



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**POTENCIAL INSECTICIDA DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H.
Rob. & Brettell Y *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE
Culex quinquefasciatus Say**

GABRIEL GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2009

La presente tesis titulada: **POTENCIAL INSECTICIDA DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell Y *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say**, realizada por el alumno: **Gabriel García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



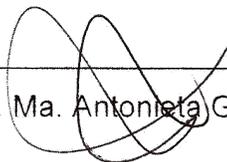
Dr. R. Marcos Soto Hernández

ASESOR:



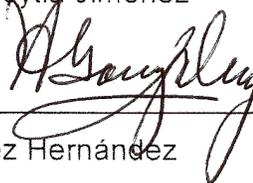
Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández

ASESOR:



Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez

ASESOR:



Dr. Víctor A. González Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Dr. R. Marcos Soto Hernández, Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández, Dra. Ma. Antonieta Goytia Jiménez y Dr. Víctor A. González Hernández por la dedicación, orientación, apoyo y consejos brindados en la realización de la presente investigación.

Al M.C. Rubén San Miguel Chavez y Sr. Domingo González Meraz por su apoyo y asesoría brindada en la fase de laboratorio.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco, M.C. Sabino Honorio Martínez Tomás y Técnico Gonzalo Flores Ambrocio, personal académico del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, por las facilidades prestadas en la realización de la investigación.

Al M.C. Ramón Nieto Hernández, C. Óscar Moreno Cernas y C. Óscar Arnoldo Vega Ortiz, encargados del Insectario de Entomología-CP, por el apoyo brindado en la realización de la investigación.

Al Dr. José Luís Villaseñor Ríos por el apoyo brindado en la identificación del material de *Roldana ehrenbergiana*.

A la Dra. Maria Eugenia Garín Aguilar y al Dr. Gustavo Valencia Del Toro por su asesoría en la realización de los análisis PROBIT.

A la Mtra. Gudelia y Sr. Adalberto por la hospitalidad ofrecida durante mi estancia en la ciudad de Oaxaca durante esta investigación.

Al Dr. Raúl Nieto Ángel, por el apoyo brindado durante mi formación académica.

Y a todas aquellas personas, amigos y familiares que de alguna u otra manera me brindaron su apoyo durante mi proceso de formación en el Colegio de Postgraduados.

Gabriel García

DEDICATORIA

A Dios.

A mi esposa Aída Juárez Cruz por ser el motivo de superación, así como por su comprensión que tuvo al permitir sacrificar momentos de convivencia, alegría y diversión, por necesidades de trabajo al realizar esta investigación.

A mi abuelita Laura García[†], por tu amor y cariño incondicional.

A mis padrinos Zenaida Ángel Jiménez y Francisco García Velasco, por el cariño y educación que me brindaron, y por abrirme las puertas de su corazón y apreciarme como a un hijo.

A mi mamá Maximina, mis hermanos: Juana, Víctor y Ma. Luisa, por su apoyo y cariño.

Y a todos aquellos familiares y personas que creyeron en mí...

Gabriel García

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
PARTE 1.....	IX - 4
RESUMEN GENERAL	X
GENERAL SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVO GENERAL	3
HIPÓTESIS GENERAL	4
PARTE 2.....	5 - 17
TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE <i>Roldana ehrenbergiana</i> (Klatt) H. Rob. & Brettell EN LARVAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i> Say.....	6
2.1. RESUMEN.....	6
2.2. INTRODUCCIÓN	7
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.3.1. Material vegetal y entomológico.....	7
2.3.2. Extractos vegetales.....	8
2.3.3. Bioensayos.....	9
2.3.4. Análisis fitoquímicos.....	9
2.3.5. Análisis estadísticos	10
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
2.4.1. Toxicidad de órganos y efecto de disolventes	11
2.4.2. Mortalidad de extractos etanólicos de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	11
2.4.3. Caracterización fitoquímica de compuestos	14
2.5. CONCLUSIONES	15
2.6. LITERATURA CITADA	16

PARTE 3	18 - 25
EFFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS DE <i>Asclepias notha</i> W. D. Stevens EN LARVAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i> Say.....	19
3.1. RESUMEN.....	19
3.2. INTRODUCCIÓN.....	20
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.3.1. Material vegetal y entomológico.....	20
3.3.2. Extractos vegetales.....	21
3.3.3. Bioensayo	22
3.3.4. Análisis fitoquímicos.....	22
3.3.5. Análisis estadísticos.....	22
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.4.1. Toxicidad de diversos órganos de <i>A. notha</i> y del sobrenadante	23
3.4.2 Caracterización fitoquímica de compuestos	24
3.5. CONCLUSIONES	24
3.6. LITERATURA CITADA	25
PARTE 4	26 - 30
DISCUSIÓN GENERAL	27
CONCLUSIÓN GENERAL	28
LITERATURA CITADA GENERAL.....	29

ÍNDICE DE CUADROS

TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

- Cuadro 1. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* ocasionada por extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* colectada bajo diferentes condiciones ambientales, observada en la ventana biológica. 12
- Cuadro 2. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* ocasionada por extractos etanólicos de raíz de *R. ehrenbergiana* observada en los bioensayos. 13
- Cuadro 3. Dosis letal media (DL₅₀) calculada de extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* colectada en dos condiciones ambientales sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*. 13

EFFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS DE *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

- Cuadro 1. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío del *C. quinquefasciatus* ocasionada por extracto acuoso y alcohólicos de órganos secos de *A. notha*. 23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción positiva para terpenos (mancha violeta) presentes en extracto etanólico de raíz de <i>R. ehrenbergiana</i>	15
---	----

PARTE 1

RESUMEN GENERAL

POTENCIAL INSECTICIDA DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell Y
Asclepias notha W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

GENERAL SUMMARY

POTENTIAL INSECTICIDE OF *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell AND
Asclepias notha W. D. Stevens IN LARVAE OF *Culex quinquefasciatus* Say

INTRODUCCIÓN GENERAL

OBJETIVO GENERAL

HIPÓTESIS GENERAL

POTENCIAL INSECTICIDA DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell Y *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

