

---

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Y AGROPECUARIAS**

---

---

**DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



**EFFECTO INSECTICIDA EN *Culex quinquefasciatus* (Say)**  
**DE EXTRACTOS Y FRACCIONES**  
**CROMATOGRAFICAS**  
**DE MELIACEAE.**

---

---

**TESIS PROFESIONAL**  
**QUE PRESENTAN**  
**PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**INGENIERO AGRONOMO FORESTAL**  
**GERARDO LARA GOMEZ**  
**INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA**  
**RUBEN PEREZ BECERRA**  
**GUADALAJARA, JALISCO. MAYO DE 1996.**

---

---



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara ( C.U.C.B.A.) División de Ciencias Agronómicas por la oportunidad de formación y preparación recibida.

A la Escuela Superior de Agricultura «Hermanos Escobar» por ser la raíz de este fruto hoy logrado. En especial a todos los maestros por su enseñanza acertada.

Al Laboratorio Química de la Madera del Departamento de Madera, Celulosa y Papel. por la facilidad otorgada para llevar a cabo las extracciones de este trabajo.

Al Dr. Marcelino Vásquez García por la orientación, coordinación y desarrollo brindado como director de este trabajo de tesis.

Al Dr. Servando Carbajal Hernández por las sugerencias y su atenta asesoría en la redacción y revisión del manuscrito.

Al M.C. Guillermo Ochoa Ruíz por su ayuda y colaboración y atención otorgados como asesor del presente trabajo.

A los Ing. Luis Manuel Angulo Vargas y Ing. Luis Angel Vásquez Estrada por su colaboración en la parte química de este trabajo y por su amistad brindada.

Al Ing. José Alvaro Labrador Aceves, por su apoyo y facilidades brindadas para la elaboración de las laminas.

A los compañeros de los grupos de Fitotecnia, Forestal y a la generación 90 - 95 por su amistad y entusiasmo durante el desarrollo del presente trabajo.

Gerardo Lara Gómez y Rubén Pérez Becerra.

Agradezco profundamente, a quienes tuvieron un gran interés en el trabajo realizado; brindándome su valioso apoyo y su gran amistad.

A mis padres : Sra. Leonor Becerra de Pérez.

Sr. Juan José Pérez Díaz.

Ya que su ejemplo de honestidad que me han profesado y cuyo esfuerzo y entusiasmo lograron e hicieron posible la firme consolidación de un paso más en mi formación profesional. De igual forma a mis hermanos : Yesenia, Martha Beatriz, José alfredo, Liliana, San Juanita y «Alfredin» (mi sobrino). A mis Tíos, Primos y mi abuelito Victor. Quienes muy especialmente siempre de ellos recibí su gran respaldo motivante a lograr metas y por su amplia contribución a mi superación.

A mis grandes Amigos :

Ing. Alma Leticia Manriquez Uzarraga (Psique).

Rogelio A. Pinal Castellanos y su esposa

L.A.E. Teresa I. Ruiz Diaz.

Efraín Avila V. y su esposa Alma Hernández J.

Cuahtémoc Orozco Quiñones.

Lic. Gerardo Castro Castro.

Cual comprensión y amistad consolidada idearon siempre. Muy especial a quien aviva la fuerza impresa en un cúmulo de cosas y siempre ilumina su beldad a mi pensamiento....

.....Carmina Idaly Acosta Hernández.

A Dios principalmente quien me conserva con salud y hace posible que hoy les dedique este trabajo producto del inmenso apoyo que recibí de todos ellos.

Rubén Pérez Becerra.

## **DEDICATORIA.**

A mi Padre que confió en mí.

A mi Madre que me apoyo en todo momento.

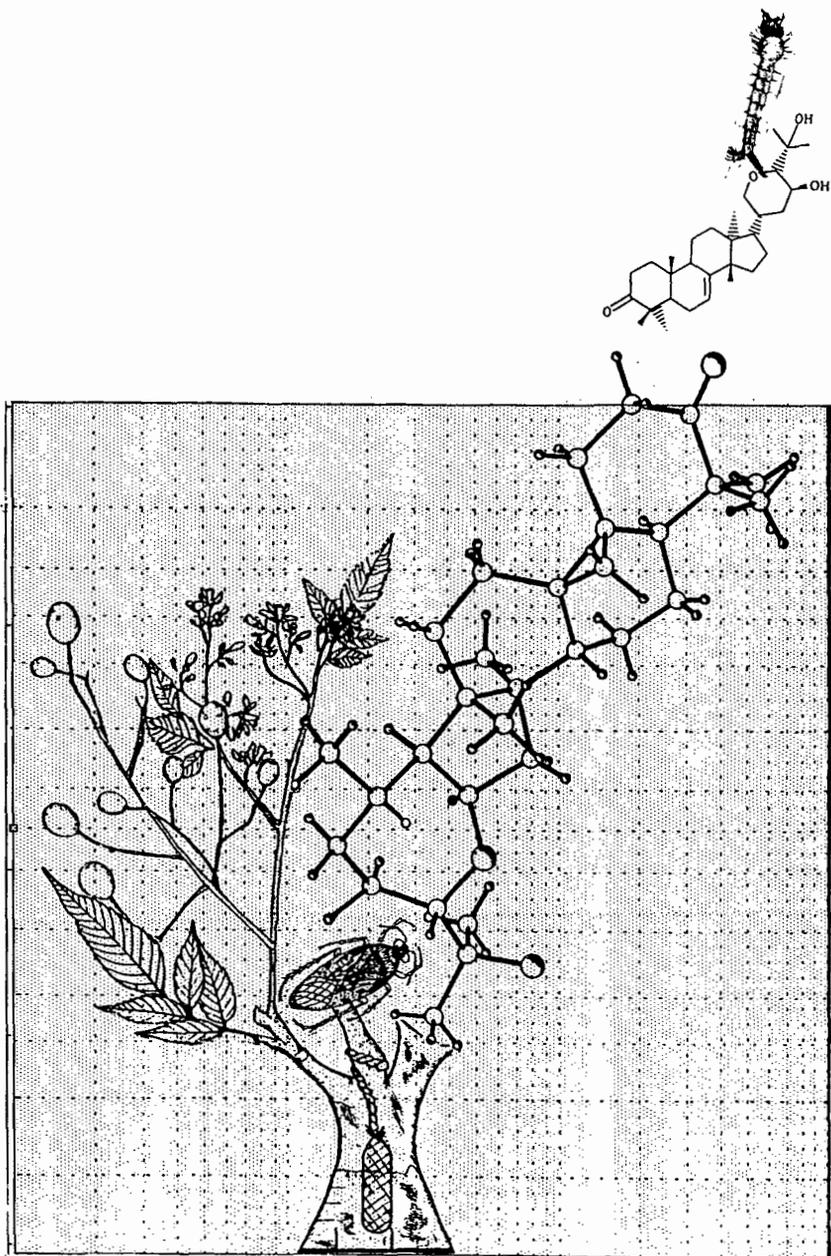
A mis hermanos que me ofrecieron estímulos para seguir este camino.

A la E.S.A.H.E. que me inició en esta formación.

A la U de G. que me abrió sus puertas.

A todos mis amigos y compañeros.

Gerardo Lara Gómez.



# CONTENIDO

	página
Índice de Figuras . . . . .	i
Índice de Cuadros . . . . .	ii
RESUMEN . . . . .	iii
<b>I. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos . . . . .	3
1.2. Hipótesis . . . . .	4
<b>II. ANTECEDENTES . . . . .</b>	<b>5</b>
2.1. Uso de Plantas bioactivas de la familia Meliaceae en el control de insectos . . . . .	7
2.1.1. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. . . . .	7
2.1.2. <i>Melia azedarach</i> L. . . . .	9
2.1.3. <i>Trichilia hirta</i> L. . . . .	13
2.2. Productos metabólicos secundarios . . . . .	17
2.2.1. Terpenos aislados y caracterizados en los géneros <i>Trichilia</i> y <i>Melia</i> (Meliaceae) . . . . .	21
2.3. Plasticidad de respuesta de los mamíferos herbívoros a las defensas químicas de las plantas . . . . .	22
2.4. Separación cromatográfica en columna . . . . .	24
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .</b>	<b>26</b>
3.1. Recolección de material vegetal . . . . .	26
3.1.1. Separación y triturado de frutos . . . . .	26
3.2. Extracciones . . . . .	27
3.2.1. Obtención de Fracciones . . . . .	28
3.3. Indicios de naturaleza química . . . . .	30
3.3.1. Método Caín y colaboradores . . . . .	30

3.4.	Pruebas de materia insaponificable . . . . .	31
3.4.1.	Prueba de Lieberman-Burchard . . . . .	31
3.5.	Colecta y cría del mosquito ( <i>Culex quinquefasciatus</i> Say.)	32
3.6.	Bioensayos . . . . .	33
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>35</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>42</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES . . . . .</b>	<b>43</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITADA . . . . .</b>	<b>44</b>
<b>VIII.</b>	<b>APENDICE . . . . .</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

Figuras	C O N T E N I D O	Página
A.	<i>Melia azedarach</i> L. A: Rama con inflorescencia; B: Flor; C: Infrutescencia . . . . .	10
B.	<i>Trichilia hirta</i> L. A: Rama con inflorescencia; B: Flor; C: fruto y semilla . . . . .	15
1.	Vía biosintética de terpenos en plantas . . . . .	20
2.	Diagrama esquemático de la extracción . . . . .	29
3.	Espectro de susceptibilidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say. en extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz . . . . .	51
4.	Espectro de susceptibilidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say. en extracción en Soxhlet . . . . .	52
5a.	Espectro de susceptibilidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , Say. en fracciones de separación por columna. ( <i>T. hirta</i> ) . . . . .	53
5b.	Espectro de susceptibilidad de larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> , Say. en fracciones de separación por columna. ( <i>M. azedarach</i> ) . . . . .	54

## Índice de cuadros

Cuadro	C O N T E N I D O	Página
1.	Concentraciones empleadas para las dos especies en cada extracción . . . . .	34
2.	CL <sub>50</sub> de extractos de <i>Trichilia hirta</i> L. sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> Say. . . . .	36
3.	CL <sub>50</sub> de extractos de <i>Melia azedarach</i> L. sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> Say. . . . .	37
4.	Comparación de toxicidad de los extractos de <i>Melia azedarach</i> L. y <i>Trichilia hirta</i> L. a el extracto acuoso de semilla del Neem. . . . .	40



BIBLIOTECA CENTRAL

## RESUMEN

Esta investigación se enfocó al estudio de los metabolitos secundarios (terpenos) con actividad insecticida que producen dos especies de la familia Meliaceae: *Melia azedarach* L. y *Trichilia hirta* L. Los cuales pueden constituir una alternativa eficaz no contaminante, para el control de algunos insectos plaga.

Este trabajo se realizó en forma interdisciplinaria con el Laboratorio de Química de la Madera del Departamento de Madera, Celulosa y Papel (DMCyP), de la Universidad de Guadalajara. Allí, mediante el apoyo de ingenieros químicos, se llevaron a cabo las extracciones con solventes universales oleofílicos. Para ello se utilizaron dos vías: la primera es conocida como lixiviación en Matraz Soxhlet, la segunda es una extracción agitada con atmósfera inerte e inhibición de luz. Por otra parte, en el Laboratorio de parasitología vegetal del Departamento de Producción Agrícola, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), se efectuaron los bioensayos para la determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), sobre larvas del 2º estadio tardío al 3º temprano de mosquitos (*Culex quinquefasciatus* Say). Las líneas de respuesta Ld-P (Logaritmo-dosis-probits) se obtuvieron mediante análisis Probits.

Los resultados indican que *Trichilia hirta* mostró mayor actividad insecticida que *Melia azedarach* sin importar el método de extracción; pero fue más evidente cuando la comparación se hizo con el parámetro de factor de actividad relativa/*Azadirachta indica* A. Juss. en extracto acuoso.

## I. INTRODUCCIÓN

La inmensa mayoría de los animales que habitan la tierra son invertebrados, sobre todo insectos, cuyo grupo comprende, según la opinión de varios autores, alrededor de 700,000 especies. Son importantes por el papel que juegan en los diversos ecosistemas; algunos son útiles por elaborar productos que son aprovechados por el hombre. Sin embargo, de entre ellos también se puede destacar un grupo que tiene importancia económica negativa debido, en gran parte, a su competencia y a la destrucción de la producción agrícola-industrial. Otros más, actúan indirectamente como transmisores cíclicos de hongos, bacterias, helmintos, protozoarios, virus y otros que atacan a organismos vivos, causándoles enfermedades importantes. Por esa razón el hombre ha buscado, a lo largo del tiempo, los medios de mayor efectividad y los más factibles en la lucha contra las plagas de insectos.

Desde el advenimiento del DDT, en los últimos 50 años se han usado muchos insecticidas orgánicos sintéticos para el control de las plagas en la agricultura, la ganadería, la forestería y en zonas urbanas, pero su uso indiscriminado y el mal manejo, provocan que algunos insectos adquieran resistencia a ellos. Por otro lado, es conveniente mencionar que la alteración de los ecosistemas se ha debido a su impacto directo pero sobre todo, a la acumulación de residuos tóxicos a través de la cadena alimenticia, así como en el suelo, el aire y el agua.

Desde siempre, han existido relaciones muy estrechas entre las plantas y los insectos lo que permiten su coevolución. La mayoría de ellos son herbívoros, pero para contrarrestar su efecto los vegetales desarrollaron metabolitos secundarios que actúan como repelentes, antialimentarios o tóxicos, que son mecanismos de autodefensa contra los fitófagos. Las plantas concentran dichas sustancias sobre todo en las partes más vulnerables como son las hojas, los frutos y en general en la cubierta externa. Existen muchas investigaciones relacionadas con el estudio de los compuestos elaborados por las plantas para su defensa contra fitófagos, pero todavía se desconocen los principios activos de muchos de ellos, así como su efecto en determinados insectos.

El «árbol del Neem» (*Azadirachta indica*), es una especie nativa de la India, que ha sido objeto de numerosos estudios fitoquímicos. Los productos de él obtenidos se han utilizado con diversos fines, lo que permite su explotación comercial en algunos países de Asia. La peculiaridad de estos productos se relaciona con su formulación elemental fácilmente degradable.

