentes aislados, que en el caso de los géneros aquí tratados serían probablemente alcaloides, flavonoides y terpenos. La actividad simultánea de alcaloides y flavonoides se ha estudiado dentro del ámbito terapéutico (Geng *et al.*, 2007) pero aparentemente no en el de la protección de cultivos. Además, los compuestos evaluados son distintos a los registrados en *Tephrosia* y *Haplophyton*. Debido a lo anterior y a que el uso tradicional de ambas plantas se basa en una mezcla sería conveniente realizar bioensayos con distintas combinaciones y concentraciones de los extractos, fracciones y compuestos que logren aislarse.

A partir de esto último es evidente la necesidad de realizar previamente un fraccionamiento de los extractos lo cual también ayudaría a la identificación del papel que juegan los distintos tipos de compuestos en la formación de la respuesta observada. Estos ensayos podrían realizarse con un número mayor de insectos y para así lograr una homogeneidad mayor en los resultados. Asimismo, sería favorable para ampliar la información disponible sobre el efecto de los extractos, realizar nuevas pruebas con distintas vías y medios de administración como la canulación y la vía tópica (González-Coloma *et al.* 1998, López *et al.* 2003) y probar en otros insectos modelo, no necesariamente del mismo género, aunque estudios han mostrado que especies emparentadas exhiben una amplia variación en susceptibilidades hacia los mismos extractos o compuestos puros (Isman, 1993).

Por último, debido a la actividad anti colinesterasa detectada en flavonoides y alcaloides de otras especies, y a que este es el modo de acción de algunos insecticidas como los carbamatos, se sugiere evaluar preliminarmente mediante CCF dicha actividad, aplicando en los extractos o fracciones que contengan flavonoides o alcaloides alguna de las técnicas descritas por Rhee *et al.* (2001, 2003) o Marston *et al. (*2002).

8. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA EN RATÓN DE EXTRACTOS DE H. cimicidum Y Tephrosia sp.

8.2. Organismos utilizados

Hembras de ratón Tac:SW (Taconic Farms Inc.) se utilizaron. Con 8-9 semanas de edad y un peso de 25-30 g. Los sujetos experimentales se colocaron en cajas de acrílico sin restricción de alimento y agua, mantenidos a una temperatura controlada de 22 °C con ciclo de luz/oscuridad natural.

8.3. Preparación de los extractos

Los extractos de utilizados fueron los de hexano y metanol. Las muestras se suspendieron en un vehículo (solución salina 0.9%, tween80 0.5%) y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) mediante una jeringa para insulina.

8.4. Evaluación de la toxicidad aguda (DL_{50})

El método usado en este estudio fue descrito por Lorke (1983), tiene como finalidad determinar el índice de toxicidad aguda (DL_{50}) empleando un número mínimo de animales. En forma resumida, se determina la DL_{50} con el cálculo de la media geométrica de dos dosis que se requieren hallar, una en la que mueren todos los organismos (3/3) y otra inmediatamente menor a aquella en la que solamente muere uno (0/3). Se procede en dos etapas: en la inicial se administran 10, 100 y 1000 mg/Kg, observándose las dosis en las cuales se producen decesos. Si no ocurren en este primer intervalo, se continúa con la segunda etapa, que utiliza concentraciones mayores (1600, 2900 y 5000 mg/Kg). Por el contrario, si ocurren muertes en la mayoría de las dosis entonces las concentraciones disminuyen (50, 200 y 400 mg/Kg) En cada nivel de dosis se utilizaron tres animales, la observación se realizó durante 14 días en los que se registraron los efectos de la toxicidad como pérdida de peso, pérdida de la locomoción, paro respiratorio y muerte. Al final de los experimentos, los

animales se sacrificaron por dislocación cervical y sus principales órganos internos fueron examinados macroscópicamente en busca de daños.

8.5. Resultados y discusión

Como se muestra en el cuadro 13, la administración i.p. de los extractos hexánico y metanólico de hojas de *H. cimicidum* no causó mortalidad en el intervalo de dosis de 10-1600 mg/Kg, el extracto metanólico produjo el 66 % de mortalidad en la dosis de 2900 y 5000 mg/Kg. Respecto a los extractos hexánico y metanólico de *Tephrosia sp.* el 100% de mortalidad se produjo con dosis más bajas: 200 y 1450 mg/Kg.

Algunos individuos tratados con extracto metanólico de *H. cimicidum* presentaron manchas oscuras irregulares y puntos blancos en la superficie del hígado, con la dosis mas alta de *Tephrosia sp.* se observó una matriz membranosa color amarillo claro entre los órganos, que podría ser una de las respuestas del cuerpo ante la presencia de cuerpos extraños (Tang y Eaton 1999).