Gabriel García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2009

Las especies *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell (Asteraceae) y *Asclepias notha* W. D. Stevens (Asclepiadaceae), son plantas que se utilizan por sus propiedades tóxicas en hormigas y para obtener una goma natural, respectivamente, ésta última, sintetiza compuestos tóxicos que pueden ser perjudiciales para ciertos insectos. Sin embargo, se desconoce la actividad insecticida de *R. ehrenbergiana* y *A. notha* en plagas de interés agrícola o sanitaria. Ante estas interrogativas, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial insecticida de *R. ehrenbergiana* y *A. notha*, utilizando larvas en cuanto instar tardío de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Para ello se prepararon extractos de diferentes órganos de la planta (flor, fruto, hoja, raíz y tallo), utilizando disolventes como agua destilada, aguardiente de caña, diclorometano, etanol 96 % y hexano, en material vegetal procedente de dos colectas (con y sin estrés hídrico), bajo dos formas de uso (fresco y seco), evaluado dos grupos de dosis, las cuales se ubicaron en los rango de 0.0001 a 20 % y de 1 a 20 % para determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀), en los extractos sobresalientes, como indicador para evaluar su efectividad insecticida. Se colocaron 20 larvas en vasos que contenían 100 mL de agua destilada, al cual se le agregó 1 mL de la dosis a evaluar, realizando 5 repeticiones y un testigo. La mortalidad se registro a las 24 h. Los resultados obtenidos indicaron que *R. ehrenbergiana* presentó fuerte actividad insecticida sobre *C. quinquefasciatus*, causando una mortalidad de 100 % comparado con el 55 y 74 % provocado por *A. notha* a dosis del 20 %. La raíz de *R. ehrenbergiana* fue el órgano con mayor toxicidad, mientras que en *A. notha* fueron la hoja y tallo. El etanol 96 % fue el disolvente mas apropiado para la extracción de los compuestos presentes en raíz de *R. ehrenbergiana*, en contraste, el agua destilada fue la mejor opción en *A. notha*. En ambas especies, la actividad insecticida se incrementó al utilizar material en forma seca. La mayor toxicidad de *R. ehrenbergiana* se presentó en raíz seca colectada en época de lluvia, obteniendo una DL₅₀ de 2.5%. El efecto tóxico en *R. ehrenbergiana* se atribuyó a compuesto de tipo terpenos, mientras que en *A. notha*, la actividad no es provocado por cardenólidos.

PALABRAS CLAVE: *Roldana ehrenbergiana*, *Asclepias notha*, *Culex quinquefasciatus*, extractos acuosos-alcohólicos, actividad insecticida, terpenos.

POTENTIAL INSECTICIDE OF *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell AND *Asclepias notha* W. D. Stevens IN LARVAE OF *Culex quinquefasciatus* Say

Gabriel García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2009

The *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell (Asteraceae) and *Asclepias notha* W. D. Stevens (Asclepiadaceae) are plants used for their toxic properties in ants and to obtain a natural chewing gum, respectively. The *A. notha* synthesizes toxic compounds that may harm to insects. However, was ignored the insecticidal effect of *R. ehrenbergiana* and *A. notha* on agricultural or health pests. With these questions, in this research was evaluated the insecticide effect from *R. ehrenbergiana* and *A. notha* in late IV instar larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). The extracts were prepared from different organs (flower, fruit, leaf, root and stem), using five solvents (distilled water, alcohol of cane, dichloromethane, 96 % ethanol and hexane) in two samplings (with and without water deficit stress), in two forms of use (fresh and dry material) and tested two dose groups in the range of 0.0001 to 20% and 1 to 20% for obtain the lethal average dose (LD₅₀), in the excellent extracts, as indicator of the insecticide effect. The 20 larvae were placed in plastic glasses with 100 mL of distilled water, later, was added 1 mL of the dose tested, with 5 repetitions. The mortality was registered at 24 h. The results indicated that *R. ehrenbergiana* presents older insecticide activity in *C. quinquefasciatus*, causing mortality of 100% compared with 55 and 74 % of *A. notha* to 20 % dose. The root *R. ehrenbergiana* is the organ with more toxicity, while in *A. notha* were leaf and stem. The 96 % ethanol is the most solvent for extraction of compounds present in root of *R. ehrenbergiana*, in contrast, the distilled water was the best option in *A. notha*. In both species, the insecticidal activity is increased by using dry material. The older toxicity in *R. ehrenbergiana* was presented in dry root collected in the rainy season, with LD₅₀ of 2.5%. The toxic effect on *R. ehrenbergiana* was attributed to terpenes, while in *A. notha*, the activity is not caused by cardenolides.

INDEX WORDS: *Roldana ehrenbergiana*, *Asclepias notha*, *Culex quinquefasciatus*, aqueous-alcoholic extracts, insecticidal activity, terpenes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde tiempos remotos el hombre ha aprovechado las plantas para satisfacer sus necesidades, el uso que ha encontrado ha sido diverso: alimenticio, medicinal, vestimenta, construcción, colorante, veneno y contra plagas. En esto último, se usaron como cenizas, humo, aceites, polvos, resinas, extractos y jugos (Rodríguez *et al.*, 2003). En este sentido, las primeras especies vegetales utilizadas como insecticidas fueron *Derris elliptica* (Wallich) Benth (Fabaceae), *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), *Ryania speciosa* Vahl (Flacourtiaceae), *Schoenocaulon officinale* (Schltdl. & Cham.) A. Gray ex Benth (Liliaceae), *Tanacetum cinerariaefolium* Trev (Asteraceae). Actualmente, otras especies que están adquiriendo importancia son *Allium sativum* L. (Liliaceae), *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), *Eucalyptus globosus* Labill (Myrtaceae), y *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) debido a que sus compuestos secundarios muestran propiedad repelente, antialimentaria y/o insecticida (Rodríguez, 2005 y 2006).

No obstante, existen otras especies que no han sido evaluadas, en este sentido, la presente investigación abordó el estudio de *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell (Asteraceae) y *Asclepias notha* W. D. Stevens (Asclepiadaceae) colectadas en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, donde se utilizan por sus propiedades tóxicas y para la obtención de una goma natural, respectivamente. La especie *R. ehrenbergiana* se ha reportado que contiene sesquiterpenos de tipo eremofilanos y furanoeremofilanos (Pérez *et al.*, 2005 y 2006), los cuales inhiben la alimentación de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) y *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (Reina *et al.*, 2001 y 2006), y podrían ser los responsables de la toxicidad en hormigas defoliadoras (Rodríguez, 1999). Sin embargo, se desconoce su potencial en otras plagas de interés agrícola o sanitaria. En el caso de *A. notha*, el látex se utiliza para obtener una goma natural que se consume como chicle en la Mixteca Alta Oaxaqueña, generando desechos vegetales y sobrenadante que puede contener compuestos tóxicos perjudiciales para ciertos insectos, entre los que pueden encontrarse plagas de importancia de agrícola o sanitaria.

Ante estas interrogativas, la presente investigación tuvo como objetivos, evaluar la actividad insecticida de *R. ehrenbergiana* y *A. notha* utilizando como modelo biológico a

Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). Para ello se evaluaron extractos acuosos, alcohólicos y orgánicos de diversas partes vegetales de ambas especies, así como del sobrenadante, para determinar el efecto tóxico sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*, con base en los procedimientos sugeridos por la OMS (1981) para determinar la susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* a insecticidas, tomando en cuenta que en etapa tardía las larvas de este insecto presentan la mayor resistencia a compuestos tóxicos, de manera que el efecto tóxico dará mejor resultado en etapas anteriores (primero, segundo y tercer instar) del desarrollo del insecto. Así mismo, *C. quinquefasciatus* cobra importancia debido al papel que juega como transmisor de virus causantes de enfermedades, como dengue y malaria, en humanos. Adicionalmente, se determinó el tipo de compuesto involucrado en la acción tóxica encontrada en los extractos sobresalientes.

