



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de  
LICENCIADO EN QUÍMICA

*"EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE BACCHARIS ARTICULATA CON  
POTENCIALES PROPIEDADES BIOCIDAS"*

CORA-JOFRÉ, FLORENCIA

SANTA ROSA (LA PAMPA)  
ARGENTINA

2012



# **PREFACIO**

“Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Química, dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNLPam), y en el Área de Química Orgánica dependiente de la Universidad Nacional de San Luis; durante el período comprendido entre el 12 de Diciembre de 2011 y el 26 de Septiembre de 2012, bajo la dirección de la Lic. Scoles, Gladis Ester; y bajo la codirección de la Dra. Bellozas Reinhard, Mónica E.”

26/ 09 /2012

Cora-Jofré, Florencia

**Departamento de Química**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Pampa, por darme la oportunidad de alcanzar esta meta, gracias a los profesores e investigadores, quienes durante estos años se esmeraron en dar lo mejor para mi formación profesional, por los conocimientos y la experiencia vivida.

A la Lic. Gladis Scoles, mi directora, gracias por brindarme la posibilidad de experimentar, aprender y avanzar. Gracias por ser una excelente directora y enseñarme que la calidad académica debe ir ligada a la calidad humana.

En especial, a la Dra. Mónica Bellozas, quien me guió en mis primeros pasos en la investigación, brindándome su tiempo, espacio, confianza y amistad.

Al Dr. Roberto Saad, por su generosa ayuda, por todo su apoyo durante mi estadía en San Luis, por abrirme las puertas de la Universidad Nacional de San Luis y por su incomparable disposición a colaborar en todo lo que necesitara. A todos los integrantes del Departamento de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, por su ayuda desinteresada.

Al Ing. Agrónomo Oscar Martínez, que con entera predisposición colaboró desde un comienzo en la realización del proyecto.

Al Dr. Miguel Cantarelli, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico.

A mis padres y hermanos, por haberme brindado siempre su amor y por su permanente apoyo en cada etapa de mi vida.

A mi abuela, por todo su amor y por seguir de cerca mis pasos.

A Matias, por su paciencia, comprensión e incondicionalidad.

A mis tíos, por enseñarme el valor de la familia.

A mis amigas del alma, simplemente gracias por TODO, las llevo en mi corazón.

A mis amig@s y compañer@s, gracias por los momentos compartidos, por dejarme entrar en sus vidas y ser parte de la mía.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron y brindaron su apoyo para la realización de esta investigación.

# RESUMEN

Los extractos vegetales son reconocidos como una fuente importante de plaguicidas naturales, postulándose como posibles alternativas de reemplazo a los insecticidas de síntesis química, que ocasionan severos daños ecológicos y a la salud del hombre. En el presente trabajo, se realizó el tamizaje fitoquímico y se analizó la actividad repelente de siete fracciones, provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de *Baccharis articulata* (Asteraceae), en adultos de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae). Posteriormente se seleccionaron aquellas fracciones bioactivas de menor polaridad para su purificación.

El estudio fitoquímico mostró sólo compuestos terpenoides en las fracciones 1 (Hex:AcOEt 5%) y 2 (Hex:AcOEt 10%). En las restantes fracciones (F<sub>3</sub>, Hex:AcOEt 20%; F<sub>4</sub>, Hex:AcOEt 30%; F<sub>5</sub>, Hex:AcOEt 50%; F<sub>6</sub>, Hex:AcOEt 75% y F<sub>7</sub>, Hex:AcOEt 100%), se detectó la presencia de terpenoides, flavonoides y taninos. Ninguna de las fracciones evaluadas presentó alcaloides.

Todas las fracciones mostraron efecto repelente. Se observó que F<sub>1</sub> (IR: 87,73; clase V) presentó el mayor efecto repelente sobre adultos de *T. castaneum*, seguida por F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>7</sub> y F<sub>6</sub> (IR: 80,00; 64,89; 63,56 y 62,13; todas clase IV).

La purificación de las fracciones 1, 2 y 3, permitió la obtención de dos compuestos. La elucidación estructural se realizó por <sup>1</sup>H RMN, lográndose la identificación de salvigenina y apigenina-7,4'-dimetiléter.

# ABSTRACT

Plant extracts have been recognized as an important source of natural pesticides and are considered to be an alternative to synthetic chemicals insecticides because extracts of plants reputedly pose little threat to the environment as well as to human health. In this work, phytochemical screening was performed and repellent activity of seven fractions (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> and F<sub>7</sub>) from ethanol-chloroform extract of *Baccharis articulata* (Asteraceae) was evaluated against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. Subsequently, less polar bioactive fractions were purified.

Phytochemical study showed only terpenoids in F<sub>1</sub> (Hex:EtOAc 5%) and F<sub>2</sub> (Hex:EtOAc 10%). It was detected that there were terpenoids, flavonoids and tannins in remain fractions (F<sub>3</sub>, Hex:EtOAc 20%; F<sub>4</sub>, Hex:EtOAc 30%; F<sub>5</sub>, Hex:EtOAc 50%; F<sub>6</sub>, Hex:EtOAc 75% y F<sub>7</sub>, Hex:EtOAc 100%). Alkaloids were not detected.

All fractions produced repellent activity on *T. castaneum*. It was observed that F<sub>1</sub> (RI: 87.73; class V) had the highest repellent effect on adult *T. castaneum*, followed by F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>6</sub> and F<sub>7</sub> (RI: 80,00; 64,89; 63,56 and 62,13; all class IV).

Purification of fractions 1, 2 and 3, allowed obtaining two compounds. The structural elucidation was performed by <sup>1</sup>H NMR. Were identified salvigenin and apigenin-7, 4'-dimethylether.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Plaguicidas de origen vegetal: factor incuestionable en la defensa integrada	1
1.1.1 Insecticidas botánicos	2
1.1.2 Actividad insecticida de plantas: aspectos destacados	5
1.1.3 Antecedentes bibliográficos	7
1.2 Especie vegetal en estudio: <i>Baccharis articulata</i> (Asteraceae)	9
1.2.1 Consideraciones generales	9
1.2.2 Clasificación taxonómica	10
1.2.3 Descripción botánica de la especie en estudio	10
1.2.4 Antecedentes etnofarmacológicos y usos tradicionales	11
1.2.5 Antecedentes fotoquímicos	12
1.2.6 Bioactividad de <i>Baccharis</i> sp. en coleópteros plaga de grano almacenado	15
1.3 Ensayo biológico: una herramienta en la búsqueda de compuestos activos presentes en vegetales	16
1.3.1 Repelencia	17
1.4 Insectos plaga de los productos almacenados	18
1.4.1 Insecto en estudio: <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	19
1.4.1.1 Clasificación de <i>Tribolium castaneum</i>	20
1.4.1.2 Distribución geográfica e importancia económica	20
1.4.1.3 Características morfológicas	20
1.5 Análisis fitoquímico	22
1.5.1 Metabolitos secundarios: conceptos generales	23
1.5.1.1 Alcaloides	24
1.5.1.2 Terpenoides	25
1.5.1.3 Compuestos fenólicos	26
<b>2. Objetivos e Hipótesis</b> .....	29
2.1 Objetivo General	29
2.2 Hipótesis	29

<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	30
3.1 Búsqueda Bibliográfica	30
3.2 Materiales y equipos de laboratorio	30
3.3 Reactivos	31
3.4 Material vegetal	32
3.4.1 Colecta	32
3.4.2 Obtención de los extractos crudos	33
3.5 Fraccionamiento de extractos	33
3.6 Tamizaje Fitoquímico	36
3.6.1 Ensayos de coloración	36
3.6.1.1 Ensayo del Cloruro Férrico	36
3.6.1.2 Ensayo de Liebermann-Burchardt	36
3.6.1.3 Ensayo de Shinoda	37
3.6.2 Análisis por cromatografía en capa delgada para determinación cualitativa de metabolitos secundarios	38
3.6.2.1 Determinación de terpenoides libres	38
3.6.2.2 Determinación de flavonoides	38
3.6.2.3 Determinación de alcaloides	39
3.7 Bioensayo	39
3.7.1 Insectos	39
3.7.2 Actividad repelente en adultos de <i>T. castaneum</i>	40
3.7.3 Métodos estadísticos	41
3.8 Purificación de las fracciones bioactivas de menor polaridad	42
3.8.1 Identificación de los compuestos puros	43
<b>4. Resultados y Discusión</b> .....	44
4.1 Resultados	44
4.1.1 Extracción	44
4.1.2 Bioensayo dirigido a la selección del extracto a purificar	45
4.1.2.1 Efecto del tiempo de tratamiento al evaluar los dos extractos	46
4.1.2.2 Comparación de dos medias muestrales	47
4.1.3 Fraccionamiento del extracto etanólico-clorofórmico	48

4.1.4 Tamizaje Fotoquímico	48
4.1.4.1 Pruebas de coloración	49
4.1.4.2 Análisis por cromatografía en capa delgada para determinación cualitativa de metabolitos secundarios	50
4.1.5 Evaluación de las fracciones obtenidas por VLC frente a ensayos biológicos	53
4.1.5.1 Promedio de insectos en el control para las horas de ensayo en las siete fracciones analizadas	55
4.1.5.2 Análisis estadístico de ANOVA	56
4.1.6 Purificación de las fracciones 1, 2 y 3	60
4.1.6.1 Identificación de metabolitos secundarios en las sub-fracciones mediante TLC	60
4.1.6.2 Estudio de la sub-fracción F <sub>3</sub> E	66
4.1.6.3 Estudio de la sub-fracción F <sub>3</sub> C-II	67
4.2 Discusión	69
<b>5. Conclusiones</b> .....	74
<b>6. Bibliografía</b> .....	76



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### **1.1 Plaguicidas de origen vegetal: factor incuestionable en la defensa integrada**

En agricultura, el control químico es utilizado para incrementar los rendimientos y proteger los productos almacenados (Ko Ko et al., 2009), considerándose a los insecticidas sintéticos la manera más eficaz y rápida de combatir los insectos plaga (Valladares et al., 2003), además de su fácil almacenamiento. Sin embargo, su uso desmedido ha causado serios problemas como: toxicidad sobre organismos no objetivo, desarrollo de resistencia, residuos tóxicos, incremento en los costos de aplicación, contaminación medioambiental, etc. (Talukder and Howse, 1993; Talukder and Howse, 1995; Valladares et al., 2003; Rossetti et al., 2008; Ko Ko et al., 2009).

En el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP), estos inconvenientes han creado un interés mundial en el desarrollo de estrategias alternativas, incluyendo la búsqueda de nuevos tipos de insecticidas, como son los “plaguicidas botánicos” o “fitoquímicos” (Talukder & Howse, 1995). Estos productos naturales de origen vegetal constituyen una fuente potencial de nuevas drogas, ya que los compuestos provenientes de ellos son extremadamente útiles como moléculas líderes para la modificación sintética y optimización de la bioactividad.

La capacidad que poseen las plantas para defenderse frente a insectos perjudiciales es el resultado de años de evolución, a través de los cuales desarrollaron la habilidad de producir una diversidad de compuestos con funciones diferentes. Se trata de sustancias aleloquímicas o metabolitos secundarios como: terpenos, alcaloides, rotenonas, flavonoides y otros, algunos de los cuales poseen actividad tóxica contra los insectos, interfieren en el desarrollo o en el comportamiento de los mismos, y contribuyen así a la regulación de sus poblaciones (Cox, 2002; Valladares et al., 2003; Viglianco et al., 2006).

Se puede afirmar entonces que las plantas actúan como laboratorios naturales, donde se sintetizan una infinidad de productos, constituyendo una fuente inagotable de sustancias químicas que podrían ser la base del surgimiento de nuevas moléculas insecticidas altamente selectivas, de baja persistencia en el ambiente y con menor posibilidad de generar fenómenos de resistencia. Esto último, se debe a que las moléculas de origen vegetal presentan una enorme diversidad estructural, que les confiere nuevos y diferentes sitios de acción si se comparan con los insecticidas sintéticos (Caballero García, 2004; Isman & Akhtar, 2007).

### **1.1.1 Insecticidas botánicos**

Un insecticida es un producto fitosanitario utilizado para controlar insectos (Insecta, en latín, literalmente “cortado al medio”, basado en la observación directa de la simetría bilateral de los mismos), generalmente por la inhibición de enzimas. El origen etimológico de la palabra insecticida deriva del latín y significa literalmente matar insectos, razón por la cual se los considera como biocidas. Estos últimos pueden ser sustancias químicas sintéticas, naturales, de origen biológico o de origen físico que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer control sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Los insecticidas tienen importancia para el control de plagas de insectos en la agricultura o para eliminar todos aquellos que afectan la salud humana y animal ([www.casafe.org.ar/pdf/Insecticidas.pdf](http://www.casafe.org.ar/pdf/Insecticidas.pdf)).

Si bien, un insecticida es aquella sustancia o mezcla de estas que provocan la muerte del insecto debido a la naturaleza de su estructura química, la mayoría de las especies de plantas que se utilizan para el manejo de plagas, exhiben un efecto insectistático más que insecticida (Rodríguez, 1996). Es decir, inhiben el desarrollo y comportamiento de los insectos en lugar de matarlos directamente por sus propiedades tóxicas. Sin embargo, no se puede olvidar que algunas sustancias vegetales provocan un efecto insecticida, como sucede con las piretrinas, la nicotina o la rotenona (Izuru 1970).

Para que una planta sea empleada en forma extensiva, no basta con que ésta sea considerada promisoriosa o con demostradas propiedades insecticidas. Además, se deben hacer análisis de riesgos para el medio ambiente y la salud (Silva et al., 2002). A continuación, se enumeran las características que debe tener una planta para ser usada como insecticida o para el control de plagas, con la finalidad de aprovecharla al máximo, sin deteriorar el ecosistema:

- a) Ser perenne.
- b) Estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o que se pueda cultivar.
- c) Usar órganos renovables (hojas, flores o frutos).
- d) No ser tóxica para mamíferos, para el ecosistema acuático, ni para el ambiente.
- d) Tener alta concentración del o los ingredientes activos.
- e) Los compuestos provenientes de la planta deben ser estables al extraerlos y durante el almacenamiento. El inconveniente de las sustancias botánicas es su inestabilidad.
- f) Ser fácil de procesar.
- g) Ser fácil de cultivar y adaptable a diferentes ambientes.
- h) No competir con plantas usadas como alimentos.
- i) No tener alto valor económico.
- j) Tener usos complementarios (como medicinales).
- k) Ser eficaz en bajas dosis.

Además, al momento de seleccionar la planta se deben tomar en cuenta características como olor (agradable o desagradable), sabor (picante, amargo, agrio o dulce) y salud de las plantas seleccionadas, ya que puede ser un indicador de la presencia de sustancias tóxicas que afectan a posibles plagas potenciales.

No sólo los aspectos antes mencionados son de relevancia al evaluar el efecto insecticida de una planta, debido a que no pueden aplicarse en todas las zonas y condiciones en forma general, ya que la misma planta que crece en lugares y suelos diferentes puede contener cantidades distintas de las mismas sustancias activas. La edad de la planta o estado del material (hojas, flores, semillas, frutos, raíces y corteza) pueden ocasionar también diferencias en dosis de ingredientes activos. Además pueden haber cambios en la estructura química de los ingredientes activos y por ende diferencias en los efectos en las plagas.

En la actualidad existe mucha controversia con esta nueva modalidad de control, de aquí nace la necesidad de definir y conocer más a fondo acerca de los productos botánicos (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1:** Descripción de las ventajas y desventajas del uso de productos botánicos en relación a los productos plaguicidas sintéticos.

<i>ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Material renovable	Poca información en prueba Tóxicas
Biodegradable	Variabilidad en cantidad de ingrediente activo
Alta disponibilidad	Mayor requerimiento de mano de obra
Bajos costos	Se necesita equipo de procesamiento
Tiene menos efecto negativo en enemigos naturales benéficos	Costo de oportunidad
	No muy buena estabilidad en los extractos
	Entrenar a personal calificado

Según Coats (1994), los compuestos naturales, en general, tienen un efecto protector que principalmente se debe a la repelencia, a su poder disuasivo de la alimentación u oviposición y su efecto regulador del crecimiento. Además, Metcalf y Metcalf (1992) señalan el efecto confusor o disruptor, que consiste en "contaminar" el medio con estímulos químicos de diferente naturaleza, de modo que el insecto no pueda identificar el aleloquímico característico del huésped vegetal, en que se alimenta o reproduce. Por lo tanto, debemos considerar a todos aquellos compuestos que sabemos que su efecto es insectistático como preventivos, más que como curativos (Rodríguez 1993). Un ejemplo de lo anterior lo constituyen los granos almacenados, donde una vez que el insecto ya penetró el grano, ningún polvo vegetal de probada eficacia protectora tendrá efecto (Lagunes y Rodríguez 1989).

Los bioplaguicidas no son la panacea para resolver todos los problemas de las plagas, pero lo importante es comprender que las decisiones deben ser tomadas con criterio

ecológico dentro del marco del MIP, para contribuir de esta forma a reducir el uso de plaguicidas sintéticos en el mundo.

### 1.1.2 Actividad insecticida de plantas: aspectos destacados

La utilización de las plantas como fuente de insecticidas naturales tiene su origen en simples observaciones empíricas, realizadas por el hombre, que determinaron que ciertos vegetales se protegían mejor que otros frente al ataque de insectos. Es así que, históricamente, los productos naturales con acción fitosanitaria tienen una historia bastante más larga que la mayor parte de los restantes plaguicidas.

Desde la antigüedad, los chinos, los griegos y los romanos utilizaron, junto al azufre y el arsénico, plantas o extractos de plantas. En muchas comunidades indígenas, esta práctica se ha mantenido a través de generaciones y representa un recurso renovable, más accesible y económico que los insecticidas químicos sintéticos. Sin embargo, es difícil saber exactamente dónde y en qué momento empiezan a utilizarse en forma sistemática plantas o extractos de las mismas en la protección de los vegetales y, con más generalidad, en la agricultura (Regnault-Roger & Vincent, 2004).

Hoy en día, los productos de origen botánico más utilizados para el control de insectos son: el piretro, la rotenona, el neem y los aceites esenciales (Isman, 2006). En la **Tabla 1.2** se detallan las propiedades de estos cuatro productos.

El piretro es una oleorresina extraída de las flores secas de *Tanacetum* sp. y *Chrysanthemum* sp. (Asteraceae), donde se encuentran los principios activos de la planta que dieron origen a los piretroides sintéticos, quienes dominan actualmente el mercado, acaparando el 80% de las ventas; debido a que poseen amplio espectro de actividad, rápido efecto, excelente degradabilidad y baja toxicidad para mamíferos (Casida & Quistad, 1995). La rotenona es un isoflavonoide presente en las raíces de *Lonchocarpus* sp. y *Derris* sp. (Favaceae) que ha sido utilizada como insecticida desde hace más de 150 años. El neem obtenido de las semillas de *Azadirachta indica* (Meliaceae) es un compuesto utilizado en la India desde hace más de 4.000 años para combatir insectos plaga de grano almacenado. El extracto obtenido de dichas semillas contiene terpenoides, de los cuales el más importante es la azaridactina, un tetranorterpenoide (C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>O<sub>16</sub>) (Jones et al., 1989).

**Tabla 1.2:** Propiedades de los insecticidas de origen vegetal utilizados actualmente en los EE.UU.

<b>Propiedad</b>	<b>Piretro</b>	<b>Rotenona</b>	<b>Neem</b>	<b>Aceites esenciales</b>
País de origen	Kenia, Australia	Sudeste asiático, Venezuela	India	Todo el mundo
Materias activas	Piretrinas (ésteres)	Rotenoides (isoflavonoides)	Azaridactina (terpenoides)	Monoterpenos
Precio aprox. (dólares/kilo)	45-60	3-5	125-200	10-25
Formulaciones	Numerosas	Polvo, polvo mojable	Concentrados emulsionables	Numerosas
Situación reglamentaria	Homologado	Homologado	Homologado	Exento
Acción frente a las plagas	Contacto Knock-down	Tóxico por ingestión	Tóxico (ingest.), RCI (regulador del crecimiento de insectos) antialimentario	Tóxico, antialimentario, repelente
Persistencia	Muy limitada	Limitada	Muy limitada	Muy limitada
Toxicidad para mamíferos	Mínima	Moderada. Muy tóxico para el hombre	No tóxico	No tóxico

Modificada de Regnault-Roger et al., 2004.

Recientemente, se han documentado fenómenos de resistencia a los piretroides. En el caso del neem, cuya materia activa es la azaridactina, ve limitada su utilización debido a su elevado costo (**Tabla 1.2**) (Caballero García, 2004; Correa et al., 2006; Isman, 2006; dos Santos Veloso et al., 2008; Soares Corrêa et al., 2008). Es por ello, que la búsqueda de nuevos compuestos vegetales para controlar insectos plaga es incesante. Según Daglish (2006), desde 1990 hasta 2005 se publicaron en el Journal of Stored Products Research más de 150 trabajos referidos al control químico de estos organismos, un 37% de éstos son sobre insecticidas de origen vegetal.

### 1.1.3 Antecedentes bibliográficos

Los extractos vegetales y aceites esenciales se presentan hoy en todo el mundo como una excelente alternativa ofreciendo: biodisponibilidad, biodegradabilidad y selectividad. Existe abundante bibliografía internacional sobre las propiedades biológicas de extractos crudos y metabolitos secundarios aislados de plantas, sobre diferentes insectos y organismos. Estos extractos vegetales, se preparan con diferentes disolventes como: agua, alcohol, éter etílico, diclorometano, acetona y benceno, que extraen distintos metabolitos con diferentes efectos.

Jilani y Su (1983) y Jilani et al. (1988) efectuaron determinaciones de repelencia en insectos plaga de granos almacenados con extractos de diferentes plantas. Una serie de sustancias, con propiedades antialimentarias y repelentes, fueron aisladas e identificadas de plantas africanas por Kubo y Nakanishi (1977). Cuñat et al. (1990) y March et al. (1991) estudiaron las actividades antimicrobianas y biocidas en plantas de Valencia, España. Hoffman et al. (1993) evaluaron la actividad antimicrobiana de 300 plantas del sudoeste de USA., González-Coloma et al. (1994) detectaron efectos antialimentarios e insecticidas en plantas de las Islas Canarias. Talukder y Howse (1993, 1995) estudiaron los efectos insecticidas, repelentes y antialimentarios de *Aphanamixis polystachya* sobre *Tribolium castaneum* Herbst y en 1994 señalaron las propiedades tóxicas y repelentes de extractos de *Aphanamixis polystachya* sobre *Sitophilus oryzae*.

El efecto de un extracto crudo del fruto de *Melia azedarach* sobre *Tribolium castaneum* Herbst fue estudiado por Del Tío et al. (1996), y por Riba et al. (1996) sobre *Sesamia nonagrioides* en España. También en este país, Ocete y Pérez (1996) observaron el efecto de extractos de *Daphne gnidium* y *Anagyris foetida* sobre diferentes insectos. Boeke et al. (2004) estudiaron la eficacia de 23 diferentes extractos vegetales sobre

*Callosobruchus maculatus*, y señalaron efectos de repelencia en los aceites volátiles. Abudalai et al. (2003) evaluaron mediante ensayos de campo una formulación de “neem” sobre *Nezara viridula*, en tanto que Leatemia e Isman (2004), analizaron la eficacia de extractos de semillas de *Annona squamosa* sobre *Plutella xylostella*.

En una amplia revisión realizada por Prakash y Rao en 1997, informan sobre 866 productos vegetales que contienen sustancias secundarias activas sobre plagas agrícolas; con actividad insecticida, repelente, antialimentaria o reguladora del crecimiento de insectos. Jacobson (1977) publicó una revisión sobre los métodos de aislamiento e identificación de estas sustancias secundarias con efectos sobre insectos.