La determinación de las DL_{50} de extractos de ambas especies nos permite conocer su grado de toxicidad, hacer comparaciones con otras sustancias y evaluar el riesgo que implica si dichos extractos entran en contacto con mamíferos, de forma particular el hombre, el ganado y las mascotas. Los resultados muestran que los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico y metanólico de hojas de *H. cimicidum* pueden considerarse no tóxicos (DL_{50} > 5000 y > 2552 mg/Kg, respectivamente). Por el contrario, ambos extractos de raíz de *Tephrosia sp.* sí tuvieron efecto, considerándose moderadamente tóxico el extracto metanólico con una DL_{50} = 538 mg/Kg y altamente tóxico el extracto hexánico con una DL_{50} = 45 mg/Kg; ambas son superiores a las DL_{50} i.p. en ratón de algunos insecticidas botánicos como la rianodina (10 mg/Kg), el derivado 12 α-β hidroxilado de rotenona (4.1 mg/Kg), la rotenona (2.8 mg /Kg), o la DL_{50} i.p. en rata de la nicotina (14.6 mg/Kg) (Ujváry, 2001). Los valores son tambien superiores a los DL_{50} en rata de algunos insecticidas sintéticos como Endrin (17.8

mg/kg) y Paration (13 mg/Kg), pero los de *Tephrosia sp.* estan debajo de otros como el Malation (1375 mg/Kg), y DDT (130 mg/Kg) (Rozman *et al*., 2001).

Cuadro 13. Determinación de la DL_{50} de los extractos hexánico y metanólico de *H. cimicidum* y *Tephrosia sp.* administrados por vía intraperitoneal

Extracto	Primera Etapa Dosis (mg/Kg)			Segunda Etapa Dosis (mg/Kg)			DL_{50} (mg/Kg)
	10	100	1000	1600	2900	5000	
H. cimicidum Hojas. Hexano	0/3[a]	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	> 5000
H. cimicidum Hojas. Metanol	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3	2552
	10	100	1000	50	200	400	
Tephrosia sp. Raíz. Hexano	0/3	1/3	3/3	1/3	3/3	3/3	45
				200	400	1450	
Tephrosia sp. Raíz.Metanol	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3	3/3	538

[a] Número de individuos muertos/número de individuos usados.

Debe tomarse en cuenta que los resultados son de extractos crudos, el contenido de MS activos podría no ser alto en el volumen del extracto y variar dependiendo, entre otros factores, del lugar, época, hora de colecta y tipo de extracción de las muestras vegetales (Salmore y Hunter, 2001; Lu *et al*., 2009; Douglas *et al*., 2010; Piluzza y Bullitta, 2010). La cantidad de los compuestos activos por unidad de volumen puede aumentar también si así se requiriera para una presentación comercial. En los extractos crudos de piretro la cantidad de piretrinas llega a 30% del total y las presentaciones comerciales alcanzan 50 - 60%, los productos comerciales de neem contienen 0.3 a 20% de azadiractina (Ujváry, 2001).

Al administrar extractos crudos es posible que todos los compuestos interactúen, directa o indirectamente; a grandes rasgos, los componentes del extracto podrían estar interfiriendo, adicionando o potenciando mutuamente sus efectos. La interferencia (antagonismo) cancelaría el beneficio o daño esperado a causa de un compuesto mientras que la potenciación lo incrementaría en función de las circunstancias (Bomford e Isman, 1996; Rozman *et al.*, 2001; Shaalan *et al.*, 2005). Asimismo, la existencia de ritmos en muchos procesos funcionales de los mamíferos es el motivo por el cual el momento de la administración estaría influyendo en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los compuestos administrados (Sukumaran *et al.*, 2010). Cabe hacer la observación que el mecanismo de acción causal de muerte podría ser distinto para organismos en el mismo tratamiento, dependiendo de la dosis y el tiempo que haya pasado hasta el momento del registro (Rozman *et al.*, 2001, Calabrese y Baldwin, 2001).

Los extractos que no tuvieron efecto tóxico agudo podrían ser objeto de un estudio de toxicidad crónica, ya que una sola administración que no produce efecto detectable inmediato puede causar un estado mórbido crónico, como ocurre con el talio, el arsénico o el fosfato de tiortocresil (Rozman *et al.*, 2001); otros posibles estudios serían los de evaluación de mutagenicidad (inducción o incremento en la frecuencia de mutaciones), teratogenicidad (aparición de malformaciones en embriones o fetos), neurotoxicidad (daño o letalidad hacia tejido neural), carcinogénesis (inducción a la formación o propagación de cáncer, hipersensibilidad (tendencia del sistema inmunológico a reaccionar exacerbadamente frente a un antígeno), bioacumulación (acumulación de compuestos en los tejidos de un organismo) y biomagnificación (acumulación de compuestos a lo largo de las cadenas tróficas) (Darvas y Polgár, 1998; Rozman *et al.*, 2001).

9. CONCLUSIONES GENERALES

Los perfiles cromatográficos y las pruebas de detección de metabolitos secundarios revelaron la presencia de alcaloides y terpenoides en los extractos de *H. cimicidum,* así como la de glicósidos, flavonoides y terpenos en los extractos de *Tephrosia sp.*

El extracto mas complejo, cualidad reflejada en la mayor cantidad de manchas en la CCF, fue el de acetato de etilo de *Tephrosia sp*., este también fue el mas activo en la reducción de talla y peso por lo cual podría considerarse su posterior fraccionamiento en la búsqueda de compuestos con actividad disuasoria de la alimentación. En contraste, en los extractos metanólicos se observó menor complejidad así como menor efecto en contra del desarrollo de los insectos. Este comportamiento podría ser debido a la presencia de glucósidos.