OBJETIVO GENERAL

Objetivo general

- Evaluar la actividad insecticida de extractos vegetales de *R. ehrenbergiana* y de *A. notha*, en larvas de *C. quinquefasciatus*.

Objetivos particulares

- Evaluar diferentes órganos vegetales, disolventes, formas de uso y dosis de *R. ehrenbergiana* y *A. notha*.
- Determinar la DL_{50} de aquellos extractos que provoquen mortalidad $\geq 50\%$ sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*.
- Identificar el grupo fitoquímico al que pertenecen los compuestos presentes en los extractos sobresalientes de *R. ehrenbergiana* y *A. notha*.

HIPÓTESIS GENERAL

- Los extractos vegetales de *R. ehrenbergiana* y *A. notha* provocan mortalidades $\geq 50\%$ en larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* a dosis $\leq 20\%$.

PARTE 2

TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

2.1. RESUMEN

2.2. INTRODUCCIÓN

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal y entomológico

2.3.2. Extractos vegetales

2.3.3. Bioensayos

2.3.4. Análisis fitoquímicos

2.3.5. Análisis estadísticos

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Toxicidad de órganos y efecto de disolventes

2.4.2. Mortalidad de extractos etanólicos de raíz de *R. ehrenbergiana*

2.4.3. Caracterización fitoquímica de compuestos

2.5. CONCLUSIONES

2.6. LITERATURA CITADA

TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

2.1. RESUMEN

La especie *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell (Asteraceae) tiene efectos tóxicos contra hormigas defoliadoras, sin embargo se desconoce su comportamiento en otras plagas. Por lo tanto, en la presente investigación se evaluó la actividad insecticida de *R. ehrenbergiana* en larvas de cuarto instar tardío de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Para ello se utilizó material vegetal procedente de dos colectas (con y sin estrés hídrico), realizando extractos en diferentes órganos de la planta (flor, hoja, raíz y tallo), bajo dos formas de uso (fresco y seco), utilizando cinco disolventes (agua destilada, aguardiente de caña, diclorometano, etanol 96 % y hexano), y evaluando dos grupos de dosis (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 20 %; y 1, 1.4, 2.1, 3.2, 4.6, 4.8, 6.6, 10, 12.1, 14.8 y 20 %) para obtener la Dosis Letal Media (DL₅₀) como indicador de la efectividad insecticida de los extractos sobresalientes. Se colocaron 20 larvas en vasos que contenían 100 mL de agua destilada, al cual se le agregó 1 mL de la dosis a evaluar, realizando 5 repeticiones y un testigo. La mortalidad se registro a las 24 h. Los resultados obtenidos indican que la raíz es el órgano donde se concentran los compuestos tóxicos y el etanol 96 % es el mejor disolvente. La mejor condición es coleccionar la raíz en época de lluvia, y luego deshidratarla, logrando con ello una DL₅₀ de 2.5 %, seguida del 5.9 y 9.3 % obtenida en raíz seca y fresca coleccionada bajo estrés hídrico. Esta investigación aporta una alternativa ecológica para el control de *C. quinquefasciatus*, que puede ampliarse a otras plagas, con compuestos tóxicos de tipo terpenos acumulados en raíz de *R. ehrenbergiana*.

Palabras claves: *Roldana ehrenbergiana*, *Culex quinquefasciatus*, extractos alcohólicos-raíz, actividad insecticida, terpenos.

2.2. INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de alternativas ecológicas para el manejo de plagas, tanto de importancia agrícola como médico veterinaria, se han probado diversas sustancias vegetales, entre las que destacan los sesquiterpenos eremofilanos y furanoemofilanos de *Senecio miser* Hook. f. y *Senecio poepigii* Hook et Arn (Asteraceae) que inhiben la alimentación de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) y *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chysomelidae), a la concentración efectiva media de 3.49 y 12.24 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Reina *et al.*, 2001 y 2006). Estos tóxicos se han reportado también en algunas especies de *Roldana* (Asteraceae) como *Roldana aschenborniana* (S. Schauer) H. Rob. & Brettell (Arciniegas *et al.*, 2004), *Roldana ehrenbergiana* (Klatt) H. Rob. & Brettell (Pérez *et al.*, 2005 y 2006), *Roldana heterogama* (Benth.) H. Rob. & Brettell (Bohlmann y Zdero, 1978) y *Roldana sessilifolia* (Hook. & Arn.) H. Rob. & Brettell (Delgado *et al.*, 1991).

Entre estas, *R. ehrenbergiana*, antes clasificada como *Senecio canicidus* Sessé & Moc y después como *Senecio ehrenbergianus* Klatt (Turner, 2005), es una especie que afecta a hormigas defoliadoras; se mezcla con aceite de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), miel, pulpa de toronja, sorgo molido y melaza, para estimular su ingestión y causar toxicidad (Rodríguez, 1999). No obstante, se desconoce su potencial en otras plagas por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad insecticida de extractos de diversos órganos, obtenidos con disolventes acuosos, alcohólicos y poco polares en larvas de cuarto instar tardío de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal y entomológico

El material vegetal de *R. ehrenbergiana* procedió de cuatro colectas (16 de agosto del 2008, 8 y 23 de julio y 19 de agosto del 2009) realizadas en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, en el paraje “llano de la hierba” ubicado a 97° 27' LO y 17° 44' LN,

a 2470 msnm. De éstas, las colectas de agosto del 2008 y 2009 se efectuaron en la época de canícula, con aproximadamente 15 días bajo estrés hídrico, mientras que las colectas de julio se hicieron en época de lluvias. Del material colectado, 3 ejemplares se prepararon para la determinación botánica y el resto se utilizó para elaborar los extractos. Los ejemplares se prensaron, secaron y etiquetaron para la determinación a nivel de especie, la cual realizó el Dr. José Luís Villaseñor¹. Este material se depositó en el Herbario Nacional de México de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El material para los extractos se dividió en dos partes para utilizarlo en fresco y seco. El material fresco se envolvió en papel periódico y se trasladó en una hielera al laboratorio de la Bioplanta del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR, Unidad Oaxaca) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) para elaborar los extractos por separado de flor, hoja, raíz y tallo. La otra parte se secó en una estufa marca Riossa® a 45 °C por 72 h en las instalaciones del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo; después se procedió a moler cada órgano por separado (flor, hoja, raíz y tallo) con un molino de grano marca Corona® y el polvo se almacenó en recipientes herméticos de plástico en un lugar seco a temperatura ambiente, por un lapso no mayor de un mes.

Las larvas de *C. quinquefasciatus* se obtuvieron de masas de huevos procedentes de una población de adultos criados en el Laboratorio de Control Biológico del CIIDIR-IPN-Oaxaca, las cuales se colocaron en 20 bandejas de plástico (47x35x12 cm) con agua, para su eclosión a una temperatura promedio de 25 ± 2 °C y una humedad relativa de 60 ± 10 %. En estas bandejas emergieron y se desarrollaron las larvas, a las cuales se les proporcionó cada 2 días alimento para peces previamente molido. Las larvas en cuarto instar tardío (OMS, 1981) se tamizaron para homogeneizar la población antes de usarlas en los bioensayos.