En su mayoría, los extractos crudos proporcionan diferentes formas de regulación de la actividad biológica de los insectos, en algunos se alteran su fecundidad o su metamorfosis, mientras que en otros inhibe el consumo de alimentos.

Estas sustancias terpenoides obtenidas de plantas bioactivas, pueden ser extraídas mediante solventes oleofílicos por su similitud a los esteroides y en algunos casos, con el uso de solventes acuosos. Estas extracciones se han hecho comunes en los últimos años, y tienen gran potencial, por su escaso impacto y poco deterioro del ambiente.

Con base en lo anterior la ciencia en el mundo, se ha abierto un camino para la búsqueda de nuevos productos vegetales, capaces de interferir en los procesos vitales propios de los insectos y con escasa o nula influencia sobre los animales superiores, las plantas y en general, sobre el ambiente.

*Melia azedarach* L. y *Trichilia hirta* L. son dos representantes tropicales de la familia Meliaceae. La primera de ellas de origen asiático, es conocida ampliamente por encontrarse como planta urbana en muchas de las ciudades de la República Mexicana. La otra especie que prolifera en forma espontánea en muchos de los bosques tropicales caducifolios de México.

De acuerdo a Waterman (1993) señala que en el orden Rutales, el cual comprende a la familia Meliaceae y otras mas, se considera por su tamaño entre los más ricos y más diversas fuentes de metabolitos secundarios entre las Angiospermas.

Con estos antecedentes, nos propusimos extraer y separar de los frutos de estas dos especies, compuestos bioactivos, los cuales se sabe que influyen en forma negativa en los procesos vitales de ciertos insectos.

Esta investigación se llevo a cabo en Laboratorio de Parasitología Vegetal de la División de Ciencias Agronómicas del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; se cubrió un período de 22 meses a partir de febrero de 1994. Los resultados obtenidos son parciales pero serán de gran utilidad para futuras investigaciones.

## OBJETIVOS

- Determinar métodos de extracción y separación de sustancias a partir de los frutos de ambas especies y con actividad en la regulación del crecimiento de insectos.
- Determinar la  $CL_{50}$  (Concentración letal media) de los extractos en etanol de los frutos de *Melia azedarach* L. y *Trichilia hirta* L. en base a la mortalidad al momento de las mudas larva-larva, larva-pupa y la emergencia de adultos de *Culex quinquefasciatus*. Say. como índice de actividad biológica relativa.
- Conocer los indicios de la naturaleza química de los compuestos responsables de la actividad biológica de las especies estudiadas, mediante pruebas simples colorimétricas.

## HIPÓTESIS

Los extractos de *Melia azedarach* L. poseen sustancias terpenoides, reguladoras de crecimiento, antialimentarios, antagonistas de la fecundidad y la ovoposición, por lo tanto los extractos de especies relacionadas taxonómicamente como lo es *Trichilia hirta* L. pueden contener compuestos similares con una actividad similar.

## II. ANTECEDENTES.

La presencia de sustancias químicas en las plantas que regulan el crecimiento, la reproducción y el desarrollo de los insectos, es un fenómeno ecológico intrigante y como señala Norris (1986), los conocimientos actuales indican que la resistencia química que poseen las plantas es uno de los principales componentes del arsenal defensivo total de las plantas contra los herbívoros; su composición es muy diversa y su eficacia es excelente.

De acuerdo con Vickery (1987), el reino vegetal en conjunto produce un espectro verdaderamente amplio de compuestos tóxicos, una especie individual por lo general produce sólo un tipo de compuestos, aún más, familias completas de plantas pueden caracterizarse por el tipo de compuestos secundarios que producen sus miembros.

Las plantas tropicales ofrecen una rica e intrigante fuente de metabolitos secundarios que poseen atractivas propiedades plaguicidas. Estos fitoquímicos son principalmente biodegradables y, lo más importante, son renovables. Debido principalmente a que las interacciones bióticas en los trópicos son intensas y esto conduce a la dinámica evolución de una gran diversidad de fitoquímicos.

Según Kubo (1993), el uso de estos materiales, podría eventualmente proveer una alternativa de control efectivo para plagas de insectos, que presenten problemas de resistencia y de la producción.

Por su parte Mauchamp (1992), menciona que las defensas químicas de las plantas generalmente pasan desapercibidas pero son más comunes de lo que se cree, estas defensas químicas están muy desarrolladas en las plantas e involucran numerosos mecanismos, la planta sintetiza permanentemente o de manera inducida, moléculas del metabolismo secundario (aleloquímicas) que de encontrarse en cantidades importantes dentro de la planta, le confieren una protección espontánea ante los ataques de insectos. Existen varios miles de moléculas químicas dentro de las plantas en forma natural, son compuestos altamente tóxicos para los insectos y poco dañinos para los vertebrados.

Rembold y Puhmann (1993), en el estudio de algunas especies hacen referencia a que estas sustancias extraídas de plantas e identificadas químicamente, mostraron una fuerte acción disuasiva de la alimentación y una interrupción en el proceso normal de asimilación esencial para el crecimiento y desarrollo de los insectos; señalan también, que esto se debe a la interac-

ción del metabolito respectivo con un quimiorreceptor definido alimentario del insecto, ó el efecto sobre el crecimiento y desarrollo se base en el disturbio sobre la regulación hormonal de la metamorfosis y de la reproducción.

Si se considera lo que mencionan Arnason *et al.* (1993), la investigación de insecticidas fitoquímicos se ha enfatizado sobre los modos de acción no neurotóxicos. Estos nuevos modos de acción podrían reducir el riesgo de resistencia cruzada en poblaciones de insectos que presentan resistencia a neurotóxicos.

En fechas recientes, se empezó a abrir posibilidades, dada la gran abundancia de compuestos secundarios, con propósitos de control de plagas (Cutler, 1988; Duke, 1986; Lydon & Duke, 1989). Los terpenoides son quizá los ejemplos más sobresalientes del uso de estos compuestos como plaguicidas.

Se ha comprobado que en los sistemas naturales de defensa de las plantas, *v.gr.* sustancias que actúan disuadiendo la alimentación de los insectos plaga sobre algunas especies, no tiene el mismo efecto en otras (Schoonhoven, 1982; Norris, 1986).

Además menciona Elakovich (1988) que se han escrito trabajos acerca de los compuestos secundarios del potencial que estos tienen como plaguicidas al utilizarse como agroquímicos.

## 2.1. Uso de plantas bioactivas de la familia Meliaceae en el control de insectos.

La familia Meliaceae comprende según Takhtajan (1987), alrededor de 53 géneros y casi 1350 especies conocidas de los trópicos y subtrópicos del mundo. Muchos insectos son incapaces de atacar algunas plantas debido a la presencia de sustancias particularmente nocivas contenidas en ellas (Fraenkel, 1969).

### 2.1.1. *Azadirachta indica* A. Juss.

De acuerdo con Taveras (1991), se incluye en esta familia el «árbol del Neem» (*A. indica*), una especie nativa de la india, resistente a la sequia y aceptada como planta de ornato, siendo reconocida en los tiempos de la colonia Británica, por lo que fue distribuida en las regiones tropicales, particularmente el este y oeste de Africa, Sudan y ahora se encuentra también en las Guayanas hasta Australia.

Como ya se mencionó, éste árbol produce sustancias que son utilizadas como insecticida repelente, inhibidor del crecimiento y la locomoción, modificador de la fecundidad y capaz de provocar la muerte. En efecto, de la semilla, casi un 50% es aceite y se obtiene con el triturado y prensado para separarlo de la torta o residuo y se emplea para repeler piojos, pulgas y acaros. De dicho aceite se sintetiza la *Azadiractina*, un tetranortriterpenoide cuyas propiedades de disuadir al insecto del hábito de alimentarse es muy eficaz y tiene un espectro relativamente amplio. Se ha recomendado como una herramienta útil para controlar insectos de granos almacenados e insectos defoliadores. La torta del resto de la semilla, cuando se ha extraído el aceite se emplea de varias formas: en preparados acuosos, como polvo de torta para protección de semilla de leguminosas y cereales; y en extracto alcohólico de torta para el control de plagas chupadoras y masticadoras en cultivos hortícolas.

Los extractos crudos derivados del «neem» en su mayoría son obtenidos con solventes orgánicos; sin embargo, la degradación por los rayos ultravioleta es estimada en un 65% con una exposición de 14 hr a los rayos del sol. Estos factores limitan su eficacia media cuando es utilizada para el control. Con el fin de lograr un derivado estable de *Azadiractina*, Azizol *et al.* (1991) estudiaron la bioquímica de sus grupos funcionales.

Kraus *et al.* (1986) por su parte, reportaron el efecto de la inhibición de la metamorfosis de las etapas juveniles de *Epilachna varivestis* y de *Spodoptera frugiperda*. Asimismo, en estudios realizados por De Souza *et al.* (1984), con *Rhodnius prolixus* encontró que su efecto fue tanto de inhibición alimentaria como en el proceso de la muda.

### 2.1.2. *Melia azedarach*, L.

Nombres comunes: (*sensu* Martínez 1979)

- «Canelo» (San Luis Potosí)
- «Cinamon» (Región de Guadalcar, S.L.P.)
- «Granillo» (Oaxaca)
- «Lila de china» (Nuevo León y S.L.P.)
- «Paraíso» (Michoacán, Veracruz, Yucatán y Jalisco).

Calderón y Germán (1993) describen a esta especie como un árbol hasta de 18 m, pero por lo común de alrededor de 10 m o menos de alto, tronco de hasta 40 cm de diámetro, las partes jóvenes provistas de pubescencia de pelos simples mezclados con pelos estrellados.

Hojas por lo general bipinnadas, de 20 a 50 cm de largo incluyendo el pecíolo y unos 15 a 25 cm de ancho, terminando en un sólo folíolo, foliolos numerosos, cortamente peciolulados, ovados o lanceolados, de (2) 3 a 8 cm de largo y (1) 2 a 3 cm de ancho, ápice agudo a largamente acuminado, base cuneada a subcordada, a veces asimétrica, borde crenado a aserrado, a veces lobado.

Panículas axilares, laxas, de 10 a 20 cm de largo, pedicelos finos, hasta de 1.5 mm de largo; Flores aromáticas; sépalos ovados o lanceolados, de unos 2 mm de largo, pubescentes; pétalos blanquecinos o rosados a color violeta, oblanceolados, de (5) 8 a 10 (12) mm de largo a veces finamente pubescentes sobre su superficie exterior; estambres 10 (12), tubo estaminal morado, de (4) 6 a 8(10) mm de largo, 10 a 12-acostillado, terminando en otros tantos apéndices alargados, a su vez hendidos o fimbriados; ovario 5-locular, estilo de unos 5 mm de largo, con 5 lóbulos estigmáticos.

Drupas lisas, amarillas (a negras en ejemplares de herbario), colgando en forma vistosa por grupos, globosas, carnosas, de 1 a 1.5 (2) cm de diámetro, conteniendo en cada lóculo una sola semilla alargada, de unos 7 mm de largo (fig. A).

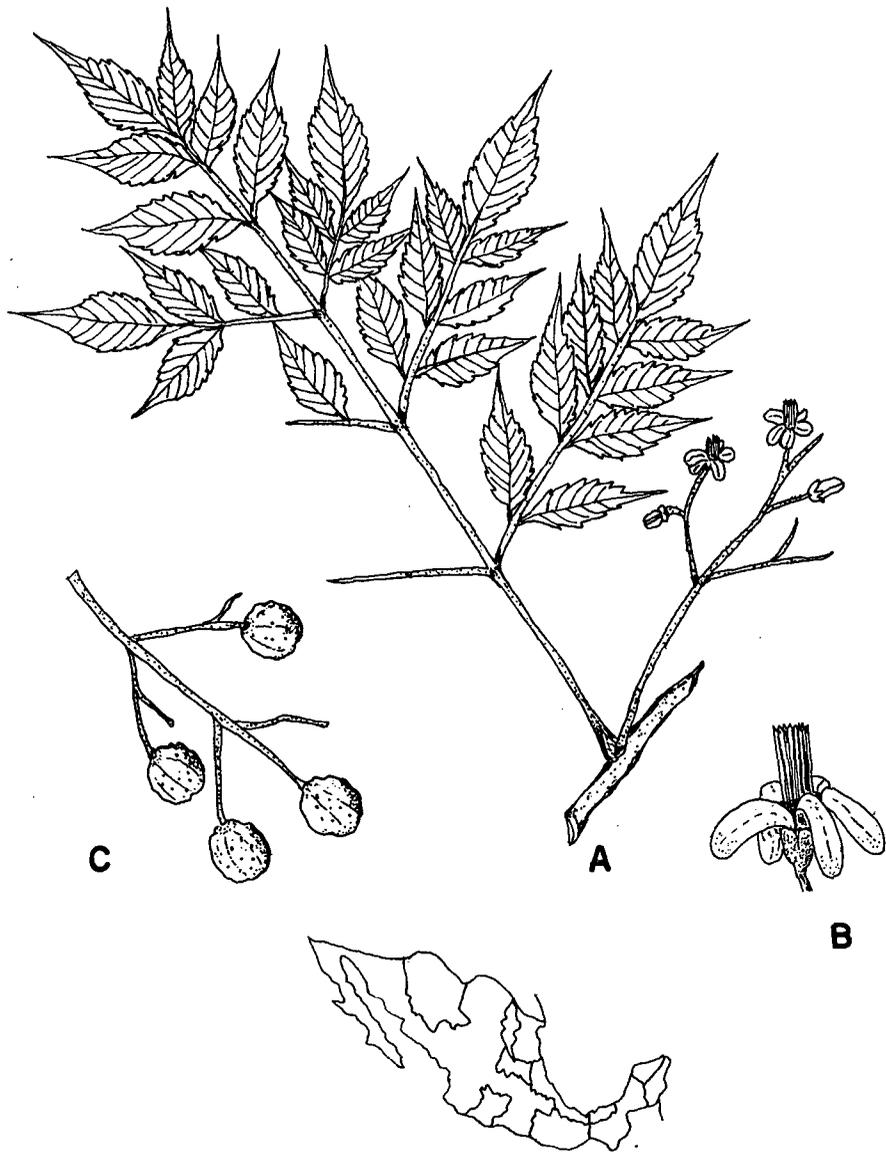


Fig. A *Melia azedarach* L. A rama con inflorescencia, B flor y C infrutescencia.

