

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Vegetal I**



**EFFECTOS DE TERPENOIDES NATURALES Y HEMISINTÉTICOS  
SOBRE “LEPTINOTARSA DECEMLINEATA  
(SAY)(COLEOPTERA:CHRYSOMELIDAE) Y “SPODOPTERA  
EXIGÛA (HÛBNER)(LEPIDOPTERA:NOCTURNAE)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Cristina Caballero García**

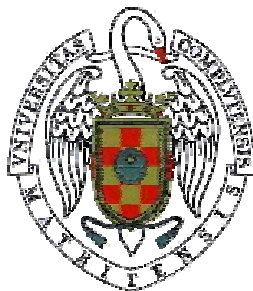
Bajo la dirección de los doctores

**Pedro Castañera Domínguez  
Félix Ortego Alonso**

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2468-X**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I**



**EFFECTOS DE TERPENOIDES NATURALES Y HEMISINTÉTICOS  
SOBRE *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (COLEOPTERA:  
CHRYSOMELIDAE) Y *Spodoptera exigua* (Hübner)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**TESIS DOCTORAL**

**CRISTINA CABALLERO GARCÍA**

**MADRID, 2004**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I**

**EFFECTOS DE TERPENOIDES NATURALES Y HEMISINTÉTICOS SOBRE**  
***Leptinotarsa decemlineata* (Say) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) Y**  
***Spodoptera exigua* (Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Memoria presentada por Cristina Caballero García para optar**  
**al grado de Doctora.**

Fdo.: Cristina Caballero García

Vº Bº de los Directores:

Fdo.: Dr. Pedro Castañera Domínguez

Fdo.: Dr. Félix Ortego Alonso

Vº Bº de la Tutora:

Fdo.: Dra Pilar Estévez López

*A mis padres y hermano*

# Agradecimientos

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de interacción Planta-Insecto del Departamento de Biología de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.) y financiada por la C.I.C. Y. T. (AGF 98-0805-C02-01).

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Pedro Castañera y Félix Ortego, la posibilidad que me brindaron para que yo pudiera realizar esta tesis doctoral. Gracias a su confianza y a sus consejos este trabajo ha sido posible.

A Benjamín Rodríguez (Centro de Química Orgánica, CSIC), por los compuestos usados en esta tesis, ya que salieron de su laboratorio, por todas sus enseñanzas del mundo de la química y por sus valiosas aportaciones en la redacción de la tesis

A Pilar Estévez, por ser mi tutora en el departamento de Biología Vegetal I y ayudarme con todos los trámites administrativos de la tesis.

A Javier Pascualena (Estación de Mejora de la Patata, Vitoria) que tan amablemente nos ha cedido año tras años las patatas necesarias para el mantenimiento de las poblaciones de escarabajo de la patata.

A mis compis de laboratorio: Manolo González, que me ayudó en los comienzos y que nos ha surtido de escarabajos durante estos años. A Fernando Álvarez, Mayte Moñivas, Cristina Magaña y Merche Díaz por sus ánimos. A Marta de la Poza porque hemos compartido las alegrías y las penas de todo este tiempo de trabajo. A Marisa Ruíz por su ayuda técnica con algunos experimentos y por hacerme reír en muchos momentos. A Ismael Sánchez y Gema Pérez porque desde que entré en el laboratorio no han dudado en ayudarme en todo lo que he necesitado, por compartir conmigo sus conocimientos y sobre todo por brindarme su amistad. A Pedro Hernández, porque durante este tiempo ha sido como un hermano mayor en la ciencia que me ha cuidado, animado y ayudado con una paciencia infinita. Y por último a Matoya, por todas sus historias y por compartir con nosotros muchos momentos de su vida.

A Beatriz Beroiz, porque gracias a nuestras charlas en los desayunos, no me he sentido tan sola en los últimos meses.

A Rafa, del laboratorio 200 y a Virginia , del laboratorio de Virus de Plantas, por sus ánimos y por esas charlas por los pasillos.

A Vicky y Mónica del Servicio de Fotografía del C.I.B., por su profesionalidad a la hora de hacer las fotos.

A Juanma y Juan, por todas las horas que han tenido que soportar mis cambios de humor, por animarme, por estar siempre ahí y en definitiva por darme su amistad y cariño en todo momento.

A Alex, sufridor directo de los últimos meses, porque gracias a su paciencia me ha ayudado a sobrellevar la tensión del esfuerzo final.