2.3.2. Extractos vegetales

El material fresco, el cual se trituró en un mortero de porcelana, y seco se depositaron en diferentes disolventes: agua destilada (acuoso), aguardiente de caña Chilapa® y etanol 96 % (alcohólicos), diclorometano y hexano (poco polares). Los extractos se

¹ Investigador en Taxonomía de la familia Asteraceae en México. Instituto de Biología de la UNAM. Septiembre del 2009.

obtuvieron por maceración a una dosis² inicial del 20 %, que se denominó “solución madre”; el macerado se depositó en recipientes de vidrio de 100 mL, donde se dejaron en reposo durante 24 h a temperatura ambiente, y después se filtraron con Miracloth[®]. Al considerar los diversos órganos y disolventes, se obtuvieron 40 soluciones madres. Cuando se usó diclorometano y hexano, después del filtrado se procedió a evaporar dichos disolventes en un rotaevaporador Buchi R114[®] hasta sequedad; el residuo se resuspendió con 1.5 mL de etanol 96 %, y éste concentrado se conservó en un vial de 2 mL a temperatura ambiente.

Se consideraron dos grupos de dosis. El primer grupo (ventana biológica) involucró dosis de 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 20 %. El segundo (bioensayo) incluyó 1, 1.4, 2.1, 3.2, 4.6, 4.8, 6.6, 10, 12.1, 14.8 y 20 %. Se realizaron 5 repeticiones en cada dosis más un testigo (0 %), al cual sólo se le añadió 1 mL del mismo disolvente utilizado en el extracto. Para la preparación de las dosis, la solución madre se diluyó con agua destilada para obtener la dosis inmediatamente menor, ésta para hacer la siguiente y así sucesivamente hasta obtener la menor dosis en cada grupo.

2.3.3. Bioensayos

Se colocaron 20 larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* en vasos Cristal[®], los cuales contenían 100 mL de agua destilada, conformando las unidades experimentales. Posteriormente se aplicó 1 mL de cada uno de los extractos a la dosis a evaluar, excepto al testigo. La mortalidad de larvas se registró a las 24 h, considerando muerta aquella larva que no presentó movimientos normales (OMS, 1981).

2.3.4. Análisis fitoquímicos

Se utilizaron 40 mL del extracto de material vegetal colectado el 8 de julio del 2009. El extracto etanólico de raíz fresca de *R. ehrenbergiana* se filtró con papel Watman[®] # 40 para eliminar residuos de raíz; después el etanol se evaporó en un rotaevaporador Buchi R114[®] hasta un volumen final de 20 mL. Con esta cantidad de extracto, se implementaron pruebas preeliminares y análisis de cromatografía en capa fina (CCF).

² Es la cantidad de extracto que se aplica a la unidad experimental.

Las pruebas preeliminares se llevaron a cabo en seis tubos de ensayo. A cada tubo se le agregaron 2 mL del extracto más los reactivos específicos para detectar alcaloides, fenólicos, lignanos, saponinas, taninos y terpenos. Al Tubo 1 se le agregó el reactivo de Dragendorff, el cual en caso de presencia de alcaloides generará un precipitado marrón; el Tubo 2 se agitó vigorosamente por 5 min para observar si había formación de espuma típica de saponinas; al Tubo 3 se añadió un trocito de cinta de magnesio y 1 mL de HCl concentrado y si generaba una espuma rojiza se tenía evidencia de la presencia de flavonoides; en el Tubo 4 se observó si había presencia de pequeñas gotas de aceites o aroma agradable que revelara presencia de aceites esenciales; al Tubo 5 se le adicionó el reactivo de Lieberman-Buchard (tres gotas de CHCl_3 , tres gotas de anhídrido acético y tres gotas de H_2SO_4 concentrado en frío) y si producía un tono rosa-violeta se demostraba la presencia de terpenos; y al Tubo 6 se le agregaron dos gotas de FeCl_3 para observar si daba la coloración violeta típica para taninos.

En el análisis de CCF se utilizó el residuo que se obtuvo después de evaporar todo el etanol 96 % presente en el extracto. Se corrieron tres placas en los siguientes medios de elusión: a) diclorometano:etanol (9:1); b) ácido acético:n-butanol:agua (7:2:1); y c) hexano:acetato de etilo (8:2). Cada una de las placas se reveló con: a) Dragendorff, b) FeCl_3 al 3 % y c) Vainillina-ácido sulfúrico, para detectar: a) alcaloides, b) flavonoides, taninos y lignanos, y c) terpenos.

2.3.5. Análisis estadísticos

Inicialmente, se seleccionaron los extractos evaluados en la ventana biológica que causaron mortalidad \geq al 50 %. Después, se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) considerando como tratamientos los diferentes ambientes y formas de uso del material, en cada dosis de interés; estos análisis se hicieron considerando un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Finalmente, los datos obtenidos de los bioensayos, donde se consideró como tratamiento las diferentes dosis, se les aplicó un análisis PROBIT con el programa SPSS ver. 15.0, el cual correlaciona la dosis expresada en forma logarítmica (\log_{10}) y la mortalidad expresada en porcentaje, para obtener la Dosis Letal Media (DL_{50}).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Toxicidad de órganos y efecto de disolventes

En la evaluación de la efectividad insecticida de los extractos acuosos y alcohólicos de flor, hoja, raíz y tallo de *R. ehrenbergiana* usados en fresco, de plantas colectadas el 8 de julio del 2009 y aplicados a dosis de de 0.0001 a 20 %, se encontró que los extractos alcohólicos de raíz fueron los únicos que causaron una mortalidad superior a 50 %.

El extracto de raíz en etanol 96 % a 10 y 20 % dio el mejor efecto al provocar 64 y 98 % de mortalidad, respectivamente, en larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*, y el extracto con aguardiente a 20 % causó 65 % de mortalidad.

La eficiencia del etanol 96 % se mantuvo al compararlo con los disolventes poco polares (diclorometano y hexano) utilizados en los extractos de raíz seca de *R. ehrenbergiana* colectada el 16 de agosto del 2008, la cual fue de 83 y 99 % de mortalidad a 10 y 20 %, en comparación a 67 y 40 % de mortalidad causada por el diclorometano y hexano, respectivamente, a la dosis de 20 %.

La eficiencia de los alcoholes para extraer compuestos sesquiterpénicos concuerda con lo encontrado por Arciniegas *et al.* (2004) y Pérez *et al.* (2006) quienes han aislado e identificado dichos compuestos en extractos metanólicos. La toxicidad de la raíz de *R. ehrenbergiana* se debe probablemente al grupo de compuestos furanoeremofilanos: roldehrenbergina A, B, C, D y sendarwina I, que han sido aislados en hoja y raíz de dicha especie (Pérez *et al.*, 2005 y 2006) y a los cuales también se les ha encontrado efecto antialimentario en *M. persicae* y *L. decemlineata* (Reina *et al.*, 2001).