Es un árbol introducido, se le observa ya naturalizado en zonas de vegetación secundaria derivada del bosque tropical subcaducifolio. Por lo general a alturas que van de los 300-1100. Se considera que fue introducido en México, Centroamérica y Las Antillas procedente de la península Ibérica poco después de la conquista.

Se atribuye a esta planta numerosas y variadas propiedades. Su propagación es relativamente fácil por semilla y otros medios, de rápido crecimiento y agradable aspecto, pero es más bien de vida corta y de ramas quebradizas. Su contenido de metabolitos secundarios, la hace útil como medicinal y como insecticidas, lo cual también la hace peligrosa, pues algunas sustancias, sobre todo en los frutos, son sumamente tóxicas (Aplin, 1980). El hueso duro que contiene los frutos se usan en la manufactura de collares y pulseras. Este árbol esta estrechamente emparentado con el árbol llamando «neem», especie nativa de las montañas Himalayas de la India (Taveras, 1991). Se cultiva como ornamental en avenidas y jardines; existen diversas variedades que se han reportado de los estados de Chihuahua, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz y Yucatán (González, 1989).

Esta especie se considera estética por su abundante y bonita floración, se utiliza plantaciones lineales. Es muy rústico y requiere pocos cuidados. Es indiferente en cuanto a la naturaleza del suelo aunque prefiere los arenosos.

Resistente al calor, al frío y a la sequía ambiental, pero necesita cierta humedad en el suelo. Aguanta los ambientes contaminados. Indicado para áreas especiales y bordes exteriores de zonas de dominio público. (Anónimo, 1990).

De acuerdo con Jiménez (1991), las partes bioactivas en *Melia azedarach*, son el tallo y sus órganos fructíferos; su efecto es de acción de contacto en forma de extracto acuoso, que actúa como disuasivo para la alimentación y regulador del crecimiento del insecto.

Los extractos crudos de la madera y la corteza de *M. azedarach* tuvieron efectos en las etapas juveniles de *Dysdercus koenigri* Fabr., en donde la metamorfosis fue inhibida de diferente manera y en diversos grados, que tuvieron como consecuencia irregularidades en el desarrollo de varias partes del cuerpo, lo que provocó en un período corto, la muerte de muchos de los insectos; los que sobrevivieron no fueron capaces de reproducirse (Jaipal *et al.*, 1983).

Taveras (1991), menciona que se ha utilizado por esos efectos en el control de plagas tales como «Gusano cogollero» (*Spodoptera frugiperda*), «Gusano de la mazorca» (*Heliothis zea*), «Gusano del repollo» (*Pieris rapae*), «chicharritas» y áfidos en general. En forma de polvo se usa para proteger semillas y harinas del ataque de «gorgojos» y «polillas».

González de Cosío (1984) por su parte, indica que la resina contiene «mangrovina», un alcaloide reconocido por su toxicidad; la «Tazetina» ( $C_{18}H_{21}NO_5$ ) que aparece en el fruto y en la corteza. El fruto seco y las hojas contienen azadiractina que inhibe el apetito de *Locusta migratoria* del desierto y que hasta donde se conoce ha dado buenos resultados; por otra parte, las hojas repelen la polilla.

Olkowski (1988) señala que *melia* tiene otros limonoides tales como «tosendanina» que puede ser efectivo también en el control de insectos.

Según Vásquez (1993) señala que extractos de *Melia* son tan sólo 8.6 veces menos activo que cypermetrina y 2.7 veces menos activos que azadiractina, pero 1.8 veces más activo que el endosulfan y 3.6 veces más activo que el DDT.

Por su parte Sánchez (1994) menciona que *melia* mostró un factor de actividad relativa/*A. indica* de 38, en extractos de pulpa/etanol.

### 2.1.3. *Trichilia hirta*, L.

Sinonimia: *Trichilia spondioidea* Jacq.  
*T. parvifolia* C.DC.

Nombres comunes: (*sensu* Martínez, 1979)

«asapescado»	(Tabasco)
«azuica»	(Sinaloa)
«cabo de hacha»	(Oaxaca)
«cedrillo»	(San Fernando, Chis.)
«cuju»	(Lengua Guarigía, Sonora)
«K'ulimsis»	(Lengua Maya, Yucatán)
«Chuminillo»	(Sonora)
«Napahuite»	(Depresión central y costera de Chiapas)
«Trompillo»	(Cotzoloapan, Chis).
«Ciguelillo»	(El bajío)
«Cabo de hacha»	(Jalisco)

Calderón y Germán (1993) describen a esta especie como un arbusto o más bien un arbolito, facultativamente caducifolio, de 5 a 10 (a veces más) metros de altura.

Ramas tiernas esparcidas o con más frecuencia densamente pubescentes, pasando con el tiempo a glabras, provistas de lenticelas evidentes.

Hojas imparipinnadas, de (5) 10 a 30 (50) cm de largos, incluyendo el pecíolo que, junto con el raquis, suele ser pubescente, foliolos (9) 13 a 21, opuestos o subopuestos, sobre peciolulos de (1) 3 a 5 (7) mm (a veces más de 1 cm en el fófolo terminal) de largo, ovado-lanceolado a oblongo-lanceolado, de (3) 4 a 10 (14) cm de largo y [1.52 a 3 (4.5)] cm de ancho, ápice por lo general acuminado, base redondeada a cuneada, con frecuencia oblicua en mayor o menor grado, con nervaduras media y laterales por lo común evidentes, membranáceos o cartáceos, glabros o algo pubescentes, especialmente en las hojas tiernas o sobre las venas del envés.

Panículas axilares, pedunculadas, más o menos tirsiformes, de 3 a 13 (20) cm de largo, pubescentes o glabras, pedicelos delgados, de (0.5) 1 a 4 (6) mm de largo, articulados hacia la base; flores verdosas, amarillentas o blanquecinas, de alrededor de 8 mm de diámetro; cáliz de 4 ó 5 lóbulos deltoides, agudos, de 1 mm de largo y otro tanto de ancho en la base, por lo común glabros; pétalos 5, libres, oblongos o lanceolados, de alrededor de 5 mm de largo y 2 mm de ancho redondeados o agudos en el ápice, glabros o a veces escasamente pubescentes por fuera o papilosos por dentro; flores masculinas: estambres 8 a 10 amarillentos, tubo estaminal acopado, de 1 a 3 (4) mm de largo, los filamentos unidos por lo general por debajo de la mitad de su largo, truncados o cortamente bilobados en el ápice, con frecuencia barbados en la parte superior, anteras de alrededor de 1 mm de largo y de ancho, pubescentes, pistilodio inmerso en el nectario; flores femeninas: ovario subgloboso, densamente pubescente, estigma capitado o ligeramente discoideo, anteras pequeñas, estériles.

Cápsula dura, verdosa, a veces tirando a blanquecina, globosa a ampliamente ovoide, tendiendo a trígona al secar, lisa, a veces ligeramente verruculosa o granulosa, pubérula, de 0.7 a 1.5 cm de diámetro, abriéndose por medio de (2) 3 valvas.

Semillas por lo común 3 ó 4 (6) por fruto, amarillo-anaranjadas o amarilla-cafés, a veces salpicadas con puntos de color más claro, de 0.5 a 1 cm de largo y hasta 8 mm de ancho, rodeadas al menos en parte por un arilorio carnoso, de color semejante al de la semilla (fig. B).

La especie florece por lo menos dos veces al año: una en la época seca, coincidiendo con el brote de hojas nuevas (de marzo a mayo) y otra, en la época de lluvias (julio a septiembre), según Pennington (1981).

Su distribución en México es en los estados de Tabasco, Chiapas, Guerrero y Oaxaca, forma parte de los bosques tropical subcaducifolio y tropical caducifolio con temperaturas anual media de 20°C y períodos de sequía que van de los 7-8 meses, con precipitaciones de alrededor de 800 mm (Niembro, 1986).

En virtud de su amplia distribución geográfica y propensión en participar en la vegetación secundaria esta especie no presenta problemas de sobrevivencia en la actualidad.

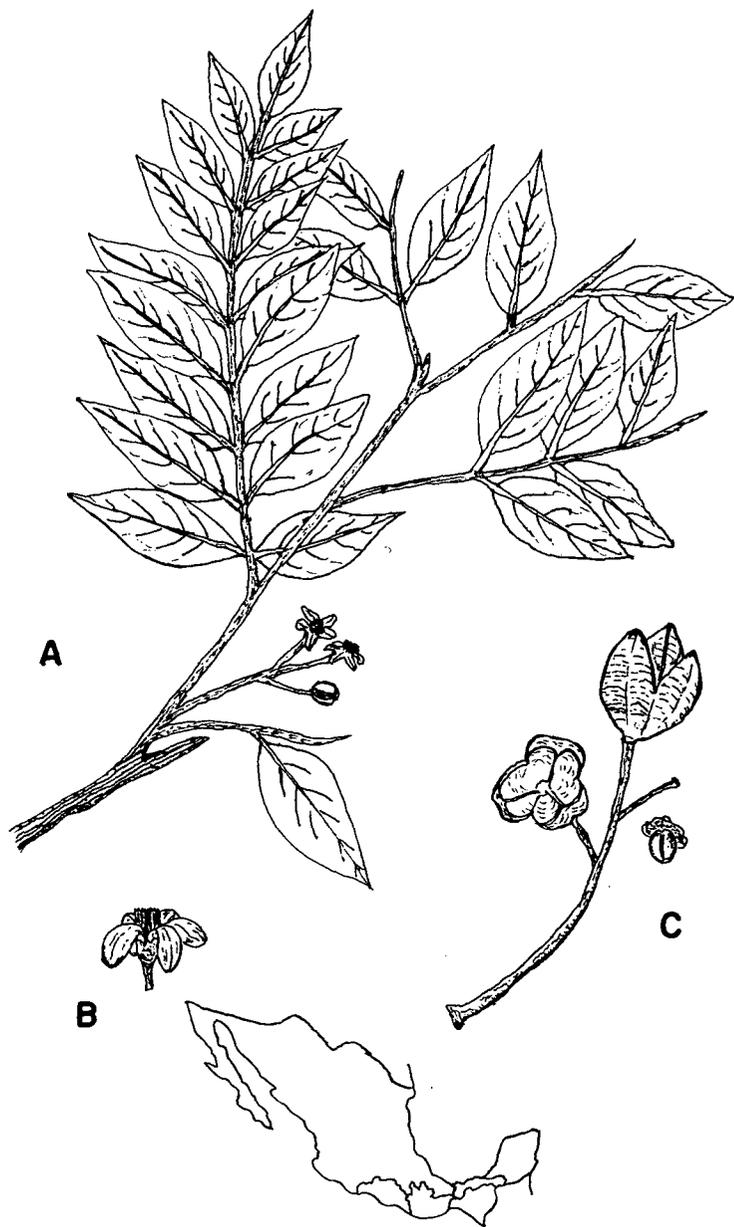


Fig. B *Trichilia hirta* L. A rama con inflorescencia, B flor y C infrutescencia.

La madera se usa en carpintería, así como para la fabricación de diversos objetos (mangos de herramientas, etc.). También se atribuyen a esta especie algunas propiedades medicinales.

Segun Niembro (1986), el arilo carnosos de color naranja que rodea a la semilla y, la semilla misma, contienen de 60-70% de aceite no secante que se emplea en algunos lugares para dar lustre al pelo, así como para destruir parásitos. Se sabe que la raíz posee propiedades purgantes violentas.

El aceite cuando se usa para éstos propósitos, se extrae por un procedimiento simple que consiste en el machacamiento de las semillas y después de esto se somete a la acción del agua caliente.

Magaña (*fide* Martínez 1936), hizo un estudio de este aceite que existe, de acuerdo con sus resultados, en una proporción de 48-52%, cuya cantidad varía naturalmente según el estado de madurez del fruto, la época de recolección, los procedimientos empleados, etc. El citado autor usó el procedimiento de los disolventes, valiéndose del éter de petróleo. El aceite que obtuvo presentó las siguientes características:

Color: anaranjado, que se decolora con la acción de la luz. Tiene un olor particular y se enrancia fácilmente. Su sabor es amargo y ligeramente acre debido a una resina que contiene.

Su densidad:	0.9360 kg/m <sup>3</sup> a 15°C
Punto de fusión:	1.5°C
Índice de refracción:	9
Índice de iodo:	49.54
Índice de saponificación:	0.203 mg
No es venenoso	

Por su parte Sánchez (1994), encontró que los extractos etanólicos de semilla mostraron una Dosis letal Media (DL<sub>50</sub>) de 60 ppm, y son tan solo 2.2 veces menos activos que el extracto acuoso de semilla de *Azadirachta indica*; los extractos de pulpa con acetona presentaron mortalidad al momento de la muda pupal, por efectos sobre el desarrollo metamórfico, encontrándose así, similitud con la azadiractina.

De otras especies de *Trichilia*, Villar y López (1991) probaron que *T. havanensis* y *T. americana* al 10%, proporcionan una protección al maíz contra el ataque del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. Por otra parte, Romo y Rodríguez (1987), señalan que únicamente en laboratorio *T. havanensis* en forma macerada resultó tóxico para larvas del primer estadio de la conchuela del frijol *Epilachna varivestis*.

## 2.2. Productos metabólicos secundarios

La gran cantidad de compuestos secundarios que las plantas producen son el resultado de la coevolución de las plantas con todas ellas. Aún mayor con un gran número de patógenos y especies herbívoras. Todas las plantas producen compuestos secundarios, algunos son biosintetizados por la vía que toman los terpenos, estos son necesarios para el crecimiento normal y desarrollo de las plantas (carotenos, xantofilas, fitoles, clorofila, ciertas hormonas). Sin embargo muchos de los productos secundarios usados por las plantas para defenderse del ataque de los herbívoros deben ser separados del citoplasma, ya que todas las plantas producen compuestos secundarios que son fitotóxicos en algún grado, provocándoles efectos como inhibición del crecimiento, síntomas fitotóxicos. Puesto que estos son altamente insolubles en agua y no pueden ser almacenados fácilmente en la vacuola (Fischer, 1986).