Las concentraciones de 1000 ppm provocaron mayores efectos sobre el desarrollo del insecto. Los extractos de hexano y acetato de etilo de *H. cimicidum* causaron más mortandad desde la primera semana y viabilidad larval nula. El extracto de acetato de etilo de hojas de *H. cimicidum* registró los valores más bajos en peso y talla. El extracto hexánico de *Tephrosia sp.* provocó el menor peso. En los tratamientos con el extracto de acetato de etilo de *Tephrosia sp.* se registró la mayor duración del periodo larval entre todos los tratamientos.

Respecto a la DL_{50} en ratones, los extractos hexánico y metanólico de *H. cimicidum* pueden considerarse no tóxicos (DL_{50} > 5000 y > 2552 mg/Kg, respectivamente). En cambio, el extracto metanólico de *Tephrosia sp.* fue moderadamente tóxico con una DL_{50} = 538 mg/Kg y el extracto hexánico altamente tóxico con una DL_{50} = 45 mg/Kg. La relación entre la polaridad de los extractos y su toxicidad plantea evaluaciones posteriores con el fin de descartar efectos tóxicos en mamíferos, incluyendo al hombre.

LITERATURA CITADA

Adesomoju A.A., M.V. Lakshmikantham y M.P. Cava. (1983a) Norisohaplophytine and haplocidiphytine – new bisindole alkaloids from *Haplophyton cimicidum* (Apocynaceae). *Heterocycles* 20(8):1511-1517.

Adesomoju A.A., V.H. Rawal, M.V. Lakshmikantham y M.P. Cava. (1983b) Cimilophytine, a new bisindole alkaloid from *Haplophyton cimicidum* (Apocynaceae). *Journal of Organic Chemistry*. 48:3015-3017.

Akthar, Y. y M.B. Isman (2004) Feeding responses of specialist herbivores to plant extracts and puire allelochemicals: affects of prolonged exposure. *Entomologia Experimentalis et Applicata* (111):201-208.

Alvarado-Cárdenas L.O. (2004) Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán 38 Apocynaceae. Instituto de Biología UNAM. México. pp 11-14

Amede, T., L. German, C. Opondo, S. Rao and A. Stroud eds. (2006) Integrated Natural Resource Management in Practice: Enabling Communities to Improve Mountain Livelihoods and Landscapes. Proceedings of a conference held on October 12-15, 2004 at ICRAF Headquarters, Nairobi, Kenya. Kampala, Uganda: African Highlands Initiative.

Anaya A.L. (2003) Ecología química. Plaza y Valdés, México. 349 p.

Arnason J.T., S. MacKinnon, A. Durston, B.J.R. Philogène, C. Hasbun, P. Sánchez, L. Poveda, L. SanRoman, M.B. Isman, C. Satasook, G.H.N. Towers, P. Wiriyachitra y J.L. McLaughlin. (1993) Insecticides in tropical plants with non neurotoxic modes of action. En Downum K.R. *et al*. Eds. Phytochemical potential of tropical plants. Plenum Press, NY.

Bellés X. coord. (1993) Insecticidas Biorracionales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. 409 p.

Berembaum, M.B. y Rosenthal, G.A. (1992) Plant secondary metabolites. Vol. 1 The chemical participants. Academic Press, New York.

Berenbaum M.R. (2002) Post genomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology* 28:873-895.

Benrey, B. y R.F. Denno. (1997) The slow growth-high-mortality hypothesis: A test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78:987–999.

Bomford M.K. y M.B. Isman (1996) Desensitization of fifth instar *Spodoptera litura* to azadirachtin and neem. *Entomologia Expermentalis et Applicata* 81:307-313.

Calabrese E.J. y L.A. Baldwin (2001) Hormesis: U-shaped dose responses and their centrailty in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences* 22(6):285-291.

Carlini, C.R. y M.F. Grossi-de-Sá (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40(11, nov):1515-1539.

Casmuz, A., Juárez M.L., Socías M.G., Murúa M.G., Prieto S., Medina S., Willink E., Gastaminza G. (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica* Argentina. 69(3-4):209-231.

Cava M.P., S.K. Talapatra y K. Nomura, J.A. Weisbach. B. Douglas y E.C. Shoop. (1963a) Haplocine and haplocidine: new aspidospermine-type alkaloids from *Haplophyton cimicidum*. *Chemistry and industry (London)*. July:1242-1243.

Cava M.P., S.K. Talapatra, P. Yates, M. Rosenberg, A.G. Szabo, B. Douglas, R.F. Raffaud, E.C. Schoop y J.A. Weisbach (1963b) Cimicine and cimicidine: Lactonic alkaloids of the aspidospermine skeletal type. *Chemistry and industry (London)* November:1875-1876

Cava M.P., A.K. Shuber y V.P. Kota. (1967) Triterpene constituents of *Tabernaemontana laurifolia* and *Haplophyton cimicidum*. *Phytochemistry* 6:1301-1303.