En Argentina, estos trabajos son mucho más escasos. Se puede citar a Peñaloza (1995), quien estudió los efectos biológicos de extractos crudos de seis plantas sobre *Tribolium castaneum* Herbst. Novo et al. (1997, 1998) observaron actividad repelente de diferentes extractos crudos de cuatro plantas nativas sobre *T. castaneum* y efecto antialimentario sobre *Anticarsia gemmatalis*. Valladares et al. (2003), estudiaron la actividad antialimentaria de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* sobre nueve especies de insectos, entre ellas *S. oryzae*. Viglianco et al. (2006), evaluaron la actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). García et al. (2007), estudiaron el efecto tóxico y repelente del aceite esencial de *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) sobre adultos de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Gleiser et al. (2007), evaluaron la actividad insecticida de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* sobre larvas, pupas y adultos de mosquitos. Toribio et al. (2007), estudiaron en cuatro especies del género *Baccharis* (Compositae) la actividad antimicrobiana frente a ocho especies bacterianas. Los extractos de 6 especies vegetales seleccionadas fueron evaluadas, por Vivot Lupi et al. (2009), en su actividad antifúngica mediante el método de microdilución en caldo, contra cepas tipificadas de *Aspergillus niger* y *Trichophyton rubrum*. En 2009, del Corral y Palacios estudiaron la actividad herbicida de compuestos aislados del extracto etanólico de *Baccharis salicifolia* L.

Estos resultados, demuestran que la utilización de aceites esenciales y extractos vegetales es una estrategia promisorio para el control de plagas de importancia agronómica, pues no solo se reduce el impacto económico y ecológico producido por el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos, sino que también contribuyen al desarrollo de la agricultura orgánica (Isman, 2006).



---

## 1.2 Especie vegetal en estudio: *Baccharis articulata* (Asteraceae)

### 1.2.1 Consideraciones generales

El orden Asterales, con cerca de 1.000 géneros y 19.000 especies, se encuentra distribuido por todas las latitudes y representa uno de los grupos más ricos de las Angiospermas, siendo uno de los órdenes más avanzados de la subclase Asteridae. En el orden se distinguen dos subfamilias, Asteraceae y Cichoriaceae (Stefanazzi, 2010).

Las plantas de la familia Asteraceae presentan un aspecto extremadamente variado, incluyendo principalmente pequeñas hierbas o arbustos y raramente árboles. En esta familia, las plantas son extensivamente estudiadas en cuanto a su composición química y actividad biológica; algunas han proporcionado el desarrollo de nuevos fármacos, insecticidas, entre otros. Numerosos trabajos científicos, realizados con especies de esta familia, muestran el aislamiento de una variedad de metabolitos secundarios, con énfasis en los flavonoides, considerados como marcadores quimiotaxonómicos importantes, además de su reconocida importancia en la medicina, para tratar y prevenir diversas enfermedades (Regnault-Roger & Vincent, 2004; Gonzaga Verdi et al., 2005).

*Baccharis* (Astereae) constituye un gran género de la familia Asteraceae con más de 400 especies distribuidas en el continente americano. Este género, pertenece a la subtribu Baccharinae Less.; proviene del latín Bacchus (Baco), el dios romano del vino y las vendimias haciendo referencia al aroma a especias de las raíces, ya que en la antigüedad las especias se consumían con vino. Es por ello, la vinculación con esta deidad pagana (Giuliano, 2000; Cifuentes et al., 2002; Simirgiotis et al., 2003; Palacio Cortés Picá, 2005).

Este género es el más rico en especies dentro de la tribu Astereae, estimándose su número entre 400 y 500, de las cuales aproximadamente 120 habitan el territorio argentino (Mangiaterra, 2005). Su distribución geográfica es exclusivamente americana, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el extremo austral de Argentina y Chile (Giuliano, 2001).

En algunos países ciertas especies de *Baccharis*, llamadas popularmente “carquejas” son usadas en medicina popular o consideradas como tóxicas para el ganado (Rangel et al., 2001; Cifuentes et al., 2002; Egly Feresin et al., 2003; Budel et al., 2004; da Cruz Pádua et al., 2010).

## 1.2.2 Clasificación taxonómica

**Reino Plantae**

**División Fanerógama Magnoliophyta**

**Clase Magnoliopsida**

**Subclase Asteridae**

**Orden Asterales**

**Familia Asteraceae (Compositae)**

**Subfamilia Asteroideae**

**Tribu Astereae**

**Subtribu Baccharinae Less.**

**Género *Baccharis***

**Especie *B. articulata* (Lam)**

Sinonimia: *Conyza articulata* Lam, *Molina articulata* Less.

## 1.2.3 Descripción botánica de la especie en estudio

Se trata de un arbusto perenne, dioico, ramoso, de 0,5-1,5 m de altura, con tallos provistos de dos alas longitudinales angostas, de 0,5-3 mm de latitud y hojas reducidas a brácteas inconspicuas (**Figura 1.1**). Capítulos sésiles, solitarios o dispuestos en glomérulos de 2-6 a su vez ordenados en un racimo simple o un racimo de espigas terminal. Capítulos pistilados con involucreo acampanado de 4-5 x 4-5 mm; filarios en 3-4 series, obtusos, los exteriores ovados y los interiores oblongos. Flores numerosas de ápice desigualmente dentado. Capítulos estaminados con involucreo acampanado de 3-4 x 4 mm; filarios semejantes a los pistilados. Flores numerosas; estilo con ramas separadas (Hieronymus, 1882; Boelcke, 1989; Gianello et al., 2000; Giuliano, 2000).



**Figura 1.1:** *Baccharis articulata* en estado vegetativo

#### 1.2.4 Antecedentes etnofarmacológicos y usos tradicionales

Dentro de las especies medicinales autóctonas, la “carqueja” es una de las plantas medicinales de mayor tradición de uso, no sólo en nuestro país sino también en todos los países de donde es oriunda: Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú. Ha sido tradicionalmente usada, para el tratamiento de desórdenes estomacales, diabetes, reumatismo y como antiséptica; también es utilizada como diurética, hepatoprotectora, antiinflamatoria, en casos de hipertensión, hemorragias cerebrales y en obesidad (Dai et al., 1993; Rangel et al., 2001; Gonzaga Verdi et al., 2005; Mangiaterra, 2005; da Cruz Pádua et al., 2010).

A la especie *Baccharis articulata* se le atribuyen propiedades digestivas, colagogas, diuréticas y protectoras del hígado en infusión o decocción. En Brasil se le adjudican propiedades estomacales y se utiliza la infusión contra indigestiones. Los campesinos de Argentina la usan para la impotencia masculina y la esterilidad femenina. Para hacer concebir a las cabras, las obligan a tragar el agua de la planta hervida. Además usan estos baños de agua hervida para enfermedades de la piel, la lepra, el reumatismo y para el tratamiento de la gota. Se emplea también el polvo de la planta seca como secante para llagas sifilíticas. Por otra parte, es utilizada en uso externo como antiséptica y secante de úlceras. Además se le han atribuido propiedades tónicas, antihelmínticas, febrífugas, estimulantes gástricas y afrodisíacas. En forma de decocción, se la suele usar como antidiarreico, para el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias (Dai et al., 1993;

He et al., 1996; Gorzalczny et al., 1999; Palacios et al., 1999; Gianello et al., 2000; Oliveira, 2002; Mangiaterra, 2005).

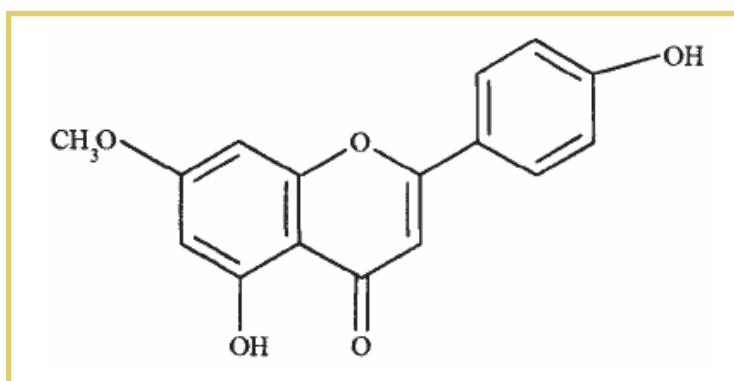
### 1.2.5 Antecedentes fitoquímicos

De la amplia revisión bibliográfica realizada, se resumen algunas de las referencias encontradas en revistas científicas nacionales e internacionales sobre la composición química de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon.

-Planta entera: 7-4'-dimetilapigenina, acacetina, genkwanina (**Figura 1.2**), cirsimaritina (**Figura 1.3**), salvigenina (**Figura 1.4**) (Gianello & Giordano, 1984; Tonn et al., 1987);

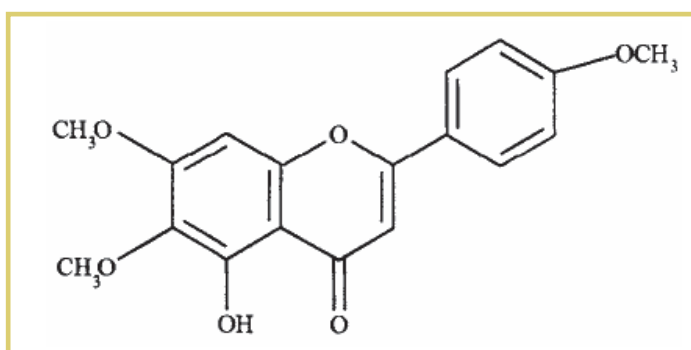
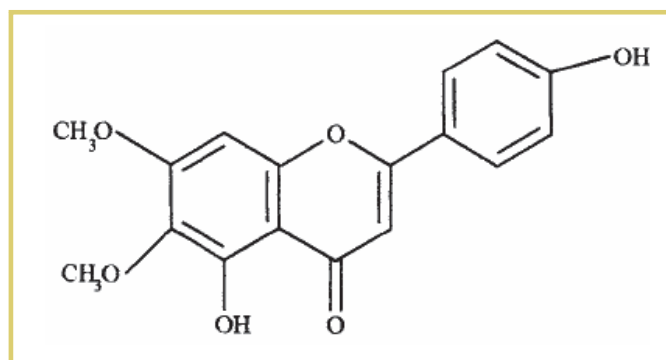
-Partes aéreas: diterpenos: articulina 0,0064% (**Figura 1.5**) (Stapel & Menssen 1977); acetato de articulina 0,0357% (Stapel et al, 1980); a-bisabolol 2,0%, g-cadineno 2,6%, a-cadinol 8,3% (**Figura 1.6**), a-calaconeno 1,1%, trans-calameneno, b-cariofileno 16,8% (**Figura 1.7**), a-cubebeno 0,1%, b-cubeneno 0,1%, cubenol 3,8%, b-elemenno 0,4%, b-cis-farneseno 1,0%, germacreno D 9,3% (**Figura 1.8**), a-gurjuneno 1,5%, a-humuleno 0,6%, limoneno (**Figura 1.9**), linalol, a-muroleno, g-muroleno 3,7%, murolol 0,4%, trans-nerolidol 15,6% (**Figura 1.10**), b-pineno, terpineol, terpinoleno 0,1%, valenceno (Zunino et al., 1998); d-cadineno 1,1 %, a-pineno, aromadendreno (Tonn et al., 1987; Zunino et al., 1998); a-cariofileno, b-guaieno, g-elemenno (Tonn et al., 1987); flavonoides: luteolina, flavonoide quercetina (**Figura 1.11**) (Stapel & Menssen, 1977); salvigenina (**Figura 1.4**) (Gianello & Giordano, 1984; Gianello et al., 2000); 7-4'-dimetilapigenina (Gianello et al., 2000).

-Flores: diterpenos: baccotricuneatina A (**Figura 1.12**), barticulidiol (**Figura 1.13**) (Gianello & Giordano, 1982; Tonn et al., 1987).

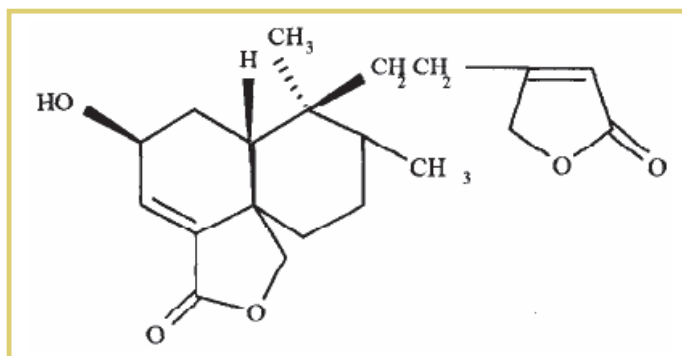


**Figura 1.2:** Estructura de genkwanina

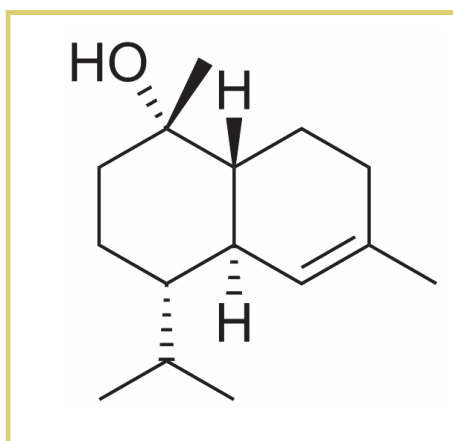
**Figura 1.3:** Estructura de cirsimaritina



**Figura 1.4:** Estructura de salvigenina

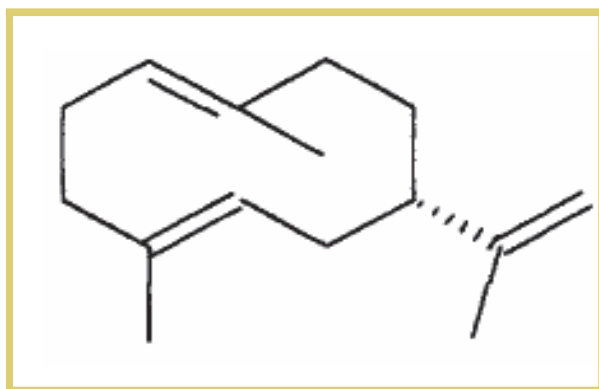
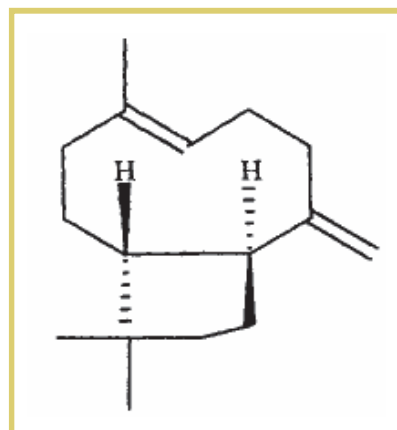


**Figura 1.5:** Estructura de articulina



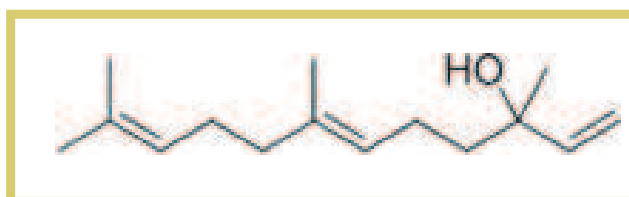
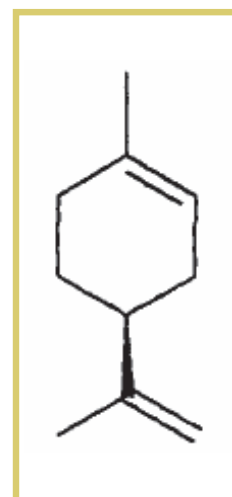
**Figura 1.6:** Estructura de  $\alpha$ -cadinol

**Figura 1.7:** Estructura de  $\beta$ -cariofileno



**Figura 1.8:** Estructura de germacreno D

**Figura 1.9:** Estructura de limoneno



**Figura 1.10:** Estructura de trans-nerolidol

Figura 1.11: Estructura de quercetina

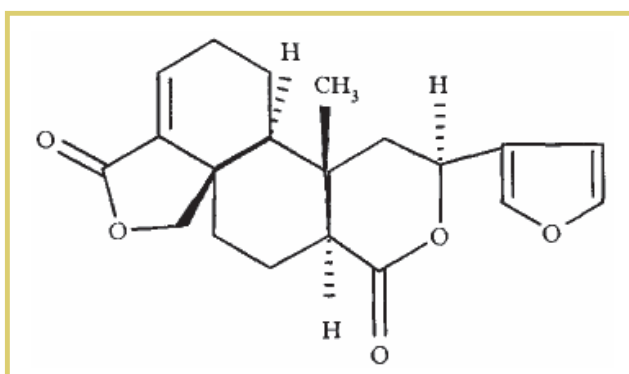
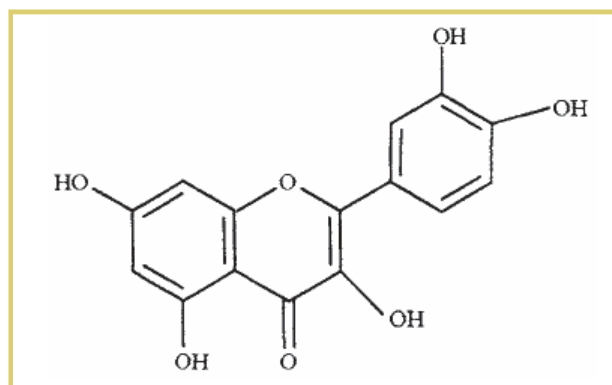
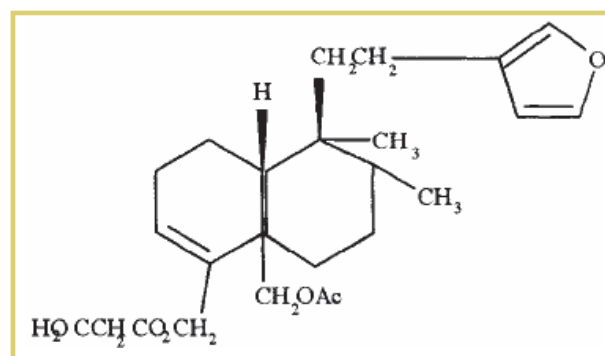


Figura 1.12: Estructura de bacchotricuneatina A

Figura 1.13: Estructura de barticulidiol



### 1.2.6 Bioactividad de *Baccharis* sp. en coleópteros plaga de grano almacenado

Algunos trabajos documentan la bioactividad de diferentes especies del género frente a plagas de grano almacenado. Enriz et al. (2000), reportaron actividad antialimentaria de los diterpenos: bacchotricuneatina A (obtenida de *Baccharis rhatinodes*) y 7- $\alpha$ -hydroxybacchotricuneatina A (de *Baccharis spicata*) frente a *Tenebrio monitor*. En 2002,

Cifuentes et al. evaluaron sobre larvas de la misma especie, la actividad antialimentaria de diterpenoides del tipo clerodano obtenidos de *Baccharis sagittalis*; presentando actividad tres de los siete compuestos ensayados. Simirgiotis et al. (2003), realizaron ensayos antialimentarios sobre *Tribolium castaneum* Herbst con un ent-kaureno y su metil éster, aislados de *Baccharis rufescens* Sprengel, encontrando en el último de ellos una significativa actividad antialimentaria. García et al. (2005), observaron toxicidad y repelencia cuando adultos de *Tribolium castaneum* Herbst fueron tratados con el aceite esencial de *Baccharis salicifolia*, como así también cuando se emplearon sus compuestos puros ( $\beta$ -pineno, pulegone,  $\alpha$ -terpineol) o derivados de los mismos. En el año 2007, Baptista et al. informaron que los derivados del kaurenol y del ácido ent-kaurénico (aislado de *Baccharis trinervis*) no produjeron efectos negativos sobre dos de los más importantes coleópteros de los granos almacenados, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum* Herbst.

### **1.3 Ensayo biológico: una herramienta en la búsqueda de compuestos activos presentes en vegetales**

Los bioensayos, han resultado ser uno de los métodos claves en la investigación de nuevos plaguicidas botánicos. Estos, se emplean para estudiar propiedades biocidas de las diferentes partes de las plantas (raíces, corteza, hojas, frutos, flores, etc.), como así también la eficacia de los diferentes extractos, formulaciones y modo de acción de los ingredientes activos. Estos ensayos biológicos deben ser altamente sensibles a las sustancias bioactivas, fáciles de manipular, baratos, de amplio espectro y brindar rápidos resultados (Iannacone, 2000).

Varios ensayos biológicos han sido diseñados para probar la actividad de los metabolitos secundarios. El uso de insectos en sus distintas etapas de desarrollo ha permitido la identificación de más de 2000 especies de plantas con propiedades anti-insectos. Sin embargo, pocos productos naturales alcanzaron el status de plaguicidas comerciales, en contraposición a la necesidad de reducir el uso de insecticidas sintéticos. Esta situación, ha dado impulso a nuevos avances en las técnicas de bioensayos con insectos.

Las plagas de productos almacenados son a menudo bioensayadas mediante el tratamiento de granos o harinas, con soluciones de disolventes orgánicos de los extractos



vegetales. Estos estudios, proporcionan información sobre repelencia, toxicidad por contacto, perturbación de la oviposición y efectos de largo alcance (Alonso- Amelot et al., 1994).

### **1.3.1 Repelencia**

La quimiorrecepción a distancia (olfato) y la de contacto (gusto) constituyen procesos extremadamente importantes en los insectos, debido a que generan algunos de los patrones de comportamiento más relevantes, como búsqueda de alimento, selección de sitios adecuados para la ovoposición, localización de parejas u hospedadores, formación de castas en los insectos sociales y respuestas a sustancias atractantes y/o repelentes (Gillott, 2005). Es así, que el comportamiento de los insectos, a diferencia de lo que ocurre con los vertebrados, es mucho más dependiente de señales químicas que de cualquier otro tipo de estímulo (visual, táctil o auditivo). Los receptores moleculares del olfato y del gusto se localizan principalmente en antenas, palpos bucales, tarsos y ovopositor, por lo que la decisión de alimentarse o no está determinada por estímulos positivos o negativos sobre dichos receptores (Dahanukar et al., 2005).

En la relación planta-insecto, el sentido del olfato se encarga de la recepción a distancia de los estímulos químicos, que provocarán la primera respuesta del insecto, atrayéndolo hacia la fuente emisora o repeliéndolo de la misma (Koul & Dhaliwal, 2001). Estas sustancias químicas emitidas por las plantas y capaces de modificar el comportamiento se denominan aleloquímicos y se agrupan en dos grandes categorías: kairomonas (Kairo = oportunista) y alomonas (Allo = diferente). Las primeras, son sustancias químicas que al ser liberadas benefician solamente al agente receptor, por ejemplo, favoreciendo al insecto porque lo orienta hacia la planta emisora, o induce su alimentación u oviposición, entre otros beneficios. Las alomonas, por su parte, son sustancias que favorecen únicamente al emisor, actuando como repelentes y disuasivos de alimentación u oviposición, actuando como defensas químicas contra herbívoros (Mareggiani, 2001; Gillott, 2005). Un ejemplo, lo constituyen las cucurbitacinas, fitoquímicos terpenoides presentes en la familia Cucurbitaceae, que actúan como alomonas para la mayoría de los insectos, pero que son atrayentes, actuando como kairomonas, para las especies de *Diabrotica* (Coleóptera: Chrysomelidae) (Mareggiani, 2001).

Los repelentes han sido definidos como sustancias químicas, que actúan localmente a distancia provocando el alejamiento de un insecto de la fuente emisora y previniendo así, su alimentación (Dethier et al., 1960; Choochote et al., 2007).