Lindroth (*vide* Spencer, 1988), explica entre varias razones el porqué las plantas contienen una gran variedad de metabolitos secundarios, es posiblemente a que algunos pueden servirle como toxinas hacia otros organismos, mientras otros las proveen de olores y sabores que actúan como advertencia para los herbívoros.

Algunos otros compuestos del metabolismo secundario se encuentran en los tricomas y glándulas de las epidermis de las plantas. Los terpenos son metabolitos más comúnmente frecuentes en estas estructuras (Kelsey *et al.*, 1984). El nombre de terpeno deriva de «turpentina» — trementina, que es la fracción volátil obtenida de la oleorresina que exuda de la superficie del corte del pino resinero (Davies *et al.*, 1969). Y por lo general, con frecuencia se encuentran en grandes concentraciones en las glándulas epidérmicas de las plantas superiores (Ascensão & Pais, 1987; Cappelletti *et al.*, 1986; y Eisner *et al.*, 1987).

En algunas plantas tanto como el 35% del área foliar pueden estar cubiertos con glándulas que contienen terpenos (Kelsey y Shafizadeh, 1980). Asimismo, se han encontrado en canales resinosos, no vivos. Esta localización, se considera que proporciona protección contra insectos barrenadores y hongos xilófagos.

Las piretrinas, es un grupo químico que se ha aislado de los terpenos y que ha sido utilizado con bastante éxito por su efecto insecticida. Brattsten (1983) y Bowers (1985), han descrito que más de una docena de mono y sesquiterpenoides derivados de las plantas tienen efectos esterilizantes en los insectos como un análogo de la hormona juvenil que poseen los insectos.

El sabor amargo de los sesquiterpenos provocan el rechazo a la ingestión de las plantas que los presentan. Por otra parte, los esteroides provenientes de plantas (fitoecdysonas) son análogos muy cercanos a la hormona ecdysoesterona, la que estimula la muda en los insectos («Ecdysis») (Kubo and Klocke, 1986). Los esteroides están entre los antialimentarios más potentes que actúan sobre los insectos (Kubo and Matsumoto, 1988); muchos diterpenos tienen también propiedades antialimentarias, e inhiben además el crecimiento de los insectos (Cooper, Driver & Le Quesne, 1987).

Un inhibidor de la ecdysis es el tetranortriterpeno «azadiractina» que producen los árboles de *Azadirachta indica* A.Juss. y *Melia azedarach* L. (Kubo and Klocke, 1986). la azadiractina no es tóxico o mutagénico a otros organismos diferentes a los insectos, pero dada su estructura tan compleja lo convierten en un compuesto difícil de sintetizar con fines comerciales, desde el punto de vista químico, por el alto costo de su producción.

Los compuestos del metabolismo secundario son, por lo general, separados en cantidades relativamente pequeñas, en comparación con las cantidades de los químicos sintéticos. El descubrimiento de los procesos para obtener plaguicidas naturales, es más complicado que el que se hace para plaguicidas sintéticos, debido a las dificultades en la separación e identificación estructural.

Se conocen numerosas opciones de biosíntesis de terpenos. De ellas, el método más simple es la extracción de compuestos directamente de las plantas, *in situ* (Duke *vide* Keeler, 1991).

Los terpenos pertenecen al grupo de los compuestos aromáticos muchos de ellos aislados de plantas. El término *aceites esenciales*, es también a menudo utilizado para describir a esta familia de compuestos. Los terpenos tienen múltiplos de cinco átomos de carbono en su estructura. Estos pueden ser saturados o no saturados, y estos a menudo contienen grupos funcionales (Alcohol, Aldehído, Cetona y otros compuestos oxigenados).

Sin embargo no son estos los que caracterizan a esta familia sino la naturaleza de sus esqueletos de átomos de carbón. En base a estos la mayoría de los terpenos pueden ser divididos en unidades de isopreno. (Morrison, 1979).

Los terpenos y esteroides elaborados a partir del isopreno (ver fig. 1), constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales.

La inmensa mayoría de los terpenos es específica del reino vegetal pero esta especificidad no es absoluta, sino que también se localizan en algunos animales marinos; en los grupos de los Celentéreos y Espongiarios, no es rara la presencia de sesquiterpenos y diterpenos.

El isopreno tiene la amplia ventaja de mostrar de manera completa la unidad biosintética de este grupo, y de dar cuenta de la existencia, según el número de unidades que intervengan, de monoterpenos ( $C_{10}$ ), Sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), Diterpenos ( $C_{20}$ ), Sesterterpenos ( $C_{25}$ ), Triterpenos ( $C_{30}$ ), Tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y Poliisoprenos ( $C_5$ )<sub>n</sub>. (Bruneton 1991).

Los terpenos simples, es decir los monoterpenos, pueden ser desdoblados por los insectos con mayor facilidad que los terpenos más complejos (Yu, 1987).

Brattsten *et al.* (1977), mencionan que la función de algunas de las oxidasas de los insectos es la de metabolizar rápidamente algunos terpenos que son inducidos en algunos insectos por cierto terpenos.

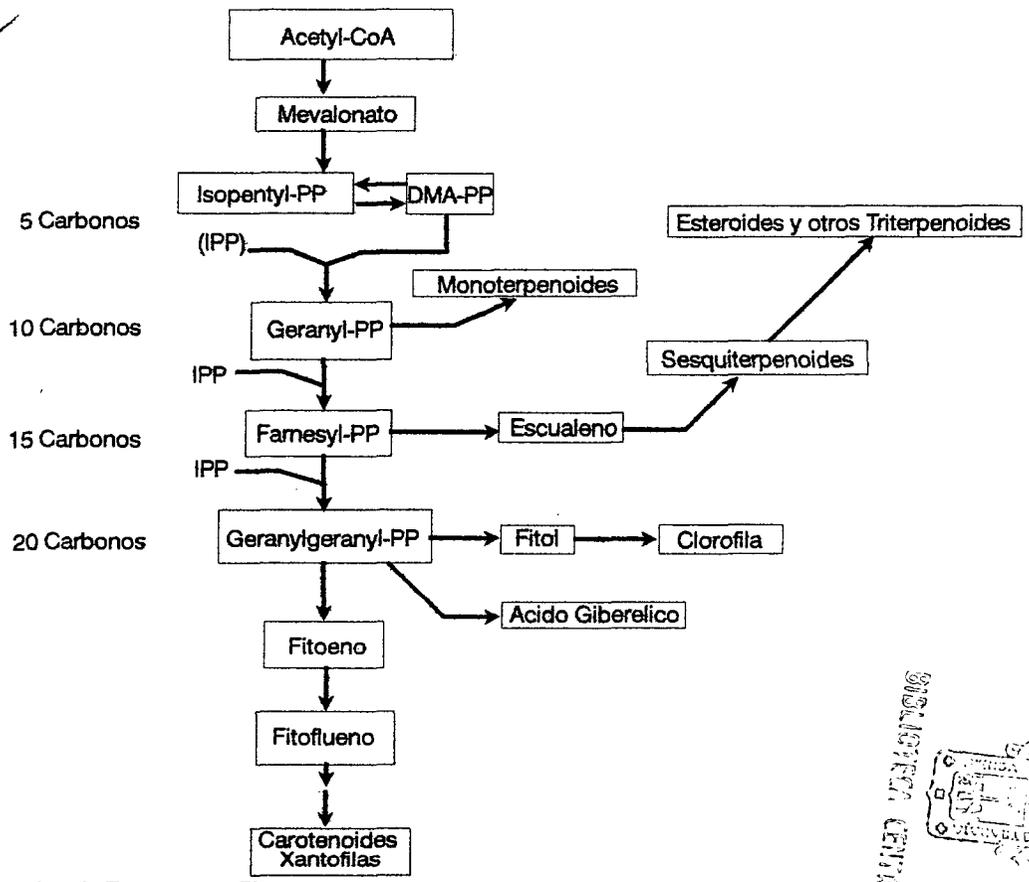
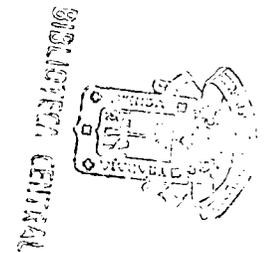


Fig. 1. Via biosintetica de Terpenos en Plantas.



## 2.2.1 Terpenos aislados y caracterizados en los generos *Trichilia* y *Melia*

Olugbade en 1991 aisló dos nuevos triterpenoides a partir de *Trichilia prieuriana*, a los que clasifico como «Prieurona» y «29-hidroxprieurona». Por su parte Tinto *et al* (1991), aislaron, a partir *Trichilia schomburgkii*, tres protolimonoides (niloticina, dihidroniloticina y Piscidinol A); el limonoide (7-deacetoxi-7oxegedunina, fitosterol) y los nuevos compuestos (2,3,4 trihidroxipregnan-16-ona e hidroxibutanolido).

Rodriguez y Arenas (1988), mediante varias repeticiones cromatográficas de las fracciones eluidas con acetato de etilo y éter de petróleo en una proporción de 3:1, separaron el limonoide triacetato «havanensina», identificado por comparación con una muestra auténtica.

También se han aislado análogos de las hormonas en donde se incluyen los sesquiterpenos «farnesol», «ácido farnesénico» y algunos otros derivados. Como se sabe, varios de estos compuestos son muy activos a nivel de nanogramos ( $10^{-9}$ ) y penetran la cutícula del insecto al igual que la hormona juvenil. (Anónimo, 1987).

Siddiqui *et al.* (1991) aislaron el «azadirol» de *Melia*. El compuesto fue probado contra 7 organismos gram positivo y 9 organismos gram negativos y se comprobó su eficacia como bactericida. Wren (1994) menciona que además del compuesto anterior contiene los siguientes principios activos: meliacinas, geduninas y sus derivados, nimbolinas A y B, melianinas A y B, protolimonoides, melianona, melianol, melianodiol y meliantol, triterpenoides, y una sustancia repelente de insectos conocida como meliantina. En trabajos realizados en *Trichilia hirta* por Chan y Taylor (1966), se reporto el aislamiento de un compuesto denominado «hirtina» y otro como «deacetilhirtina».

Cortez *et al.* (1992) aislaron de los frutos y de la hoja de *Trichilia hirta*, una especie mexicana, dos nuevos limonoides: Metil 1-B-acetoxi-6-hidroxi-12 alfa-2-metil propioniloxi-3,7-dioxo-1,5,14,20,22 meliacatetraen-29-oato, también conocido como «Sistosterol». Metil-11-B-acetoxi-6,23-hidroxi-12 alfa(2-metil propioniloxi)-3,7,21-trioxa,1,5,14,20 meliacatetraen-29-oato o «Sistostenona». Asimismo, confirmaron la presencia de otros limonoides que ya habían sido encontrados en otra meliaceas, tal es el caso de «bourjotinolona A», «melianona» y «melianodiol» en la especie *Melia*.

### 2.3. Plasticidad de respuesta de los mamíferos herbívoros a las defensas químicas de las plantas.

Debido a la similitud de los procesos metabólicos primarios en todos los organismos, investigaciones recientes con mamíferos han mostrado que algunos de los efectos de los compuestos secundarios son los mismos a los que se muestran sobre los insectos. Pero los mamíferos no son simplemente «Insectos grandes peludos», estos se diferencian de los insectos en varios aspectos, y esas diferencias tienen implicaciones por las cuales los aleloquímicos han intervenido en la evolución en cada grupo de herbívoros y en contraste con los productos químicos convencionales, que por lo general son de un amplio espectro afectando no solo a los insectos, si no también a mamíferos, crustáceos, peces, etc. debido a su acción neurotóxica, mientras que la gran mayoría de los metabolitos secundarios solo actúan en el sistema hormonal, No solo esto los mamíferos además tienen varios mecanismos de respuesta hacia estas sustancias.

Primeramente entre una variedad de factores que promueven las diferencias en las respuestas a los metabolitos secundarios de las plantas son los requerimientos nutricionales. Segundo, el tamaño grande del cuerpo y la eficiencia baja de conversión (debido a mantenimiento de la Homeotermia) de los mamíferos, hace que estos requieran de consumir grandes cantidades de alimento, y esta a su vez los fuerza a que sean consumidores de un amplio espectro de plantas. Tercero los sistemas de desintoxicación son diferentes tanto cuantitativamente como cualitativamente entre los dos grupos de herbívoros. Cuarto, en los mamíferos la longevidad es mayor, sujetas a generaciones y por lo general son activos sobre mas temporadas del año que los insectos, los cuales pasan períodos adversos en el estado de dormancia. Variaciones en la calidad y cantidad de los alimentos disponibles en las diferentes temporadas del año hace que los mamíferos requieran de mantener considerable plasticidad en sus hábitos alimenticios. Finalmente la capacidad de los mamíferos para adquirir un aprendizaje sofisticado (en contraste a los comportamientos innatos) es mayor que el que muestran los insectos y estas diferencias pueden profundamente influenciar sus respectivos comportamientos de alimentación.(Lindroth, 1988.)

Las defensas químicas de las plantas pueden afectar el *status* nutricional de un mamífero herbívoro directamente por la alteración de la selección del alimento y de los patrones de consumo, al disminuir su digestión o la eficiencia en su conversión, o bien, causando varios grados de toxicidad. De manera alternativa, estos pueden afectar a un animal indirectamente al cambiarle o modificarle la microflora intestinal o alterando la eficiencia de su sistema bioquímico de desintoxicación.

Se puede esperar que los mamíferos herbívoros muestren una plasticidad considerable en respuesta a las defensas químicas de las plantas, y esta plasticidad tiene implicación, como ya se vio arriba, en la coevolución de las interacciones entre plantas y mamíferos.

La información obtenida que incide sobre estudios efectuados en animales de laboratorio, animales de granja y mamíferos silvestres, indican que los mamíferos han desarrollado un sistema de comportamiento fisiológico y bioquímico en respuesta a los aleloquímicos de las plantas de las que se alimenta. Según Lindroth (1988), es suficiente decir que casi todos los fitoquímicos asimilables pueden ser metabolizados por una o por varias vías metabólicas en los mamíferos, pero por supuesto, la eficacia de dicha reacción esta influenciada por un numero de factores y estos varían grandemente.