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

Cohen A.C. (2003) Insect diets: Science and technology. CRC Press, Boca Raton, Fl. 324 pp.

Cole M.D. (1994) Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. *Biochemical Systematicas and Ecology* 22(8):837-856.

Céspedes C.L., L. Achnine, B. Lotina-Hennsen, J.R. Salazar, F. Gómez-Garibay, y J.S. Calderón. (2001) Inhibition of Photophosphorylation and Electron Transport by Flavonoids and Biflavonoids from Endemic *Tephrosia* spp. of Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 69:63–76 .

Calderón J.S., F. Gómez-Garibay y C.L. Céspedes (2001) Isoprenylated flavonoids from *Tephrosia tuitoensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:763-764.

Chinou Ioanna. (2008) Primary and secondary metabolites and their biological activity. En Waksmundzka-Hajnos Monika, Joseph Sherma y Teresa Kowalska, eds. Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp 59-76.

Codorniu-Hernández E., A. Rolo-Naranjo y L.A. Montero-Cabrera. (2007) Theoretical affinity order among flavonoids and amino acid residues: An approach to understand flavonoid-protein interactions. *Journal of Molecular Structure: TEOCHEM*. 819(1-3):121-129.

Cordell G.A. (1979) The Aspidosperma alkaloids en Manske R.H.F. Y H.L. Holmes eds. The Alkaloids: chemistry and physiology. Vol 17. Academic Press, New York.

Darvas B. y L.A. Polgár (1998) Novel-Type Insecticides: Specificity and Effects on Non-target Organisms, en Ishaaya I. y D. Degheele, eds. Insecticides with novel modes of action: mechanisms and aplication. Springer-Verlag, Berlin. Pp 188-259.

Davidowitz G., L.J. D'Amico y F. Nijhout (2003) Critical weight in the development of insect body size. *Evolution & Development* 5(2):188-197

Delfel N.E. (1965) Insectide identification: Hydroiodic acid as a new selective reagent for detection of rotenone in chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 3:56-57.

Delfel N.E. (1966) Thin layer chromatography of rotenoids and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 14:130-132.

Delfel N.E. y W.H. Tallent (1969) Thin layer densitometric determination of rotenone and deguelin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 52:182-187.

Dev, S. y O. Koul. (1997) Insecticides of natural origin. Harwood Academic Publishers, The Netherlands. 365 pp.

Dirzo R. (1984) Herbivory, phytocenytric overview. En R. Dirzo y J. Sarukhán eds. Perspectives on plant population ecology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 141-165.

Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411(14, jun):843-847 .

Domínguez X.A., O. Téllez y G. Ramírez. (1983) Mixtecacin, a prenylated flavanone and oaxacacin its chalcone from the roots of *Tephrosia woodii*. *Phytochemistry*. 22(9):2047-2049.

Dominguez, X. A. (1985) Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, D.F., México. 281 p.

Douglas J.A., J.M. Follett, G.A. Parmenter, C.E. Sansom, N.B. Perry y R.A. Littler (2010) Seasonal variation of biomass and bioactive alkaloid content of goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Fitoterapia*. 81(7):925-928.

Duchowicz P.R., M. Goodarzi, M.A. Ocsachoque. G.P. Romanelli, E del V. Ortiz, J.C. Autino, D.O. Bennardi, D.M. Ruiz y E.A. Castro (2009) QSAR analysis on *Spodoptera litura* antifeedant activities of flavone derivatives. *Science of The Total Environment* 408(2):277-285.

Dzenda T, J.O. Ayo, A.B. Adelaiyde, A.O. Adaudi (2008) Ethnomedical and veterinary uses of *Tephrosia vogelii* Hook F (Fabaceae): A review. *Australian Journal of Medical Herbalism* 20(2):71-80.

Fagerström, M.H.H., S.I. Nilsson, M. van Noordwijk, T. Phien, M. Olsson, A. Hansson and C. Svensson. (2002) Does *Tephrosia candida* as fallow species, hedgerow or mulch improve nutrient cycling and prevent nutrient losses by erosion on slopes in northern Viet Nam?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 90:291-304.

Frame D. (2001) Chromosome studies in *Schoenocaulon* (Liliaceae: Melanthieae) a relict genus. *Anales del Instituto de Biología UNAM. Serie Botánica*. 72(2):123-129.

Ganapaty S., S.T. Pannakal, G.V.K. Srilakshmi, P. Lakshmi, P.G. Waterman y R. Brun (2008) Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry letters* 1(4):175-178.

Ganapaty S., G.V.K. Srilakshmi, S.T. Pannakal, H. Rahman, H. Laatsch y R. Brun (2009) Cytotoxic benzyl and coumestan derivatives from *Tephrosia calophylla*. *Phytochemistry* 70(1):95-99.

Geng, P., Y. Yang, Z. Gao, Y. Yu, Q. Shi, G. Bai (2007) Combined effect of total alkaloids from Fecuale Bombycis and natural flavonoids on diabetes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(8):1145-1150.