2.4.2. Mortalidad de extractos etanólicos de raíz de *R. ehrenbergiana*

La respuesta de mortalidad de los extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* se registró entre 1 y 20 %, con mortalidad total de larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* en el extracto etanólico de raíz seca colectada bajo condiciones de estrés hídrico a una dosis del 20 % (Cuadro 1). Sin embargo, la actividad insecticida de dicho extracto disminuyó cuando se aplicó al 10 %, teniendo

que la mayor mortalidad ($P \leq 0.05$), para dicha dosis, se presentó en el extracto etanólico de raíz seca colectada en humedad, con un 99 % de mortalidad.

Cuadro 1. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* ocasionada por extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* colectada bajo diferentes condiciones ambientales, observada en la ventana biológica.

Dosis (%)	Condiciones ambientales			
	Estrés hídrico [†]		Humedad ^{††}	
	Fresca	Seca	Fresca	Seca
0 (Testigo)	0	0	0	0
1 [§]	0 B	15 ± 8.7 A	0 B	13 ± 2.7 A
10	47 ± 12.5 [¶] C^{§§}	70 ± 10.6 B	7 ± 10.4 D	99 ± 2.2 A
20	96 ± 4.2 A	100 ± 0.0 A	33 ± 15.7 B	98 ± 2.7 A

[†]Colecta del 19 de agosto del 2009. ^{††}Colecta del 23 de julio del 2009. [§]Las dosis de 0.0001 a 0.1 % se omitieron debido a que no causaron mortalidad. [¶]Los valores son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. ^{§§}Medias con letras diferente en una misma fila, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En los bioensayos subsecuentes se obtuvo mortalidad total ($P \leq 0.05$) en el extracto etanólico de raíz seca colectada bajo condiciones de humedad a una dosis del 10%, seguido por el 76 y 48 % de mortalidad ocasionada en los extractos de raíz seca y fresca, respectivamente, colectada bajo estrés hídrico (Cuadro 2).

Las DL_{50} determinadas en extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* colectada bajo condiciones de humedad y estrés hídrico corroboraron las diferencias observadas en mortalidad, teniendo que la menor DL_{50} y por tanto mayor toxicidad, se obtuvo en el extracto de raíz seca colectada bajo condiciones de humedad con 2.5 %, seguida de las DL_{50} de 5.9 y 9.3 % de los extractos de raíz seca y fresca colectadas bajo estrés hídrico (Cuadro 3).

Cuadro 2. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* ocasionada por extractos etanólicos de raíz de *R. ehrenbergiana* observada en los bioensayos.

Dosis (%)	Raíz fresca colectada bajo estrés hídrico [†]	Raíz seca colectada bajo estrés hídrico [†]	Raíz seca colectada en humedad ^{††}
0 (testigo)	0	0	0
1.0	0	5 ± 6.1	18 ± 7.6
1.4	ne [§]	16 ± 11.9	23 ± 9.7
2.1	0	19 ± 10.8	51 ± 17.5
3.2	ne	28 ± 7.6	62 ± 13.0
4.6	ne	34 ± 19.8	69 ± 7.4
4.8	12 ± 7.6 ^{§§}	ne	ne
6.6	ne	49 ± 14.3	78 ± 7.6
10.0	48 ± 10.4 ^{c¶}	76 ± 8.2 ^B	100 ± 0.0 ^A
12.1	64 ± 11.4	ne	ne
14.8	88 ± 2.7	ne	ne
20.0	99 ± 2.2	ne	ne

[†]Colecta del 19 de agosto del 2009. ^{††}Colecta del 23 de julio del 2009. [§]dosis no evaluada (ne) para la condición indicada. ^{§§}Los valores son promedio de cinco repeticiones ± desviación estándar. [¶]Medias con letras diferente en la dosis de 10.0 % son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cuadro 3. Dosis letal media (DL₅₀) calculada de extractos etanólicos de raíz fresca y seca de *R. ehrenbergiana* colectada en dos condiciones ambientales sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*.

Condiciones de colecta	Forma de uso	DL ₅₀ (%)	Límites fiduciales (%) al 95 %	
			Inferior	Superior
Estrés hídrico [†]	Fresca	9.3	7.95	10.62
	Seca	5.9	4.68	8.27
Humedad ^{††}	Seca	2.5	1.88	3.13

[†]Colecta del 19 de agosto del 2009. ^{††}Colecta del 23 de julio del 2009.

Las diferencias observadas en los extractos etanólicos de raíz de *R. ehrenbergiana* producto de los ambientes contrastantes de humedad bajo el cual se colectó la raíz, sugiere que el estrés hídrico afectó la producción de compuestos tóxicos, como sucedió en las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) en donde la emisión de compuestos sesquiterpénicos se redujo o inhibió después de 4 días de estrés hídrico (Ormeño *et al.* (2007); desde el punto de vista fisiológico, el estrés disminuyó la tasa de fotosíntesis neta en *Hypericum perforatum* L. (Clusiaceae) pasando de 6.2 a 3.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ después de 12 días bajo estrés hídrico, lo que afectó la producción de metabolitos, propicia la disminución de ciertos compuestos (hipericina) y el incremento de otros (hiperforina) Zobayed *et al.* (2007).

Con lo que respecta a la DL_{50} del 2.5 % obtenida en el extracto etanólico de raíz seca de *R. ehrenbergiana* colectada en humedad, equivalente a 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, fue similar a la concentración letal media determinada por Pavela (2009) de 278 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el extracto metanólico de raíz seca de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae) cuando evaluó la actividad larvicida sobre larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus*, mismo que atribuyó a compuestos fenólicos, terpénicos y/o alcaloides.

2.4.3. Caracterización fitoquímica de compuestos

Las diversas pruebas implementadas en el extracto etanólico de raíz fresca de *R. ehrenbergiana* dieron reacciones negativas para alcaloides, fenoles, saponinas y taninos; en contraste dio reacción positiva a terpenos por revelarse el color violeta al aplicar el reactivo de Lieberman-Buchard en el Tubo 5, color característico de este grupo de compuestos. El análisis posterior de este extracto por cromatografía en capa fina y revelada con vainillina en medio ácido, mostró también el desarrollo color violeta característico de los compuestos terpénicos (Wagner y Bladt, 1996) (Figura 1). La reacción de color permite postular que la toxicidad de los extractos de raíz se debe a compuestos sesquiterpénicos de tipo furanoeremofilanos, mismos que han sido aislados y caracterizados por Pérez *et al.* (2005 y 2006) en raíz de *R. ehrenbergiana* y que han mostrado efecto contra plagas de *M. persicae* y *L. decemlineata* (Reina *et al.*, 2001).



Figura 1. Reacción positiva para terpenos (mancha violeta) presentes en extracto etanólico de raíz de *R. ehrenbergiana*.