En la agricultura tradicional de África, India y Europa, una práctica común consistía en mezclar material de plantas locales con granos almacenados destinados a la alimentación para reducir la presencia de plagas. Así, hojas de neem o de menta, eran utilizadas en los sitios de almacenamiento para repeler insectos (Van Puyvelde, 1976; Ignatowicz et al., 1994). Los pequeños productores del sudoeste de Francia tenían la costumbre de colocar plantas aromáticas como menta, ajo o laurel en el interior de los sacos de granos para protegerlos de la infestación (Regnault-Roger & Vincent, 2004).

Durante la Segunda Guerra Mundial se invirtieron esfuerzos y dinero en la investigación y síntesis de nuevas sustancias químicas repelentes. Así, entre 1952 y 1962 se testaron más de 11.000 compuestos, de los cuales sólo unos pocos fueron efectivos contra un amplio rango de insectos (Ryan, 2002). Entre ellos podemos mencionar al DEET (N,N-dietil-meta-toluamida), que permanece actualmente como el más efectivo y a pesar de sus efectos adversos sobre la salud del hombre no se ha encontrado aún un sustituto que otorgue el mismo grado de protección y la efectividad repelente frente a artrópodos hematófagos (Nerio et al., 2010).

El uso intensivo y extensivo de repelentes ha generado serios inconvenientes relacionados con la salud del hombre y del planeta (Nerio et al., 2010). Así, la necesidad de encontrar productos efectivos, persistentes y prácticos de utilizar ha incrementado el interés por las sustancias repelentes de origen vegetal.

## **1.4 Insectos plaga de los productos almacenados**

Las primeras interacciones del hombre con los insectos fueron tan ambiguas como en la actualidad. Así, muchos insectos resultan beneficiosos, en tanto que otros son destructivos y pueden causar severos daños a la salud del hombre, a sus animales domésticos, a los cultivos y a los productos que almacena. Con relación a esto último, existe una cuestión obvia y es que el hombre y los insectos están condenados a compartir hábitats y recursos; por este motivo, la aparición de fenómenos de competencia interespecífica es algo inevitable y a pesar de los notables avances tecnológicos, este

enfrentamiento todavía continua vigente a juzgar por las graves pérdidas que los insectos ocasionan en relación a los alimentos almacenados (De los Mozos Pascual, 1997).

En la actualidad, es sabido que deben cumplirse tres requisitos básicos para evitar la proliferación de los insectos en el almacenaje. El grano se debe guardar: seco, sano y limpio. Para esto, la consigna básica y válida en todo tipo de almacenamiento es: “mantener los granos vivos con el menor daño posible”. Cuando los granos se guardan sin alteraciones físicas y fisiológicas mantienen todos los sistemas propios de autodefensa y se conservan mejor durante el almacenamiento (Casini & Santa Juliana, 2005). Si estas condiciones no se cumplen, se produce la infestación de los granos por los insectos. Esto genera un impacto negativo que se traduce en importantes daños y pérdidas económicas.

Existen unas 1.000 especies de insectos que infestan los productos almacenados (De los Mozos Pascual, 1997). Tradicionalmente, a estas especies se las suele clasificar en plagas primarias o secundarias en base al daño producido sobre el grano (Dell'Orto Trivelli & Arias Velásquez, 1985). Las primeras se alimentan de granos enteros, mientras que las plagas secundarias poseen un espectro de alimentación más amplio. Es así, que algunas se alimentan de granos parcialmente dañados, debido al ataque previo de las plagas primarias o a daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, transporte, limpieza y secado de los granos. Otras tienen preferencia por las harinas, que podría considerarse el caso más extremo de daño en el grano y finalmente existen algunas especies que atacan preferentemente cereales, fideos, chocolates o alimentos para mascotas (Rees, 2004).

Las plagas primarias están representadas por insectos altamente especializados con la capacidad de perforar la testa de las semillas, las plagas secundarias en cambio; son insectos poco especializados que atacan un amplio rango de productos almacenados, procesados y manufacturados (De los Mozos Pascual, 1997; Kalinovic et al., 2002; Rees, 2004; Pascual-Villalobos, 2006; Sahaf et al., 2008).

#### **1.4.1 Insecto en estudio: *Tribolium castaneum* (Herbst)**

El género *Tribolium* comprende 30 especies, cinco de ellas se encuentran en asociación con los productos almacenados, siendo *T. castaneum* la plaga más importante a nivel mundial (Rees, 2004). Esta especie es una plaga común que afecta muchos molinos harineros, silos y almacenes (García et al., 2005).

### 1.4.1.1 Clasificación de *Tribolium castaneum*

**Phylum Arthropoda**

**Clase Insecta**

**Orden Coleóptera**

**Suborden Polyphaga**

**Serie Cucujiformia**

**Superfamilia Cucujoidea**

**Familia Tenebrionidae**

**Género *Tribolium***

**Especie *Tribolium castaneum* Herbst**

### 1.4.1.2 Distribución geográfica e importancia económica

Es una especie cosmopolita, se desarrolla en climas templados y mediterráneos aunque es dominante en climas cálidos, siendo los fríos los menos favorables. Se trata de una de las especies que se encuentran con mayor frecuencia en los productos almacenados.

Ataca virtualmente cualquier tipo de producto seco, de origen animal o vegetal, siendo especialmente importante como plaga de cereales y granos. Es considerada una plaga secundaria ya que tanto las larvas como los adultos se alimentan de grano partido. La infestación puede dejar un olor persistente y desagradable en el grano debido a la secreción de benzoquinonas liberadas desde glándulas abdominales (Rees, 2004).

### 1.4.1.3 Características morfológicas

Adultos: presentan una coloración marrón rojiza y miden entre 2.6 y 4.4 mm (**Fig. 1.14**). Poseen los últimos tres segmentos antenales de mayor tamaño que los anteriores. En una vista lateral de la región cefálica, se puede observar claramente una carena que divide el ojo en dos facetas. Ventralmente la distancia entre ambos ojos es relativamente estrecha y puede observarse un proceso en forma de hacha entre el primer par de patas. Dorsalmente, el tórax presenta pequeños hoyos en la región central del pronoto (Rees, 2004).

Huevos: pequeños y alargados, de color blanquecino, recién ovipuestos están cubiertos de una capa viscosa que les sirve para adherirse a las superficies facilitando la infestación (Dell'Orto Trivelli & Arias Velázquez, 1985).

Larva: pequeña, delgada, cilíndrica mide entre 5 y 10 mm de longitud, de color blanco amarillo pálido y cabeza rojiza (**Fig. 1.15**).

Pupa: de color blanco al comienzo de la fase, gradualmente se torna color amarillo y antes de emerger el adulto se torna de coloración castaño rojiza (Metcalf & Flint, 1974).



**Figura 1.14:** Adultos de *T. castaneum*

**Figura 1.15:** Larva de *T. castaneum*



Ciclo de vida: La hembra puede depositar más de 1.000 huevos durante su vida adulta. Las larvas se alimentan del producto almacenado e incluso de otros insectos pequeños. El canibalismo es muy común tanto en larvas como en adultos. La larva completa su desarrollo en unos 25 días aproximadamente. Los estados de huevo y pupa son cortos, pasando más del 60% del ciclo en estado larval. El adulto puede vivir por dos o tres años si se dan las condiciones adecuadas. Se multiplica en un rango de temperaturas que va de 22 a 40° C y una Humedad Relativa (HR) no inferior al 1%. En condiciones óptimas de temperatura y humedad (35 a 37° C y 70% HR) el ciclo se completa en 20 días. Esta es la tasa de reproducción más rápida alcanzada por una plaga de grano almacenado.

## **1.5 Análisis fitoquímico**

La fitoquímica, o química de las plantas, se ha desarrollado en los últimos años como una disciplina distinta, en algún lugar entre la química de productos naturales orgánicos y la bioquímica de las plantas, estando ambas estrechamente relacionadas. Está vinculada a la enorme variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y acumuladas por las plantas, teniendo como objetivo principal su aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de las diversas sustancias producidas por los vegetales (Harborne, 1998).

El conocimiento de la composición química de un extracto vegetal es un hecho rutinario que se apoya en técnicas de tamizaje fitoquímico, comprendiendo una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica; que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en macerar la planta entera o partes de la misma (raíces, parte aérea, etc.) con solventes o mezclas de ellos de diferentes polaridades, y el empleo de reacciones de coloración sobre los extractos obtenidos. Permitiendo así, la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de los ensayos biológicos complementarios (Osorio Durango, 2009; Sharapin, 2000).

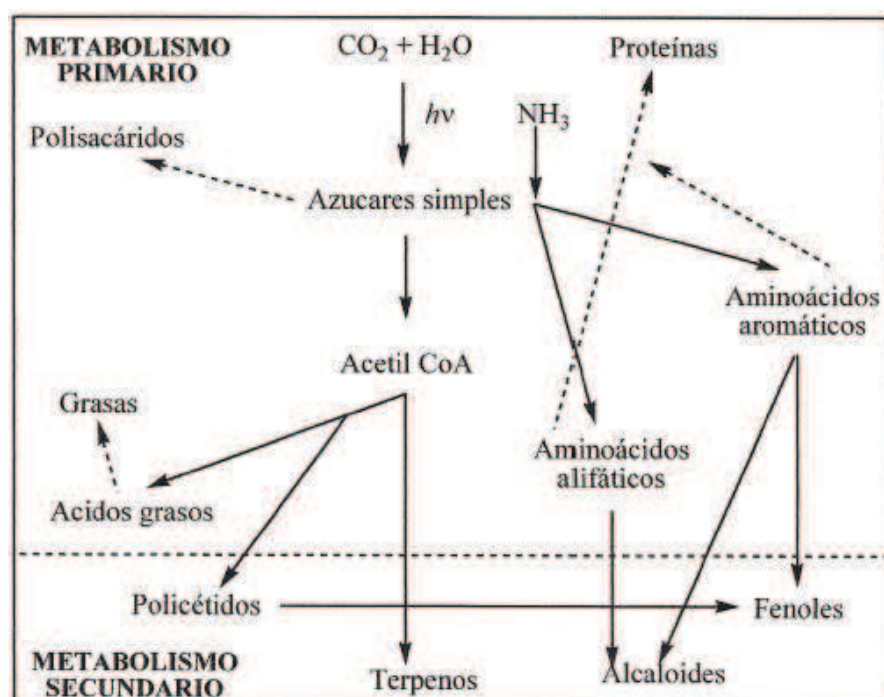
Estos análisis fitoquímicos, por muchos años han demostrado ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios con actividades biológicas interesantes (Sanabria-Galindo et al., 1997). Casi siempre, en una misma planta existen varios componentes biológicamente activos, el principal de ellos probablemente determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión. Sin embargo, el grado en el que los componentes secundarios influyen sobre la acción biológica queda puesto de manifiesto al aislar el principio activo principal (Pawlow, 1985). Una característica importante en la estrategia de defensa de las plantas es la distribución variable de los compuestos secundarios en los diferentes tejidos vegetales, dependiendo de su importancia para la planta, así como su redistribución según avanza el desarrollo fenológico (Cheeke, 1995).

Por otro lado, el aislamiento y conocimiento estructural de compuestos provenientes de las plantas, podría dar a lugar a diseñar reacciones para producir derivados semisintéticos. Es entonces de gran importancia aislar los principios activos de las plantas,

y su localización en las diferentes partes de las mismas o en los diferentes extractos, para ser sometidos a ensayos biológicos adecuados.

### 1.5.1 Metabolitos secundarios: conceptos generales

Un gran porcentaje de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas, de distribución más restringida y característica de fuentes botánicas específicas, en contraposición a los llamados metabolitos primarios; los cuales están universalmente distribuidos. Además, participan en la actividad celular de todo ser viviente (Lock, 1994; Lock, 1998; Kuklinski, 2000; Enriquez Flores et al., 2008). Debido a que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios (**Figura 1.16**), ambas clases de compuestos están interconectados en una extensión que hace difícil el establecimiento de una clara división entre ellos (Azcón-Bieto & Talón, 2000).



**Figura 1.16:** Relaciones entre el metabolismo primario y secundario

Los metabolitos secundarios de las plantas eran considerados hasta hace unas décadas, como sustancias carentes de una función específica, que reflejaban un mero



aspecto de la biodiversidad. Las investigaciones realizadas desde hace pocos años en el campo de la ecología química, han puesto de manifiesto que muchos de estos compuestos secundarios juegan un importante papel en las relaciones planta-insecto (Pemonge et al., 1997). Intervienen en relaciones de competencia entre las plantas, actuando como agentes alelopáticos; como moléculas portadoras de información relacionada con posibles funciones defensivas; además actúan como sustancias naturales que son repelentes o inhibidores del crecimiento, desarrollo y/o alimentación de los insectos (García Solórzano, 2003). Es decir, se trata de sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno.

### **1.5.1.1 Alcaloides**

Los alcaloides representan los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas. Son un grupo muy heterogéneo tanto química como biológicamente (Domínguez, 1973; Barillas López, 1998; Maldoni, 1991).

Son moléculas orgánicas más o menos complejas, de carácter básico por la presencia en ellas de uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo; se sintetizan de aminoácidos o de sus derivados inmediatos. Son sustancias más o menos tóxicas, preferentemente sobre el sistema nervioso central (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

Pueden encontrarse en todos los órganos vegetales, pero con frecuencia, dependiendo de las especies, se acumulan sólo en algunos de ellos (por ejemplo, en cortezas, raíces, hojas y frutos), mientras que al mismo tiempo, hay otros órganos libres de alcaloides. Una sola especie vegetal puede contener más de un centenar de alcaloides diferentes, y la concentración puede variar de una pequeña fracción al 10% del peso seco (Robinson, 2001).

Se ha tratado de conocer la función de los alcaloides en las plantas; se los consideran como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, también se los asocian con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos (Domínguez, 1973). Por otra parte, se ha sugerido que algunos alcaloides participan en el crecimiento del vegetal, ya sea por su capacidad de formar quelatos o intervenir en fenómenos de óxido-reducción.



Se encuentran en las plantas en forma de sales con ácidos vegetales comunes (acético, oxálico, láctico, málico, tartárico, cítrico) o con ciertos ácidos especiales (fumárico, verátrico, acónito); son solubles en agua y poco solubles en disolventes orgánicos. Siendo estas propiedades en las que se fundan los procedimientos que se siguen para su extracción, así como para su purificación (Muñoz, 1996).

### **1.5.1.2 Terpenoides**

Los terpenoides o isoprenoides constituyen uno de los grandes grupos de compuestos secundarios presentes en el reino vegetal. Entre ellos se encuentran metabolitos claramente secundarios (como los componentes de las esencias, bálsamos y resinas) y un importante grupo de metabolitos considerados fisiológicamente primarios.

Entre los isoprenoides considerados primarios figuran las fitohormonas: giberilinas y el ácido abscísico; la cadena isoprenoide de algunas citoquininas, de la plastoquinona y de la ubiquinona; el fitol de la clorofila; los carotenoides; los fitoesteroles esenciales para la integridad de las biomembranas y los dolicoles.

En las plantas se sintetizan a partir del compuesto de C<sub>5</sub> isopentenil pirofosfato (IpPP), que se puede considerar el isopreno activo, hipotético de Ruzicka (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

Están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno, y constituyen una familia muy grande de compuestos que tienen una variedad de roles diferentes en las plantas. Los triterpenos (treinta átomos de carbono) son importantes componentes estructurales de las membranas celulares de las plantas. Muchos pigmentos de plantas, incluyendo los carotenoides amarillos y rojos, son tetraterpenos (cuarenta átomos de carbono). Los monoterpenos y sesquiterpenos son componentes comunes de los aceites esenciales.

Muchos terpenos juegan un papel como hormonas y en las defensas de las plantas contra las enfermedades microbianas, herbívoros e insectos; otros tienen importantes propiedades medicinales. Los avances recientes en biología molecular han hecho posible modificar genéticamente el metabolismo de los terpenos en las plantas con fines agrícolas, industriales y farmacéuticos (Robinson, 2001).

### 1.5.1.3 Compuestos fenólicos

La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales. Son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol, pero la mayoría de estos compuestos son polifenoles.

Entre los polifenoles vegetales figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos y los flavonoides. Estos últimos forman el grupo más numeroso. Además existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos.

En la naturaleza, los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la protección de la planta frente a depredadores, como fitoalexinas y sustancias alelopáticas. También actúan como señales químicas en la floración y la polinización de las plantas, y en los procesos de simbiosis y parasitismo vegetal. A su vez, el contenido y la naturaleza de los fenoles en la planta pueden actuar sobre su crecimiento (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

#### **Clasificación**

- Existen **fenoles simples** (C<sub>6</sub>), como el fenol, el catecol y el floroglucinol; también derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos (Azcón-Bieto & Talón, 2000).
- **Ligninas**: son los polímeros fenólicos más importantes en la naturaleza, puesto que proporcionan fuerza y rigidez estructural a la pared de la célula vegetal. La lignificación fue un suceso clave en la evolución de los vegetales, permitió el desarrollo de las plantas herbáceas como árboles y separa a las plantas vasculares de las algas y las briófitas (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

Estrechamente relacionados con las ligninas, los **lignanos** pueden variar desde dímeros a grandes oligómeros. Los lignanos pueden, por ejemplo, tanto ayudar a defenderse de patógenos como actuar de antioxidantes en flores, semillas, frutos, tallos, cortezas, hojas y raíces ([www.psicostasia.com](http://www.psicostasia.com)).

- **Taninos**: se clasifican en hidrolizables y condensados (no hidrolizables por el calor o los ácidos diluidos, a diferencia de los primeros). Ambos son insolubles en solventes no polares (éter, cloroformo, hexano, benceno) y solubles en agua y alcohol (Austin, 1989). Reaccionan con las proteínas salivares y glucoproteínas de la boca ejerciendo un efecto astringente, lo cual hace que actúen como disuasorios alimentarios para depredadores (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

La gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos que poseen los taninos les hace ser muy reactivos, proporcionándoles numerosos puntos de anclaje susceptibles de formar puentes de hidrógeno, siendo éste el motivo por el que forman asociaciones reversibles con otras moléculas, demostrando mayor afinidad por las proteínas debido a la fuerte tendencia a formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los taninos y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos. Se encuentran principalmente en hojas de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas (García Solórzano, 2003).

- **Flavonoides:** son pigmentos vegetales derivados de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona (esqueleto carbonado  $C_6 - C_3 - C_6$ ). Se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres como glicósidos con una a tres unidades de azúcar. Existen 6 clases principales: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanoles, antocianinas y taninos condensados, y otras dos más, xantonas y auronas (Barillas López, 1998; Domínguez, 1973). Se hallan presentes en todas las partes de la planta, algunos se encuentran ampliamente distribuidos como flavonas y flavonoles, mientras que chalconas y auronas son más restringidos en su ocurrencia.

La función original de los flavonoides en las células vegetales se piensa que es defensiva, proporcionando protección contra insectos, ataques de hongos, y virus y el consumo por herbívoros invertebrados y vertebrados. Con la evolución, sus funciones se diversificaron (Robinson, 2001), atribuyéndoseles diversas propiedades en las plantas, entre ellas podemos citar (a) protección a los vegetales contra la incidencia de rayos ultravioleta y visible, así como protección contra insectos, hongos, virus y bacterias, (b) atrayentes de animales con finalidad de polinización, (c) antioxidantes, (d) control de la acción de las hormonas vegetales, (e) agentes alelopáticas y (f) inhibidora de las enzimas.

Como características generales de estos compuestos se deben señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basado inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un

examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado (Lock, 1994).

- **Cumarinas, furanocumarinas y estilbenos:** protegen frente al ataque bacteriano y de hongos patógenos, repelen herbívoros e inhiben la germinación de las semillas ([www.psicostasia.com](http://www.psicostasia.com)).

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivo General

Extraer, purificar y determinar los componentes químicos (metabolitos secundarios) provenientes de extractos de *Baccharis articulata* con potenciales propiedades repelentes frente al escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Herbst).

#### 2.2 Hipótesis

Los extractos crudos vegetales de *Baccharis articulata* y las fracciones provenientes de estos, poseen actividad repelente en adultos de *T. castaneum* debido a la presencia de principios activos (metabolitos secundarios) de origen natural; permitiendo de esta manera el control de plagas; con buena eficacia, selectividad y amigables con el ambiente. Evitando así el uso de plaguicidas convencionales, muchos de los cuales son resistidos por las plagas, causan contaminación ambiental y producen efectos secundarios en otras especies consideradas beneficiosas.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Búsqueda Bibliográfica**

La búsqueda y actualización bibliográfica se realizó de manera permanente. A través de la Red Universitaria fue posible la investigación y revisión de trabajos referidos al tema a través del buscador científico Scopus, como así también la descarga de los trabajos por medio de la Biblioteca de Ciencia y Tecnología perteneciente al MINCYT.

#### **3.2 Materiales y equipos de laboratorio**

- ✦ Atomizador (spray de vidrio)
- ✦ Balanza analítica
- ✦ Columna cromatográfica
- ✦ Cristalizadores
- ✦ Cromatofolios de silcagel 60 F<sub>254</sub> en capa fina – Merck
- ✦ Cuba para cromatografía
- ✦ Embudo simple y buchner
- ✦ Envases de vidrio
- ✦ Equipo para VLC
- ✦ Lámpara de luz UV
- ✦ Micropipetas
- ✦ Molino de cuchillas

- ✱ Papel de filtro
- ✱ Pipetas
- ✱ Placas de Petri
- ✱ Probetas
- ✱ Silicagel 70-230 mesh 60Å – Aldrich Chemical Company
- ✱ Silica gel 60 H – Merck
- ✱ Tips
- ✱ Tubos de ensayo

### **3.3 Reactivos**

- ✱ Acetato de etilo – Dorwil p.a.
- ✱ Ácido sulfúrico concentrado – Cicarelli p.a. (95-98 %)
- ✱ Ácido clorhídrico concentrado – Cicarelli p.a. (36,5-38 %)
- ✱ Anhídrido acético – Cicarelli p.a
- ✱ Alcohol etílico “absoluto” – Dorwil p.a.
- ✱ Benceno – Cicarelli p.a.
- ✱ Cintas de magnesio metálico
- ✱ Cloroformo – Dorwil p.a.
- ✱ Éter de petróleo – Biopack p.a.
- ✱ Hidróxido de amonio – Cicarelli p.a. (28-30 %)
- ✱ Metanol – Biopack p.a.
- ✱ *n* – Hexano – Dorwil p.a.
- ✱ Tolueno – Mallinckrodt
- ✱ Tricloruro férrico anhidro (FeCl<sub>3</sub>) – Merck
- ✱ Vainillina - Mallinckrodt

## 3.4 Material vegetal

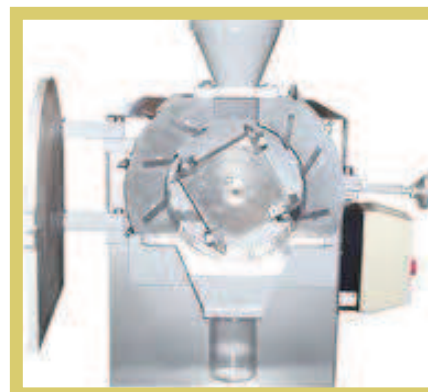
### 3.4.1 Colecta

La especie *Baccharis articulata*, proveniente de la provincia de La Pampa, se colectó en la Ruta Provincial 14, Km 150 aproximado; en los meses de marzo - abril de 2010 y en abril de 2011. El material herbario corresponde al Dpto. Conhelo, Eduardo Castex (Troiani y Steibel 6198, 21-XI-79). Tanto la recolección como la clasificación botánica fueron realizadas por el Ingeniero Agrónomo Oscar Martínez, docente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa.