A Estíbaliz, juntas comenzamos en el mundo de la investigación y desde entonces siempre me ha dado ánimos para continuar en esta ardua empresa.

A Angel, por las veces que me ha llamado interesándose por mi trabajo.

A Miguel, Toñín, Javi, Emma, Pablo y Conchi, por los fines de semana que hemos disfrutado el momento y por todos esos ratos que tanto nos hemos reído.

A Carlos, Sara, Gonzalo, Cristina, Dani y Arancha porque ellos han estado desde el principio y han sido partícipes de los buenos y malos momentos.

A los que desde la distancia siempre me han animado y preocupado por mis avances: Ana, Isa, Antonio, Pili, Christina y Christiana.

A Carlos Cea, porque siempre que lo he necesitado, me ha tendido su mano sin condición alguna.

A las chicas de Preciados, Adela y Ana, porque me han ayudado a desconectar en el momento que más lo necesitaba.

Y no por últimos menos importantes, quiero agradecer especialmente a mis padres el apoyo incondicional que siempre me han dado ante todas las decisiones que he ido tomando en mi vida.

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA</b> .....	
1.1.1. INSECTICIDAS DE ORIGEN BOTÁNICO .....	1
1.1.2. MODO DE ACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN BOTÁNICO FRENTE A INSECTOS .....	3 5
1.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA Y MODO DE ACCIÓN .....	8
<b>1.2. TERPENOIDES</b> .....	10
1.2.1. ESTRUCTURA, ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN EN PLANTAS.....	10
1.2.2. DITERPENOS <i>NEO</i> -CLERODÁNICOS .....	10
1.2.3. SESQUITERPENOS: ARTEMISIIFOLINAS Y EUDESMANOS.....	12
1.2.4. LIMONOIDES .....	13
<b>1.3. ESCARABAJO DE LA PATATA (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)</b> .....	14
1.3.1. SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA .....	15
1.3.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....	16
1.3.3. BIOLOGÍA, DAÑOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	17
1.3.4. CONTROL Y ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS .....	18
<b>1.4. GARDAMA (<i>Spodoptera exigua</i>)</b> .....	21
1.3.5. SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA .....	21
1.3.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....	22
1.3.7. BIOLOGÍA, DAÑOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	23
1.3.8. CONTROL Y ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS .....	24
<b>1.5. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
<b>2.1. INSECTOS</b> .....	27
2.1.1. CRÍA DE <i>L. decemlineata</i> EN LABORATORIO .....	27

2.1.2. CRÍA DE <i>S. exigua</i> EN LABORATORIO .....	28
<b>2.2. MATERIAL VEGETAL .....</b>	<b>30</b>
2.2.1. PLANTAS DE PATATA .....	30
2.2.2. PLANTAS DE REMOLACHA .....	31
<b>2.3. OBTENCIÓN DE TERPENOIDES NATURALES Y HEMISITÉTICOS. ....</b>	<b>31</b>
2.3.1. DITERPENOS <i>NEO</i> -CLERODÁNICOS .....	32
2.3.1.1. AJUGARINAS Y TEUMASILENINAS .....	32
2.3.1.2. DERIVADOS DE 19-ACETILGNAPHALINA Y ERIOCEPHALINA .....	33
2.3.1.3. SCUTECYPROL A Y SCUTALBINA C .....	36
2.3.2. SESQUITERPENOS .....	36
2.3.3. LIMONOIDES .....	38
<b>2.4. BIOENSAYOS .....</b>	<b>40</b>
2.4.1. GENERAL .....	40
2.4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA .....	42
2.4.2.1. ENSAYOS DE PREFERENCIA .....	42
2.4.2.2. ENSAYOS DE NO PREFERENCIA .....	43
2.4.3. ENSAYOS NUTRICIONALES .....	44
2.4.3.1. CÁLCULO DE ÍNDICES NUTRICIONALES.....	45
<b>2.5. ENSAYOS ENZIMÁTICOS .....</b>	<b>46</b>
2.5.1. REACTIVOS Y EQUIPOS .....	46
2.5.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS .....	46
2.5.3.. VALORACIÓN DE PROTEINA .....	48
2.5.4. TAMPONES .....	48
2.5.5.. CONDICIONES GENERALES .....	48
2.5.6. ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA .....	48
2.5.7. ACTIVIDAD ESTERASA .....	49
2.5.8. ACTIVIDAD MONOOXIGENASA .....	49
<b>2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>50</b>
 <b>3. ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE TERPENOIDES FRENTE A LARVAS DE <i>L. DECEMLINEATA</i> Y <i>S. EXIGUA</i> .....</b>	 <b>51</b>
<b>3.1. DITERPENOS <i>NEO</i>-CLERODÁNICOS .....</b>	<b>52</b>