2.5. CONCLUSIONES

La raíz de *R. ehrenbergiana* es el órgano en donde se acumulan compuestos tóxicos los cuales se extraen con etanol 96 %, disolvente más apropiado para tal propósito; la mayor toxicidad se presenta cuando la raíz es colectada en época de lluvia y luego deshidratada al obtener una DL_{50} de 2.5 %, teniendo que el estrés hídrico afecta la producción de los compuestos tóxicos de tipo terpenos, responsables de la actividad insecticida.

2.6. LITERATURA CITADA

- Arciniegas A , A L Pérez-Castorena, J L Villaseñor, and A Romo de Vivar (2004)** Chemical constituents of *Roldana aschenborniana*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 615–618.
- Bohlmann F and C Zdero (1978)** New Cacalol derivatives from *Roldana heterogama*. *Phytochemistry* 17: 565-566.
- Delgado G, P E García, R A Bye and E Linares (1991)** Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry* 30: 1716-1719.
- OMS (1981)** Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Organización Mundial de la Salud (OMS). Geneva: WHO (WHO/VBC/81.80).
- Ormeño E, J P Mévy, B Vila, A Bousquet Melou, S Greff, G Bonin and C Fernández (2007)** Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67: 276-284
- Pavela R (2009)** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 105: 887-92.
- Pérez Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, I De la Rosa, J L Contreras and A Romo de Vivar (2005)** Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. *Z. Naturforsch.* 60b: 1088-1092.
- Pérez Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, R A Toscazo, J L Contreras and A Romo de Vivar (2006)** 8,9-seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. *Journal of the Mexican Chemical Society.* 50: 157-159.
- Reina M, A González Coloma, C Gutiérrez, R Cabrera, M L Rodríguez, V Fajardo and L Villarroel (2001)** Defensive Chemistry of *Senecio miser*. *Journal of Natural Products* 64: 6-11.
- Reina M, A González Coloma, D Domínguez Díaz, R Cabrera, C Jiménez Mariño, M L Rodríguez and L Villarroel (2006)** Bioactive eremophilanolides from *Senecio poepigii*. *Natural Product Research* 20:13–19.

- Rodríguez H C (1999)** Técnicas tradicionales para el combate de hormigas defoliadoras. *In*: Memoria avances en la investigación 1998. T J Cibrian, C C Llanderal, P R Guzmán y R D Alvarado (eds). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. pp:15-17.
- Turner B L (2005)** A recension of the Mexican species of *Roldana* (Asteraceae: Senecioneae). *Phytologia* 87:205-249.
- Wagner H and S Bladt (1996)** Plant drug analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. 384 p.
- Zobayed S M A, F Afreen and T Kozai (2007)** Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* 59:109-116

PARTE 3

EFFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS DE *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

3.1. RESUMEN

3.2. INTRODUCCIÓN

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal y entomológico

3.3.2. Extractos vegetales

3.3.3. Bioensayo

3.3.4. Análisis fitoquímicos

3.3.5. Análisis estadísticos

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Toxicidad de diversos órganos de *A. notha* y del sobrenadante

3.4.2 Caracterización fitoquímica de compuestos

3.5. CONCLUSIONES

3.6. LITERATURA CITADA

EFFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS DE *Asclepias notha* W. D. Stevens EN LARVAS DE *Culex quinquefasciatus* Say

3.1. RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la efectividad de las sustancias tóxicas presentes en los subproductos generados en el aprovechamiento de látex de *Asclepias notha* W. D. Stevens (Asclepiadaceae) para el control de plagas de interés agrícola o sanitario, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad insecticida de *A. notha* sobre larvas de cuarto instar tardío de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Para ello se prepararon extractos de diferentes órganos de la planta (flor, fruto, hoja, tallo), bajo dos formas de uso (fresco y seco), utilizando como disolventes agua destilada, aguardiente de caña y etanol 96 %, en dosis de 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 10 y 20 %. Se depositaron 20 larvas en vasos con 100 mL de agua destilada, al cual se le agregó 1 mL de la dosis a evaluar, considerando 5 repeticiones y un testigo. La mortalidad se registro a las 24 h. Los extractos acuosos de hoja y tallo de material seco causaron mortalidades de 74 y 55 %, respectivamente, a una dosis del 20 %. Los análisis fitoquímicos indicaron nula presencia de cardenólidos. La presente investigación demuestra que *A. notha* es una especie que no sintetiza cardenólidos, pero evidencia la presencia de compuestos en hoja y tallo con cierta actividad toxica.

Palabras claves: *Asclepias notha*, *Culex quinquefasciatus*, extracto acuosos-orgánicos, actividad insecticida.

3.2. INTRODUCCIÓN

El proceso evolutivo del género *Asclepias* (Asclepiadaceae) se ha encaminado a la producción de látex con compuestos tóxicos como medio de defensa contra sus enemigos naturales. Sin embargo, especies como *Labidomera clivicollis* Kirby (Coleoptera: Chysomelidae) y *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae) han coevolucionado con tal mecanismo de defensa al alimentarse y secuestrar dichos compuestos presentes en el látex de *Asclepias syriaca* L.; utilizándolos como medio de defensa contra sus depredadores (Agrawal *et al.*, 2008; Seiber *et al.*, 1986). No obstante, la mayor parte de insectos y herbívoros ha fracasado en tal adaptación.

En el caso de *Asclepias notha* W. D. Stevens, es una especie cuyo látex extraído de diversas partes vegetales (hoja y tallo), se obtiene una goma natural que se consume como chicle en la Mixteca Alta Oaxaqueña, generando residuos vegetales y acuosos en el proceso, los cuales pueden contener sustancias tóxicas que pueden ser perjudiciales para ciertos insectos.

En este sentido, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad insecticida de extractos acuosos y alcohólicos de órganos vegetales y sobrenadante generado en el aprovechamiento del látex de *A. notha* aplicados a larvas de cuarto instar tardío de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal y entomológico

El material vegetal de *A. notha* utilizado se colectó el 19 de mayo y 8 de julio del 2009 en el municipio de San Miguel Tulancingo, Oaxaca, en el paraje conocido como “llano del chicalote”, ubicado a los 97° 26' LO y 17° 43' LN, y a 2500 msnm. El material colectado se dividió en dos partes, una para utilizarla en fresco y otra en seco. La parte fresca se envolvió en papel periódico y se trasladó en una hielera al laboratorio de la Bioplanta del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral

Regional (CIIDIR, Unidad Oaxaca) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) para elaborar extractos de flor, fruto, hoja y tallo. La otra parte, se secó en una estufa marca Riossa® a 45 °C por 96 h en las instalaciones del Colegios de Posgraduados, Campus Montecillo; después se procedió a moler cada órgano por separado (flor, fruto, hoja y tallo) con un molino de grano marca Corona® y el polvo se almacenó en recipientes herméticos de plástico en un lugar seco a temperatura ambiente, por un lapso no mayor de un mes.