Las partes aéreas, colectadas en su hábitat natural, se secaron al aire ( $26 \pm 2$  °C) (Fig. 3.1) durante 10 días, rotándose diariamente y cambiando el papel periódicamente, ya que este absorbe el agua. Una vez secas, se molieron para tener un área de contacto mayor con el disolvente de extracción. La molienda se realizó empleando un molino de cuchillas (Fig. 3.2) hasta obtener un polvo fino (malla de 200 mesh).



**Figura 3.1:** Secado de las partes aéreas de *Baccharis articulata*



**Figura 3.2:** Molino de cuchillas



### 3.4.2 Obtención de los extractos crudos

El material vegetal seco y molido (2,120 Kg) se sometió a maceración, colocándolo en un recipiente de vidrio con el disolvente, en una proporción 1:5 p/v. Se dejó en reposo por un período de 48 hs, agitando con frecuencia. Los solventes utilizados fueron primeramente *n*-hexano con el fin de desengrasar el material vegetal y seguidamente etanol-cloroformo 1:1, realizando dos extracciones con esta mezcla de solventes (Cifuentes et al., 2002; Davicino et al., 2007).

Los extractos crudos se filtraron al vacío (**Fig. 3.3**) y se concentraron bajo campana. Los extractos concentrados (hexánico y etanólico-clorofórmico) fueron conservados en frascos color ámbar para evitar la descomposición de las sustancias activas por acción de la luz (fotosensibles). Las muestras se dejaron en refrigeración a 5 °C para posteriormente someterlas a análisis (Frías Tamayo et. al., 2011).



**Figura 3.3:** Filtración por Büchner

### 3.5 Fraccionamiento de extractos

El extracto etanólico-clorofórmico (149,46 g) se fraccionó mediante cromatografía líquida al vacío (VLC) sobre sílica gel 60 H, eluyendo con mezcla de *n*-hexano y acetato de etilo, de polaridad creciente (Cifuentes et. al., 2002) (**Fig 3.4**). Se recolectaron 38 fracciones, cada una de ellas fue cromatografiada en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> y luego reveladas con oleum (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O en la relación 4:20:1). Posteriormente se calentaron en estufa a 100-105 °C. Se agruparon aquellos eluatos que mostraron R<sub>f</sub>

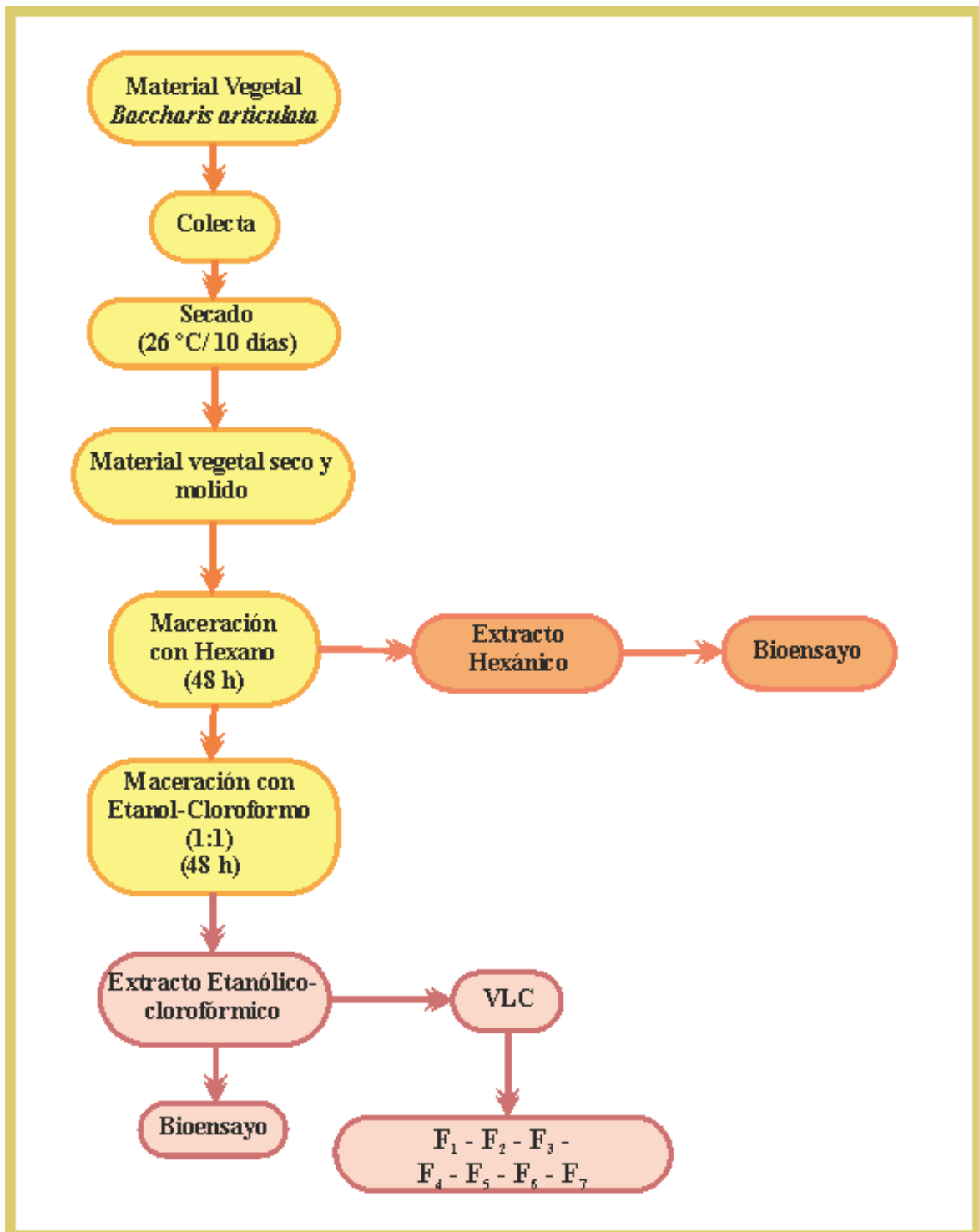
similares por cromatografía en capa fina (TLC), obteniendo 7 fracciones finales (Petenatti et. al., 2005).



**Figura 3.4:** Fraccionamiento por VLC del extracto etanólico-clorofórmico de *B. articulata*

Cada una de las fracciones fue sometida a pruebas de tamizaje o screening fitoquímico y les fue probada su actividad repelente. Las fracciones bioactivas de menor polaridad se purificaron por cromatografía en columna (CC).

El proceso de extracción y fraccionamiento de los extractos orgánicos de *B. articulata* se puede observar en el siguiente diagrama de flujo (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5:** Proceso de extracción y fraccionamiento de los extractos orgánicos de *B. articulata*

## **3.6 Tamizaje Fitoquímico**

### **3.6.1 Ensayos de coloración**

#### **3.6.1.1 Ensayo del Cloruro Férrico**

Permite determinar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Para ello, a una alícuota del extracto crudo se le redisolvió en etanol absoluto, obteniéndose el extracto alcohólico, al cual se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico (Aragadvay Yungán, 2009). Un ensayo positivo brinda la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

#### **3.6.1.2 Ensayo de Liebermann-Burchardt**

Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides. Para ello se redisolvió una alícuota de cada fracción en 1 ml de cloroformo, se le adicionó 1 ml de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejaron caer 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sin agitación (Aragadvay Yungán, 2009).

La reacción de Liebermann-Burchard es típica de los ciclos fusionados que contienen dos dobles enlaces conjugados, en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble enlace en un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La reacción debe realizarse en medio absolutamente anhidro, ya que, al existir moléculas de agua, estas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la formación de un agente oxidante, muy necesario para la efectividad del ensayo en mención.

El cloroformo solubiliza a la muestra, favoreciendo la captación de algunas moléculas de agua presentes, debido a que es un solvente inmiscible, que absorbe el agua y, el ácido sulfúrico, reacciona con el anhídrido acético, dando lugar a la liberación de hidrogeniones, los cuales catalizan la dimerización del triterpeno inicial y además, la generación de trióxido de azufre, el agente oxidante que promoverá una deslocalización

generalizada y, con ello la generación de un compuesto coloreado (Enríquez Flores et al., 2008).

Un ensayo positivo se dió por un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido
- Verde intenso-visible aunque rápido
- Verde oscuro-negro final de la reacción

El primer cambio de color muy pocas veces puede observarse, mientras que el tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. En definitiva el cambio de color que se observa con mayor frecuencia es el segundo, quedando la reacción en esta fase de desarrollo de la coloración.

### **3.6.1.3 Ensayo de Shinoda**

Permite reconocer en un extracto la presencia de flavonoides. Para la determinación se redisolvió una alícuota de cada fracción en 2 ml de etanol, adicionando 2-3 virutas de Mg y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado por las paredes del vial.

Se observa la coloración, la cual varía para las distintas estructuras. Las coloraciones anaranjadas, rojas, rojas-azulosas o violetas indican la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. Ocasionalmente los flavonoles, las flavononas y flavononoles dan colores verdes o azules (Aragadvay Yungán, 2009; Carvajal Rojas et al., 2009).

En esta reacción, el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico concentrado, dando como productos al hidrógeno molecular, que es eliminado en forma de gas, y el cloruro de magnesio, forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente, actúa sobre el grupo carbonilo de los flavonoles, produciendo una coloración roja, este aumento de intensidad es debido a que el magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado.

En los flavonoles el magnesio divalente presenta dos enlaces de coordinación fuertes y dos débiles; los primeros son formados por los oxígenos de los grupos carbonilos y los segundos por los hidroxilos de la posición 3, de esta manera la intensidad aumenta dando como resultado una coloración que va desde el rojo al crimson (Enríquez Flores et al., 2008).

### 3.6.2 Análisis por cromatografía en capa delgada para determinación cualitativa de metabolitos secundarios

La cromatografía se realizó en placas de silicagel 60 F<sub>254</sub> con sistemas de solventes propios para cada tipo de compuestos.

#### 3.6.2.1 Determinación de terpenoides libres

Para la realización del análisis por TLC:

- ✘ *Adsorbente*: gel de sílice F<sub>254</sub>.
- ✘ *Sistema A* (según Domínguez, 1973):
  - Fase móvil: Benceno-acetato de etilo (8:2).
  - Revelador de Liebermann-Burchardt.

Se considera resultado positivo si bajo estas condiciones aparecen manchas en cualquier tonalidad del rojo, azul o verde.

- ✘ *Sistema B* (según Mangiaterra 2010):
  - Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (95:5)
  - Revelador vainillín sulfúrico.

Se considera un resultado positivo si bajo estas condiciones aparecen manchas en tonalidades violetas y azules.

#### 3.6.2.2 Determinación de flavonoides

Para la realización del análisis por TLC:

- ✘ *Adsorbente*: gel de sílice F<sub>254</sub>.
- ✘ *Sistema de solvente cromatográfico*: éter de petróleo-acetato de etilo (2:1).

Aunque la mayoría de los flavonoides poseen color, cuando están depositados sobre papel o capa delgada en cantidades de microgramos son casi incoloros. La luz UV puede mostrar manchas amarillo verdosas de flavonoles, cafés de flavonas, cafés o negros de antocianinas. Las chalconas poseen fluorescencia amarilla o anaranjada que se intensifican al exponerlas a vapores de amoníaco. Los vapores de amoníaco al desaparecer permiten

efectuar otras pruebas, por lo que el procedimiento seguido fue el siguiente (Domínguez, 1973):

1. Se observaron las manchas visibles (auronas, chalconas, antocianinas).
2. Se examinaron las placas con luz UV de onda larga (366 nm) observando las manchas fluorescentes (flavonoles, chalconas) o manchas oscuras.
3. Se expusieron las placas a vapores de amoníaco en tanto que se examinaron con luz UV. Las flavonas y glicósidos flavonólicos exhiben fluorescencia amarilla, las flavononas se ven amarillas y las catequinas azul claro.
4. Se observaron nuevamente a la luz ordinaria, las antocianinas se ven azul-grisáceo, las flavonas amarillo, las chalconas y auronas naranja-rojo.
5. Se empleó además como revelador una disolución al 1% de FeCl<sub>3</sub> en etanol, dando manchas azules, rojas, verdes y/o marrones en presencia de flavonoides.

### **3.6.2.3 Determinación de alcaloides**

Para la realización del análisis por TLC:

- ✘ *Adsorbente*: gel de sílice F<sub>254</sub>.
- ✘ *Sistema de solvente cromatográfico* (según Domínguez, 1982): cloroformo - acetato de etilo (8:2).
- ✘ *Detección*: revelador de Dragendorff. Coloración roja a naranja.

## **3.7 Bioensayo**

### **3.7.1 Insectos**

Los ejemplares de *T. castaneum* provienen de una colonia susceptible provista por el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEDEF/CONICET), se criaron en recipientes plásticos de 14 x 10,5 x 30 cm; cerrados con tela de malla fina. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (25 ± 2°C) y humedad relativa (65 ± 5% HR) y un fotoperíodo 12:12 hs. (L:O) para permitir su rápida reproducción (F.A.O.,

1974). Los insectos fueron alimentados con una mezcla de harina-levadura en proporción 7:1.

### 3.7.2 Actividad repelente en adultos de *T. castaneum*

Las pruebas de repelencia se llevaron a cabo siguiendo el método propuesto por Talukder & Howse (1993, 1994). Se utilizaron círculos de papel de filtro de 9 cm. de diámetro separados en dos mitades iguales. En una de ellas se aplicó 1 mL de la solución de los extractos en concentración de 10 mg/mL, distribuyéndose uniformemente con una pipeta, y lográndose un sustrato tratado de 0,31 mg de extracto/cm<sup>2</sup>. La otra mitad (control) fue tratada con el solvente utilizado en la preparación de la solución. Los círculos se secaron al aire hasta evaporación completa del solvente y fueron dispuestos en placas de Petri a las que se les colocaron diez insectos adultos. Para cada extracto se realizaron ensayos independientes de tres réplicas cada uno (**Figura 3.6**). El recuento de gorgojos presentes en cada mitad se efectuó a intervalos regulares de una hora hasta la quinta hora posterior al inicio del tratamiento. Los datos fueron convertidos en porcentaje de repelencia (PR) por medio de la siguiente fórmula:

$$PR (\%) = (Nc - 5) * 20$$

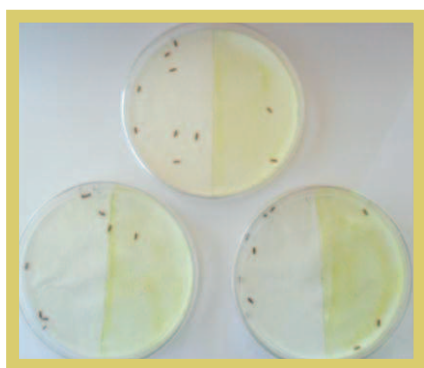
Donde **Nc**, es el número de insectos presentes en la mitad control.

Valores positivos (+) expresan repelencia y valores negativos (-) atracción.

Los valores obtenidos luego fueron categorizados según la siguiente escala:

Clase	PR (%)
0	>0,01 a <0,1
I	0,1 a 20
II	20,1 a 40
III	40,1 a 60
IV	60,1 a 80
V	80,1 a 100





**Figura 3.6:** Réplicas para bioensayo de repelencia en placa de Petri

### **3.7.3 Métodos estadísticos**

Para el ensayo de repelencia, además del cálculo del índice mencionado anteriormente, los datos se analizaron empleando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA), con un nivel de significancia  $p = 0,05$ ; mediante el paquete de Microsoft Office 2003. En el caso de existir diferencias significativas entre las medias de las fracciones estudiadas se realizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) (InfoStat, 2001).

El procedimiento seguido con las 7 fracciones obtenidas por VLC a partir del extracto etanólico-clorofórmico, se puede observar en el siguiente diagrama de flujo (**Figura 3.7**).

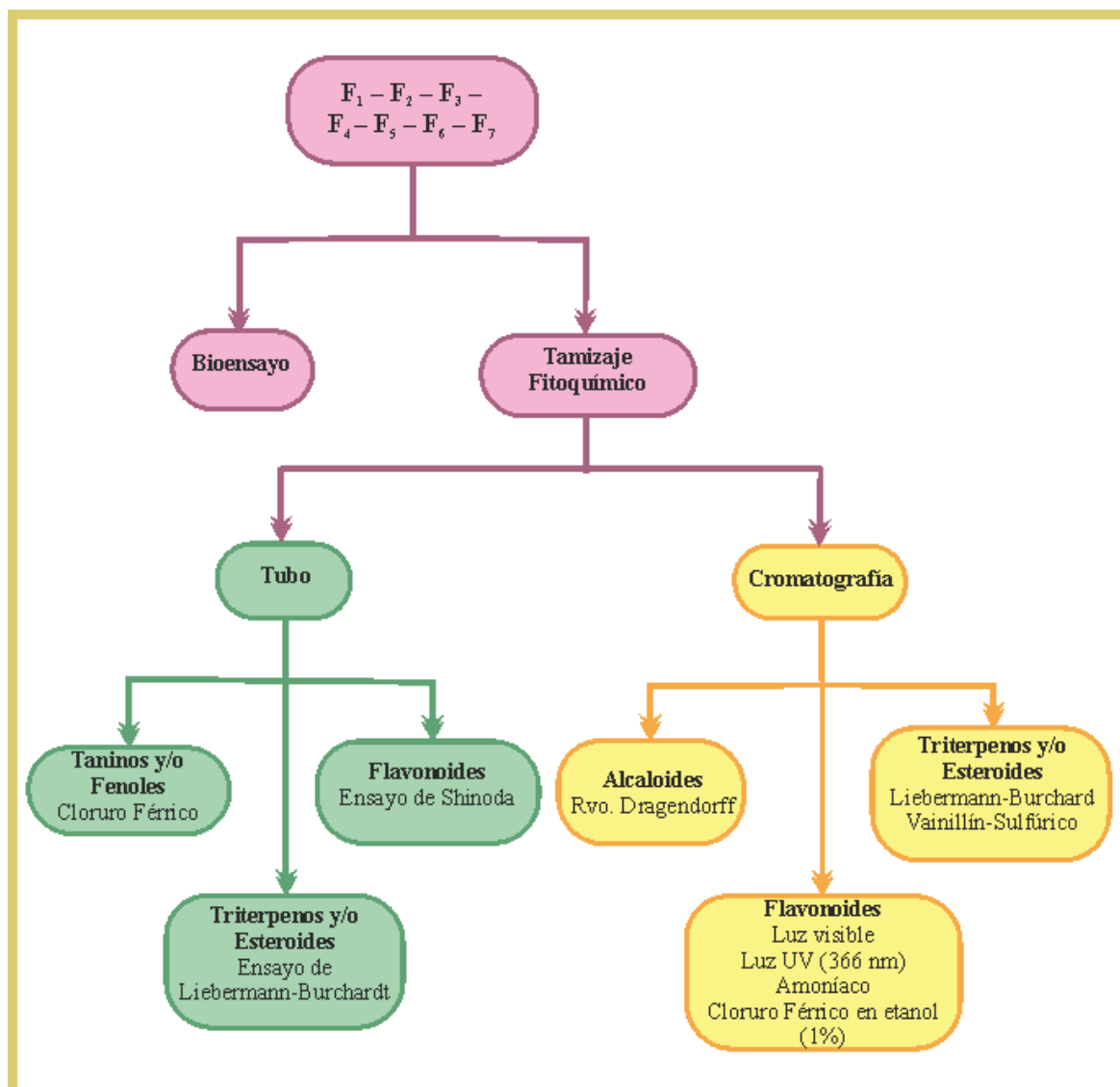


Figura 3.7: Procedimiento seguido con las fracciones obtenidas mediante VLC

### 3.8 Purificación de las fracciones bioactivas de menor polaridad

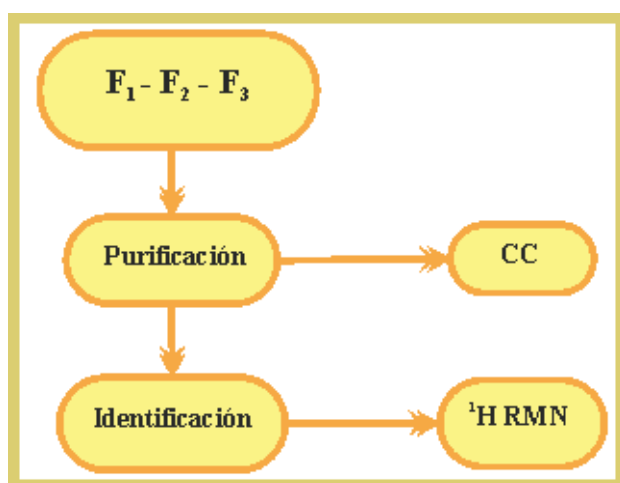
Las fracciones bioactivas de menor polaridad ( $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_3$ ) se purificaron por cromatografía en columna (CC) con gel de sílice, malla 70-230 (15,60 g para  $F_1$ ; 13,80 g para  $F_2$  y 14,50 g para  $F_3$ ), utilizando sistemas de disolventes de polaridad creciente ( $n$  – Hexano,  $n$  – Hexano-EtOAc y EtOAc). Posteriormente, se reunieron los eluatos obtenidos de cada fraccionamiento que mostraron similares  $R_f$  por cromatografía en capa fina (TLC). Las TLC se realizaron sobre placas de gel de sílice 60  $F_{254}$  y se observaron con luz UV (254 nm y 366nm).

A las sub-fracciones se les realizaron pruebas fitoquímicas mediante TLC para la identificación de las familias de compuestos pertenecientes a flavonoides y terpenoides; según las técnicas descritas anteriormente.

### 3.8.1 Identificación de los compuestos puros

Los compuestos presentes en las fracciones F<sub>3</sub>E y F<sub>3</sub>C-II, provenientes de la purificación de la fracción 3, fueron identificados mediante <sup>1</sup>H RMN. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN que permitieron la identificación y la elucidación estructural, fueron realizados empleando un espectrómetro Bruker AC-200.13 Mz., usando Cl<sub>3</sub>CD como solvente y TMS como estándar interno.

El proceso de purificación e identificación de las fracciones bioactivas y de menor polaridad se presenta en el siguiente diagrama de flujo (**Figura 3.8**).



**Figura 3.8:** Proceso de purificación e identificación de las fracciones bioactivas

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Resultados

##### 4.1.1 Extracción

Mediante el método de extracción sólido-líquido, explicado en la sección 3.4.2, se obtuvo el rendimiento de extracción de la especie vegetal finamente molida, utilizando como solventes *n*-hexano y etanol-cloroformo (1:1). Se calculó como g de extracto cada 100 g de material vegetal. La **Tabla 4.1** muestra los rendimientos de extracción obtenidos con *n*-hexano y con etanol-cloroformo para *B. articulata*. Se aprecia el mayor rendimiento con la mezcla de solventes (etanol – cloroformo), siendo muy superior al obtenido empleando *n*-hexano.

**Tabla 4.1:** Porcentaje de extracción de *Baccharis articulata* con *n*-hexano y etanol-cloroformo

Especie vegetal	Rendimiento con <i>n</i> -Hexano (%)	Rendimiento con Etanol-Cloroformo (%)
<i>Baccharis articulata</i>	0,13	7,05

El uso de diferentes disolventes, permite separar compuestos con características de polaridad semejante a la de estos. Los principios activos deben pasar de la planta al

disolvente, de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad del disolvente (Kuklinsky, 2000).

#### 4.1.2 Bioensayo dirigido a la selección del extracto a purificar

Se realizaron bioensayos con los dos extractos obtenidos, para determinar el índice de repelencia de cada uno de ellos a los largo del tiempo de ensayo.

Se pudo observar efecto repelente sobre los adultos de *T. castaneum*, a partir de la primera hora de iniciado el tratamiento, tanto con el extracto hexánico como con el etanólico-clorofórmico de *B. articulata*.