En tiempos mas recientes, los investigadores se han percatado de que los microorganismos también juegan un papel importante en la desintoxicación de algunos metabolitos secundarios de las plantas. Así la microflora intestinal puede ser considerada como la «vanguardia defensiva» de los mamíferos herbívoros (Reid, 1973). Las reacciones de los microbios en el intestino ocurren bajo condiciones anaerobicas y pertenecen a las tres clases mayores de reacciones en donde se incluyen la hidrólisis, la reducción y degradación (Allison, 1978).

Los microbios del intestino tienen gran capacidad para adaptarse no únicamente a una variedad de compuestos secundarios, sino también a una variación temporal en las cantidades y composiciones de mezclas de compuestos. En contraste a la reacciones de las enzimas de los tejidos, las reacciones de desintoxicación de la microflora del intestino puede cambiar cualitativa y cuantitativamente.

Los compuestos secundarios que son adsorbidos por el intestino son usualmente metabolizado por el sistema específico de enzimas que se localiza principalmente en el hígado, pero que también se encuentran en algunos otros órganos, en lo particular en los riñones, intestinos y pulmones. Estas enzimas de los tejidos metabolizan compuestos extraños a través de un gran numero de vías, las cuales están típicamente clasificadas como oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación. Estas reacciones no son desintoxicantes, porque producen compuestos más hidrofílicos y por lo tanto, mas fácilmente excretados que el compuesto original. En contraste, las reacciones de la microflora mas importantes que ocurren en el intestino son, según Millburn (1978), la oxidativa y la conjugativa.

## 2.4 Separación Cromatografica en Columna.

La separación de los compuestos bioactivos se lleva a cabo mediante cromatografía, que es un proceso de separación basado en la polaridad de las sustancias (Smoot, 1979).

Dadas las particularidades de proceso y su importancia para numerosas investigaciones, es necesario hacer una breve reseña de su desarrollo.

Este proceso es muy popular desde hace treintaicinco años. La palabra cromatografía deriva del griego *χρωμα*, color debido a que en los primeros experimentos, los componentes separados se identificaban mediante el color (Masterton *et al.*, 1987).

Según menciona Masterton *et al.* (1974), esta técnica de separación, puede aplicarse a mezclas extraordinariamente complejas. Además puede emplearse para muestras muy pequeñas o para compuestos existentes en concentraciones muy bajas. Explica Domínguez *et al.* (1982), que el fundamento de este proceso es que la separación de una mezcla de dos o mas compuestos y que se da por la distribución diferencial entre dos fases, una estacionaria (por ejemplo silica gel) y la otra móvil (el solvente y la mezcla). Además, conviene señalar que existen varios tipos de cromatografía, diferenciados según la naturaleza de las dos fases involucradas y si los compuestos son detenidos en la fase estacionaria por adsorción o partición.

Para nuestra investigación utilizamos la cromatografía en columna, que es uno de los procesos incluido dentro de la fase solido-líquido. El otro proceso engloba los grupo de las fases líquido-líquido y gas-líquido (en fase vapor).

De acuerdo con O'connor (1976), la cromatografía de adsorción es un proceso de separación que depende del equilibrio entre una sustancia adsorbida sobre la superficie de algún solido y la sustancia disuelta de un solvente en contacto con el solido. Cabe señalar que los componentes mas polares de la mezcla se enlazan mas estrechamente a las partículas de la fase estacionaria que los componentes que son menos polares.

Al utilizar este proceso Smoot *et al.* (1979) encontraron que un fluido constituido por varias sustancias que se hacen pasar por un medio que atrae a los materiales polares, las sustancias del fluido viajaran a diferentes velocidades debido a su distinta polaridad. Por tanto pueden separarse. A estos separados se les llama «fracciones».

Con esa base, O'connor (1976) concluye que cuando la columna se eluye con un solvente no polar, los compuestos mas solubles y los menos fuertemente adsorbidos, son eluidos primero.

La mayoría de los estudios, recomiendan para formular una muestra eluente, hacer uso de uno de los solventes de la partición y otro que pueda competir en su afinidad, aquí se utilizó una mezcla de Eter de petróleo-Acetato de Etilo en una proporción de 3:1, tal y como lo hicieron Arenas y Rodríguez-Hanz (1988).

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Recolección de material vegetal

La extracción de los compuestos químicos se efectuó directamente en los frutos. Por este motivo se colectó esta estructura de los árboles en estudio, se trasladaron al laboratorio y para su mejor conservación se pusieron en refrigeración. Las especies que se utilizaron son *Trichilia hirta* L. «palo de tlacuache», que fueron recolectados en San Ramón, Municipio de Zapopan, Jal.

Los frutos de árbol del paraíso *Melia azedarach* L. se recolectaron en diferentes avenidas de la ciudad de Guadalajara.

La cantidad de material recolectado fue el suficiente para realizar las extracciones de este trabajo y de posteriores. Para la identificación de los ejemplares se uso la información proporcionada por Sánchez (1994).

#### 3.1.1.- Separación y triturado de semillas.

Para la preparación de los extractos de *Trichilia*, en primer lugar se separó en forma manual el árido carnosos que rodea a la semilla. Después de lo anterior se pesaron 50 gr de la semilla dentro de un cartucho de manta y después se lixiviaron.

En la preparación de la semilla de *Melia*, se utilizó un molino de piedras concéntricas para triturar las semillas y poder liberar las almendras de la parte dura del fruto, después de esto se procedido a separar las almendras del resto, y se pesaron 50 gr dentro de un cartucho de manta y se efectuó el proceso de extracción.



### 3.2. Extracciones

La extracción es una operación de separación y purificación que tiene por objeto aislar una sustancia de la mezcla. Se someten a purificación numerosos productos naturales así como las sustancias que intervinieron o se formaron en una síntesis orgánica. Este proceso se llevo a cabo en el Laboratorio Química de la Madera del Departamento de Madera, Celulosa y Papel de la U de G. Con la colaboración de los Ingenieros Químicos, Luis Manuel Angulo Vargas y Luis Ángel Vásquez Estrada. Las extracciones de semilla en cada una de las especies fue por separado, pero con los mismos procedimientos. (Ver fig. 2.) Consistió en colocarlos dentro de los cartuchos de tela de manta, enseguida uno de ellos se sumergió en etanol dentro de un matraz Erlenmeyer y el otro dentro de un Soxhlet. Se emplearon dos métodos de extracción:

1. La solución se mantuvo en movimiento durante 72 hr mediante un agitador magnético para favorecer la transferencia de masa y se cubrió totalmente el matraz con papel aluminio para evitar la degradación de los compuestos activos por la luz y al mismo tiempo se le aplico una atmósfera inerte a base de  $N_2$  (gas). Después se evaporó el solvente al vacío, aplicandole una presión de 30 mm Hg con una temperatura de  $40^{\circ} C$ . A continuación se separó de el solvente el extracto que presento un aspecto semisolido o aceitoso; para lograr evaporar el Etanol residual del extracto se desecó. El sólido se pesó en una balanza analítica, se prepararon las concentraciones requeridas para efectuar los bioensayos.

- 2.-El segundo método consistió en una extracción continua (solido-líquido) en Soxhlet.

La extracción en Soxhlet es especialmente útil en el aislamiento de productos naturales existentes en plantas con un contenido en agua elevado, y para lixiviar compuestos orgánicos de sales inorgánicas. Brewster *et al.* (1982).

Para extraer los compuestos solidos se colocó en un matraz de ebullición fondo redondo de 2000 ml, el disolvente extractor (Etanol), que fue llenado hasta la mitad y equipado con un aparato tipo Soxhlet, con refrigerante de condensación tipo Allihn con punta de goteo.

La semilla se colocó en el cartucho de manta y se introdujo al Soxhlet. El disolvente contenido en el matraz se le aplico calor manteniéndose en ebullición utilizando una manta de calentamiento, provocando con esto que los vapores ascendieran por el tubo lateral y al momento de llegar al refrigerante se condensaran, y las gotas que se formaron, descendieron por gravedad, goteando sobre el cartucho de la semilla. Cuando ha caído suficiente líquido en el depósito del cartucho también se ha llenado la rama

interior del tubo delgado, pasándose al matraz por gravedad. Ahí el disolvente, vuelve a evaporarse, dándose un reflujo, repitiéndose el principio hasta que todo el material soluble ha sido extraído de la semilla y pasa a concentrarse en la solución.

De esta extracción tomamos unas pequeñas cantidades que fueron necesarias, para realizar las pruebas de indicios de la naturaleza química, para comprobar la presencia de terpenos y poder decidir si se continuaba con la separación de éstos en la columna.

### **3.2.1. Obtención de fracciones.**

Para efectuar la separación cromatografica se efectuaron las operaciones siguientes: el tubo de vidrio se empacó con gel de sílice de 70 - 230 mallas reactivo Merck. Enseguida se agregó acetato de Etilo para lavar la columna, dejándose reposar 18 hr para humedecer la Silica gel y lograr que se hinchara. El material por fraccionar, proveniente de la solución madre de la extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz se introdujo por la parte superior de la columna. Dado que cada sustancia de el fluido viaja a diferente velocidad, esto permite la separación de las sustancias. Conforme el disolvente desciende por el tubo, cada vez se diluye mas y el adsorbente atrae al soluto. Las sustancias menos atraídas salen mas rápido, no importa si el disolvente esta diluido, por percolación continua, separándose las sustancias en fracciones. Para la purificación se volvieron a cromatografiar las fracciones obtenidas para aislar los compuestos con actividad biológica.

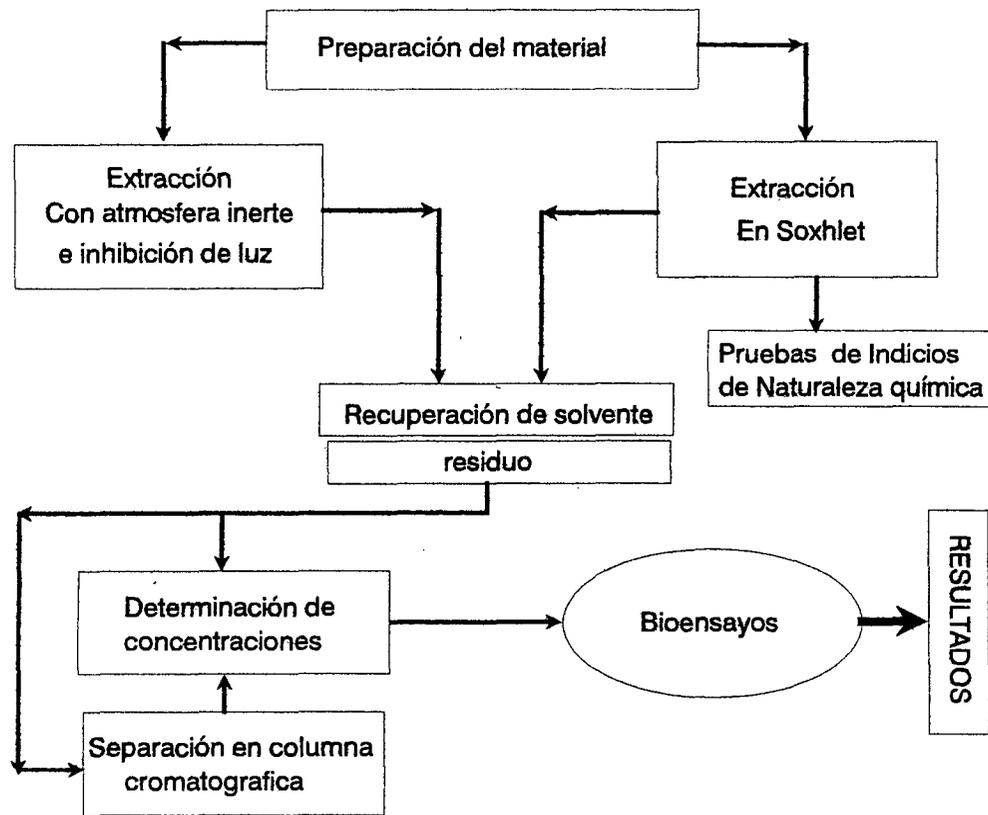


fig.2 . Diagrama Esquemático de las Extracciones

### 3.3. Indicios de naturaleza química.

En la búsqueda de los principios activos, son útiles en el campo y en laboratorio la pruebas químicas sencillas, sensibles, específicas rápidas y que requirieren equipo mínimo, económico y fácil de transportar. Si se considera que en las investigaciones químicas el tiempo y el costo requerido en cada estudio, resulta conveniente efectuar pruebas químicas preliminares que permitan detectar la presencia de los constituyentes de interés. En otros estudios se pueden utilizar muestras de 1 a 1000 gr y orientarse a localizar cualitativamente y cuantitativamente uno o varios principios activos. Los métodos que se utilizaron para revelar la presencia de terpenoides, consistieron en reacciones de coloración, que es un tratamiento de extracto con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados. Posteriormente se emplearon métodos biológicos (*v.gr.* para ver el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, insectos etc). Tomando en cuenta que en la práctica es ventajoso utilizar estos dos métodos.

Por ser los frutos las estructuras más ricas en principios activos de estas dos especies en estudio, sobre estas se efectuó el siguiente método para detectar la presencia de triterpenos.

#### 3.3.1. Método Cañ y colaboradores.

El material seco y molido (50 gr), primeramente se extrajo en Soxhlet con Etanol, el cual después se evapora al vacío. El residuo rojo o café semmsolido se uso para el bioensayo siguiente:

Para detectar Triterpenos se procedido a formular una mezcla reaccionante, que consistió en preparar: anhídrido acético, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), cloroformo ( $CHCl_3$ ) con una proporción de (10:1:25) v/v respectivamente. Posteriormente se disolvió una porción de los residuos de los extractos de cada una de las especies, durante 1-2 minutos. La aparición de colores como azul, rojo, rosa o púrpura se considera prueba positiva. Domínguez (1973).

### 3.4 Pruebas de Materia insaponificable.

#### 3.4.1. Prueba de Liebermann-Buchard.

Además, se uso una reacción general muy útil para la identificación y la determinación de esteroides y terpenos conocida como Liebermann-Buchard Test, su característica principal es la formación de color, aplicada sobre sustancias insaponificables como lo señala Browning (1967).