Las larvas de *C. quinquefasciatus* se obtuvieron de masas de huevos procedentes de una población de adultos criados en el Laboratorio de Control Biológico del CIIDIR-IPN-Oaxaca. Los huevos se colocaron en 10 bandejas de plástico (47x35x12 cm) con agua para su eclosión a una temperatura promedio de 25 ± 2 °C y una humedad relativa de 60 ± 10 %. Las larvas emergieron y se desarrollaron en las bandejas, a las cuales se les proporcionó cada 2 días alimento para peces previamente molido. Cuando las larvas llegaron a cuarto instar tardío (OMS, 1981), éstas se tamizaron para homogeneizar la población.

3.3.2. Extractos vegetales

El procedimiento utilizado fue la maceración, el cual consistió en depositar el material fresco, el cual se trituroó en un mortero de porcelana, y seco en recipientes de vidrio, los cuales contenían 100 mL del disolvente respectivo: agua destilada (acuoso), aguardiente de caña Chilapa® y etanol 96 % (alcohólicos), donde se dejaron en reposo durante 24 h a temperatura ambiente, y después se filtraron con Miracloth®. Los extractos se obtuvieron a una dosis³ inicial del 20 %, que se denominó “solución madre”. Al final se obtuvieron 24 diferentes extractos. También, se evaluó el “sobrenadante” que se obtuvo al procesar látex colectado el 8 de julio del 2009, previamente almacenado en viales color ámbar y colocado en congelación (0 °C) por un periodo de 24 h; terminado este tiempo se observó la parte sólida (goma) y otra líquida.

Se evaluó una ventana biológica considerando dosis de 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 20 %, cada una con sus respectivas 5 repeticiones y un testigo, al cual se le añadió 1 mL del mismo disolvente utilizado en el extracto; para ello, la solución madre se diluyó

³ Es la cantidad de extracto que se aplica a la unidad experimental

hasta obtener la concentración de 10 %, ésta se diluyó para obtener 1 %, y así sucesivamente hasta tener la de 0.0001 %.

3.3.3. Bioensayo

En vasos Cristal[®] con 100 mL de agua destilada se colocaron 20 larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*, conformando las unidades experimentales. Posteriormente se aplicó 1 mL de cada uno de los extractos a la dosis evaluada, excepto al testigo. La mortalidad en larvas se registró 24 h, considerando muerta aquella larva que no presentaba movimientos normales (OMS, 1981).

3.3.4. Análisis fitoquímicos

Se utilizó 15 g de material seco y molido de hoja y tallo de *A. notha* colectado el 19 de mayo del 2009, el cual se desengrasó con hexano y posteriormente se hizo una extracción con etanol 96 % en equipo Soxhlet; obteniendo un volumen final de 120 ml de extracto etanólico 96 %, el cual se concentró en un rotaevaporador Buche R114[®] y se diluyó a una concentración final de etanol 50 % con agua destilada; después se agregó acetato de plomo 5 % para precipitar los pigmentos vegetales. La solución se filtró con papel Watman[®] # 40 y se transfirió a un embudo de separación; a continuación, se hicieron tres extracciones con diclorometano, se recuperó la fase orgánica y se evaporó el diclorometano a sequedad en un rotaevaporador Buchi R114[®]; el residuo se resuspendió con 5 mL de etanol 96 %.

Las pruebas fitoquímicas se realizaron en dos partes: la primera, se utilizaron 3 tubos de ensayo, a cada tubo se le agregaron 2 mL de cada extracto y de látex; la segunda, los extractos se aplicaron en una placa de cromatografía de capa fina (CCF) con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (85:14:1) como medio de elusión; tanto en los tubos como en la CCF, se utilizó el reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico 2 % en metanol + KOH 5.7 % en agua destilada) como revelador para detectar cardenólidos.

3.3.5. Análisis estadísticos

Los datos de los diferentes tratamientos (extractos) se sometieron a análisis de varianza y pruebas de comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) bajo el modelo de diseño completamente al azar con cinco repeticiones.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Toxicidad de diversos órganos de *A. notha* y del sobrenadante

Los extractos acuosos y alcohólicos de los diversos órganos vegetales de *A. notha* usados en fresco de material colectada el 8 de julio del 2009 no mostraron efectividad insecticida cuando se evaluaron a dosis de 0.0001 a 20 %, ya que la mayor mortalidad que se observó fue de 4 % en los extractos alcohólicos al 20 %. No obstante, el sobrenadante provocó 16 % de mortalidad a una dosis de 20% sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*.

En cambio, el nivel de toxicidad en los extractos de material seco fue mayor; la máxima mortalidad ($P \leq 0.05$) se presentó en el extracto acuoso de hoja con 74 %, seguida del extracto acuoso del tallo con 55 %, ambos extractos a dosis del 20 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. Mortalidad (%) de larvas de cuarto instar tardío del *C. quinquefasciatus* ocasionada por extracto acuosos y alcohólicos de órganos secos de *A. notha*.

Órgano	Disolvente	Dosis (%)			
		0(Testigo)	1 [§]	10	20
Flor	Agua destilada	0	4 [¶] a	16 a ^{¶¶}	36 abcd
	Aguardiente	0	1 a	4 a	17 bcd
	Etanol 96 %	0	0 b	2 a	9 cd
Fruto	Agua destilada	0	0 b	2 a	2 cd
	Aguardiente	0	0 b	1 a	7 cd
	Etanol 96 %	0	0 b	7 a	8 cd
Hoja	Agua destilada	0	0 b	19 a	74 a
	Aguardiente	0	0 b	1 a	6 cd
	Etanol 96 %	0	0 b	0 a	0 d
Tallo	Agua destilada	0	0 b	31 a	55 ab
	Aguardiente	0	0 b	0 a	45 abc
	Etanol 96 %	0	0 b	0 a	0 d

[§]Las dosis de 0.0001 a 0.1 % se omitieron debido a que no causaron mortalidad. [¶]Valores promedio de 5 repeticiones. ^{¶¶}Medias con letras iguales en una misma columna, no son estadísticamente diferente (Tukey, 0.05).

Estos resultados muestran que la actividad insecticida de *A. notha* se incrementó al utilizar material seco, sobresaliendo los extractos de acuosos de hoja y tallo seco a una dosis del 20 %, provocando mortalidades superiores a 50 % sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus*. Ésta respuesta tóxica probablemente no está propiciada por cardenólidos, debido a que el agua no es el medio más apropiado para su extracción, siendo los alcoholes los disolventes más utilizados (Seiber *et al.*, 1982; Rodríguez y Fonseca, 1991; Warashina y Noro, 1994)

3.4.2 Caracterización fitoquímica de compuestos

Los extractos etanólicos de hoja y tallo, así como el látex de *A. notha*, mostraron nula presencia de cardenólidos, ya que no se desarrolló el color violeta, tanto en los tubos de ensayo ni en la placa de cromatografía en capa fina, ambos revelados con el reactivo de Kedde. Lo anterior corrobora que la toxicidad observada en los extractos acuosos de material seco de hoja y tallo de *A. notha* sobre *C. quinquefasciatus* no está relacionada con cardenólidos e indica que *A. notha* no sintetiza dichos compuestos, tal como ocurre en *Asclepias eastwoodiana* Barneby (Sady y Seiber, 1991).