3.1.1. AJUGARINAS Y TEUMASILENINAS .....	52
3.1.2. DERIVADOS DE 19-ACETILGNAPAHALINA .....	55
3.1.3. DERIVADOS DE ERIOCEPHALINA .....	57
3.1.4. SCUTECYPROL A Y SCUTALBINA C .....	58
3.1.5. ESTRUCTURA-ACTIVIDAD .....	59
<b>3.2. SESQUITERPENOS: ARTEMISIIFOLINAS Y EUDESMANOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. LIMONOIDES .....</b>	<b>62</b>
<b>3.4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>4. MODO DE ACCIÓN DE TERPENOIDES EN LARVAS DE <i>L. DECEMLINEATA</i></b>	
<b><i>Y S. EXIGUA</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1. <i>LEPTINOTARSA DECEMLINEATA</i> .....</b>	<b>69</b>
4.1.1. TEUMASILENINA A .....	69
4.1.2. TEUMASILENINA C .....	72
<b>4.2. <i>SPODOPTERA EXIGUA</i> .....</b>	<b>74</b>
4.2.1. SCUTECYPROL A .....	74
<b>4.3. DISCUSIÓN .....</b>	<b>76</b>
<b>5. EFECTOS DE TERPENOIDES TÓXICOS Y DISUASORIOS SOBRE ENZIMAS</b>	
<b>DE DETOXIFICACIÓN EN LARVAS DE <i>S. EXIGUA</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE DETOXIFICACIÓN EN LARVAS</b>	
<b>DE <i>S. exigua</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>5.2. EFECTOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE LA</b>	
<b>ACTIVIDAD DE LAS LARVAS DE <i>S. EXIGUA</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3. DISCUSIÓN .....</b>	<b>86</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO I: ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS .....</b>	<b>106</b>

# Resumen

---

Se ha determinado la actividad antialimentaria de tres grupos de terpenoides (diterpenos *neo*-clerodánicos, sesquiterpenos y limonoides), frente al escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), y la gardama, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Se han escogido estas dos especies por su importancia económica y por sus distintos hábitos alimenticios, ya que el escarabajo de la patata es una especie oligófaga y la gardama es polífaga.

La evaluación de la actividad antialimentaria de los compuestos objeto de estudio (15 de origen botánico y 29 derivados hemisintéticos) se realizó mediante ensayos de alimentación de corta duración en condiciones de preferencia (índice de disuasión) y de no preferencia (índice antiapetitivo). Asimismo, se comparó la actividad dentro de cada grupo de compuestos en función de la modificación de sus grupos funcionales para tratar de establecer la relación estructura-actividad. Los resultados ponen de manifiesto como mínimos cambios en la estructura de las moléculas son responsables de cambios, tanto del tipo de actividad antialimentaria (actividad disuasoria y/o actividad antiapetitiva) como de su especificidad por alguna de las dos especies. El estudio de los diterpenos *neo*-clerodánicos indica la importancia de la presencia del anillo de decalina y del grupo epóxido entre C-4 y C-18 como determinante de la actividad para ambas especies. Otro factor importante a tener en cuenta son las funciones que aparecen sobre C-6 y C-19, las cuales determinan cambios en la actividad antialimentaria, especialmente de tipo disuasoria, en larvas de *S. exigua*. Los carbonos C-6 y C-15 parecen jugar un importante papel en la actividad de los sesquiterpenos estudiados en este trabajo. En cuanto a los limonoides, la funcionalidad

en C-1 y C-3, ya sea hidroxilo o cetona, son los principales responsables de actividad, mientras que el grupo epoxido en posición C-14-15 no parece ser imprescindible.

En general, dentro de cada uno de los grupos de terpenoides se observó que había más compuestos con actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata* que frente a larvas de *S. exigua*. La única excepción corresponde a los grupos de las ajugarinas y los eudesmanos, que sólo fueron activas frente a larvas de *S. exigua*. Además, de los 15 compuestos naturales analizados, 12 de ellos presentaban actividad antialimentaria frente alguna de las dos especies de insectos. Por el contrario, aproximadamente la mitad de los compuestos hemisintéticos carecían de actividad. Estos resultados ilustran la eficacia de las plantas en la síntesis de defensas químicas frente a herbívoros y sugieren que la estructura global de la molécula es importante para mantener la actividad biológica.