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

Gilbert, L.I. ed. (2009) Insect development: morphogenesis, molting and metamorphosis. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 739 p.

Gokhale A.B., M.N. Saraf (2000) Tephrosia purpurea: A review of contemporary literature and medicinal properties. *Indian Drugs* 37(12):553-560.

Gomez-Garibay F., L. Quijano y T. Ríos. (1991) Flavanones from *Tephrosia leicoarpa*. *Phytochemistry* 30(11):3832-3834.

Gómez-Garibay F., J.S. Calderón, L. Quijano, O. Téllez, Ma. del S. Olivares y T. Ríos. (1997) An unusual prenyl biflavanol from *Tephrosia tepicana*. *Phytochemistry* 46(7):1285-1287.

Gomez-Garibay F., J.S. Calderón, M. de la O Arciniega, C. L. Céspedes, O Téllez-Valdés, J. Taboada. (1999) An unusual isopropenyldihydrofuran biflavanol from *Tephrosia crassifolia*. *Phytochemistry* 52(6):1159-1163.

Gómez-Garibay F. (2001) Plantas mexicanas: género *Tephrosia*. Instituto de Química,UNAM, México. 41pp.

González-Coloma A., A. Guadaño, C. Gutiérrez, R. Cabrera, E. de la Peña, G. de la Fuente y M. Reina (1998) Antifeedant Delphinium Diterpenoid Alkaloids. Structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(1):286-290.

Grainge Michael y Saleem Ahmed (1988) Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & sons, New York. 470 pp.

Greenamyre J.T., J.R. Cannon, R. Drolet y P.G. Mastroberardino (2010) Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 31(4): 141-142.

Harborne J.B. (1988) Introduction to ecological biochemistry. 3rd ed. Academic Press, London. 356 p.

Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68:2831-2846.

Houghton P.J., Y. Ren y M. Howes (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports*. 23:181-199.

Ishaaya I. (2001) Biochemical processes related to insecticide action: an Overview, en Ishaaya I. ed. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer-Verlag. Berlin.

Isman M.B. (1993) Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. *Pesticide Science* 38:57-63.

Isman M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual review of entomology* 51:45–66.

Khambay B.P.S. y N. O'Connor. (1993) Progress in developing insecticides from natural compounds. En Van Beek T.A. y H. Breteler eds. Phytochemistry and agriculture. Clarendon Press, Oxford. pp 40-61.

Khambay B.P.S., D.G. Beddie y M.S.J. Simmonds. (1997) In pursuit of insecticidal compounds from plants. En Wrigley S., M. Hayes, R. Thomas, E. Chrystal eds. Phytochemical diversity: a source of new industrial products. The Royal Society of chemistry, Cambridge UK.

Khan M.T.H., I. Orhan, F.S. Senol, M. Kartal, B. Sener, M. Dvorská, K. Smejkal y T. Slapetová. (2009) Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-biological interactions* 181(3):383-389.

Kubo, I. (1993) Insect control agents from tropical plants. En Downum. K.R., J.T. Romeo y H.A. Stafford eds. Phytochemical potencial of tropical plants. *Recent Advances in Phytochemistry*. 27:3927-3939.

Lapointe S.L., C.L. McKenzie, and W.B. Hunter (2003) Toxicity and Repellency of *Tephrosia candida* to Larval and Adult *Diaprepes* Root Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 96(3):811-816.

Loizzo M.R., R. Tundis, F. Menichini y F. Menichini (2008) Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: An update. *Current medicinal chemistry* 15:1209-1228.

López J.F., R.C. Rocha, P. Lozano, A. Aragón, A.M. Tapia y M.A. Martínez (2003) Técnicas para evaluar actividad biológica de extractos vegetales. En Tornero C.M., J.F. Lopez-Olguín y A. Aragón eds. Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Pp 243-258.

Lorke D. (1983) A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of toxicology*. 54(4):275-287.

Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual review of entomology* , 52 , 231-253.

Liu, Y, P. Newman, B.N. Timmermann y T. Marbry (1989) Tecniques for flavonoid analysis, *Revista Latinoamericana de Química, Suplemento 1*. Pp 90-130.

Lu Y., J. Du, J. Tang, F. Wang, J. Zhang, J. Huang, W. Liang y L. Wang (2009) Environmental regulation of floral anthocyanin synthesis in *Ipomoea purpurea*. *Molecular Ecology*, 18(18):3857-3871.

Lümmen P. (1998) Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 1364(2):287-296.

Lwande, W., M.D. Bentley, A. Hassanali (1986) The structure of hildecarpin, an insect antifeedant 6a-hydroxypterocarpin from the roots of *Tephrosia hildebrandtii* Vatke. *Insect Science and its application* 7:501–503.

Machocho A.K., W. Lwande, J.I. Jondiko, L.V.C. Moreka y A. Hassanali (1995) Three new flavonoids from the roots of *Tephrosia emoroides* and their antefeedant activity against the larvae of the spotted stalk borer *Chilo partellus* Swinhoe. *International Journal of Pharmacognosy* 33(3):222-227.

Marston A., J. Kissling y K. Hostettmann (2002) A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* 13:51-54.