El extracto hexánico muestra a la hora 2 su mayor índice de repelencia, mientras que el mínimo efecto se observa a la hora 4. En el caso del extracto etanólico-clorofórmico el máximo se da en la hora 4.

Ambos extractos se encuadran dentro de la clase III (40,1 – 60,0), sin mostrar ninguno de ellos una repelencia del 100%.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.2:** Índice de Repelencia sobre *T. castaneum* al aplicar los extractos hexánico y etanólico-clorofórmico de *Baccharis articulata*.

Extracto	Conc. Extracto (mg/cm <sup>2</sup> )	IR promedio para las horas de tratamiento					Promedio IR (%)	Clase
		1	2	3	4	5		
Hexánico	0,31	40,95	53,33	42,86	26,67	45,71	41,90	III
Etanólico- clorofórmico	0,31	45,26	40,53	37,37	52,14	41,03	43,27	III

#### **4.1.2.1 Efecto del tiempo de tratamiento al evaluar los dos extractos**

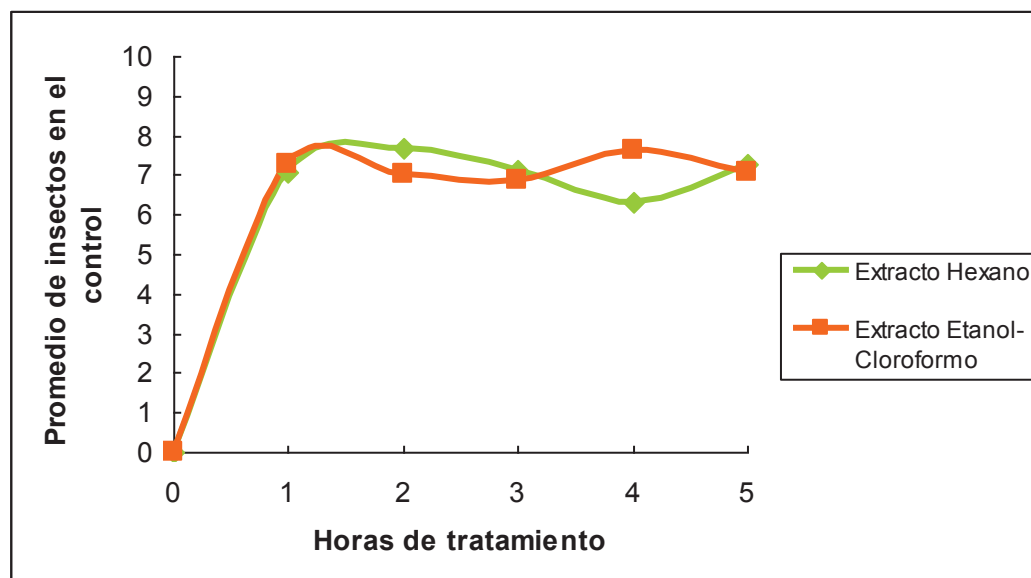
Se evaluó el comportamiento de los insectos adultos a lo largo del tiempo de ensayo (5 hs.) con la finalidad de determinar cual resulta ser el óptimo para el subsiguiente fraccionamiento.

La máxima repelencia observada se obtiene cuando los diez insectos adultos colocados en la placa de Petri, se encuentran en la mitad que corresponde al control, sin embargo; también se habla de repelencia cuando el número de insectos en esta mitad es superior a 5. En caso contrario, es decir cuando la cantidad de gorgojos en el control es inferior a 5 se habla de atracción del extracto evaluado.

Tal como se aprecia en la **Figura 4.1**, durante el tiempo que duró el tratamiento, no se observó atracción en ninguno de los dos extractos, tampoco una distribución homogénea en ambas mitades. Por lo tanto, ambos extractos muestran efecto repelente, ya que en todo momento el número de insectos en la mitad control es superior a 5.

El máximo número de insectos presentes en la mitad control para el extracto hexánico, se obtuvo a las dos horas de comenzado el tratamiento; mientras que en el caso del extracto etanólico-clorofórmico la mayor cantidad de insectos presentes en el control se tuvo luego de cuatro horas. Sin embargo, para ambos extractos se observa que una vez cumplida la primera hora, poseen buena actividad repelente (**Figura 4.1**).

Los resultados antes descritos se evidenciaron en la sección precedente al analizar los IR obtenidos en las cinco horas de estudio.



**Figura 4.1:** Efecto repelente de los extractos hexánico y etanólico-clorofórmico de *B. articulata* sobre *T. castaneum*

#### 4.1.2.2 Comparación de dos medias muestrales

Se compararon las medias de ambos extractos, para determinar si las varianzas de las muestras eran homogéneas o heterogéneas empleando un ensayo F. Se pudo comprobar que ambas varianzas pertenecen a la misma población, esto es, son estimaciones de la misma varianza poblacional, por lo que fue posible calcular una varianza conjunta o promedia.

Para comparar las medias se calculó el valor de  $t_0$  (empleando el valor de  $s^2$  conjunta) y se lo comparó con el  $t_{crit}$ . A partir de dicha comparación se observó que tanto para cada hora, como así también a nivel global, los valores de  $t_0$  resultaron ser inferiores al  $t_{crit}$ , es decir, no se demostró que exista diferencia entre las medias para el valor de significación elegido ( $p < 0,05$ ).

De acuerdo con los resultados obtenidos y como se expresó precedentemente no se observan diferencias significativas entre los índices de repelencia para ambos extractos, razón por la cual al momento de la elección del extracto a purificar, se escogió el extracto etanólico-clorofórmico proveniente de *B. articulata*. La elección se debe a que éste presenta un rendimiento superior al momento de la obtención del extracto, favoreciendo en este sentido, la obtención de mayor cantidad de material a fraccionar, para la posterior realización del tamizaje fotoquímico, como así también la determinación de la repelencia.

### 4.1.3 Fraccionamiento del extracto etanólico-clorofórmico

Se realizó el fraccionamiento del extracto etanólico-clorofórmico por VLC empleando como solventes *n*-hexano y mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo, en concentraciones crecientes de este último. Se agruparon las fracciones como se indica en la **Tabla 4.3**. Posteriormente, a las siete fracciones finales se les realizaron estudios fitoquímicos y pruebas de repelencia.

**Tabla 4.3:** Fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico obtenidas por VLC

FRACCIÓN	POLARIDAD DEL ELUYENTE
F <sub>1</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 5%
F <sub>2</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 10%
F <sub>3</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 20%
F <sub>4</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 30%
F <sub>5</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 50%
F <sub>6</sub>	<i>n</i> -Hexano:AcOEt 75%
F <sub>7</sub>	AcOEt puro

### 4.1.4 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico, desarrollado por medio de técnicas de análisis químico cualitativo no instrumental, constituyó una de las etapas que permitió determinar los principales grupos químicos presentes en las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de la especie estudiada.



#### 4.1.4.1 Pruebas de coloración

El análisis fitoquímico, mediante el empleo de pruebas de coloración, de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de las partes aéreas de *B. articulata*; comprendió la identificación de aquellos metabolitos secundarios que con mayor frecuencia se asocian a un efecto repelente; mediante el empleo de pruebas específicas, rápidas, reproducibles y de bajo costo. Según el análisis preliminar, la mayoría de las fracciones presentan fenoles y/o taninos, esteroides y/o terpenos y flavonoides.

La presencia de compuestos fenólicos y/o taninos se observa en 5 de las 7 fracciones: F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>. Los terpenoides por su parte, están presentes en todas las fracciones, observándose la tercera fase de desarrollo de color; con excepción de F<sub>4</sub>, en la cual el desarrollo de color quedó en la segunda fase. Finalmente, los flavonoides presentan una distribución más restringida, encontrándose en 3 fracciones: F<sub>3</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>. Los resultados se muestran con mayor claridad en la **Tabla 4.4**.

**Tabla 4.4:** Identificación de metabolitos secundarios por pruebas de coloración, en las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico, obtenidas por VLC

Ensayo/ Metabolito	Indicadores	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>
Cloruro férrico/ Compuestos fenólicos y/o taninos	rojo-vino (+) verde intenso (+) azul (+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Liebermann Burchardt/ Triterpenos y/o esteroides	rosado-azul (+) verde intenso- visible (++) verde oscuro- negro (+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
<i>Shinoda</i> / Flavonoides	amarillo, naranja, rojo, violeta, verde o azul (+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)

#### 4.1.4.2 Determinación cualitativa de metabolitos secundarios por TLC

Se evaluaron por cromatografía en capa fina las siete fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>). Los cromatogramas revelados con los agentes cromogénicos, demuestra que cualitativamente se tiene la presencia de metabolitos secundarios tales como: terpenoides y flavonoides.

##### ✧ Terpenoides

###### ✧ Sistema A

En la placa cromatográfica se pudo observar, en la calle correspondiente a la fracción 2, la presencia de una mancha de color rosado, que indica la presencia de compuestos terpenoides. También se observaron manchas de color verde en las fracciones 3 y 4; si bien la presencia de manchas de dicho color es indicativa de terpenoides, en este caso podría deberse a los pigmentos que poseen estas fracciones (ver **Figura 4.2**).

Los resultados obtenidos para este sistema no se condicen completamente con los obtenidos en los ensayos de coloración en tubo, para los cuales las siete fracciones presentaban este tipo de compuestos, estas diferencias pueden deberse a la sensibilidad de los métodos o del revelador empleado.



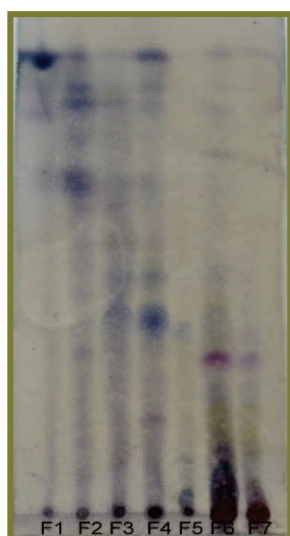
**Figura 4.2:** Cromatograma de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico en el sistema A, revelado con el reactivo de Liebermann-Burchardt.

###### ✧ Sistema B

Para este segundo sistema, se observaron manchas azules y azul-violáceas, exhibiendo la presencia de terpenoides. Esta coloración se apreció en todas las fracciones evaluadas (**Figura 4.3**), lo que concuerda con los resultados obtenidos para las reacciones en tubo. Este resultado, apoyaría la hipótesis anteriormente planteada en lo que respecta a una menor sensibilidad del revelador de Liebermann-Burchardt al momento de la detección

en placa cromatográfica de los terpenoides, ya que este revelador detecta la presencia únicamente de triterpenos, mientras que el revelador vainillín-sulfúrico es mucho más general.

Las fracciones que mostraron mayor número de bandas son: F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub>, indicando una mayor diversidad de terpenoides en estas fracciones con respecto al resto. También se observan en estas fracciones bandas con igual R<sub>f</sub>, es decir que los compuestos terpenoides en estas resultarían ser los mismos.



**Figura 4.3:** Cromatograma de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico en el sistema B, revelado con el reactivo vainillín sulfúrico.

### ✧ Flavonoides

Al observar la placa cromatográfica a la luz visible, la presencia de manchas puede considerarse que se debe a un pigmento. En lo que respecta a la luz UV de onda larga (366 nm) se observaron principalmente manchas oscuras en las fracciones F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>, pudiendo ser atribuidas a la presencia de flavonas y/o antocianinas (Domínguez, 1973). También se observó fluorescencia rosada (en F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub>) y fluorescencia blanca (en F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>), sin embargo, no se encontró bibliografía que indique a que tipo de compuestos pudieran deberse estas coloraciones fluorescentes.

Se obtuvo un resultado positivo empleando como revelador los vapores de amoníaco en F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>, presentando todas las fracciones mencionadas coloración anaranjada y este color fue más intenso en el caso de las dos últimas.

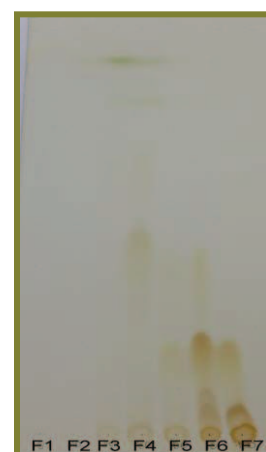
Finalmente, al emplear la solución de FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol como revelador, la coloración observada en la placa cromatográfica fue la marrón, presentándose en las fracciones F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>.

Todo lo expuesto anteriormente puede observarse en las **Figuras 4.4, 4.5 y 4.6.**



**Figura 4.4:** Cromatograma de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico revelado con luz UV de onda larga (366 nm).

**Figura 4.5:** Cromatograma de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico revelado con vapores de amoníaco.



**Figura 4.6:** Cromatograma de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico revelado con  $\text{FeCl}_3$  al 1% en etanol.

Los resultados observados por TLC no concuerdan completamente con los obtenidos mediante las reacciones en tubo. Por lo que, se puede expresar que el revelador luz UV es más sensible, pudiendo mostrar resultados positivos para un mayor número de fracciones. En contraposición, las reacciones en tubo indican el menor número de fracciones positivas, debiéndose, quizás a que la concentración de estos metabolitos en las fracciones analizadas no es la suficiente como para dar la coloración esperada. Para el caso de los dos reveladores restantes se observó que presentaron resultados positivos en las mismas

fracciones (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>), por lo cual puede inferirse que la sensibilidad que presentan los mismos se encuentra dentro del mismo rango.

En términos generales, si bien no hubo concordancia en un 100% entre los distintos reveladores y con las reacciones en tubo, la presencia de flavonoides en las fracciones F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub> fue corroborada, obteniéndose resultados positivos al menos por dos metodologías (este es el caso de F<sub>3</sub>). Los mejores resultados se obtuvieron en F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub> ya que la presencia de flavonoides fue confirmada en las cuatro determinaciones realizadas.

#### ✳ Alcaloides

En lo que respecta a la determinación de alcaloides mediante TLC empleando como revelador el reactivo de Dragendorff, no fue posible evidenciar en este estudio la presencia de estos metabolitos secundarios. La prueba resultó negativa, ya que no se observaron manchas de color rojo o naranja como se esperaba para estos compuestos.

Como se pudo observar mediante la realización del análisis fitoquímico, las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico que presentaron mayor cantidad de compuestos fueron: F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub>, ya que se detectó la presencia de terpenoides, flavonoides y taninos. Estos últimos, serían de tipo pirocatecólicos en F<sub>3</sub> y F<sub>4</sub>; y en F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub> de tipo pirogalotánicos.

Por otra parte, las fracciones 1 y 2, que son poco polares, presentaron únicamente compuestos terpenoides, aunque el número de bandas observadas es inferior al de F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> y F<sub>5</sub>.

Finalmente, ninguna de las siete fracciones evaluadas presentó alcaloides.

### 4.1.5 Evaluación de las fracciones obtenidas por VLC frente a ensayos biológicos

En este trabajo, las siete fracciones obtenidas luego de realizar la cromatografía flash al extracto etanólico-clorofórmico, fueron evaluadas mediante la realización de ensayos biológicos. Les fue probada su repelencia sobre el gorgojo rojo de la harina, mostrando todas las fracciones efecto repelente sobre *T. castaneum*.

Las fracciones que produjeron los porcentajes de repelencia más altos al finalizar las cinco horas de ensayo fueron F<sub>1</sub>, seguida por: F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>7</sub> y F<sub>6</sub>, con 87,73; 80,00; 64,89;

63,56 y 62,13% respectivamente. El resto de las fracciones presentaron una repelencia inferior al 60,00% (Tabla 4.5). La fracción 1 provocó una repelencia máxima de 93,33% en la cuarta hora de estudio. Este fue el único tratamiento que se encuadró en la clase V.

Como promisorias se destacan las tres primeras fracciones, presentando F<sub>1</sub> clase V y F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>, clase IV.

**Tabla 4.5:** Índice de Repelencia de las fracciones obtenidas por VLC del extracto crudo etanol-cloroformo de *B. articulata* sobre *T. castaneum*

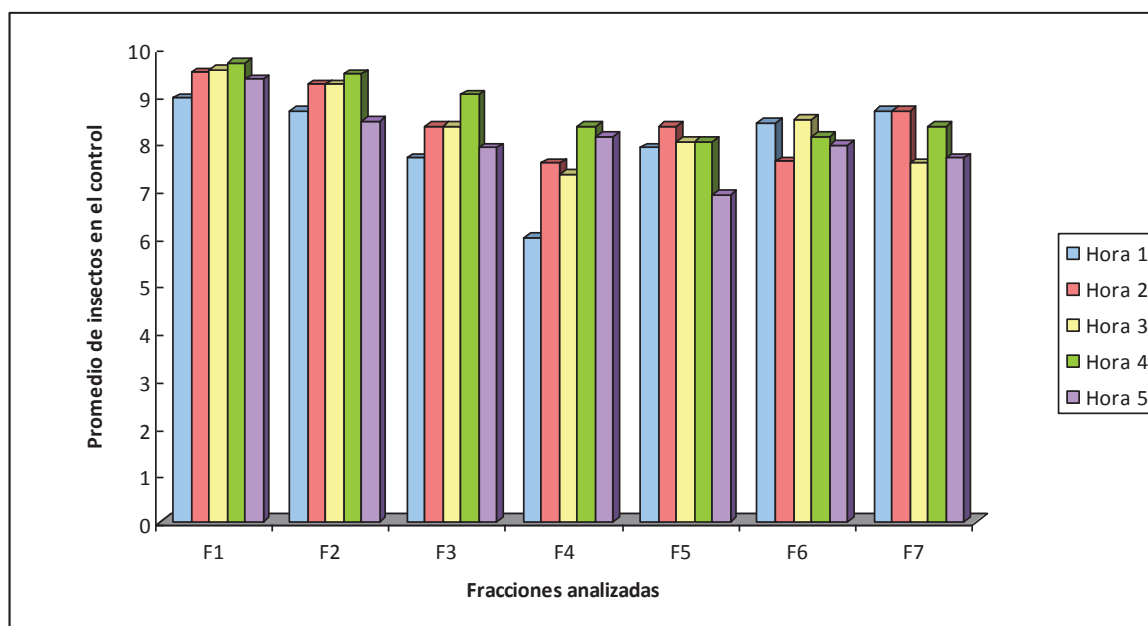
E <sub>Extracto</sub>	Conc. Extracto (mg/cm <sup>2</sup> )	IR promedio para las horas de tratamiento					Promedio IR (%)	Clase
		1	2	3	4	5		
F <sub>1</sub>	0,31	78,67	89,33	90,67	93,33	86,67	87,73	V
F <sub>2</sub>	0,31	73,33	84,44	84,44	88,89	68,89	80,00	IV
F <sub>3</sub>	0,31	53,33	66,67	66,67	80,00	57,78	64,89	IV
F <sub>4</sub>	0,31	20,00	51,11	46,67	66,67	62,22	49,33	III
F <sub>5</sub>	0,31	57,78	66,67	60,00	60,00	37,78	56,44	III
F <sub>6</sub>	0,31	68,00	52,00	69,33	62,67	58,67	62,13	IV
F <sub>7</sub>	0,31	73,33	73,33	51,11	66,67	53,33	63,56	IV

#### 4.1.5.1 Promedio de insectos en el control para las horas de ensayo, en las siete fracciones analizadas

Se evaluó para cada una de las fracciones (siete) el comportamiento de los insectos adultos a lo largo del tiempo de ensayo (5 hs.) con el objeto de determinar cuales resultan apropiadas para una posterior purificación.

Tal como se mencionó en la sección 4.1.2.1, la máxima repelencia se obtiene cuando los diez insectos adultos colocados en la placa de Petri se encuentran en la mitad que corresponde al control, aunque también existe repelencia cuando el número de insectos en esta mitad es superior a 5.

Como puede apreciarse en la **Figura 4.7**, durante el tiempo que duró el tratamiento, no se observa atracción en ninguna de las fracciones. Sin embargo, sí puede hacerse referencia al efecto repelente, ya que en todo momento el número de insectos en la mitad control es superior a 5.



**Figura 4.7:** Promedio de adultos de *T. castaneum* en las horas de ensayo para las siete fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de la especie *B. articulata*

Se observa que las fracciones 1, 2, 3 y 4 presentan comportamiento semejante, ya que el número de insectos en la mitad control, se incrementa al transcurrir las horas de tratamiento, alcanzando el valor máximo en la cuarta hora del comienzo del mismo.

Comparando estas 4 fracciones puede observarse también que la mayor repelencia se da para la fracción 1, seguida por 2, 3 y finalmente la fracción 4 es aquella que presenta menor repelencia entre estas, como así también a nivel global.

Para el caso de la fracción 5 el máximo se observa en la hora 2, disminuyendo la repelencia en las horas subsiguientes. En la fracción 6 el máximo se observa luego de transcurridas tres horas del inicio del ensayo biológico. Finalmente la fracción 7 presenta su mayor índice de repelencia en la primera hora de tratamiento, manteniéndose en la segunda este mismo valor, para luego disminuir en la hora 3.

Si se comparan las siete fracciones a la hora 1, puede observarse que  $F_1$  es aquella que presenta el mayor número de insectos en el control, evidenciando una mayor repelencia; seguida por las fracciones 2 y 7, con igual repelencia; a estas le siguen  $F_6$ ,  $F_5$ ,  $F_3$  y en último lugar  $F_4$ .

En la hora 2, siguen siendo  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_7$  aquellas que muestran mayor repelencia, y  $F_4$  si bien incrementa su nivel de repelencia, sigue siendo la fracción con menor poder repelente. Para la hora 3 son  $F_1$ ,  $F_2$  y  $F_6$  las tres fracciones más repelentes y  $F_4$ , continua siendo la fracción que muestra menor actividad.

En las últimas dos horas de tratamiento las fracciones 1 y 2 continúan siendo las que muestran el mayor poder repelente, y la que muestra la menor repelencia es  $F_5$ .

#### **4.1.5.2 Análisis estadístico de ANOVA**

##### a) Análisis estadístico de ANOVA para la hora 1

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las medias muestrales obtenidas de los ensayos biológicos a las siete fracciones, en la primera hora de estudio. Los resultados se aprecian en la **Tabla 4.6**.



**Tabla 4.6:** Promedios y varianzas, en la primer hora, obtenidos para el análisis de ANOVA de las siete fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de la especie *B. articulata*

<i>Grupos</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
F <sub>1</sub>	15	8,93	1,21
F <sub>2</sub>	9	8,67	2,50
F <sub>3</sub>	9	7,67	3,50
F <sub>4</sub>	9	6,00	8,00
F <sub>5</sub>	9	7,89	8,61
F <sub>6</sub>	15	8,40	2,69
F <sub>7</sub>	9	8,67	3,75

Mediante el test de ANOVA se pudo apreciar que en la hora 1 del tratamiento existía una diferencia entre las medias de las 7 fracciones analizadas, debido a que el valor del F calculado ( $F_0$ ) 2,53 excedía al  $F_{\text{crít}}$  2,24.

Para evaluar entre que valores de medias existía variabilidad, se calculó la diferencia significativa menor (DMS); mediante el test de Tukey con  $\alpha= 0,05$ . Se pudo observar mediante este cálculo que la media que variaba con respecto al resto, es la que corresponde a la fracción 4; mientras las medias restantes no presentaron diferencias significativas entre ellas, indicando que son estadísticamente iguales. Sin embargo, tal como se aprecia en la **Tabla 4.7**, no existen diferencias significativas entre F<sub>4</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>5</sub> y F<sub>6</sub>.