Con el objetivo de establecer el modo de acción de algunos de los compuestos que mostraron mayor actividad, se realizaron ensayos nutricionales para distinguir si su actividad antialimentaria podía deberse a un efecto disuasorio de la alimentación o a un efecto tóxico post-ingestivo. Estos índices se calcularon durante un periodo en el que las larvas se alimentaban con discos foliares tratados con los compuestos a ensayar a diferentes dosis (periodo de tratamiento) así como durante el periodo inmediatamente posterior en que se alimentaban sobre discos no tratados (periodo de post-tratamiento). Para *L. decemlineata* se utilizaron los diterpenos teumassilenina A y teumassilenina C. En el caso de *S. exigua* estudiamos el neo-clerodano scutecyprol A.

Las reducciones del consumo, el crecimiento y la eficiencia de conversión del alimento ingerido en larvas alimentadas con teumassilenina A en el periodo de post-tratamiento sugieren un modo de acción tóxico en las larvas de esta especie. Por el contrario, las larvas alimentadas con teumassilenina C se recuperan durante este periodo, al igual que las larvas que estuvieron en ayuno, indicando que actúa como disuasorio de la alimentación. Estos resultados ponen de manifiesto como pequeños cambios estructurales pueden modificar el modo de acción de estos compuestos. En cuanto al otro compuesto estudiado, el neo-clerodano scutecyprol A, nuestros resultados con índices nutricionales confirman que este compuesto tiene un modo de acción disuasorio frente a larvas de *S. exigua*.

Los insectos son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos exógenos, entre los que se encuentran los metabolitos secundarios presentes en sus plantas-huesped, por medio de la actividad de sus enzimas de detoxificación. Las enzimas de detoxificación son energéticamente costosas, por lo que es esperable que el insecto intente eliminar mediante la inducción de enzimas de detoxificación los metabolitos secundarios que sean tóxicos, mientras que esta inducción no sería necesaria para aquellos compuestos que sólo sean disuasorios de la alimentación. Nuestro objetivo es comprobar si esta respuesta enzimática dependiente del modo de acción del compuesto al que están expuestos también ocurre en larvas de *S. exigua*. Para ello hemos seleccionado el scutecyprol A, un diterpeno *neo*-clerodano con una potente actividad como disuasorio de la alimentación frente a larvas de *S. exigua* y que no mostraba efectos post-ingestivos y una mezcla de limonoides (1,7-di-O-acetilhavanensina y 3,7-di-O-acetilhavanensina, aislados a partir de extractos de semillas de *Trichilia havanensis* (Meliaceae), que mostró un modo de acción tóxico frente a larvas de *S. exigua*.

Hemos caracterizado las principales actividades enzimáticas de detoxificación (mono-oxigenasas P-450, esterasas y glutatión S-transferasas) presentes en los extractos digestivos de larvas de *S. exigua*. Nuestros resultados demuestran que los efectos de los compuestos ensayados sobre las actividades enzimáticas de esta especie se ajustan a su modo de acción. Así, la mezcla de limonoides, con un modo de acción tóxico, afecta a la actividad de las enzimas de detoxificación en los periodos de tratamiento y post-tratamiento. Por el contrario, el scutecyprol A, con un modo de acción disuasorio de la alimentación, no tiene ningún efecto sobre estos procesos enzimáticos.

# CAPÍTULO 1

## Introducción

---

### **1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA**

A lo largo de la evolución, tanto las plantas como los insectos han ido adaptándose a las presiones ambientales a las que han estado sometidos. Así, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos por los cuales, por un lado, atraen a insectos que son beneficiosos para ellas y por otro, se defienden frente al ataque producido por insectos fitófagos. Por su parte, los insectos han desarrollado estrategias para evadirse de las defensas generadas por las plantas, creándose así un equilibrio dinámico entre plantas e insectos (Harborne, 1982).