Los principales componentes de estas sustancias son hidrocarburos, alcoholes alifáticos y cíclicos, y componentes carbonilos.

De acuerdo a los procedimientos usuales de separación después de la saponificación, los insaponificables son separados como fracciones insolubles en agua, pero solubles en éter de petróleo o éter etílico.

En la separación de «fracciones neutras» los extraíbles solubles en solventes orgánicos, son comúnmente sujetos a una extracción líquido-líquido entre el agua inmiscible en la fase de solvente y ligeramente alcalino en la fase acuosa.

Tal procedimiento es una prueba cualitativa. El reactivo es preparado con una mezcla de 7.5 volúmenes de ácido acético glacial, 3 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado, 12 volúmenes de anhídrido acético, y 7 volúmenes de dioxano. Los productos químicos se enfriaron antes de mezclarse y así se mantiene en enfriamiento. Debiendo ser usados inmediatamente después de su preparación.

Aparte, se preparó otra solución que consistió en agregar una gota de ácido sulfúrico concentrado y un mililitro de anhídrido acético, también se mantuvieron en frío.

Para realizar la prueba, se tomaron dos volúmenes de la solución y se mezclaron con un volumen del reactivo, aplicándose al residuo del extracto.

### 3.5 Colecta y cría de mosquito

El mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. es un hematofago de la familia Culicidae el cual es transmisor de la filaríasis humana, causada por los nematodos *Wuchereria bancrofti* urbana y rural, y tiene hábitos nocturnos. Martínez (1986)

Es un insecto adecuado para utilizarse en pruebas de toxicidad y además, por ser relativamente fácil de reproducir en grandes cantidades en laboratorio.

Las masas cementadas de huevecillos de *Culex quinquefasciatus* Say. se recolectaron en diferentes partes de la Ciudad de Guadalajara, en aquellos lugares en donde se encontró agua estancada. Se trasladaron al laboratorio donde se encuentra la cámara de cría de insectos en ambiente controlado, con una temperatura de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$  y una humedad relativa ambiental de  $75 \pm 6\%$ . y se colocaron sobre charolas que contenían agua limpia. Al eclosionar las larvas y durante todo sus estadios larvales, se alimentaron con una dieta a base de Dog Chaw (un alimento balanceado para perros de la marca «Purina»). Al iniciar el estadio de pupa, se cambiaron a otros vasos de plástico pequeños, que se colocó dentro de una jaula entomológica de  $30 \times 40$  cm, cubiertas con tela mosquitera; al emerger el adulto, a los machos se les proporcionó un alimento a base de agua con azúcar al 10% y uvas pasas; a las hembras se las alimentó con la sangre de pollos de 3-5 días de nacidos. Se mantuvo un fotoperíodo de 12 hr en la cámara de cría.

### 3.6 Bioensayos

Los bioensayos se hicieron de acuerdo a los procedimientos estandares de la *World Health Organization* Organismo Mundial de la Salud. Anónimo, 1980.

Para determinar su concentración letal media ( $CI_{50}$ ) de cada una de las fracciones extraídas, se utilizaron vasos pequeños de plástico que contenían 100 ml de agua destilada, con 25 larvas de 2º estadio tardío al 3º estadio temprano de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say.

De las fracciones que se obtuvieron se prepararon las diferentes concentraciones (Cuadro 1), con las que se prepararon 4 diluciones seriadas, de las cuales se colocó 1 ml en cada vaso. Se hicieron cuatro repeticiones, por lo que se tuvieron 100 larvas por cada dosis de cada tratamiento, además se tuvieron dos testigos, uno con el solvente utilizado (Etanol) y otro con agua. Las evaluaciones de mortalidad de larvas se iniciaron a las 24 hr y se continuaron en ese rango hasta la emergencia de los adulto sobrevivientes.

**Cuadro 1.** Concentraciones empleadas en los bióensayos para el calculo de la  $Cl_{50}$  para las dos especies en cada extracción y separación cromatografica.

<b>Extracción con atmósfera inerte de Nitrogeno</b>	
<i>Melia azedarach L.</i>	<i>Trichilia hirta L.</i>
<b>D O S I S (ppm)</b>	
35.81	132.92
7.16	13.29
1.42	1.33
0.29	0.13
<b>Extracción en Soxhlet</b>	
36.12	55.99
7.22	11.20
1.44	1.12
0.29	0.22
<b>Fracciones de la columna</b>	
50	50
50	100
50	50

#### IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### *Trichilia hirta* L.

Las  $CL_{50}$  de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Trichilia* variaron de 14.1 a 118.7 ppm. Los valores menores de  $CL_{50}$  que indican mayor actividad en la regulación del crecimiento de larvas, se obtuvieron con las extracciones con atmósfera inerte y con Soxhlet respectivamente, resultados que sugieren la obtención de terpenoides mas activos (Cuadro 2).

Las  $CL_{50}$  de las fracciones cromatograficas fueron mayores y variaron de 50.8 a 118.7 ppm, que indican menor actividad, sin embargo, este método de separación puede también ser adecuado para la obtención de terpenoides activos (cuadro 2, fig. 5a).

Al analizar en conjunto las  $CL_{50}$  de los extractos y de las fracciones cromatograficas de columna podría considerarse que cuatro de estas son estadísticamente iguales entre sí (27.3, 50.8, 66.3, 118.7) debido al traslape de sus límites fiduciales, sin embargo estadísticamente diferentes a 14.14 que corresponde a la extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz que es el extracto mas activo (cuadro 2).

##### *Melia azedarach* L.

Las  $CL_{50}$  de los extractos y de las fracciones obtenidos a partir de *M. azedarach* fueron siempre mayores que las de la especie anterior. Ello significa que la actividad conjunta de los terpenoides como reguladores del crecimiento presentes en esta especie, es menor que aquella actividad encontrados en *T. hirta*. Los valores variaron de 127.6 a 4050 ppm (Cuadro 3), cuatro de ellos fueron estadísticamente iguales entre sí por el traslape observado en sus límites fiduciales, y diferentes de la extracción soxhlet (4050 ppm) que mostró la mas pobre actividad.

El extracto mas activo de acuerdo al menor valor de  $CL_{50}$  fue el obtenido usando atmósfera inerte e inhibición de luz (127.6 ppm) sin embargo la extensión de los límites fiduciales en su nivel inferior, indica deficiencias del bioensayo y por ende se considera resultado que necesita otra comprobación.

**Cuadro 2.** CL<sub>50</sub> de extractos de *Trichilia hirta* L. sobre *Culex quinquefasciatus* Say.

Extractos	CL <sub>50</sub> (ppm)	Limites fiduciales	línea log-dosis-probit
Extracción con atmósfera inerte/sin luz	14.4	(8.73-25.36)	$Y=20.64+0.5(X)$
Extracción en Soxhlet	27.3	(7.77-139.21)	$Y=22.079+0.75(X)$
Separación en columna	50.8	(39.79-72.25)	$Y=0.6612+1.07(X)$
	118.7	(82.84-202.50)	$Y=3.292+0.50(X)$
	66.3	(46.35-115.05)	$Y=1.521+1.01(X)$

**Cuadro 3.** CL<sub>50</sub> de extractos de *Melia azedarach* sobre *Culex quinquefasciatus* Say.

Extractos	CL <sub>50</sub> (ppm)	Limites fidu- ciales 95%	línea log-dosis-probit
Extracción con atmós- fera inerte/ sin luz	127.6	(11.11-4312.07)	$Y = 14.1 + 0.79(X)$
Extracción en Soxhlet	4050.5	(1.02-2.91)	$Y = 5.93 + 0.32(X)$
Separación en columna	158.4	(74.27-578.56)	$Y = 2.82 + 0.71(X)$
	190.3	(7412-944.20)	$Y = 16.97 + 0.14(X)$
	137.9	(62.56-503.94)	$Y = 13.52 + 0.29(x)$

## Métodos de extracción.

### *Trichilia hirta* L.

El método de extracción inerte e inhibición de luz mostró la  $CL_{50}$  mas baja (14.14 ppm) resultando mejor que el método de extracción en Soxhlet con una  $CL_{50}$  de 27.30; Comparando este último método con las fracciones cromatograficas de la columna su  $CL_{50}$  fue más baja que la que presentaron las fracciones cromatograficas (50.8, 118.7, 66.3)

### *Melia azedarach* L.

Al igual que con *Trichilia* el método de extracción inerte e inhibición fue el que mostró una  $CL_{50}$  mas baja (127.6) comparandolo con el método de extracción en Soxhlet (4050) y las fracciones cromatograficas de la columna (158.4, 190.3, 137.93). Es importante observar que  $CL_{50}$  mas baja de *Melia* (127.6) fue mayor que la  $CL_{50}$  mas alta de *trichilia* (118.7).

Los resultados con el método de extracción en Soxhlet con una  $CL_{50}$  demasiado alta (4050 ppm) indican posiblemente fallas en los bioensayos.

Comparando *Trichilia* y *Melia* en la extracción con atmósfera inerte, (fig 3) estadísticamente son iguales por el traslape de sus limites fiduciales pero tomando en cuenta las  $Cl_{50}$  *Trichilia* fue la mejor con 14.4 ppm.

En la extracción en Soxhlet (Fig. 4) la comparación es similar con el método de extracción antes mencionado ya que tampoco hubo diferencia estadística entre las dos especies siendo también *Trichilia* la mejor con una  $Cl_{50}$  de 27.3 ppm.

Para la separación cromatografica en columna, en las tres fracciones (Figs. 5a, 5b) de las dos especies respectivamente presentaron diferencias en la fracción primera, y siendo iguales las demás fracciones; la mejor de todas fue la primera fracción de *Trichilia* en comparación con a las demás entre si.

### Factor de actividad relativa de los extractos.

El cuadro 4 muestra los valores de  $CL_{50}$  obtenidos en todos los bioensayos conducidos y relacionados con la  $CL_{50}$  de un extracto acuoso de semillas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Zebit, 1986). Este valor sirvió para calcular la actividad relativa mediante la siguiente formula:

$$\text{FARE} = \frac{CL_{50} \text{ Azadirachta indica (Referente)}}{CL_{50} \text{ Extracto (Observado)}} = X \text{ Veces la actividad insecticida del extracto acuoso de } A. \text{ indica.}$$

Un valor FARE igual a 1, equivale a igual actividad que el extracto acuoso de neem; valores menores que 1 indican que los extractos tienen menor actividad y valores mayores que 1 significan mayor actividad.

De los extractos realizados destaca la extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz de *T. hirta* (FARE = 1.85) que muestra mayor actividad que el extracto acuoso del neem.

Desde el punto de vista practico, este resultado significa un relevante acontecimiento, ya que el extracto acuoso del neem es usado en algunas partes del mundo como un plaguicida agrícola y el hecho de que *T. hirta* presente mayor actividad sugiere un potencial como herramienta en el control de plagas.

Comportamiento similar e igual potencial podrían tener la extracción Soxhlet de la misma especie (FARE = .96).

**Cuadro 4.** Comparación de toxicidad de los extractos de *Melia azedarach* L. y *Trichilia hirta* L. a el extracto acuoso de semilla del Neem.

EXTRACTO	CL <sub>50</sub>	Factor de actividad relativa del extracto- <i>A.indica</i> (FARE)
<b>Extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz</b>		
<i>Trichilia hirta</i> L.	14.14	1.85
<i>Melia azedarach</i> L.	127.62	0.20
<b>Extracción en Soxhlet</b>		
<i>Trichilia hirta</i> L.	27.30	0.96
<i>Melia azedarach</i> L.	4050.51	0.0065
<b>Fraciones de la columna cromatografica</b>		
<i>Trichilia hirta</i> L.		
f1	50.76	0.51
f2	118.67	0.22
f3	66.33	0.39
<i>Melia azedarach</i> L.		
m1	158.41	0.17
m2	190.28	0.14
m3	137.93	0.19
<i>Azadirachta indica</i> (Zebitz, 1986)		
Semilla/ agua	26.14	

### Pruebas Colorometricas.

En el método Caín se obtuvo como resultados un color rojo en el extracto de *Trichilia*, y un color rojo pálido en el de *Melia*, considerándola prueba positiva.

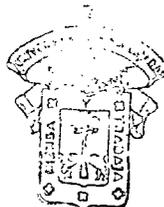
En la prueba de Lieberman-Buchard. *Melia* presentó un color verde ligero a verde pardo, mientras que en *Trichilia* un color rojo intenso a rojo vino.

Todas las coloraciones presumen la presencia de sustancias fácilmente oxidables, sin embargo los colores verdes encontrados en fracciones de *Melia* afirman la presencia de diterpenos (esqueletos de mas de 19 átomos de carbón), fitoesteroles y tetranortriterpenoides. El autor de la técnica afirma la presencia de sustancias de por lo menos 8 núcleos carbónicos, pero si los hubiera en cantidades notables, estos darían estabilidad al color.

Por otro lado nos dice que el color rojizo pueden causarlo los esteroides, aunque las pruebas sobre *Trichilia* lo presentaron, este se hubiera afirmado con un exceso de la sustancia probada, pero no fue así, ya que estos proveen colores de un verde amarillento.

## V CONCLUSIONES.

- Se constató que extracciones de *T. hirta* presentan una actividad insecticida mayor que las de *M. azedarach*, por ello tienen un mejor potencial práctico.
- El método de extracción con atmósfera inerte con  $N_2$  e inhibiendo la acción de la luz sobre los extractos, fue el método que produjo extractos mas activos.
- Las fracciones cromatograficas que fueron separadas de las extracciones con atmósfera inerte e inhibición tuvieron una actividad insecticida menor debido a la degradación de los compuestos activos por la luz.
- La acción de la temperatura en el método de extracción Soxhlet parece influir en la actividad insecticida de los extractos.
- La utilización de pruebas colorométricas, positivas en nuestro trabajo, son útiles para determinar con anticipación la presencia de sustancias bioactivas de interés, terpenoides en nuestro caso, fueron necesarias para decidir proseguir con la investigación.
- Los efectos morfogeneticos presentes en los insectos tratados con los extractos de compuestos de origen vegetal, confirman la bioactividad reguladora del crecimiento ocasionada por los terpenoides que contienen estas especies.