Martínez M. y E. Matuda (1979) Flora del Estado de México. Biblioteca enciclopédica del Estado de México. Tomo 3:451 México.

Mihm, J.A. (1989) Mass Rearing Stem Borers, Fall Armyworms and Corn Earworms at CIMMYT. In: Toward Insect Resistant Maize for the Third World: Proceedings of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects, International Maize and Wheat Improvement Center. CIMMYT. México, ISBN:9686127356. pp 5-22.

Morehouse N.I. y R.L. Rutowski (2010) Developmental responses to variable diet composition in a butterfly: the role of nitrogen, carbohydrates and genotype. *Oikos*. 119:636-645.

Morimoto M., K. Tanimoto, S. Nakano, T. Ozaki, A. Nakano, K. Komai (2000) Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(2):389-393.

Mroue M.A. y M. Alam (1991) Crooksiine, a bisindole alkaloid from *Haplophyton crooksii*. *Phytochemistry* 30(5):1741-1744.

Mroue M.A., M.A. Ghuman y M. Alam (1993) Crooksidine, an indole alkaloid from *Haplophyton crooksii*. *Phytochemistry* 33(1):217-219.

Mroue M.A., K. Euler, M.A. Ghuman y M. Alam (1996) Indole alkaloids from *Haplophyton crooksii*. *Journal of natural products* 59(9):890-893.

Muiva L.M., A. Yenesew, S. Derese, M, Heydenreich, M.G. Peter, H.M. Akala, F. Eyase, N.C. Waters, C. Mutai, J.M. Keriko y D. Walsh (2009) Antiplasmodial β-hydroxydihydrochalcone from seedpods of *Tephrosia elata*. *Phytochemistry letters* 2(3):99-102.

Mukherjee P.K., V. Kumar, M. Mal, P.J. Houghton (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14:289–300.

Ohmura W., S. Doi, M. Aoyama y S. Ohara (2000) Antiifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood Science*. 46(2):149-153.

Pereira, M. de M., R.L.R.P. Jácome, A.F. de C. Alcântara, R.B. Alves y D.S. Raslan (2007) Alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quimica Nova*. (30)4:970-983.

Parmar B.S. y S. Walia. (2001) Prospects and problems of phytochemical biopesticides en Koul O. y G.S. Dhaliwal eds. Advances in biopesticide research Vol. 1 Phytochemical Biopesticides. Hardwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands.

Piluzza G. y Bullitta S. (2010) The dynamics of phenolic concentration in some pasture species and implications for animal husbandry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9):1452-1459.

Pimentel D. (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability* 7:229-252.

Rhee I.K., M. van der Meent, K. Ingkaninan y R. Verpoorte (2001) Screening of acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A.* 915:217–223.

Rhee I.K., R.M. van Rijn y R. Verpoorte (2003) Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis* 14:127-131.

Rodríguez C. (2003) Cuantificación de la inhibición de crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. En Tornero C.M., J.F. López-Olguín y A. Aragón eds. Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 223-242.

Rogers E.F., H.R. Snyder y R.F. Fischer (1952) Plant insecticides. II. The alkaloids of *Haplophyton cimicidum*. *Journal of the American Chemical Society* 74:1987-1989.

Romanelli G.P., E.G. Virla, P.R. Duchowicz, A.L. Gaddi, D.M. Ruiz, D.O. Bennardi, E. del Valle-Ortiz y J.C. Autino. (2010) Sustainable synthesis of Flavonoid Derivatives, QSAR Study and Insecticidal Activity against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:6290-6295.

Rozman, K.K., J. Doull y W.J.Jr. Hayes. (2001) Dose, time and other factors influencing toxicity En Krieger R.I. ed. Handbook of pesticide toxicology, Vol. 1 Principles. Academic press, San Diego, USA.

Salmore, A.K. y M.D. Hunter (2001) Environmental and Genotypic Influences on Isoquinoline Alkaloid Content in *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*. 27(9):1729-1747.

Savelev, S., E. Okello, N.S.L. Perry, R.M. Wilkins y E.K. Perry (2003) Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavanduleaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75: 661–668.

Saxena S.C. y L. Sumithra (1985) Laboratory evaluation of leaf extract of a new plant to suppress the population of malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Current Science* 54:201–202.

Saxton J.E. (1965) Alkaloids of *Haplophyton cimicidum*. En Manske R.H.F. ed. The Alkaloids: Chemistry and Physiology, Vol 8. Academic Press, New York. Pp. 673-678.

Saxton, J.E. (1998) Alkaloids of the aspidospermine group en Cordell G.A. ed. The Alkaloids: chemistry and biology. Vol 51. Academic Press, New York. Pp. 1-197.

Seigler, D.S. (1998) Plant secondary metabolism. Kluwer Academic, Boston. 759p.

Schapira A.H. (2010) Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Experimental Neurology* 224:331-335.

Schoonhoven L.M. (1993) Insects and phytochemicals -nature's economy. En Van Beek T.A. y H. Breteler eds. Phytochemistry and agriculture. Clarendon Press, Oxford. Pp 1-17.