Como resultado de la coevolución entre plantas e insectos, las plantas han desarrollado una inmensa variedad de mecanismos de defensa, que pueden ser de tipo físico o químico, gracias a los cuales adquieren una serie de ventajas adaptativas (Boulter, 1993). Los mecanismos de tipo físico, son aquellos que implican una modificación morfológica en la planta, que supone una barrera al insecto en su intento de acceso a ésta. Estas modificaciones se observan en las plantas como espinas, tricomas, ceras, etc (Deverall, 1979). Las defensas de tipo químico pueden ser directas en forma de sustancias tóxicas, disuasorias, repelentes y reductoras de la digestibilidad (Cornell y Hawkins, 2003), o indirectas mediante sustancias volátiles que atraen a los

enemigos naturales (depredadores y parasitoides) de los insectos que atacan a la planta (Turlings et al., 1995).

Whittaker y Feeny (1971) propusieron el término de compuestos aleloquímicos para referirse a sustancias no nutricionales producidas por individuos de una especie y que afecta al comportamiento, el desarrollo o la biología de individuos de otras especies. En plantas, estos compuestos químicos denominados también metabolitos secundarios, ya que no están implicados directamente en los procesos metabólicos primarios o de crecimiento y desarrollo de la planta, tienen una función ecológica importante como defensas químicas contra microorganismos, insectos, otros herbívoros e incluso contra otras plantas (Balandrin et al., 1985; Feeny, 1992; Berenbaum y Rosenthal, 1992). La importancia de los metabolitos secundarios en las interacciones planta-insecto es bien conocida, pudiendo actuar de forma constitutiva o inducible como atrayentes, repelentes, estimulantes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición, como sustancias tóxicas y como reguladores del desarrollo (Jacobson, 1989; Ascher, 1993).

Hasta la fecha, se han identificado más de 100.000 metabolitos secundarios en plantas (Dixon, 2001). Sin embargo, se considera que el potencial que ofrece el reino vegetal como fuente de compuestos potencialmente útiles no ha sido suficientemente aprovechado, ya que sólo un limitado porcentaje de las 270.000 especies de plantas superiores conocidas han sido investigadas en cuanto a sus compuestos activos y es frecuente el caso en que las plantas son investigadas solamente por un tipo específico de actividad biológica (Balandrin et al., 1985).

En función de la ruta metabólica que los sintetiza, los metabolitos secundarios de plantas se pueden dividir en cinco grandes grupos (Nakanishi et al., 1974; Croteau, 2000):

**1 Terpenoides:** Se conocen unos 25.000 y todos ellos poseen un precursor de 5 carbonos que es el isopreno. Es el grupo que presenta una mayor diversidad estructural, e incluye aceites esenciales, resinas, fitoesteroides, piretrinas de origen natural y saponinas.

**2 Alcaloides:** Se han descrito alrededor de 12.000. Todos ellos poseen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. Se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos.

**3 Fenoles:** Se conocen unos 8000 compuestos fenólicos y todos ellos provienen de la ruta del ácido siquímico. Algunos de los más conocidos son las quinonas, cumarinas, ligninas y taninos.

**4 Policetometilenos:** Se conocen alrededor de 6000 compuestos de este tipo, que provienen de la ruta biosintética del acetato, vía malonil-coenzima A.

**5 Metabolitos de biogénesis mixta,** que provienen del acoplamiento de dos o más partes estructurales biosintetizadas por las rutas metabólicas indicadas anteriormente. Algunos de los más conocidos con acción insecticida son los flavonoides, y algunos alcaloides como la ergotamina. (Nakanishi et al., 1974).

Los mecanismos de defensa químicos que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución tienen un gran potencial en el desarrollo de métodos más racionales para el control de plagas, bien como protectores naturales de las plantas o como modelos para el desarrollo de productos sintéticos (Murray et al., 1999).

### **1.1.1. INSECTICIDAS DE ORIGEN BOTÁNICO**

El registro de nuevos productos insecticidas en la Unión Europea demanda unos requerimientos cada vez más estrictos sobre selectividad e impacto ambiental. La abundancia de metabolitos secundarios en las plantas ofrece excelentes perspectivas para su extracción, identificación estructural y evaluación como plaguicidas (McLaren, 1986). Estos productos, además de su alta selectividad y baja persistencia ambiental, tienen especial interés debido a que podrían retrasar la aparición de resistencia, ya que están constituidos por una mezcla de varios compuestos con distinto modo de acción (Völlinger, 1987). La identificación estructural y evaluación de estas sustancias constituye uno de los objetivos de la química de los productos naturales y es un importante paso para desarrollar métodos más racionales para el control de plagas (McLaren, 1986; Coll, 1988).