## VI RECOMENDACIONES

- Después de extraer el conjunto de compuestos responsables de actividad insecticida de estas especies, en especial *Trichilia hirta* L. es recomendable continuar esta línea de investigación para llegar a aislar, purificar y determinar su estructura molecular y con esto tener una guía para una posible síntesis del compuesto activo.

- Además sería recomendable probar diferentes métodos cromatográficos para poder determinar el adecuado en la separación y purificación de estas sustancias, entre otras TLC (Cromatografía en Capa Fina), HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

- Para realizar pruebas de campo sobre plagas agrícolas de estas sustancias es recomendable que sean producidas en cantidades mayores, por ejemplo en plantas piloto, guiadas por la técnica de extracción con atmósfera inerte e inhibición de luz.

- Por último es recomendable también que se realicen trabajos Toxicológicos, relacionados con los efectos que estas sustancias podrían ejercer sobre organismos mayores (Mamíferos, peces, crustáceos etc.) con estos determinar su grado de toxicidad.

## VII LITERATURA CITADA

- Allison, M.J. 1978. The Role of Rumial microbes in the metabolism of toxic constituents from plants. In «Effects Poisonous Plants on Livestock» (R.F. Keeler, K.R. Van Kampen and L.F. James, Eds.), Academic Press, N.Y. pp 101-118.
- Anónimo. 1980. The titration of experimental and commercial primary powders and formulations of *Bacillus Thurigiensis* Serotype H-14. Problems and prospect. Unpublished document World Health Organization. WHO/UBC/80.05 pp.
- Anónimo. 1987. Control de plagas de plantas y animales, manejo y control de plagas de insectos 2a parte., National Academy of Sciences., Editorial Limusa. pp 303-309.
- Anónimo. 1990. Catalogo de especies vegetales a utilizar en plantaciones de carreteras. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo (MOPU). Madrid. pp. 121.
- Arenas, C. y Rodriguez-Hans. 1988. Limonoids from *Trichilia havanensis* J.Phytochemistry. **52**: 2956.
- Arnason, J. T., S. MacKinnon, A. Durst, B. J. R. Philogene. 1993. Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of actions. In «Phytochemical potential of tropical plants» (K.R. Downum eds.), Plenum Press, N.Y. pp. 107-132.
- Ascensao, L., y M.S.S. Pais. 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (spp maritima): Ontogeny and Histochemistry of the secretory product. Bot. Gaz. **148**: 221-227.
- Azizol Abdul Kadir, y J. P. Conolly. 1991. Preparations of 3-deacetylazadirachtin using Azadirachtin insolet from *Azadirachta indica* seeds. Journ. Trop. For. Sci. **3**(4): 342-347.

- Bowers, W. W. 1985. Phitochemical disruptions of insects development and behavior. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **276**: 225-236.
- Brattsten, L. B. 1983. Citocrome p-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insects hervivores. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **208**: 173-195.
- Brattsten, L.B., C. F. Wilkinson, y T. Eisner. 1977. Herbivore- Plant interactions: mixed-functions oxidasas and secondary plants substances. *Science* **196**: 1349-1352.
- Brewster, R. Q., C. A. Vanderwert, W. E. Mc Ewen. 1982. *Curso practico de Química Organica. Tercera edición*, Ed. Alhambra. España pp. 33.
- Browning, B. L. 1967. *Methodos of Wood Chemistry*. Interscience Publichers, N.Y. **1**: 207-221.
- Bruneton, J. 1991. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Editorial ACRIBIA. España.
- Calderon de Rzedowski G., M.T. German. 1993. *Meliaceae in Rzedowski J. & G.C. de Rzedowski «Flora del bajo y regiones adyacentes»*. Instituto de Ecologia A.C. Patzcuáro, Michoacán. **11**: 12
- Cappelletti, E. M., R. Caniato and G. Apendino. 1986. Localization of the cytotoxic hidroperoxyeudesmanolides in *Artemisa umbrelliformes*. *Biochem. Syst. Ecol.* **14**: 183-199.
- Chan, W. y D. R. Taylor. 1966. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 206.
- Cooper-Driver, G. A., y P.Q. Le quesne. 1987. Dipertenoids as insects antifeedants with growth inhibitors: role in solidago species. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **330**: 534-550.
- Cortez V., A. G. Diogenes, J. Fernandes, F. Da Silva y G. Ferreira. 1992. Limonoids from *Trichilia Hirta.*, *Phytochemistry*, **31**(2): 625-628.
- Cuttler, H. G. 1988. Natural products and their potential in agriculturae. *Am. Chem. Soc. Ser.* **380**: 1-22.
- Davies, D.D., J. Giovanelly, J. A. Rees. 1969. *Bioquímica Vegetal*. Ed OMEGA., Barcelona, España.

- De souza, G.E. y H. Rembold. 1984. Effects of Azadirachtin on Ecdysis of *Rhodnius prolixus* Journal Insects Physiology. Great Britain. 30(12): 939-941.
- Domínguez Xorge A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica., Ed. Limusa Méx. D.F. pp. 41-43.
- Domínguez, X. A., X. A. S. Domínguez. 1982. Química organica experimental. Ed. Limusa, Mexico . pp.79-97.
- Duke, S.O. 1986. Naturally occurring chemical compounds as herbicide. Rev. Weed Sci. 2: 15-44.
- Duke, S.O. 1990. Natural Pesticides from Plants. In Toxicology of plants and fungal compounds handbook of natural toxins., Ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. USA. 6: 35
- Eisner, T., M. Eisner, y J. Meinwald. 1987. Technique for visualization of epidermal glandular structures in plants. J. Chem. Ecol. 13: 943-946.
- Elakovich, S. D. 1988. Terpenoids as models for new agrochemicals. Am. Chem. Soc. Sym. Ser. 380: 250-261.
- Fisher, N.H. 1986. The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In science of allelopathy, A.R. Putman and C.S. Tang (eds). Wiley-Interscience, New York, pp 203-218.
- Fraenkel, G. 1969. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. Entomología Exp. Appl. 12: 473-486.
- Gonzales de Cosio, M. 1984. Especies vegetales de importancia económica en México., Ed. Porrúa, Mex.
- Gonzales S. A. 1989. Plantas tóxicas para el ganado. Ed. LIMUSA. Mex. D.F.
- Jaipal, S., Z. Singh. y R. Chauhan, 1983. Juvenile-Hormone-Like activity in extracts of some common Indian Plants. Indian; J. Agric. Sci., 53(8): 730-733.

- Keeler, F.R. 1991. Toxicology of plants and fungal compounds handbook of natural toxins., Ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. USA. 6:
- Kelsey, R.G., y F. Shafizadeh. 1980. Glandular trichomes and sesquiterpene lactones or *Artemisia nova* (Asteraceae). *Biochem. Syst.Ecol.* 8: 371-377.
- Kelsey, R.G., G. W. Reynolds. y E. Rodriguez. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In *biology an chemistry of trichomes*, E. Rodriguez, P.L. Healey, and I. Mehta (Eds). Plenum Press, N.Y., pp 187-241.
- Kubo, I., y T. Matsumoto. 1988. Potent insect antifeedants from the afraican medicinal plant *Bersama abyssinica*. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 276: 183-200.
- Kubo, I., y J. Klocke. 1986. Insects ecdysis inhibitors. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 296: 206-219.
- Kubo, I. 1993. Insect control agents from tropical plants. In «*Phytochemical potentials of tropicals plants*» (K.R.Downum, eds.), Plenum Press. N.Y. pp. 133-152.
- Kraus, W.S., M. Baumann, U. Bokel, A. Keller, M. Klent, H. Pohnl Klingele, y Schwinger. 1986. Control of insect feeding and development by constituents of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. *Proc. 3rd Int Weem Conf. Nairobi*, pp. 111-125.
- Lindroth, R. L. 1988. Mammalian adaptations to plant defenses. In«*Chemical mediation of coevolution*» (Kevin C. Spencer, ed.), Academic Press. N.Y. pp. 415-445.
- Lydon, J., y S. O. Duke. 1989. The potential of pesticides from plants. In *herbs, spices, and medicinal pants: Recent advances in botany, horticulture, and pharmacology*, L. E. Cracker and J. E. Simon (Eds.) Oryx Press, Phoenix, Az., pp. 1-44
- Martínez, B.M. 1986. *Manual de parasitología Médica*. 2a. edición, ediciones Copilco, Mex. D.F., pp. 387-415.

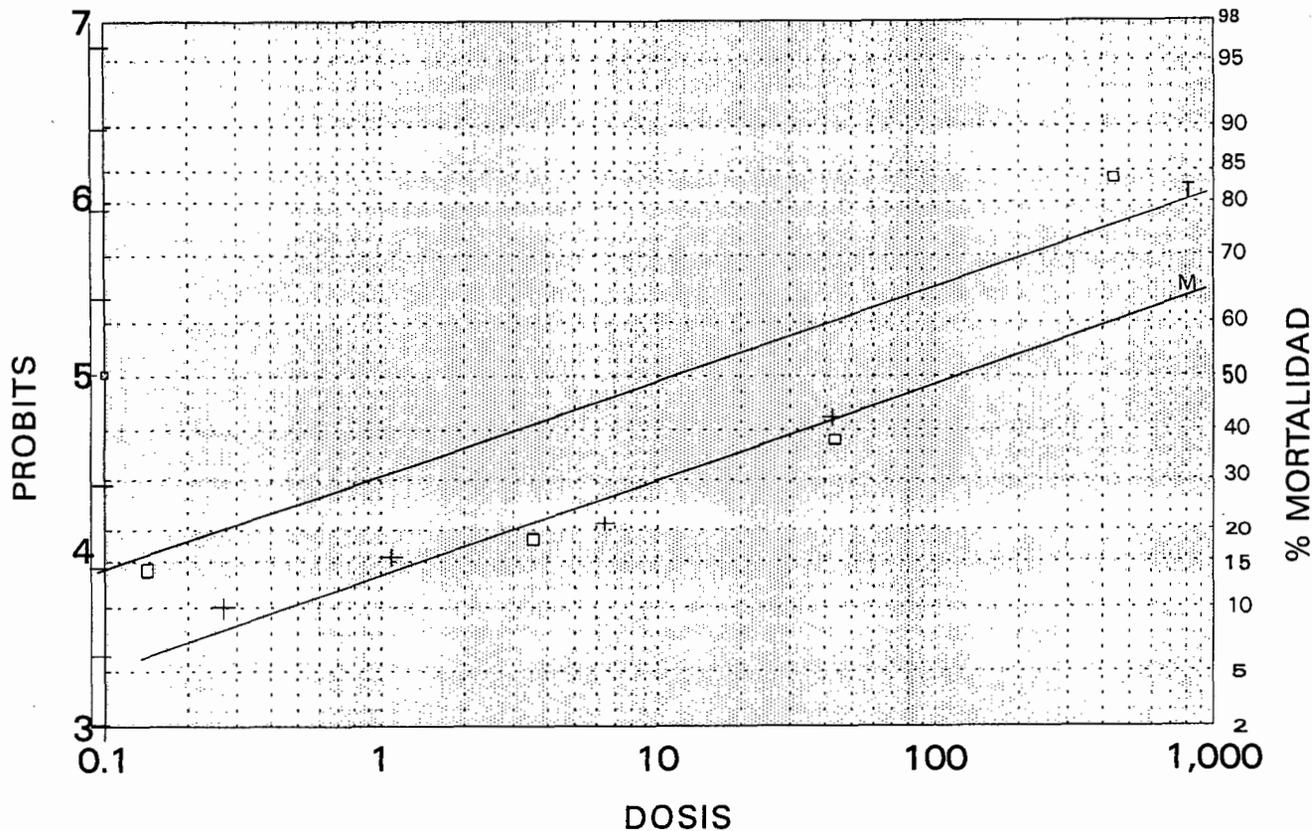
- Martínez, Maximino. 1979. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México D.F. pp. 79
- Martínez, Maximino. 1936. Plantas útiles de México. 2a Edición, México: Botas. 400 p.
- Masterton, W. L., E. J. Slowinski. 1974. Química general superior. Ed. Interamericana, tercera edición. México., pp.14-15.
- Masterton, W. L., E. J. Slowinski, C. L. Sanistki. 1987. Química general superior. McGraw-Hill, Sexta edición. Madrid, España. pp. 22-23.
- Mauchamp, Bernard. 1992. Plants e insectos horizons nouveaux pour la potection des cultures-apports de la biologie moleculaive et du genie genetique. Interfase 41, mayo. pp. 29-31.
- Millburn, P. 1978. Biotransformation of xenobiotics by animals. In «Biochemical aspects of the plants and animals coevolution» (J. B. Harborne. ed), Academic Press. N.Y. pp. 35-73.
- Morrison, D.J. 1979. Organic Chemistry. Ed. Wadsworth. USA. pp. 203.
- Niembro, R.A. 1986. Árboles y arbustos útiles de México. UACH. editorial Limusa., pp. 183.
- Norris, D. M. 1986. Antifeedings compounds , pp. 99-146. In G. Haug & H. Hoffman (eds.), Chemistry of plant protection, vol. 1. Springer, Berlin.
- O'connor, R. 1976. La Química. Editorial Harla. México, pp. 650.
- Olkowski, W. y Olkowski. 1988. New Botanical Pesticides from the Meliaceae. IPM Practitioner. 10(9): 1-6.
- Pennington, P.D. y J. Saruthan. 1981. Árboles tropicales de México. Universidad de Oxford, England, publicado en México. pp 246.
- Reid, C. S. W. 1973. Limitations to the productivity of herbage-fed ruminant tha arise from the diet. In «Chemestry and biochemestry of herbage» (G. W. Buttler and R. W. Bailey, eds.), Academic Press. N.Y. 3: 215-262.