Scott I.M., H.L. Jensen, B.J.R. Philogène y J.T. Arnason (2008) A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*. 7(1):65-75.

Shaalan E.A., D. Canyon, M.W.F. Younes, H. Abdel-Wahab, A. Mansour (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential, *Environment International* 31(8):1149-1166.

Sheng R., Z. Lin, J. Zhang, K.S. Chol, W. Huang, B. Yang, Q. He y Y. Hu (2009) Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17:6692-6698.

Silva G., A. Lagunes, J.C. Rodríguez, D. Rodríguez (2002) Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:4-12.

Simmonds M.S.J., W.M. Blaney, F. Delle Monache y G.B., Marini Bettolo (1990) Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *Journal of chemical ecology* 16(2):365-380.

Simmonds, M.S.J. (2001) Importance of flavonoids in insect–plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56(3):245-252.

Sintim H.O., T. Tashiro y N. Motoyama (2009) Response of the cutworm *Spodoptera litura* to sesame leaves or crude extracts in diet. *Journal of insect science* 9:52.

Snyder H.R., R.F. Fischer, J.F. Walker, H.E. Els y G.A. Nussberger (1954a) The insecticidal principles of *Haplophyton cimicidum*. I. Haplophytine. *Journal of the American Chemical Society* 76:2819-2825.

Snyder H.R., R.F. Fischer, J.F. Walker, H.E. Els y G.A. Nussberger (1954b) The insecticidal principles of *Haplophyton cimicidum*. II. Haplophytine and cimicidine. *Journal of the American Chemical Society* 76:4601-4605.

Sparks A.N. (1979) A review of the biology of the fall armyworm. *The Florida Entomologist* 62(2):82-87.

Speight M.R., M.D. Hunter, A.D. Watt (2008) Ecology of insects: concepts and applications. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ. 628p.

Standley P. (1924) Contributions for the USA National Herbarium. Vol. 23, Part 4:1162. Washington, EUA.

Sukumaran S., R.R. Almon, D.C. DuBois, W.J. Jusko (2010) Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(9-10):904-917.

Taiz L. y E. Zeiger (2002) Plant Physiology. Sinauer Associates Inc. Sunderland, USA. Pp 283–308.

Tanner C.M., F. Kamel, G. Webster Ross, J.A. Hoppin, S.M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G.S. Bhudhikanok, M. Kasten, A.R. Chade, K. Comyns, M. Barber Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D.M. Umbach, A. Blair, D.P. Sandler y J.W. Langston (2011) Rotenone, Paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspectives* (119)6:866-872.

Tang L. y J.W. Eaton (1999) Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. *Molecular Medicine*, 5(6):351-358.

Tunaz H. y N. Uygun (2004) Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 28:377-387.

Ujváry I. (2001) Pest control agents from natural products. En Krieger R.I. ed. Handbook of pesticide toxicology, vol 1 Principles. Academic Press, San Diego, USA.

U.S. EPA (2007) Reregistration elegibility decision for rotenone. Marzo, EPA 738-R-07-005.
Disponible en: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/rotenone_red.pdf

Van Beek T.A. y H. Breteler eds.(1993) Phytochemistry and agriculture. Clarendon Press, Oxford. pp xiii-xxv.

Vas, Á. y B. Gulyás (2005) Eburnamine derivatives and the brain. *Medicinal Research Reviews* 25(6):737-757.

Wang F., M. Shing, Y. Huen, S.Y. Tsang y H. Xue (2005) Neuroactive flavonoids interacting with GABAA receptor complex. *Current drug targets-CNS and neurological disorders*. 4(5):575-585.

Wagner, H. y S. Bladt. (1996). Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Germany. 384 pp.

Weiss, M.R. (2006) Defecation behavior and ecology of insects. *Annual Review of Entomology*. 51:635-661.

Wheeler D.A., M.B. Isman, P.E. Sanchez-Vindas y J.T. Arnason. (2001) Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodopera litura* (Lepidoptera:Noctuidae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 29:347-358.

White P.S. (1980) *Tephrosia*. *Annals of the Missouri botanical garden*. 67(3):777-783.

Williams, J.K. (1995) Miscellaneous notes on *Haplophyton* (Apocynaceae: Plumerieae: Haplophytinae). *SIDA Contributions to Botany*. 16(3):469-475.

Wink M. (1993) Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. En Van Beek T.A. y H. Breteler eds. Phytochemistry and agriculture. Clarendon Press, Oxford. Pp 171-213

Yamamoto I. (1970) Mode of action of Pyrethroids, Nicotinoids and Rotenoids. *Annual Review of Entomology*, 15(1):257-272.

Yurk B.P. y J.A. Powell (2010) Modeling the effects of developmental variation on insect phenology. *Bulletin of Mathematical Biology*. 72:1334-1360.

ANEXO A. REVELADORES

A1. Revelador de anisaldehído (Wagner y Bladt, 2006)

Detección de terpenoides, propilpropanoides, saponinas, glicósidos y esteroides.