Los extractos de origen vegetal han sido usados como productos insecticidas desde la antigüedad. En muchas regiones del mundo, especialmente en las comunidades indígenas donde se produce para el autoconsumo, esta práctica se ha seguido usando a

través de generaciones y representan un recurso renovable, más accesible y económico que los insecticidas químicos sintéticos. El auge de la Agricultura Ecológica en los países industrializados, que autoriza el uso de estos compuestos, ha hecho resurgir su interés económico y la búsqueda de plantas con nuevas actividades insecticidas. La comercialización de insecticidas de origen botánico, basados en extractos de plantas activas, ha experimentado un incremento considerable en los últimos años. Actualmente, representan un 1% del mercado mundial de insecticidas y con incrementos anuales entre el 10 y el 15% (George et al., 2000)

La primera generación de insecticidas de origen botánico incluye extractos y compuestos derivados de plantas tales como piretrinas, rotenoides y alcaloides. Algunos de estos compuestos fueron la base para la elaboración de insecticidas sintéticos de segunda generación, como es el caso del las piretrinas naturales obtenidas de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae) que dieron origen a los piretroides sintéticos (Casida y Quistad, 1998). Entre los rotenoides, la rotenona, obtenida principalmente de las raíces de algunos géneros la familia Leguminosae (*Derris*, *Lonchocarpus*), ha sido ampliamente usada como insecticida. El alcaloide más importante como insecticida es la nicotina, que se extrae de las hojas de al menos 18 especies del género *Nicotiana* (Solanaceae) (George et al., 2000).

Muchas especies de plantas, pertenecientes a las familias de las meliaceas, labiadas y rutaceas, han recibido atención en los últimos años debido al hecho de que poseen numerosos terpenoides que actúan como antialimentarios, toxinas y reguladores del crecimiento de los insectos (Connolly, 1983; Wheeler e Isman, 2001). Un ejemplo particularmente relevante de este grupo de sustancias es la azadiractina, un terpeno de estructura compleja (Jones et al., 1989) aislado de *Azadirachta indica* (el árbol del neem) y de *Melia azedarach* (Meliaceae), del que existen numerosas formulaciones registradas (Parmar, 1995) y es ampliamente utilizado en diversos sistemas de producción. Sus hojas y frutos han sido usadas en India y Sri Lanka durante siglos para proteger libros, ropa y comida almacenada del daño de los insectos (Adhikari, 1980). Hay casos de especies sensibles a la azadiractina en la mayoría de los órdenes de insectos (Schmutterer, 1995a). En ensayos de laboratorio se han observado efectos sobre enemigos naturales (Schmutterer, 1995b; Viñuela et al., 1998). Sin embargo, los



efectos secundarios en campo han sido nulos o tolerables en la práctica (Schmutterer, 1995b; Viñuela et al., 1996).

Existen múltiples formulaciones de neem, que se han registrado para la protección de diversos cultivos, donde la principal materia activa es el limonoide azadiractina. Entre ellas están los productos comerciales: “Azatin”, “Bioneem” y “Neemesis” en los EEUU, “Safer’s ENI” en Canadá, “RD-9 Repelin”, “Welgro”, “Neemguard” y “Neemark” en la India y “NeemAzal” de una firma alemana (Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993). Otros productos son “Nimbosol”, “Biosol”, “Neemrich”, “Margosan-O” y “Align” (Ascher, 1993). Solamente en la India, Parmar (1995), cita 35 productos del neem que se han desarrollado comercialmente para el control de plagas. En nuestro país, los productos comerciales de la azadiractina son “Align” y Neemix, (<http://www.mapya.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/introregistro.htm>), los cuales tienen registro para el control de pulgones, moscas blancas, ácaros y diversas orugas en arándanos, arboles y arbustos.