- Rembold, H., y I. Puhmann. 1993. Phytochemistry and biological activity of metabolites from tropical Meliaceae. In «Phytochemical potential of tropical plants» R.Downum, eds.) Plenum Press. N.Y. pp. 153-165.
- Romo, O.J.M. y C. H. Rodriguez. 1987. Combate de la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Muls. (Coccinellidae:Coleoptera) con extractos acuosos vegetales en Chapingo, Edo de México. Resúmenes del XXXIII Congreso Nacional de Entomología. Morelia, Michoacan, Mex. pp. 282.
- Sánchez, G. Ma. F. 1994. Evaluación de la actividad de cinco especies de plantas de la familia meliaceae del edo. de Jalisco. F. de ciencias biológicas. U. de G.
- Schoonhoven, L. M. 1982. Biologicals aspects of antifeedants. Entomol. Exp. Appl. 31: 57-69.
- Siddiqui, S., B.S. Siddiqui, S. Faizi, y T. Mahmood. 1991. Tetracyclic Triterpenoids. Journal of Natural Products. 54(2): 413
- Smoot, R. C., J. Price. 1979. Química un curso moderno. C.E.C.S.A.. Mex. pp 256-257.
- Taveras, F. 1991. Pesticidas naturales, importancia y uso. CEDECO., Editora Bumo., Republica dominicana, pp 32-37.
- Takhtajan, A. 1987. Sytema Magnoliophytorum. Oficina Editoria NAUKA sect. Leninopolitana [1]-5-438[439] pp.
- Tinto, W.F., P.K. Jagessar, P. Ketwaru. 1991. Constituents of *Trichilia schomburgkii* Journal of Natural products, 54(4): 972.
- Vásquez, G. M. 1993. Tesis.«Evaluación de la susceptibilidad relativa del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith a insecticidas de diferente grupo toxicologico a extractos de origen botánico». Facultad de Agronomía, U de G.
- Vickery Margaret L. 1987. Ecología de Plantas Tropicales. Editorial Limusa. pp 165.

- Villar, M.C. y M.A. Lopez. 1991. Evaluación de *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) y *Erodium cicutarium* (Geraniaceae) para el combate del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el C.A.E.A. San Luis Potosí. II Simposium Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. pp. 63.
- Waterman, P.G. 1993. Phytochemical Diversity in the Order Rutales. In «Phytochemical Potential of Tropical Plants» (K.R.Downum, Eds.), Plenum Press, N.Y. pp. 203-205.
- Wren, R.C. 1994. Nueva Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos., Edit. GRIJALVO., México. pp. 417.
- Yu, S.J. 1987. Microsomal Oxidation of allelochemicals in generalist (*Spodoptera frugiperda*) and semiespecialist (*Anticarsia gemmatalis*) insects. J. Chem. Ecol. 13: 423-436.
- Zebitz, W. C. P. 1986. Potential of neem seed kernel extracts in mosquito control. Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, pp. 555-573.

Fig.3 Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus*, Say.

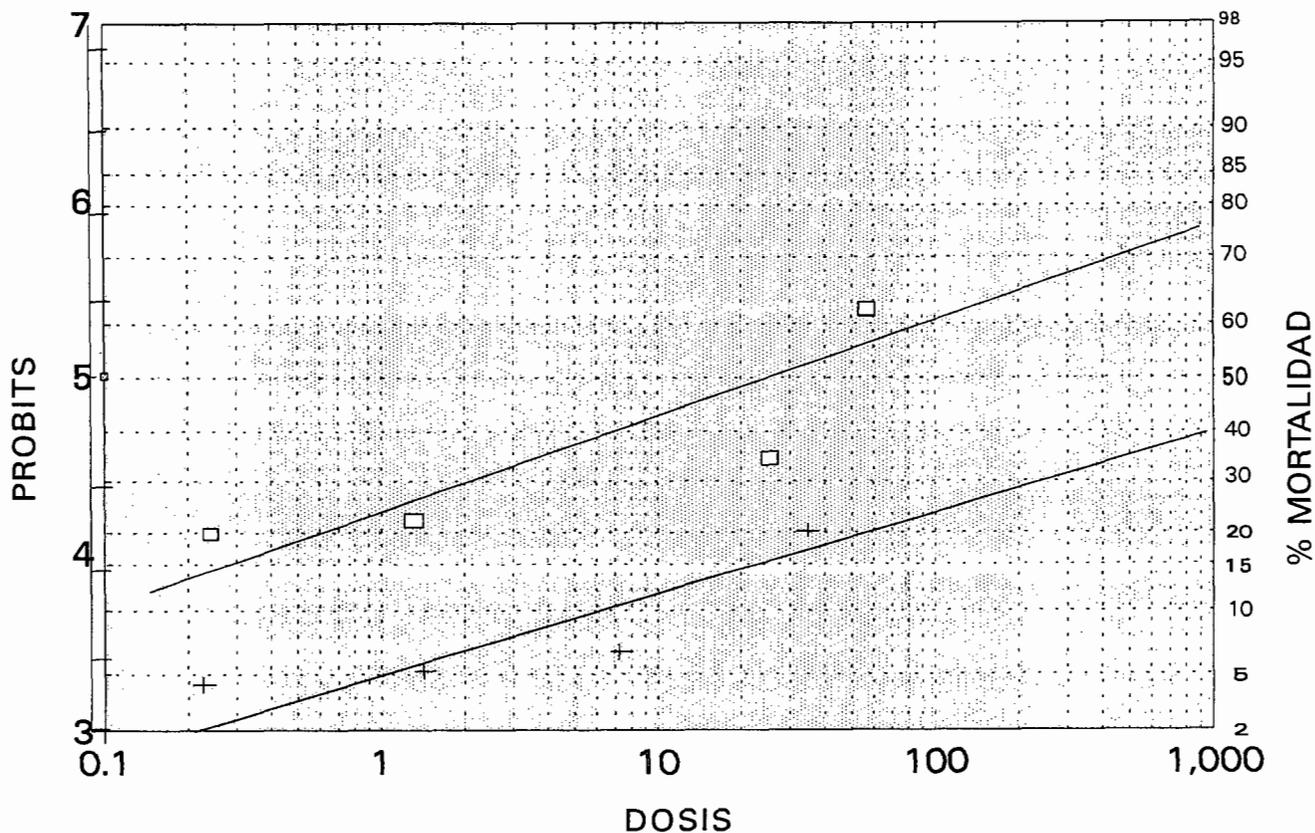
Extraccion con atmosfera inerte e inhibicion de luz



□ *Trichilia hirta* L. + *Melia*

Fig.4 Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus*, Say.

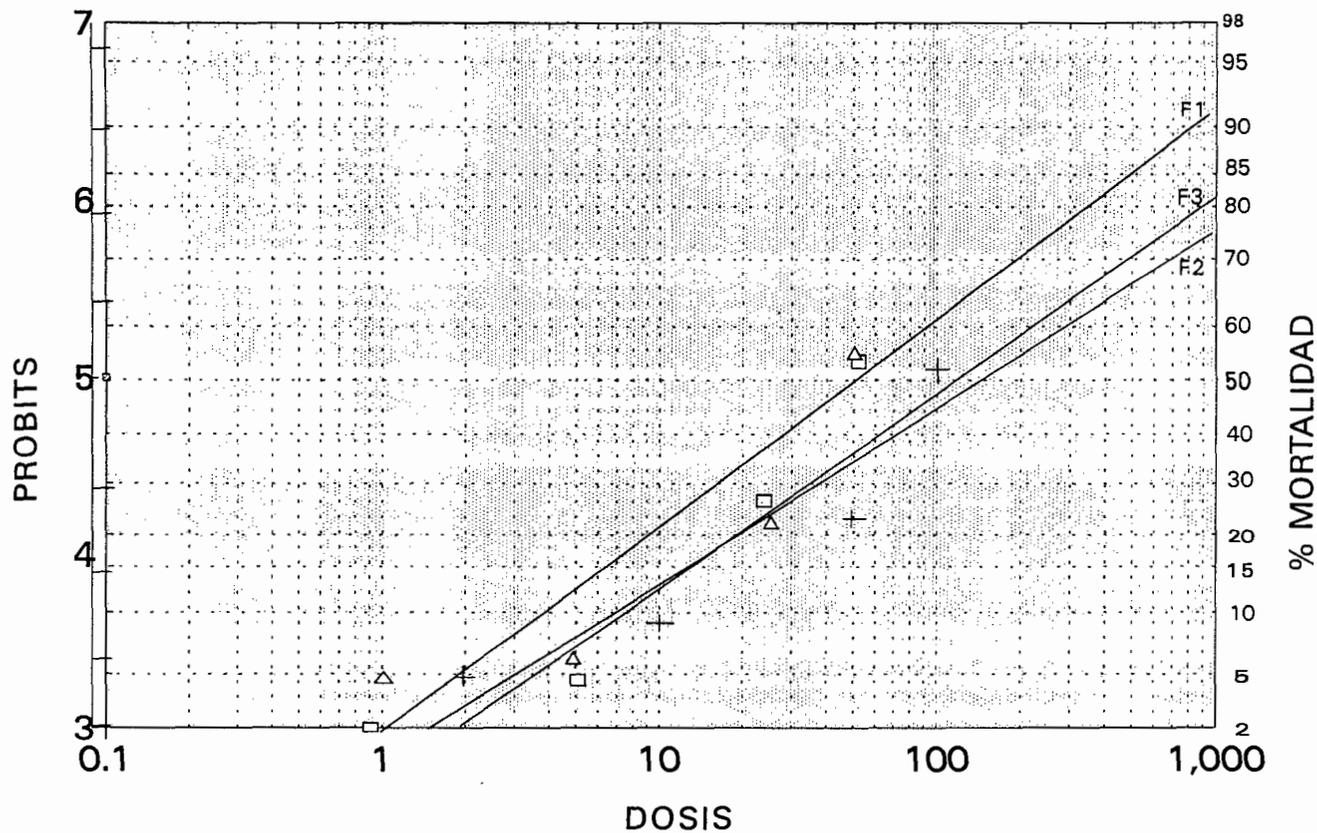
Extraccion en Soxhlet



° *Trichilia hirta* L. + *Melia*

Fig.5a Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquéfasciatus*, Say.

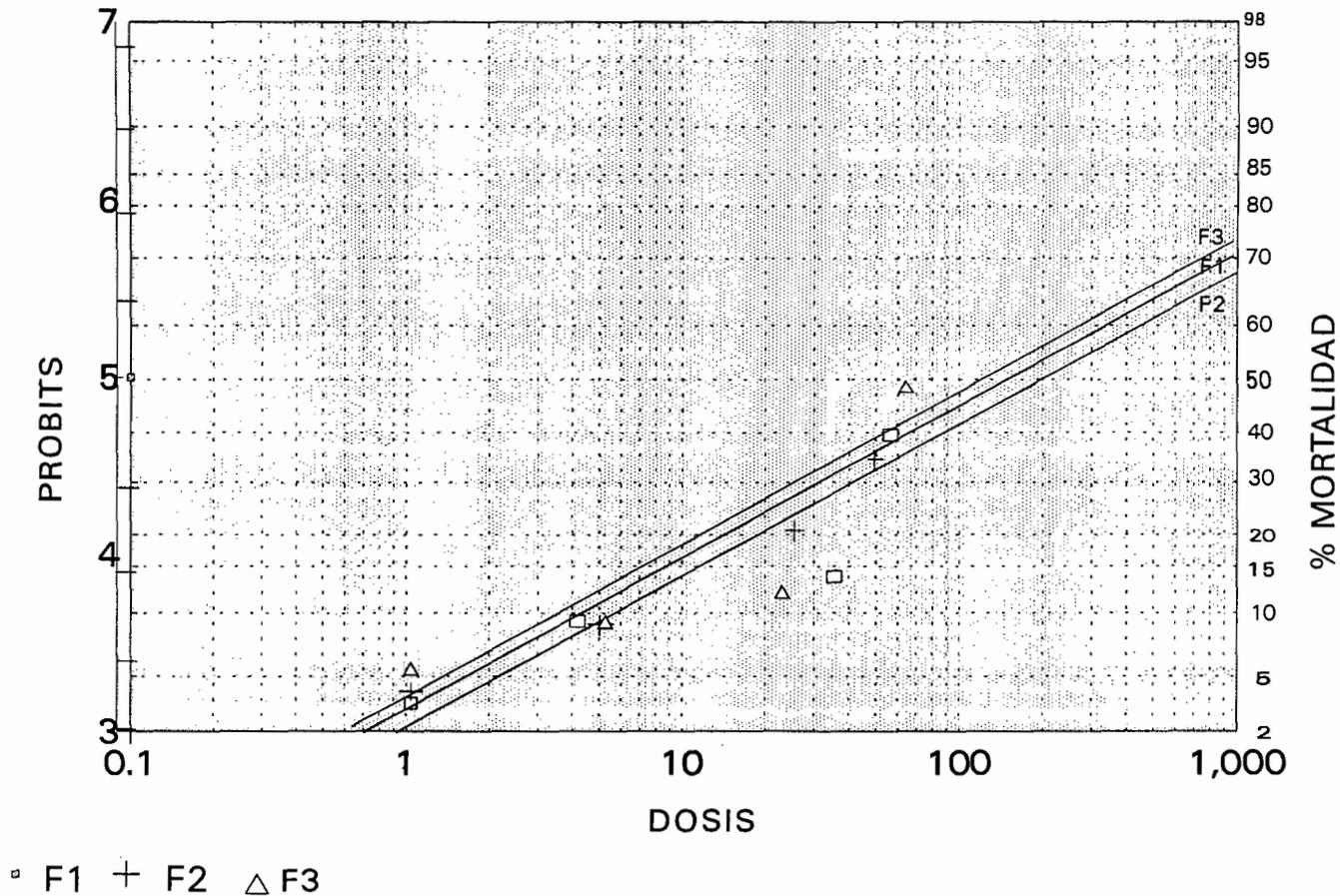
En separacion cromatografica de columna (T. hirta)



□ F1 + F2 △ F3

Fig. 5b Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus*, Say.

En separacion cromatografica de columna (M. azedarach)



## VIII. APENDICE

Fotografía que muestra: 1. Adulto con alas atrofiadas  
2. Efectos morfogenéticos en las fases de larva-  
pupas (*Culex quinquefasciatus*).

1.-



2.-



## ACROSTICO A MI CARRERA

A nte un futuro inmediato ya enfrentados y la  
G eneración nacida que llega embestida de literatura y energía;  
R ealizados, forjados académicamente hoy preparados. Y  
O bligados de pies a cabeza al agro sin compas de espera.  
N ormar nuestro criterios, encarar el difícil realismo,  
O cupando las ideas al campo y las atenciones demandadas cada día  
M ostrando que la meta trascendental aun no termina, pues..  
O tro importante renglón nos espera en la variada faceta de la vida.

*Rubén Pórez Becerra.*