Se prepara alcohol acidulado: 90% (v/v) metanol; 5% (v/v) ácido sulfúrico; 5% (v/v) ácido acético. Se agregan 100 μL de p-anisaldehído en 20 mL de alcohol ácido. La placa se asperja y se calienta en la estufa por 5-10 minutos.

A2. Reactivo de Dragendorff (Wagner y Bladt, 2006)

Detección de alcaloides.

Solución A. 0.85 g de nitrato básico de bismuto en 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua caliente. Filtrar si es necesario.
Solución B. 8 g de yoduro de potasio en 30 mL de agua.
Solución stock. Las soluciones A y B se mezclan 1:1
La solución para asperjar se prepara al momento: 1 mL de la solución stock, 2 mL de ácido acético glacial y 10 mL de agua. La placa se calienta en parrilla por 5-10 minutos. Se observa en luz visible.

A3. Revelador de Liebermann – Burchard (Wagner y Bladt, 2006)

Detección de triterpenos, y esteroides.

5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado se añaden cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto en un baño de hielo. El reactivo se usa recién preparado. La placa asperjada se calienta a 100 °C durante 5-10 minutos. Se observa en luz visible.

A4. Revelador de van Urk (Wagner y Bladt, 2006)

Detección de alcaloides indólicos.

1 g de 4-dimetilaminobenzaldehído se disuelve en 50 mL de HCl al 36% y 50 mL de EtOH.

A5. Revelador de Productos Naturales/Polietilenglicol (RPN/PEG) (Wagner y Bladt 2006, Liu et al. 1989)

Detección de flavonoides.

Solución A. 2-aminoetil difenilborato (2-APB, Sigma D9754) al 1% en metanol.

Solución B. Polietilenglicol 4000 al 5% en metanol.

La placa se asperja primero con la solución A y posteriormente con la solución B. Se observa con luz UV_{365}. La comparación entre coloraciones de la mancha antes y después del revelado proporciona información acerca de la posible estructura del compuesto.

ANEXO B. PREPARACIÓN DE LA DIETA PARA Spodoptera

Para preparar un kilogramo de la dieta merídica son necesarios 800 mL de agua destilada, 10 g de agar, 232.5 g de una mezcla sólida ya preparada [60 g de dieta para *Diatraea grandiosella* (Product #F0635 Southwestern Corn Borer, Bio-Serv, Canada), 100 g de maíz molido, 20 g de espiga de maíz esterilizada, 40 g de levadura de cerveza, 10 g de vitaminas (Vitamin mix fortification lepidoptera, Bio-Serv, Canada), 0.6 g de sulfato de neomicina y 1.7 g de metil paraben, 2.5 mL de formaldehído y 1.7g de ácido sórbico disueltos en 17 mL de etanol caliente. El procedimiento es el siguiente:

El agar se disuelve en 100 mL de agua destilada, se añaden 400 mL de agua, se hierve la disolución. Se agregan 300 mL de agua destilada fría y se transfiere todo al vaso de una licuadora de tipo doméstico. Se incorpora a continuación la mezcla sólida y se comienza a licuar, añadiendo los 2.5 mL de formaldehído y la disolución de etanol caliente y ácido sórbico. Después de licuarse por un minuto, la dieta recién preparada se vierte en recipientes de polietileno que son cubiertos y mantenidos en refrigeración hasta que es requerida.

ANEXO C. REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Previamente se decoloran los extractos con carbón activado en baño María por 5 minutos, a continuación se prepara una solución madre con una concentración de 5 mg/mL, de la cual se toma lo necesario para usarse en las pruebas.

C1. Liebermann – Burchard

Detección de triterpenos, y esteroides.

En un tubo de ensayo se mezclan 1 mL de cloroformo a 0° y 1mL de anhídrido acético, dejándolo resbalar por las paredes. Se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. 1 mL de éste reactivo se pone en contacto con los extractos previamente secos y redisueltos en cloroformo. Se considera positiva si se observa un cambio de coloración a rosa, naranja, verde o azul.

C2. Shinoda

Detección de flavonoides.

Se agrega una limadura de magnesio y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado a un tubo de ensayo que contiene el extracto previamente seco y redisuelto en metanol. Se considera positiva si se observa un cambio de coloración a anaranjado, violeta o azul.

C3. Dragendorff

Detección de alcaloides

Los extractos se disuelven en metanol, se adiciona una gota de HCl concentrado y dos gotas del reactivo de Dragendorff. La prueba se considera positiva si se presenta un precipitado anaranjado-marrón.

C4. Ácido silicotúngstico

Detección de alcaloides

Se disluelven 50g de ácido silicotúngstico en ácido sulfúrico 6N para obtener 100 mL de solución, ésta se agrega al extracto. La aparición de un precipitado indica resultado positivo

C5. Molisch

Detección de glicósidos.

Las muestras se disuelven en metanol. Se agregan dos gotas una solución al 5% de α-naftol en etanol, seguidas de 1 mL de H_2SO_4 concentrado dejándolo deslizar por las paredes del tubo con el fin de formar dos fases. La evaluación de la prueba se efectúa observando la coloración del anillo en la interfase. Se considera positiva cuando se observa un color violeta.