**Tabla 4.7:** Resultados test de Tukey para la hora 1

<b>Fracciones</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>		
1	8,93	15	B	
7	8,67	9	B	
2	8,67	9	B	
6	8,40	15	B	A
5	7,89	9	B	A
3	7,67	9	B	A
4	6,00	9		A

b) Análisis estadístico de ANOVA para la hora 2

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las medias muestrales obtenidas de los ensayos biológicos a las siete fracciones, en la segunda hora de estudio. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las medias, y que estas son iguales, debido a que el valor de  $F_0 (1,35)$  es inferior al  $F_{crít} (2,24)$ .

c) Análisis estadístico de ANOVA para la hora 3

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las medias muestrales obtenidas de los ensayos biológicos a las siete fracciones, en la tercera hora de estudio. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las medias, y que estas son iguales, debido a que el valor de  $F_0 (1,63)$  es inferior al  $F_{crít} (2,24)$ .

d) Análisis estadístico de ANOVA para la hora 4

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las medias muestrales obtenidas de los ensayos biológicos a las siete fracciones, en la tercera hora de estudio. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las medias, y que estas son iguales, debido a que el valor de  $F_0 (1,20)$  es inferior al  $F_{crít} (2,24)$ .

e) Análisis estadístico de ANOVA para la hora 5

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las medias muestrales obtenidas de los ensayos biológicos a las siete fracciones, en la tercera hora de estudio. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las medias, y que estas son iguales, debido a que el valor de  $F_0 (1,20)$  es inferior al  $F_{crít} (2,24)$ .

f) Análisis estadístico de ANOVA total

Se realizó la aplicación de ANOVA para comparar todas las medias muestrales, obtenidas mediante la realización de los bioensayos con las siete fracciones obtenidas por VLC. Logrando una evolución integral del efecto repelente manifestado en los distintos ensayos biológicos realizados. Los resultados se aprecian en la **Tabla 4.8**.

**Tabla 4.8:** Promedios y varianzas totales, obtenidas para el análisis de ANOVA de las siete fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de la especie *B. articulata*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
F1	75	9,39	0,86
F2	45	9,00	2,36
F3	45	8,24	4,05
F4	45	7,47	5,57
F5	45	7,82	10,60
F6	75	8,11	5,31
F7	45	8,18	5,65

Mediante la aplicación de la prueba de ANOVA a las 7 fracciones, se determinó que existía una diferencia significativa entre sus distintas medias, arrojando un valor de  $F_0$  de 5,53 que excedía el  $F_{crit}$  de 2,12.

Se calculó la diferencia significativa menor (DMS); mediante el test de Tukey con  $\alpha=0,05$ , el cual proporciona las diferencias entre los posibles pares de medias. A partir de los resultados obtenidos se observa que existen diferencias significativas entre los siguientes pares de medias: F<sub>1</sub>-F<sub>6</sub>, F<sub>1</sub>-F<sub>5</sub>, F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub> y F<sub>2</sub>-F<sub>4</sub>. Es decir que para el nivel de significancia escogido F<sub>4</sub> difiere estadísticamente de F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, pero no del resto de las medias. En el caso de F<sub>5</sub> y F<sub>6</sub> difieren de F<sub>1</sub>, pero no del resto. Todo lo expuesto anteriormente se observa en la **Tabla 4.9**.

**Tabla 4.9:** Resultados test de Tukey

<b>Fracciones</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>			
1	9,39	75	A		
2	9,00	45	A	B	
3	8,24	45	A	B	C
7	8,18	45	A	B	C
6	8,11	75		B	C
5	7,82	45		B	C
4	7,47	45			C

#### **4.1.6 Purificación de las fracciones 1, 2 y 3**

Se purificaron las fracciones bioactivas de menor polaridad (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>) mediante cromatografía en columna (CC), empleando sistemas de disolventes de polaridad creciente (*n* – Hexano, *n* – Hexano-EtOAc y EtOAc).

De F<sub>1</sub> se recolectaron 30 sub-fracciones y el análisis por TLC permitió reunir aquellas con idéntico R<sub>f</sub> hasta obtener un total de 4 sub-fracciones (F<sub>1</sub>O, F<sub>1</sub>P, F<sub>1</sub>Q, F<sub>1</sub>R). La sub-fracción F<sub>1</sub>R fue sometida a CC sobre silica gel (70 – 230 mesh, 5,60 g) eluyendo con un gradiente de *n* – Hexano – EtOAc (100:0 a 0:100), obteniéndose un total de 22 eluatos, que se agruparon obteniendo 8 sub-fracciones finales, pero ninguna de interés a los fines de obtener compuestos purificados.

Luego de la CC de F<sub>2</sub> se recogieron 19 sub-fracciones. Los eluatos se monitorearon por TLC y se reunieron 5 sub-fracciones finales de acuerdo con sus perfiles cromatográficos (F<sub>2</sub>J, F<sub>2</sub>K, F<sub>2</sub>L, F<sub>2</sub>M, F<sub>2</sub>N).

La fracción 3, también sometida a CC, permitió la recolección de 33 sub-fracciones que fueron reunidas en 8 grupos (F<sub>3</sub>A, F<sub>3</sub>B, F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D, F<sub>3</sub>E, F<sub>3</sub>F, F<sub>3</sub>G, F<sub>3</sub>H) de acuerdo a su perfil cromatográfico. De esta purificación se destaca el interés de la fracción F<sub>3</sub>E, la cual mostró una única mancha en la cromatografía sobre placa fina. La sub-fracción F<sub>3</sub>C se comatografió en columna sobre silica gel (70 – 230 mesh, 4,80 g) obteniéndose 6 sub-fracciones. Estas sub-fracciones fueron analizadas por TLC y combinadas, permitiendo obtener 2 sub-fracciones: F<sub>3</sub>C-I y F<sub>3</sub>C-II. Esta última resultó de interés.

Las sub-fracciones obtenidas se sometieron a pruebas de tamizaje fitoquímico mediante TLC, para la identificación de las familias de compuestos pertenecientes a flavonoides y terpenoides. Los alcaloides no fueron determinados ya que anteriormente se estableció la ausencia de los mismos.

##### **4.1.6.1 Identificación de metabolitos secundarios en las sub-fracciones mediante TLC**

###### **Estudio de las sub-fracciones provenientes de F<sub>1</sub>**

Las 4 sub-fracciones (F<sub>1</sub>O, F<sub>1</sub>P, F<sub>1</sub>Q, F<sub>1</sub>R) obtenidas luego de la purificación de F<sub>1</sub> se sometieron a análisis fitoquímico mediante TLC.

## ✧ Terpenoides

### ✕ Sistema A

Al emplear el revelador de Liebermann-Burchardt no se observaron manchas rojas, azules o verdes en la placa cromatográfica; por lo que no se detecta la presencia de terpenoides. Sin embargo, este resultado no resulta concluyente debido a que quizás en estas sub-fracciones no se encuentran presentes los compuestos triterpenoides detectados por este revelador o, debido a las cantidades en que estos metabolitos secundarios se encuentran presentes.

### ✕ Sistema B

Para este segundo sistema se observaron manchas azul-violáceas en todas las sub-fracciones evaluadas. La fracción que mayor número de bandas mostró fue F<sub>1</sub>R, indicando una mayor diversidad de terpenoides con respecto al resto. Sin embargo, las bandas se presentan difusas y no son claramente diferenciables (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>1</sub> en el sistema B, revelado con el reactivo vainillín sulfúrico.

## ✧ Flavonoides

Al observar la placa cromatográfica, tanto a la luz visible como a la luz UV, no se aprecian manchas que indiquen la presencia de flavonoides. Tampoco se detecta la presencia de flavonoides al exponer la placa a los vapores de amoníaco y a la solución de tricloruro férrico.

Estos resultados son los esperados ya que en el análisis fitoquímico realizado precedentemente a F<sub>1</sub> se había determinado la presencia de terpenoides y la ausencia de flavonoides.

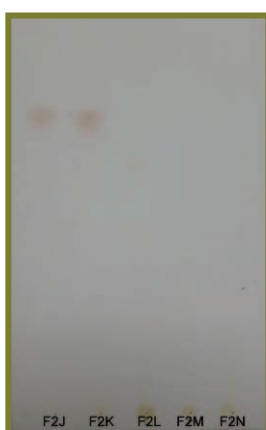
### Estudio de las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub>

Las 5 sub-fracciones (F<sub>2</sub>J, F<sub>2</sub>K, F<sub>2</sub>L, F<sub>2</sub>M, F<sub>2</sub>N) obtenidas a partir de F<sub>2</sub> se sometieron a análisis por TLC para determinar los metabolitos secundarios presentes en ellas.

#### ✧ Terpenoides

##### ✧ Sistema A

Al emplear el revelador de Liebermann-Burchardt, en la placa cromatográfica se visualizaron dos bandas de color rosado en las primeras dos calles, que corresponden a las sub-fracciones F<sub>2</sub>J y F<sub>2</sub>K, estas bandas indicarían la presencia de terpenoides (**Figura 4.9**).

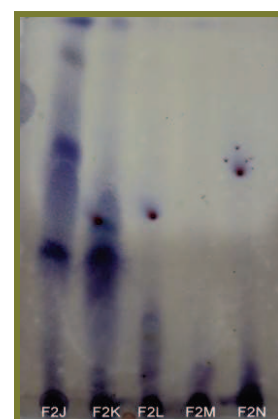


**Figura 4.9:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub> en el sistema A, revelado con el reactivo de Liebermann-Burchardt.

##### ✧ Sistema B

Para este segundo sistema se observaron manchas azul-violáceas, estableciendo la presencia de terpenoides en todas las sub-fracciones evaluadas. Las fracciones que mayor número de bandas mostraron fueron F<sub>2</sub>J y F<sub>2</sub>K, las cuales son las mismas que dieron resultados positivos con el revelador de Liebermann-Burchardt (**Figura 4.10**).

**Figura 4.10:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub> en el sistema B, revelado con el reactivo vainillín sulfúrico.



### ✧ Flavonoides

Al observar la placa cromatográfica a la luz visible no se detecta la presencia de manchas que puedan atribuirse a flavonoides, si bien la mayoría de estos poseen color, cuando están depositados sobre capa delgada en cantidades de microgramos son casi incoloros. En lo que respecta a la luz UV de onda larga (366 nm) se observó una mancha oscura en la sub-fracción F<sub>2</sub>L, pudiendo ser atribuida a la presencia de flavonas y/o antocianinas (Domínguez, 1973). También se observó fluorescencia rosada en F<sub>2</sub>K, y fluorescencia blanca en F<sub>2</sub>L, sin embargo no se encontró bibliografía que indique a que tipo de compuestos pudieran deberse estas coloraciones fluorescentes.

No se obtuvieron resultados positivos empleando como revelador los vapores de amoníaco.

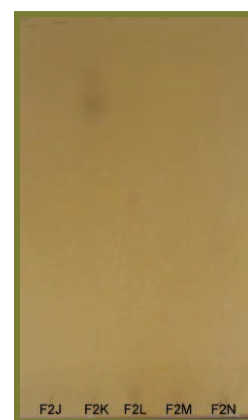
Al emplear la solución de FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol como revelador un resultado positivo se tuvo en la sub-fracción F<sub>2</sub>K, presentando una coloración marrón.

Todo lo expuesto anteriormente puede observarse en las **Figuras 4.11** y **4.12**.



**Figura 4.11:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub>, revelado con luz UV de onda larga (366 nm).

**Figura 4.12:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub>, revelado con FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol.



Los resultados obtenidos indican que en las sub-fracciones provenientes de F<sub>2</sub> se encuentran presentes compuestos pertenecientes a las familias flavonoides y terpenoides. Los terpenoides están presentes en las 5 sub-fracciones, mientras que los flavonoides sólo se detectaron en dos de ellas.

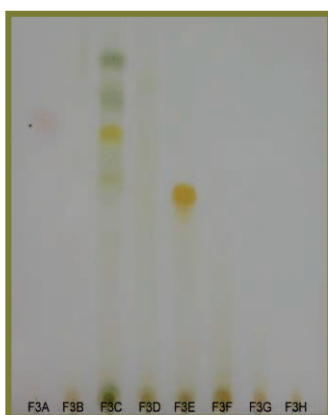
### **Estudio de las sub-fracciones provenientes de F<sub>3</sub>**

Las 8 sub-fracciones (F<sub>3</sub>A, F<sub>3</sub>B, F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D, F<sub>3</sub>E, F<sub>3</sub>F, F<sub>3</sub>G, F<sub>3</sub>H) obtenidas a partir de F<sub>3</sub> se sometieron a análisis por TLC para determinar las metabolitos secundarios presentes en ellas.

#### **✧ Terpenoides**

##### **✧ Sistema A**

En la placa cromatográfica puede observarse una mancha de color rosado, indicando la presencia de terpenoides en F<sub>3</sub>A. También se observan manchas de color verde en la sub-fracción F<sub>3</sub>C; si bien la presencia de manchas de dicho color es indicativa de terpenoides, en este caso podría deberse a los pigmentos que posee esta sub-fracción (ver **Figura 4.13**).



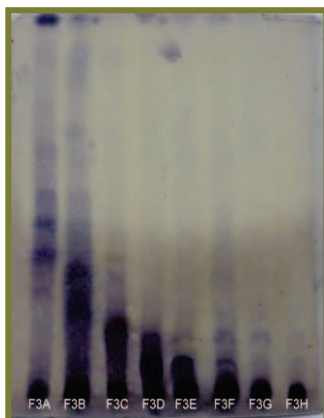
**Figura 4.13:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>3</sub> en el sistema A, revelado con el reactivo de Liebermann-Burchardt.

##### **✧ Sistema B**

Para este segundo sistema se observan manchas azules y azul-violáceas, exponiendo la presencia de terpenoides. Este resultado fue positivo para todas las fracciones evaluadas, observándose una mayor respuesta del revelador en las sub-fracciones de menor polaridad (F<sub>3</sub>A, F<sub>3</sub>B y F<sub>3</sub>C) (ver **Figura 4.14**).



Estos resultados no concuerdan completamente con los obtenidos en el sistema A, atribuyéndose estas diferencias a la sensibilidad del revelador empleado, tal como se explicó en la sección 4.1.4.2.



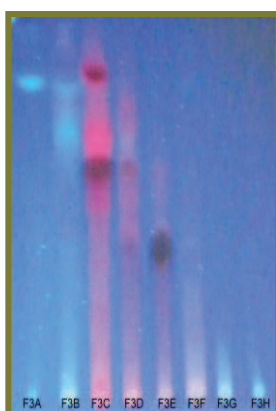
**Figura 4.14:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>3</sub> en el sistema B, revelado con el reactivo vainillín sulfúrico.

#### ✶ Flavonoides

Al observar la placa cromatográfica a la luz visible no se observaron manchas que puedan atribuirse a la presencia de flavonoides. Posteriormente, al emplear la luz UV de onda larga (366 nm) se observaron manchas oscuras en las sub-fracciones F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D y F<sub>3</sub>E, pudiendo atribuir las a la presencia de flavonas y/o antocianinas. También se observaron bandas fluorescentes, rosadas (F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D y F<sub>3</sub>E) y blancas (F<sub>3</sub>A y F<sub>3</sub>B), no pudiendo ser atribuidas a compuestos flavonoides.

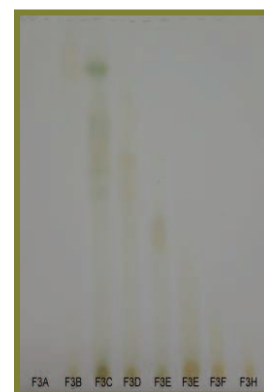
Al emplear los vapores de amoníaco como revelador, se observaron bandas de coloración anaranjada en las sub-fracciones F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D y F<sub>3</sub>E. La solución de FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol como revelador, dio un resultado positivo en las sub-fracciones F<sub>3</sub>C, F<sub>3</sub>D y F<sub>3</sub>E, observándose coloraciones verdes, violetas y marrones.

Todo lo expuesto anteriormente puede observarse en las **Figuras 4.15, 4.16 y 4.17.**



**Figura 4.15:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>3</sub>, revelado con luz UV de onda larga (366 nm).

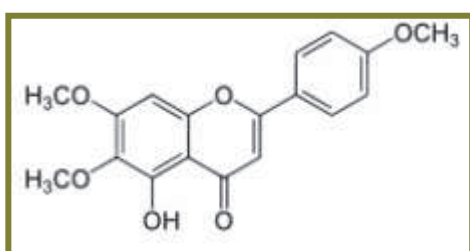
**Figura 4.16:** Cromatograma de las fracciones provenientes de F<sub>3</sub>, revelado con vapores de amoníaco.



**Figura 4.17:** Cromatograma de las sub-fracciones provenientes de F<sub>3</sub>, revelado con FeCl<sub>3</sub> al 1% en etanol.

#### 4.1.6.2 Estudio de la sub-fracción F<sub>3</sub>E

El componente mayoritario de la sub-fracción F<sub>3</sub>E resultó ser Salvigenina (**Figura 4.18**) (5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona) por comparación con muestra auténtica.



**Figura 4.18:** Estructura de Salvigenina

El espectro UV realizado en MeOH presentó dos máximos de absorción, a 329 y 277 nm, correspondientes a las Bandas I y II de una flavona. La ausencia de desplazamientos batocrómicos en presencia de MeOH y AcONa respecto del espectro en MeONa descartó la existencia de HO- libres en C<sub>7</sub> y C<sub>4'</sub> de los anillos A y B respectivamente. El espectro en AlCl<sub>3</sub> mostró corrimientos a mayores longitudes de onda de ambos máximos que permanecieron invariables por el agregado de HCl poniendo de manifiesto la formación de un complejo estable en medio ácido debido a la existencia de un HO- libre en C<sub>5</sub>. La

diferencia de 21 nm observada en la Banda I en el espectro con  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  respecto al de MeOH orientó a la existencia de una función oxigenada en  $\text{C}_6$ .

Las señales observadas en el espectro impuro  $^1\text{H}$ -RMN (**Espectro 4.1**) son las siguientes:

H-2' y H-6' a  $\delta = 7.85$  (d,  $J = 10$  Hz).

H-3' y H-5' a  $\delta = 7.02$  (d,  $J = 10$  Hz).

H-3 a  $\delta = 6.60$  s.

H-8 a  $\delta = 6.55$  s.

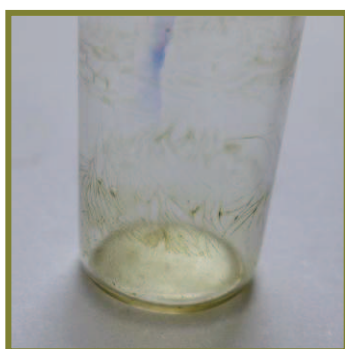
$\text{OCH}_3$  en C-6 a  $\delta = 3.91$  s.

$\text{OCH}_3$  en C-7 a  $\delta = 3.95$  s.

$\text{OCH}_3$  en C-4' a  $\delta = 3.99$  s.

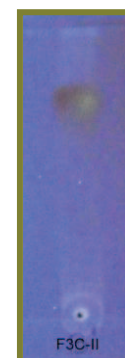
#### 4.1.6.3 Estudio de la sub-fracción $\text{F}_3\text{C-II}$

Esta sub-fracción se presentó en forma de agujas de color verde-amarronado distribuidas sobre las paredes del vial (**Figura 4.19**). Al cromatografiarla sobre placa fina se observó que se trataba de un compuesto en estado puro, dado que se visualiza una única banda (**Figura 4.20**).

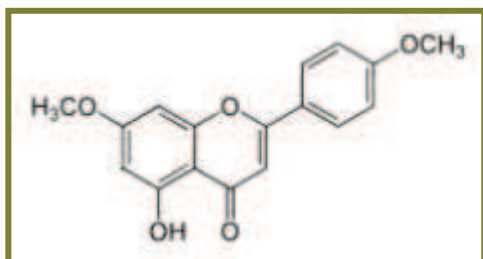


**Figura 4.19:** Vial con agujas del compuesto purificado.

**Figura 4.20:** Placa cromatográfica del compuesto purificado ( $\text{F}_3\text{C-II}$ ), revelada con luz UV de onda larga (366 nm).



El componente aislado de la F<sub>3</sub>C-II resultó ser Apigenina-7,4'-dimetiléter (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona) (**Figura 4.21**) por comparación con muestra auténtica.



**Figura 4.21:** Estructura de Apigenina-7,4'-dimetiléter

El espectro UV en MeOH mostró dos máximos de absorción, uno a 327 nm (Banda I) y el otro a 268 nm (Banda II), consistentes para una flavona. La ausencia de desplazamientos batocrómicos sustanciales en los espectros de MeONa y AcONa respecto al de MeOH indicaron la ausencia de grupos HO- libres, particularmente en C<sub>7</sub> y C<sub>4'</sub>. En cambio, el agregado de AlCl<sub>3</sub> provocó un desplazamiento a mayores longitudes de onda en ambos máximos, que permaneció invariable por el agregado de HCl y que se atribuyó a la presencia de un grupo hidroxilo libre en C<sub>5</sub>.

Las señales observadas en el espectro impuro <sup>1</sup>H-RMN (**Espectro 4.2**) son las siguientes:

H-2' y H-6' a  $\delta = 7,85$  (d, J = 10 Hz).

H-3' y H-5' a  $\delta = 7.05$  (d, J = 10 Hz).

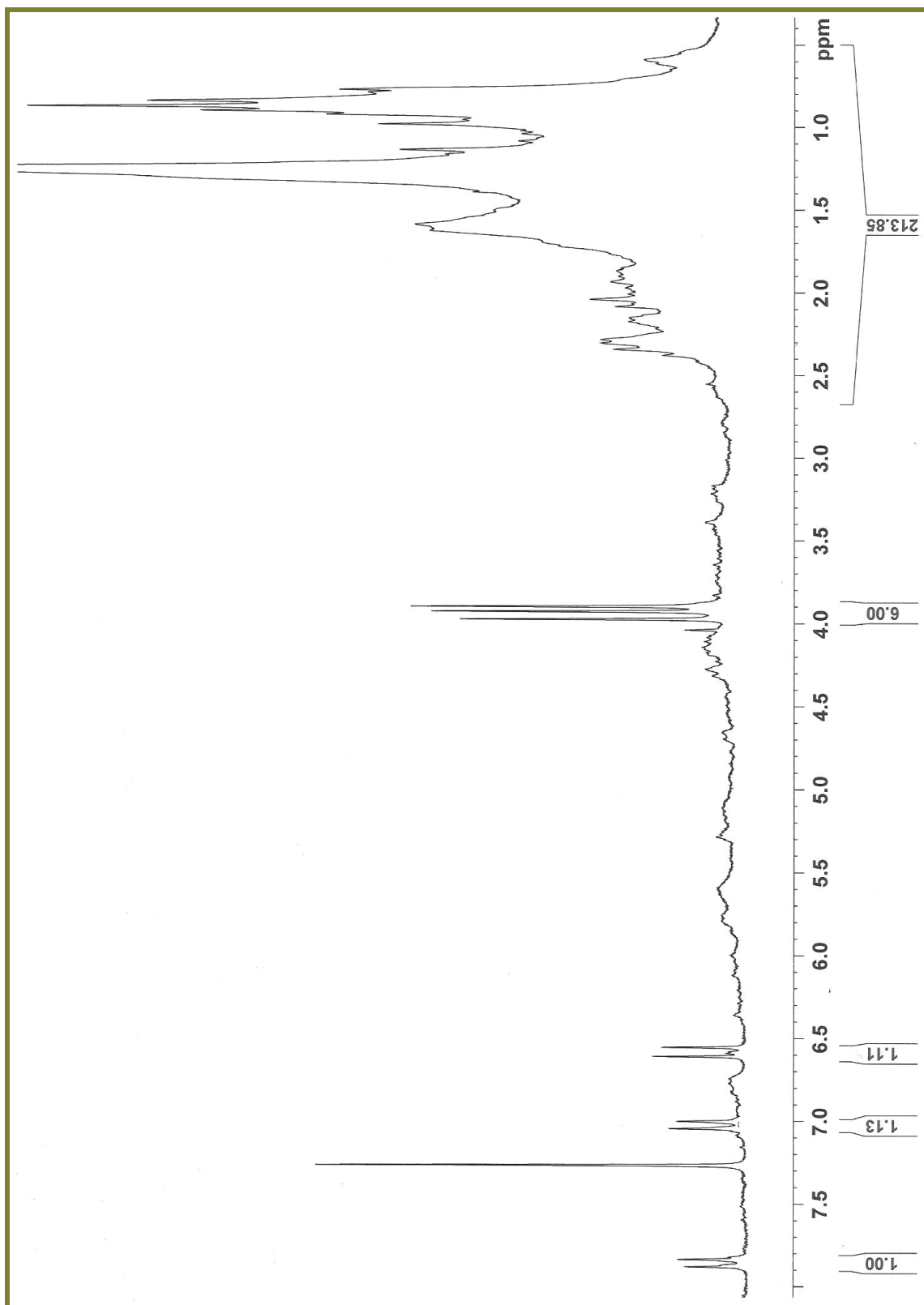
H-3 a  $\delta = 6.60$  s.