3.5. CONCLUSIONES

La actividad insecticida de *A. notha* sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* se ubica en los extractos hojas y tallo seco a una dosis del 20 %. El agua destilada es el mejor disolvente para extraer los compuestos tóxicos, los cuales no están relacionados con los cardenólidos.

3.6. LITERATURA CITADA

- Agrawal A A, M J Lajeunesse and M Fishbein (2008)** Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a phylogenetic test of plant defense escalation. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128:126-138.
- Burrows E G and J R Tyrl (2001)** Toxic Plants of North America. Ed. Iowa State Press, a Blackwell Publishing Company, USA, pp. 125-143.
- Fukuyama Y, M Ochi, H Kasai and M Kodama (1993)** Insect growth inhibitory cardenolide glycosides from *Anodendron affine*. *Phytochemistry* 32: 297-301.
- OMS (1981)** Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Organización Mundial de la Salud (OMS). Geneva: WHO (WHO/VBC/81.80).
- Rodríguez H L and G Fonseca (1991)** The cardenolide content of *Asclepias linaria*. *Phytochemistry* 20: 3941-3942.
- Sady B M and J N Seiber (1991)** Chemical differences between species of *Asclepias* from the intermountain region of North America. *Phytochemistry* 30: 3001-3003.
- Seiber N J, C J Nelson and S Mark Lee (1982)** Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 21: 2343-2348.
- Seiber J N, L P Brower, S M Lee, M M McChesney, H T A Cheung, C J Nelson and T R Watson (1986)** Cardenolide connection between overwintering monarch butterflies from Mexico and their larval foodplant, *Asclepias syriaca*. *Journal of Chemical Ecology* 12:1157–1170.
- Warashina T and T Noro (1994)** Cardenolide glycosides from *Asclepias fruticosa*. *Phytochemistry* 37: 601-804.

PARTE 4

DISCUSIÓN GENERAL

CONCLUSIÓN GENERAL

LITERATURA CITADA GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En la búsqueda de alternativas ecológicas para el control de plagas, las plantas con propiedades tóxicas e incluso medicinales, representa una buena alternativa para tal fin. En este ámbito, *R. ehrenbergiana* y *A. notha*, son especies conocidas y explotadas de manera local cuyo uso se basa un conocimiento empírico. En este sentido, la presente investigación generó información que servirá para hacer un uso más responsable de estos materiales. En la especie *R. ehrenbergiana* se determinó que sobresale su actividad insecticida en comparación con *A. notha* sobre larvas de cuarto instar tardío de *C. quinquefasciatus* al obtener una DL_{50} de 2.5 %, la cual se concentró en raíz colectada en época de lluvias, utilizada en seco; lo cual indicó que el estrés hídrico, de aproximadamente 15 días, afectó negativamente la producción y/o concentración de compuesto terpenicos, muy probablemente a que dicho estrés afectó la tasa fotosintética neta (Zobayed *et al.*, 2007) y por ende la producción de fotoasimilados destinados a la biosíntesis de metabolitos secundarios; o bien, que dicha respuesta fue producto de un cambio en la concentración de los compuestos roldehrenbergina A, B, C, D y sendarwina I (Pérez *et al.*, 2005 y 2006), producto del estrés hídrico. En el caso de *A. notha*, todos los extractos de residuos vegetales y sobrenadante no mostraron actividad insecticida, excepto los extractos acuosos de material seco de hoja y tallo; sin embargo se requirió de dosis poco prácticas (20 %) para provocar una mortalidades de 55 a 74 % en larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus*; adicionalmente, dicha actividad no esta involucrada a cardenólidos, por lo cual es prudente realizar estudios detallados para determinar el tipo de compuestos involucrados.

CONCLUSIÓN GENERAL

Se determinó que *R. ehrenbergiana* presenta mayor actividad insecticida, sobre larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus*, al causar una mortalidad de 100 % comparado con el 55 y 74 % causado por *A. notha* a dosis del 20 %, respectivamente. La raíz de *R. ehrenbergiana* es el órgano con mayor toxicidad, mientras que en *A. notha* fueron la hoja y tallo.

El etanol 96 % es el disolvente mas apropiado para la extracción de los compuestos presentes en raíz de *R. ehrenbergiana*, en contraste, el agua destilada fue la mejor opción en *A. notha*; en ambas especies, la actividad insecticida se incrementa al utilizar material en forma seca, aunado a que la mayor toxicidad de *R. ehrenbergiana* se presento en raíz seca colecta en época de lluvia, obteniendo una DL_{50} de 2.5%; dicho efecto tóxico en *R. ehrenbergiana* esta atribuido a compuesto de tipo terpenos, mientras que en *A. notha*, la actividad no es provocado por cardenólidos.

LITERATURA CITADA GENERAL

- OMS (1981)** Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Organización Mundial de la Salud (OMS). Geneva: WHO (WHO/VBC/81.80).
- Pérez Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, I De la Rosa, J L Contreras and A Romo de Vivar (2005)** Furanoeremophilanes from *Roldana ehrenbergiana*. Z. Naturforsch. 60b: 1088-1092.
- Pérez Castorena A L, A Arciniegas, M L Hernández, R A Toscazo, J L Contreras and A Romo de Vivar (2006)** 8,9-seco-eremophilanolides from *Roldana ehrenbergiana*. Journal of the Mexican Chemical Society. 50: 157-159.
- Reina M, A González Coloma, C Gutiérrez, R Cabrera, M L Rodríguez, V Fajardo and L Villarroel (2001)** Defensive Chemistry of *Senecio miser*. Journal of Natural Products 64: 6-11.
- Reina M, A González Coloma, D Domínguez Díaz, R Cabrera, C Giménez Mariño, M L Rodríguez and L Villarroel (2006)** Bioactive eremophilanolides from *Senecio poepigii*. Natural Product Research 20:13–19.
- Rodríguez H C (1999)** Técnicas tradicionales para el combate de hormigas defoliadoras. *In*: Memoria avances en la investigación 1998. T J Cibrian, C C Llanderal, P R Guzmán y R D Alvarado (eds). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, México. pp:15-17.
- Rodríguez H C (2005)** Plantas contra plagas 2: epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higerilla y sabadilla. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 209 pp.
- Rodríguez H C (2006)** Plantas contra plagas 1: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 132 pp.
- Rodríguez H C, G Silva Aguayo y J Djair Vendramin (2003)** Insecticidas de origen vegetal. *In*: Bases para el manejo racional de insecticidas. Capítulo 5. Silva Aguayo G y R Hepp G (eds). Trama Impresiones. Chillán, República de Chile. pp.87-111.

Zobayed S M A, F Afreen and T Kozai (2007) Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* 59:109-116