H-8 a  $\delta = 6.5$  (d, J = 3 Hz).

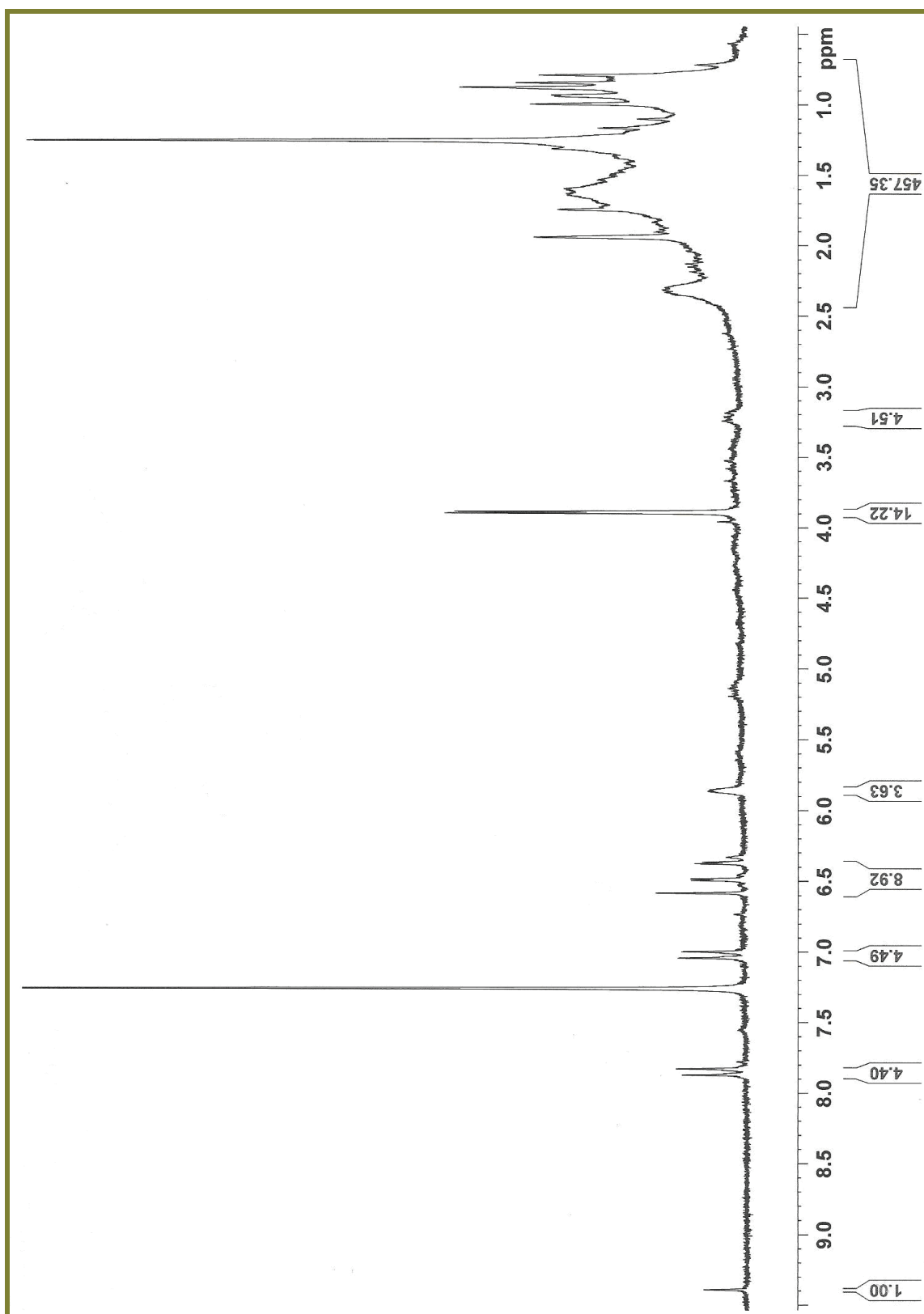
H-6 a  $\delta = 6.35$  (d, J = 3 Hz).

OCH<sub>3</sub> en C-4' a  $\delta = 3.90$  s.

OCH<sub>3</sub> en C-7 a  $\delta = 3.91$  s.



Espectro 4.1: <sup>1</sup>H-RMN de la fracción F<sub>3</sub>E



**Espectro 4.2:** <sup>1</sup>H-RMN de la fracción F<sub>3</sub>C-II

## 4.2 Discusión

Hoy en día, muchos estudios tienden a retornar las investigaciones hacia los extractos de plantas para un control natural de plagas (George et al., 2008; Isman, 2006) de importancia agrícola. Los extractos botánicos obtenidos de diferentes especies vegetales han mostrado un amplio espectro de actividades biológicas (Aivazi and Vijayan, 2009; Banchio et al., 2003, 2005; Ciccina et al., 2000; Ferrero et al., 2006; Jbilou et al., 2006). Cada extracto individual comprende una mezcla única de diferentes fitoquímicos (metabolitos secundarios). La naturaleza química de estos constituyentes varía considerablemente entre las especies. El mismo extracto vegetal puede variar dependiendo de la época de cosecha, de la planta escogida, del proceso de secado, entre otros factores. Existen algunos “extractos caracterizados” disponibles comercialmente para uso medicinal que tienen especificados uno o dos de sus componentes químicos. Esta especificación, sin embargo, no da un perfil completo del producto botánico, porque múltiples constituyentes son generalmente los responsables del efecto terapéutico. Los diferentes componentes de un extracto pueden actuar sinérgicamente y no deben ser separados en partes activas. Algunos autores sugieren que puede ser necesario definir todos los constituyentes fitoquímicos de los extractos botánicos con el fin de garantizar la fiabilidad y repetitividad de las investigaciones sobre sus bioactividades (He, 2000); sin embargo, la mayoría de las investigaciones concluyen que debido a que más de 150 compuestos químicos conforman un extracto botánico individual (Cutler and Cutler, 1999), el extracto completo debe ser considerado como un “compuesto” activo. No obstante, todavía existen debates acerca de las técnicas cromatográficas y espectroscópicas que deben ser empleadas en la caracterización fitoquímica de los componentes de los extractos (He, 2000; Ong, 2004).

En el presente trabajo, la actividad repelente de las siete fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico de *B. articulata* fueron evaluadas sobre *T. castaneum*. Todas produjeron efecto repelente en la especie-plaga estudiada, obteniéndose IR para las distintas horas que oscilaron entre 20,00% y 93,33%.

En términos generales F<sub>1</sub> presentó la mayor actividad repelente con un IR promedio de 87,73% (clase V), seguida por F<sub>2</sub> (80,00%), F<sub>3</sub> (64,89%) y F<sub>7</sub> (63,56%). Estas tres últimas en clase IV. Estas fracciones de baja polaridad mostraron un marcado efecto repelente sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Para el caso de las fracciones que mostraron un menor potencial repelente (F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> y F<sub>6</sub>), un factor a evaluar previo a su descarte definitivo, está relacionado con la

concentración empleada en los bioensayos. En este sentido, es sabido que el efecto de un producto químico depende de muchas variables, una de ellas es la concentración, por ello, una misma sustancia puede comportarse como repelente o attractante dependiendo de las condiciones dadas en el bioensayo (Giordano et al., 2000).

Otra posibilidad podría ser la pérdida de componentes debido a la volatilización, lo que podría explicar la disminución de la repelencia observada en nuestro estudio, razón por la cual resultaría necesario realizar un estudio posterior para evaluar esta pérdida de compuestos.

También es importante considerar que, los compuestos más activos sobre un insecto pueden no serlo para otros, incluso para la misma especie la actividad puede variar en los diferentes estadios de desarrollo (Hamraoui & Regnault-Roger, 1997). Este fenómeno se observa con frecuencia en plagas de grano almacenado (Stadler et al., 1990; Rejendran & Sriranjini, 2008; Nyamador et al., 2010), resultando importante evaluarlos sobre otras especies biológicas.

Desde el punto de vista del análisis del efecto repelente en función del tiempo, se observó que en cuatro de las siete fracciones el máximo de repelencia recién se evidencia en la cuarta hora del bioensayo. El conocimiento de este comportamiento nos permite apreciar que los efectos repelentes no son evidentes en forma inmediata, si no que requieren de un tiempo para ser evidenciados. El tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta alcanzar el efecto máximo, podría deberse a que durante las primeras horas los insectos se aclimatan al ambiente al cual son sometidos. Esta respuesta del insecto a algunas sustancias es diferente, debido a que requiere de un proceso de activación de sus receptores (Stefanazzi, 2010).

La toxicidad de los extractos en plagas de almacenaje es influenciada por la composición química de los mismos. Además aquellos compuestos que se encuentran en bajas proporciones pueden actuar como sinergistas aumentando el efecto de los componentes mayoritarios (Berenbaum, 1985; Tripathi et al., 2003), tal como se mencionó anteriormente. El importante efecto repelente observado en F<sub>1</sub> podría deberse a un efecto individual y/o sinérgico de alguno de sus constituyentes, que se encuadran dentro de los terpenoides. La presencia de estos compuestos está directamente vinculada al solvente empleado en la extracción y en el fraccionamiento, ya que en función de sus propiedades físicas y químicas, los solventes son capaces de disolver diferentes tipos de sustancias presentes en los vegetales. Así por ejemplo, los aceites esenciales (constituidos



principalmente por monoterpenos) por tener baja polaridad se disuelven en solventes como hexano, encontrándose en las fracciones de menor polaridad.

En este trabajo se pudo determinar que los compuestos químicos dominantes son los terpenoides, los cuales se presentaron en todas las fracciones, seguidos por los flavonoides y taninos presentes en cinco de siete fracciones estudiadas. En el caso de los alcaloides que no fueron detectados en ninguna de las fracciones, puede considerarse que el resultado es el esperado en concordancia con los resultados obtenidos por Mangiaterra en 2005, quien expresa la presencia de compuestos terpenoides y flavonoides en las partes aéreas de *Baccharis articulata* pero no hace referencia a la presencia de alcaloides.

En función de los resultados obtenidos puede expresarse el hecho de que los mayores IR (%) son debidos a los terpenoides, ya que estos fueron los únicos que se detectaron en F<sub>1</sub>, la cual como se expresó anteriormente es la fracción con mayor actividad repelente. Si bien F<sub>2</sub> también presentó como únicos constituyentes a los terpenoides, el IR que mostró fue inferior; sin embargo en esta fracción se observó una mayor diversidad de estos metabolitos secundarios, pudiendo alguno de estos actuar como antagonista de aquellos que producen el efecto repelente o bien el compuesto causante de la repelencia en F<sub>1</sub> no se halla en F<sub>2</sub>.

Si bien no se tiene literatura publicada sobre los efectos repelentes de *Baccharis articulata* sobre *Tribolium castaneum*, si existe literatura acerca de la acción repelente de los compuestos terpenoides. Los clerodanos diterpenoides y triterpenoides son productos naturales derivados del ácido mevalónico ampliamente distribuidos en la naturaleza (plantas, hongos, insectos y otros organismos), que presentan variabilidad estructural y amplio espectro de actividad biológica. Ciertos clerodanos diterpenoides aislados del género *Baccharis* muestran actividad antialimentaria y repelente sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Sosa et al., 1994). Los metabolitos aislados de *B. salicifolia*, y algunos derivados preparados a partir de germacreno y pulegona, fueron evaluados sobre *T. castaneum*. Los compuestos que mostraron mayor repelencia son aquellos que poseen un hidroxilo: terpineol, y germacrol, estos resultados sugieren que el grupo hidroxilo afecta positivamente la repelencia sobre *T. castaneum* (García et al., 2005).

Las propiedades repelentes de varios aceites esenciales están asociadas a la presencia de monoterpenoides y sesquiterpenos. Algunos monoterpenoides como  $\alpha$ -pineno, cineol, eugenol, linoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal y timol son constituyentes de aceites esenciales que presentan repelencia sobre mosquitos (Nerio et al., 2010). Entre los

sesquiterpenos se puede mencionar  $\beta$ -cariofileno con una alta actividad repelente sobre *Aedes aegypti*. Chen et al. (1983) aislaron seis componentes terpenoides de *Cordia alliodora* (Boraginaceae), con repelencia para *A. cephalotes*.

Otro compuesto extraído de las plantas que en la actualidad se puede utilizar en agricultura ecológica para combatir plagas es la azaridactina, que es un tetranorterpenoide característico de la familia Meliaceae pero principalmente extraído del árbol Neem (*Azadirachta indica*). Este compuesto se encuentra en la corteza, hojas y frutos de este árbol pero la mayor concentración se ubica en las semillas. En el extracto se han identificado varios compuestos entre los que se destacan salanina, meliantrol y azaridactina, que es el que se encuentra en mayor concentración (Kumar y Parmar, 1996; Govindachari et al., 2000). En el caso de *P. aquilinum* se ha informado que las raíces y hojas presentan esteroides y triterpenoides que causan repelencia en *Locusta migratoria* y *Trichoplusia ni* (Ramírez-Moreno et al., 2001).

La purificación de las fracciones bioactivas y de menor polaridad permitió la determinación de dos compuestos puros, ambos flavonas (salvigenina y apigenina-7,4'-dimetiléter). Las flavonas son compuestos derivados de la benzo- $\gamma$ -pirona que pertenecen al grupo de los flavonoides (Harborne, 1980). Ciertas especies del género *Baccharis* poseen flavonas con propiedades anti-inflamatoria y antifúngica (Gianello et al., 1999; Rahalison et al., 1995).

Abad Martínez et al. (2005) informaron del aislamiento de una lactona diterpénica y una flavona, de *B. genistelloides* los cuales mostraron actividad antimicrobiana. Huangchin (*Scutellaria baicalensis*) es una hierba medicinal que ha sido utilizada sistemáticamente y de manera tópica en China para el tratamiento periodontal de abscesos y heridas orales infectadas. La flavona, baicaleína se informó que es la mayor responsable de los efectos antimicrobianos de esta planta (Tsao et al., 1982).

González et al. (1990) han estudiado el efecto in Vitro, de productos naturales obtenidos de especies de la flora autóctona del norte de Chile, sobre tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Un efecto tripanocida significativo se observó al emplear tres compuestos aislados de *B. boliviensis*: dos terpenos y una flavona: 4,5-dihidroxi-3,3',6,7,8 - pentametoxiflavona. En 1995, Rahalison et al. aislaron de *B. pedunculata* cuatro compuestos, dentro de los que se incluyen una flavona y una flavona 3-metil éter, que fueron identificados como responsables de la actividad antifúngica contra algunos patógenos humanos y hongos fitopatógenos. Nakasugi y Komai (1998) examinaron los

componentes antimutagénicos de *B. genistelloides*, una planta medicinal popular brasileña utilizada para tratar las enfermedades del hígado y el reumatismo; cuatro sustancias activas se identificaron en el extracto metanólico: genkwanina, cirsimaritina, hispidulina y apigenina. Se piensa que estas flavonas son las principales sustancias activas en esta planta.

Por otra parte, Mostahar et al. (2006) investigaron la actividad biocida de varias flavonas sintetizadas y de sus correspondientes chalconas sobre cepas bacterianas y fúngicas. Dos compuestos: 7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona y 4'-metilflavona; mostraron buena actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica sobre las cepas seleccionadas.

En el review realizado Cushnie y Lam (2005) se hace referencia a los flavonoides (incluidas flavonas) y sus actividades, considerando que diferentes preparaciones contienen estos compuestos como los principales constituyentes fisiológicamente activos, los cuales han sido empleados en el tratamiento de enfermedades humanas. Crecientemente, esta clase de productos naturales es el objeto de estudios, y muchos grupos de flavonoides han sido aislados e identificadas sus estructuras, presentando actividades antifúngica, antiviral y antibacteriana. Además, varias investigaciones han demostrado sinergismo entre flavonoides activos y entre flavonoides y quimioteratuticos existentes. También, numerosos grupos de estudio han elucidado los mecanismos de acción antibacterianos de flavonoides seleccionados, como quercetina, robinetina, miricetina, apigenina, entre otros.

Nuestros resultados muestran que en general, las fracciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> en las concentraciones empleadas son las más adecuadas para usarse como repelentes junto a otras herramientas en el MIP para el control de *Tribolium castaneum*. Sería interesante, por su aplicación práctica, que esta especie pudiera ser utilizada como repelente de insectos. Nuestros resultados no permiten todavía esta afirmación, habría que comprobar ésta y otros tipos de actividad con otras plagas agrícolas. En el caso particular de la carquejilla tendría la ventaja añadida de no ser tóxica para el hombre.

En lo que respecta a los compuestos puros aislados deberían realizarse estudios para evaluar su actividad repelente, ya que no existe literatura al respecto. Sin embargo, como se expresó precedentemente poseen actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral, entre otras; resultando interesante poder evaluar su actividad repelente.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

La especie *Baccharis articulata* por su amplia distribución geográfica, asociada a su importancia en la medicina popular, tanto en Argentina como en otros países de América del Sur, presenta escasos estudios de actividad biológica. Su gran potencial en metabolitos secundarios y actividades descritas en la medicina popular, dejan un campo abierto para el estudio de nuevas moléculas activas.

#### **Del tamizaje fitoquímico**

- En el tamizaje fitoquímico de las fracciones provenientes del extracto etanólico-clorofórmico, los resultados obtenidos demuestran marcada presencia de flavonoides, terpenoides y fenoles. No se observó presencia de alcaloides, posiblemente porque se encuentran en mínima cantidad o en ausencia total.

- F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub> presentaron la mayor variedad de compuestos, ya que se determinaron en estas fracciones flavonoides, terpenoides y fenoles.

- F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> sólo presentaron compuestos del tipo terpenoide.

#### **De la actividad repelente**

- Todas las fracciones evaluadas poseen principios con efecto repelente sobre *T. castaneum*.

- Todas las fracciones analizadas poseen mayor actividad repelente que el extracto etanólico-clorofórmico.

- La mayor actividad repelente se encontró en el extracto menos polar (F<sub>1</sub>), su actividad se debe quizás a la presencia de terpenoides.

### **De la purificación**

- La purificación de F<sub>3</sub> permitió la identificación de dos flavonas; salvigenina y apigenina-7,4'-dimetiléter. La presencia de agliconas flavonoides es una característica marcada del género, donde se observa preponderancia de flavonas.

Cabe mencionar que es necesario formular nuevos estudios sobre la bioactividad de los metabolitos secundarios encontrados con el fin de obtener bioinsecticidas que se puedan emplear en el control integrado de *T. castaneum*, como así también de otras plagas de productos almacenados.

---

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

Abad Martínez, M. J.; Latourrette Bessa, A. & Bermejo Benito, P. (2005) Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry*, 30: 703-759.

Abudalai, M.; Shepard, B.M. & Salifu, A.B. (2003) Field evaluation of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) based formulation Neemix against *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) in cowpea. *International Journal of Pest Management*, 49(2): 109-113.

Aivazi, A. A. & Vijayan, V.A. (2009) Larvicidal activity of oak *Quercus infectoria* Oliv. (Fagaceae) gall extracts against *Anopheles stephensi* Liston. *Parasitology Research*, 104: 1289–1293.

Alonso-Amelot, M., Avila, J., Otero, D., Mora, F. & Wolf, B. (1994) A new bioassay for testing plant extracts and pure compounds using red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Chemical Ecology*, 20(5): 1161-1177.

Aragadvay Yungán, S. P. (2009) Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de Chilca (*Baccharis latifolia*) y Hierbamora (*Solanum nigrum*) (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador.

Austin, P. & Suchar, J. (1989) Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 1311-1347.

Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2000) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitat de Barcelona, McGraw Hill Interamericana. España.

- 
- Banchio, E.; Valladares, G.; Defagó, M.; Palacios, S. & Carpinella, C. (2003) Effects of *Melia azedarach* (Meliaceae) fruit extracts on the leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae): assessment in laboratory and field experiments. *Annals of Applied Biology*, 143:187–193.
- Banchio, E.; Zygadlo, J. & Valladares, G. R. (2005) Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb in response to insects with different feeding habits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6903–6906.
- Baptista, J. G.; Monsalve, M.; Alonso, M. E.; Ávila, J. L. & Usubillaga, A. (2007) Ensayos de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del ent-kaureno. *Ciencia*, 15(2): 248-258.
- Barillas Lopez, T. L. (1998) Tamizaje Fitoquímico de la raíz de *Dioscorea convolvulacea* (madre de maíz) (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Berenbaum, M. (1985) Alelochemical interactions in plants. *Recent Advances in Phytochemistry*, 19: 139-169.
- Boeke, S.J.; Barnaud, C.; van Loon, J.A.; Kossou, D.K.; van Huis, A. & Dicke, M. (2004) Efficacy of plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Pest Management*, 50(4): 251-258.
- Boelcke O. (1989) *Plantas Vasculares de la Argentina*. Ed. Hemisferio Sur. Segunda reimpresión. Buenos Aires, pp. 265-369.
- Budel, J. M.; Duarte, M. R. & Santos, C. A. M. (2004) Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14(1): 41-48.
- Caballero García, C. (2004) Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre *Leptinotarse decemlineata* (SAY) y *Spodoptera exigua* (HUBNER) (Lepidoptera:Nocturnae) (Tesis Doctoral) Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, 107 pp.
- Carvajal Rojas, L.; Hata Uribe, Y.; Sierra Martinez, N. & Rueda Nino, D. (2009) Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombiana Forestal*, 12: 161-170.
-

- 
- Casida, J. & Quistad, G. (1995) *Pyrethrum owens: Production, Chemistry, Toxicology and Uses*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 356 pp.
- Casini, J. & Santa Juliana, M. (2005) Postcosecha de trigo. Secado y Almacenaje, pp. 55-70. En: *Jornadas técnicas de Capacitación en Siembra, Cosecha, Poscosecha, Pulverización y Fertilización*. 88 pp.
- Cheeke, P. R. (1995) Plants toxins and mammalian herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 437-456.
- Chen, T.; Ales, D.; Baenziger, N. & Wiemer, D. (1983) Ant-repellent triterpenoids from *Cordia alliodora*. *Journal of Organic Chemistry*, 48(20): 3525-3531.
- Choochote, W.; Chaithong, U.; Kamusuk, K.; Jitpakdi, A.; Tippawangkosol, P.; Tuetun, B.; Champakaew, D. & Pitasawat, B. (2007) Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78: 359-364.
- Ciccia, G.; Coussio, J. & Mongelli, E. (2000) Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 185-189.
- Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S. & Tonn, C. E. (2002) Clerodane diterpenoids from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. *Phytochemistry*, 61: 899-905.
- Coats, J. R. (1994) Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*, 39: 489-515.
- Correa, A.; Santos, J.; Cordeiro, E. & Guedes, R. (2006) Fluctuating asymmetry in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Conference Papers.*, 285-291.
- Cox, P. (2002) Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. *Journal of Stored Products Research*, 38: 95 – 115.
- Cuñat, P.; Primo, E.; Sanz, I.; Garcerá, M. D.; March, M. C.; Bowers, W. S. & Martínez-Pardo, R. (1990) Biocidal activity of some Spanish Mediterranean plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38: 497-500.
-



- 
- Cushnie, T. T. P & Lamb, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoides. Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
- Cutler, H.G. & Cutler, S. J. (1999) Biologically active natural products: agrochemicals. CRC Press, London.
- da Cruz Pádua, B.; Dornela Silva, L.; Rossoni Júnior, J. V.; Humberto, J. L.; Martins Chaves, M.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. & Caldeira Cosata, D. (2010) Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129: 381-386.
- Daglish, G. (2006) Opportunities and barriers to the adoption of potential new grain protectants and fumigants. 9<sup>th</sup> *International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 3. New Chemicals and Food Residues. Keynotes*, pp. 209-216.
- Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D. & Kinghorn, D. (1993) Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry*, 34(4): 1087-1090.
- Dahanukar, A.; Hallem, E. A. & Carlson, J. (2005) Insect chemoreception. *Current Opinion in Neurobiology*, 15: 423 – 430.
- Davicino, R.; Mattar, M. A., Casali, Y. A.; Correa, S. G.; Pettenati, E. M. & Micalizzi, B. (2007) Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista peruana de biología*, 14(2): 247:251.
- Del Corral, S. & Palacios, S. M. (2009) Actividad herbicida de compuestos aislados del extracto etanólico de *Baccharis salicifolia* (Asteraceae). Libro de Resúmenes, XVII SINAQO, pp. 38.
- Dell'Orto Trivelli, H. & Arias Velásquez, C. (1985) *Insectos que dañan granos y productos almacenados*. Ed. Oficina Reg. de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile, 142 pp.
- De los Mozos Pascual, M. (1997) Plagas de productos almacenados. *Boletín S.E.A. (Sociedad Entomológica Aragonesa)*, 20: 93 – 109.
- Del Tío, R.; Martín Santana, P. & Ocete, M.E. (1996) Efectos de la aplicación de un extracto bruto del fruto de *Melia azedarach* L. a la dieta de *Tribolium confusum* Duv. (Coleoptera, Tenebrionidae). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 22: 421-426.
- Dethier, V.; Barton Browne, L. & Smith, C. (1960) The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology*, 53: 134-136.
-

---

Domínguez, X. A. (1973) *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial LIMUSA. México. pp. 81-89.

Dominguez, X. A. (1982) *Cromatografía en papel y en capa delgada*. Departamento de Química. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Monterrey, N. L. México. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 44, 59 pp.

dos Santos Veloso, M.; de Almeida Oliviera, R.; Barboza Silva, L.; Carvalho Guedes, R.; Evangelista Visôto, L.; Fernandes Moreira, L.; Pilon, A.; de Oliviera, J. & da Paixão, G. (2008) Taxa respiratória e comportamento de populações resistentes e susceptível do caruncho do milho expostas à cipermetrina. *XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Grãos Armazenados. ResumoID: 1915.2*. Uberlândia, MG.

Egly Feresin, G.; Tapia, A.; Gimenez, A.; Gutierrez Ravelo, A.; Zacchino, S.; Sortino, M. & Schmeda-Hirschmenn, G. (2003) Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 73-80.

Enríquez Flores, A. M.; Prieto Vela, E. P.; De los Rios Martinez, E. & Ruiz Reyes, S. G. (2008) Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jenjibre” de la ciudad de Chanchamayo-Región Junín. Perú. *Revista Médica Vallejana*, 5(1): 50-64.

Enriz, R. D.; Baldoni, H. A.; Zamora, M. A.; Jáuregui, E. A.; Sosa, M. E.; Tonn, C. E.; Luco, J. M & Gordaliza, M. (2000) Structure-Antifeedant Actuvuty Relationship of Clerodane Diterpenoids. Comparative Study with Withanolides and Azaridachtin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1384-1392.

F.A.O. 1974. Boletín Fitosanitario de la FAO. Método provisional para gorgojos adultos importantes en cereales almacenados, con malatión o lindano. Método N° 15. FAO, 22: 127-137.

Ferrero, A. A.; Werdin González, J. O. & Sánchez Chopa, C. (2006) Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77: 381–383.

Frías Tamayo, J.; Mesa Guevara, L.; Pérez García, B.; Sánchez Palanco, T. & Marín Castro, R. (2011) Actividad antibacteriana de las tinturas al 20% de las hojas y tallos de la *Turnera ulmifolia* l. *Infarmate*, 7(26) 345-369. [www.infarmate.org.mx](http://www.infarmate.org.mx)

- 
- García, M.; Donadel, O. J.; Ardanaz, C. E.; Tonn, C. E. & Sosa, M. E. (2005) Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science*, 61: 612-618.
- García, M.; Gonzalez-Coloma, A.; Donadel, O. J.; Ardanaz, C. E.; Tonn, C. E. & Sosa, M.E. (2007) Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 181-187
- García Solórzano, M. del C. (2003) Análisis fitoquímico y actividad insecticida de *Cercidium praecox*. (Tesis de Grado) Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México.
- George, D.R.; Guy, J. H. A. S.; Harrington, D.; De Luna, C.; Okello, E. J.; Shiel, R. S.; Port, G. & Sparagano, O. A. E. (2008) Use of plant-derived products to control arthropods of veterinary importance: a review animal biodiversity and emerging diseases. *Ann NY Acad Sci*, 1149:23–26.
- Gianello J.C. & Giordano O.S. (1982) Barticulidiol: un nuevo Furano Diteroeno aislado de *Baccharis articulata* Lam. (Persoon). *Revista Latinoamericana de Química*, 13(2): 76-78.
- Gianello J.C. & Giordano O.S. (1984) Exámen Químico en seis Especies del Género *Baccharis*. *Revista Latinoamericana de Química*, 15(2): 84-86.
- Gianello, J. C.; Cifuentes, D. A.; Giordano, O. S. & Tonn, C. E. (1999) Bioactive Flavones and Terpenes from *Baccharis calliprinos* and *B. rhetinodes* (Asteraceae). *Acta Farmacológica Bonaerense*, 18(2): 99-102.
- Gianello, J. C.; Ceñal, J. P.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E.; Petenatti, M. E.; Petenetti, E. M. & Del Vitto, L, A. (2000) Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. II. “Carquejas”: Control de Calidad de las Drogas Oficiales y Sustituyentes. *Acta Farmacológica Bonaerense*, 19: 99-103.
- Gillot, C. (2005) *Entomology*. Springer. Third edition. 831 pp.
- Giordano, O.; Sosa, M. & Tonn, C. (2000) Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios de Plantas frente a *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Anales Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 52:13-17.
- Giuliano, D. A. (2000) Subtribu Baccharinae: *Baccharis*, en A. T. Hunziker (ed.). *Flora Fanerogámica Argentina*. ProFlora CONICET, 66: 6-67.
-

---

Giuliano D.A. (2001) Clasificación Infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana* 39 (1-2): 131-154.

Gleiser, R. M.; Bonino, M. A. & Zygadlo, J. A. (2007) Bioactividad de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* contra mosquitos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 350-351.

Gonzaga Verdi, L.; Costa Brighente, I. M. & Pizzolatti, M. G. (2005) Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Económicos e Biológicos. *Química Nova*, 28(1): 85-94.

González, J.; Sagua, H.; Araya, J.; Loyola, A.; Morales, G.; Pereira, J. & Estrada, M. (1990) In vitro activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research*, 4(1): 1-4.

González - Coloma, A.; Escoubas, P.; Reina, M. & Mizutani, J. (1994) Antifeedant and insecticidal activity of endemic canarian lauraceae. *Applied Entomology and Zoology*, 29(2): 292-296.

Gorzalczany, S.; Rojo, A.; Rondina, R.; Debenedetti, S. & Acevedo, C. (1999) Estudio de Toxicidad Aguda por Vía Oral de Plantas Medicinales Argentinas. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 18(3): 221-224.

Govindachari, T. R.; Suresh, G. & Weslwy, S. D. (2000) Insects antifeedant and growth regulating activities of neem seed oil- the role of major tetranortriterpenoids. *Journal of Applied Entomology*, 124: 287-291.

Hamraoui, A. & Regnault-Roger, C. (1997) Comparaison des activités insecticides monoterpènes sur deux espèces d'insectes ravageurs des cultures *Ceratitis capitata* et *Rhopalosiphum padi*. *Acta Bot. Gallica*, 144: 413 -417.

Harborne, J. B. (1980) *Plant phenolics*. In: Bell EA, Charlwood BV (eds) *Encyclopedia of plant physiology*, vol. 8 Secondary plant products. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 329-395.

Harborne, J. B. (1998) *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd edition. Chapman & Hall Pub. London, UK.

He, K.; Montenegro, G.; Hoffman, J.J. & Timmermann, B.N. (1996) Diterpenoid from *Baccharis linearis*. *Phytochemistry*, 41: 1123-1127.

- 
- He, X-G (2000) On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography A*, 880:203–232.
- Hieronimus, J. (1882) *Plantae Diaforicae, Florae Argentinae*. Tomo VI. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, Buenos Aires.
- Hoffmann, J. J.; Timmermann, B. N.; McLaughlin, S. P. & Punnapayak, H. (1993) Potential antimicrobial activity of plants from the southwestern United States. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(2): 101-115.
- Iannacone, J. (2000) La pulga del agua *Moina macrocopa* y el nematodo *Panagrellus redivivus* como modelos alternativos de bioensayos para la detección de sustancias biocidas fisiológicamente activas. pp. 13 – 26. In Arning, I. y H. Velásquez (eds.). *Plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos (RAAA)*, Lima, Perú.
- Ignatowicz, S.; Wesolowska, B. & Banasik, K. (1994) Potential of common plants as grain protectants: repellents effect of powdered leaves and seeds of the neem tree on stored product pests. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> international conference on Insects chemical, physiological and environmental aspects. Conference on 105<sup>th</sup> birthday Anniversary of Stefan Kopec'*, páginas 317-322. Ladek Zdrój, Poland.
- Isman, M. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51 :45-66.
- Isman, B. M. & Akhtar, Y. (2007) Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides, 235-288. en: Ishaaya, i.; nauen, r. y horowitz, a.r. *Insecticides Desing Using Advanced Technologies*, 314 pp.
- Izuru, Y. (1970) Mode of action of pyrethroids, nocotinoids and rotenoids. *Annual Review of Entomology*, 15: 257-272.
- Jacobson, M. (1977) *Isolation and identification of toxic agents from plants*. En: Host plant resistance to pests. Ed. A.P. Hedin. American Chemical Society. Washington DC. pp. 153-164.
- Jbilou, R.; Ennabili, A. & Sayah, F. (2006) Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Biotechnology*, 5(10): 936–940.
-

- 
- Jilani, G. & Su H.C.F. (1983) Laboratory studies on several plant materials as insect repellents for protection of cereal grains. *Journal of Economic Entomology*, 76: 154-157.
- Jilani, G.; Saxena R.C. & Rueda, B.P. (1988) Repellent and growth-inhibiting effects of turmeric oil, sweeflag oil, neem oil and “Margosan-O” on red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 81(4): 1226-1230.
- Jones, P.; Ley, S.; Morgen, E. & Santafianos, D. (1989) The chemistry of the neem tree, pp: 19-45. En: *Focus of Phytochemicals-Pesticides*. Jacobson, M. (Eds). CRC, Bocarraton, FL.
- Kalinović, I.; Rozman, V.; Guberac, V. & Marić, S. (2002) Insecticidal activity of some aromatic plants from Croatia against lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* f.) on stored wheat. *Advances in Stored Product Protection. 8<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection. Chemical and Physical Control*, pp. 768-775.
- Ko Ko, Waraporn Juntarajumnong & Angsumarn Chandrapatya (2009) Repellency, Fumigant and Contact Toxicities of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon Against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 43: 56-63.
- Koul, O. & Dhaliwal, G. (2001) *Phytochemical Biopesticides*. Harwood Academic Publishers.
- Kubo, I. & Nakanishi, K. (1977) Insect antifeedants and repellents from African plants. En: *Host plant resistance to pests*. Ed. P.A. Hedin. American Chemical Society. Symposium Series 62, Washington.
- Kuklinski, C. (2000) *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. 1<sup>a</sup> ed. Ed. Ediciones Omega S.A. España. pp. 4.
- Kumar, J. & Parmar, B. S. (1996) Physicochemical and chemical variation in Neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2137-2143.
- Lagunes, T. A. & Rodríguez, H. C. (1989) Búsqueda de la tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. CONACYT, Colegio de Posgraduados, 150 pp.



- Leatemala, J. A. & Isman, M. B. (2004) Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica*, 32: 30–7.
- Lock, O. (1994) *Investigación Fitoquímica, Método en el Estudio de Productos Naturales*. Fondo Editorial PUCO. Lima. pp. 114-130.
- Lock, O. (1998) *Investigación Fitoquímica*. 1ª ed. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. pp. 1-3.
- Maldoni, B. (1991) Alkaloids: Isolation and purification. *Journal of Chemical Education*., 68: 700-703.
- Mangiaterra, P. A. (2005) Evaluación de parámetros botánicos y fotoquímicos para el control de calidad de “carqueja” (Tesis de grado). Bs. As.: Universidad de Belgrano.
- March, C.; Sanz, I. & Primo Yúfera, E. (1991) Antimicrobial activities on Mediterranean Plants. *Zentralbl. Microbiology*, 146: 291-295.
- Mareggiani, G. (2001) Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas*, 60: 22-30.
- Metcalf, C. & Flint, W. (1974) *Insectos destructivos e insectos útiles: sus costumbres y su control*. Ed. Cía. Continental S.A. Trad. de la 4 Edic. en Inglés. México, 1208 pp.
- Metcalf, R. L. & Metcalf, E. R. (1992) *Plant kairomones in insect ecology and control*. Chapman and Hall. New York. US. 169 pp.
- Mostahar, S.; Alam, S. & Islam, A. (2006) Cytotoxic and antimicrobial activities of some synthetic flavones. *Indian Journal of Chemistry*, 45B: 1478-1486.
- Muñoz, M. (1996) *Química Orgánica*. Editorial McGraw Hill Interamericana. México, D. F.; pp. 560-586.
- Nakasugi, T. & Komai, K. (1998) Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2560–2564.
- Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010) Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101: 372-378.
- Novo, R. J.; Viglianco, A. & Nassetta, M. (1997) Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *Tribolium castaneum* Herbst. *Agriscientia*, 14: 31-36.

- 
- Novo, R. J.; Viglianco, A. & Nassetta, M. (1998) Efecto antialimentario de extractos de cuatro plantas sobre *Anticarsia gemmatilis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 24: 525-530.
- Nyamador, W.; Ketoh, G.; Amévoin, K.; Nuto, Y.; Koumaglo, H. & Glitho, I. (2010) Variation in the susceptibility of two *Callosobruchus* species to essential oils. *Journal of Stored Products Research*, 46(1): 48-51.
- Ocete, R. & Pérez, M.A. (1996) Efectos de la aplicación de extractos de *Daphne gnidium* L. y *Anagyris foetida* L. sobre diversos grupos taxonómicos. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 22: 45-56.
- Oliveira, S. Q. (2002) Characterization of compounds present in butanolic extract from *Beccharis articulata* (Lam.) Persoon. *Caderno da Farmácia*, 18(1): 37-38.
- Ong, E. S. (2004) Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, 812(1-2): 23-33.
- Osorio Durango, E. J. (2009) *Aspectos Básicos de Farmacognosia*. Ed. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. pp. 58.
- Palacio Cortés Picá, A. M. (2005) Biomassa, Óleo Essencial, Perfil Fitoquímico e Nutrientes da Carqueja sob influência de fontes e doses de nitrogênio (Tesis de grado). Curitiba, Brasil.
- Palacios, P. S.; Wilson, E. G. & Debenedetti, S. L. (1999) Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. *Dominguezia*, 15(1): 39-46.
- Pascual-Vilalobos, M. (2006) Occurrence of coleoptera and lepidoptera species at Calasparra (Murcia, Spain). 9<sup>th</sup> *International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 5. Biology, Behavior, and Pest Detection on Stored Grain*, pp. 387-391.
- Pawlow, M. (1985) *El gran libro de las plantas medicinales*. Editorial Everest. España pp. 22, 25, 405.
- Pemonge, J.; Pascual-Villalobos, M. J. & Regnault-Roger C. (1997) Effects of Material and Extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. Against the Stored Product Pests *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 33(3): 209-217.
-



- 
- Peñaloza, C. (1995) Efectos biológicos de diferentes extractos de plantas sobre *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera, Tenebrionidae) (Tesis de Grado). Universidad Nacional de Córdoba: Facultad de Ciencias Naturales, Físicas y Matemáticas, pp. 100.
- Petenatti, M. E.; Álvarez, M. E.; Petenatti, E. M.; Del Vitto, L. A. (2005) Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino, V. *Clematis montevidensis* var. *Montevidensis*, Caracterización de la Droga. *Acta Farmacológica Bonaerense*, 24(2): 190-196.
- Prakash, A. & Rao, J. (1997) Botanical pesticides in agriculture. CRC Press Inc. 461 pp.
- Rahalison, L.; Benathan, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Gupta, M. P.; Solis, P. N.; Fuzzati, N. & Hostettmann, K. (1995) Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. *Planta Medica*, 61(4): 360-362.
- Ramírez-Moreno, L. A.; García-Barrios, L. E.; Rodríguez Hernández, C.; Morales, H. E. & Castro Ramírez, A. E. (2001) *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 60: 50-56.
- Rangel, D.; García, I.; Velasco, J.; Buitrago, D. & Velasco, E. (2001) Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 42: 43-46.
- Regnault-Roger, B.; Philogène, B.J.R. & Vincent, C. (2004) *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. México. 337 pp.
- Rees, D. (2004) *Insectes of Stored products*. CSIRO. Australia. 181 pp.
- Rejendran, S. & Sriranjini, V. (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44: 126 -135.
- Riba, M.; Torra E. & Martí, J. (1996) Bioactividad de extractos de *Melia azedarach* L. sobre el taladro del maíz *Sesamia nonagrioides* Lef. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 22: 261-276.
- Robinson, R. (2001) *Plant Sciences*. McMillan Referente USA, 1(204): 32.
- Rodríguez, H. C. (1993) Fitoinsecticidas en el combate de insectos. In: "Bases prácticas de la agroecología en el desarrollo centroamericano". Módulo II: Manejo de plagas en el sistema de producción orgánica. San Martín Zapotitlan, Retalhuelu. pp. 112-125.
- Rodríguez, H. C. (1996) Extensión y capacitación en el uso de plaguicidas botánicos. In: Memoria I Taller latinoamericano sobre bioplaguicidas. ¿Mito, Placebos o una alternativa en la agricultura sostenible? Escuela Panamericana de Agricultura. El Zamorano. HN. pp. 1-6.
-

- Rossetti, M. R.; Dafagó, M. T.; Carpinella, M. C.; Palacios, S. M. & Valladares, G. (2008) Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidóptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 67: 115-125.
- Ryan, F. (2002) *Insect Chemoreception. Fundamental and Applied*. Kluwer Academia Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 323 pp.
- Sahaf, B.; Moharramipour, S. & Meshkatsadat, M. (2008) Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11: 175 – 179.
- Sanabria-Galindo, A.; López, S. I. & Gualdrón, R. (1997) Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm*, 26: 15-19.
- Sharapin, N. (2000) Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Programa Interamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Colombia. pp. 195-202.
- Silva, G.; Lagunas, A.; Rodríguez, J. C. & Rodríguez, D. (2002) Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 66: 4-12.
- Simirgiotis, M. J.; García, M.; Sosa, M. E.; Giordano, O. S. & Tonn, C. E. (2003) An entkaurene derivate from aerial parts of *Baccharis rufescens*. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 91(4-6): 109-116.
- Soares Corrêa, A.; Albinati Oliveira, P.; Góes Cordeiro, E.; Guedes Pereira, E. & Carvalho Guedes, R. (2008) Resistência a permetrina em populações brasileiras de caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Grãos Armazenados. ResumoID: 118-1*. Uberlândia, MG.
- Sosa, M. E.; Tonn, C. E. & Giordano, O. S. (1994) Insect Antifeedant Activity of Clerodane Diterpenoids. *Journal of Natural Products*, 57 (9): 1262–1265.
- Stadler, T.; Picollo, M. & Zerba, E. (1990) Factores ecofisiológicos relacionados con la susceptibilidad a insecticidas y la resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 16: 743 -754.
- Stapel G. & Menssen H.G. (1977) Flavonoids and diterpenes from *Baccharis articulata*. *Planta Medica*, 32:20.

- 
- Stapel G., Menssen H.G., Snatzke G. (1980) Isolation and structure Elucidation of two Diterpenes from *Baccharis articulata*. *Planta Medica*, 39: 366-374.
- Stefanazzi, N. (2010) Aceites esenciales, una herramienta alternativa en el manejo integrado de plagas de grano almacenado (Tesis de Doctor en Biología). Bahía Blanca, Bs. As.: Universidad Nacional del Sur.
- Talukder, F.A. & Howse, P.E. (1993) Deterrent and Insecticidal effects of extracts of Pithraj, *Aphanamixis polystachya* (Meliaceae), against *Tribolium castaneum* in storage. *Journal of Chemical Ecology*, 19(11): 2463 – 2471.
- Talukder, F.A. & Howse, P.E. (1994) Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree, *Aphanamixis polystachya* Wall & Parker, against *Sitophilus oryzae* (L.). *International Journal of Pest Management*, 40(3): 274-279.
- Talukder, F. A. & Howse, P. E. (1995) Evaluation of *Aphanamixis polystachya* as a Source of Repellents, Antifeedants, Toxicants and Protectants in Storage Against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 31(1): 55-61.
- Tonn C.E., Gianello J.C. & Guidugli F.H. (1987) Some essential oil component of *Baccharis crispa* and *Baccharis articulata*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 75: 5-3.
- Toribio, M. S.; Oriani, D. S.; Fernández, J. G.; Toso, R. E. & Tortone C. A. (2007) Estudio de la actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Baccharis*. *Ciencias Veterinarias*, 9(1): 44-48.
- Tripathi, A.; Prajapati, V.; Preet, S.; Khanuja, S. & Kumar, S. (2003) Effect of d-limonene on three stored-product beetles. *Journal of Economic Entomology*, 96(3): 990 - 995.
- Tsao, T. F., Newman, M. G., Kwok, Y. Y. & Horikoshi, A. K. (1982) Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 61(9): 1103-1106.
- Valladares, G.; Garbin, L.; Defagó, M. T.; Carpinella, C. & Palacios, S. (2003) Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62: 53-61.
- Van Puyvelde, L. (1976) L' umuravumba-iboza riparia (Hochst.) N.E.BR. (Lamiaceae), la plante medicinale d' usage curant au Rwanda. *Rapp. Deuxieme Coll. Cames*, 60: 121-136.
-

Viglianco, A. I.; Novo, R. J.; Cragolini, C. I. & Nassetta M. (2006) Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). *Agriscientia*, 23(2): 83-89.

Vivot Lupi, E. P.; Sánchez Brizuela, C. I.; Cacik Jeifetz, F. & Sequin Acosta, C. J. (2009) Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(4): 74-84.

[www.casafe.org.ar/pdf/Insecticidas.pdf](http://www.casafe.org.ar/pdf/Insecticidas.pdf)

[www.psicostasia.com](http://www.psicostasia.com)

Zunino M. P., Newton M. N., Maestri D. M., Zygadlo J. A. (1998) Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica*, 64(1): 86-87.