### **1.1.2. MODO DE ACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN BOTÁNICO FRENTE A INSECTOS**

Los insectos pueden ser repelidos por compuestos volátiles emitidos por las plantas, o una vez que se establecen sobre estas ser disuadidos de continuar alimentándose u ovipositando (Schoonhoven 1982). Varios constituyentes químicos de las plantas sirven como estímulos olfativos y gustatorios para los insectos. Estos compuestos químicos pueden ser nutrientes (azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, etc.) o metabolitos secundarios (terpenoides, glucosinolatos, taninos, ligninas, etc.) (Tabla 1.1). La actividad de estos compuestos parece ser debida a los efectos producidos sobre quimiorreceptores presentes en las antenas y el aparato bucal del insecto (Messchendorp et al., 1998; Huotari et al., 2003). Se sabe que algunos terpenoides y alcaloides actúan sobre una neurona situada en los organos maxilares de los insectos (Blaney et al, 1988; Bernays et al., 2002). Así mismo, se han identificado en larvas de *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera) dos neuronas maxilares que responden a compuestos de acción disuasoria, tales como las cardenolidas y la azadiractina (Joop et al., 1999). La actividad disuasoria de los sesquiterpenos drimánicos está relacionada con su capacidad para

formar aductos con grupos amino y sulfhidrilo de los receptores del insecto (Jansen y de Groot, 1991).

Los metabolitos secundarios con actividad tóxica pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología del insecto (Tabla 1.1). Los modos de acción más conocidos son aquellos que afectan a: a) el sistema nervioso, como agonistas de neurotransmisores o interfiriendo con los canales implicados en la transmisión del impulso nervioso (Wink, 2000) b) la producción de energía, inhibiendo enzimas implicadas en la respiración celular (Miyoshi, 1998); c) el sistema endocrino, actuando como reguladores del crecimiento que inhiben la formación de la muda o alterando la función de las hormonas que regulan estos mecanismos (Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993); d) la replicación del DNA (Wink, 2003); y e) el proceso digestivo, actuando como reductores de la digestibilidad o inhibiendo la actividad de enzimas hidrolíticas (Rhoades, 1979; Koul et al, 1996).

Tabla 1.1: Modo de acción de metabolitos secundarios sobre insectos.

Compuesto	Modo de acción	Referencias
Alcaloides	Interferencia con la replicación del DNA Interferencia con el transporte en membranas Inhibición de enzimas Agonista de la acetil colina	Wink, (2003) Wink et al., (1998) Fellows et al., (1986) Sultana et al., (2002)
Flavonoides	Inhibición de la NADH deshidrogenasa en el transporte respiratorio de e <sup>-</sup>	Miyoshi, (1998)
Terpenoides	Repelentes y disuasorios Interfieren en la producción de la hormona de la muda y de la hormona juvenil Inhibidores de la síntesis de quitina Inhibición de enzimas digestivas	Ave et al., (1987) Mordue (Luntz) y Blackwell (1996) Koul et al. (1996)
Glicósidos cianogénicos	Inhibición de la citocromo oxidasa en el transporte respiratorio de e <sup>-</sup>	Wink, (2003)
Glucosinolatos	Repelentes y disuasorios	Erickson y Fenny (1974)
Cumarinas	Reaccionan de forma irreversible con el ADN	Berenbaum et al., (1991)
Taninos y Ligninas	Reductores de la digestibilidad	Rhoades (1979)
Quinonas	Reductor de la digestibilidad	Felton et al., 1992
Piretrinas	Actúan sobre los canales de sodio de las neuronas interfiriendo con la transmisión del impulso nervioso	Bloomquist (1996)
Saponinas	Repelentes y disuasorios Alteran la estructura de membranas	Soulé et al., (2000) Pelah et al., (2002)

### 1.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA Y MODO DE ACCIÓN.

Muchas sustancias de origen vegetal previenen o reducen la alimentación en insectos como resultado de efectos pre- (disuasorio de la alimentación) y post-ingestivos (tóxico) (Schoonhoven, 1982; Klocke et al., 1989). La estrategia más eficaz para encontrar sustancias con actividad antialimentaria es la de aislar de plantas sus metabolitos secundarios y ensayar estos compuestos frente a insectos. Adicionalmente, se pueden modificar químicamente estos compuestos activos, con el objetivo de dilucidar la relación estructura química-actividad. Estos estudios tienen como finalidad el facilitar el diseño de moléculas activas más simples, que puedan ser obtenidas por síntesis química, así como modular la actividad y la especificidad de los compuestos naturales activos, ampliando su potencialidad como insecticidas biorracionales (Rodríguez et al., 1999).

Una importante consideración al evaluar compuestos aleloquímicos, es la selección de las especies de insectos. Debe tomarse en cuenta su importancia económica, facilidad de cría y rango de sensibilidad a sustancias químicas (Kubo, 1993). El estado biológico del insecto es otro factor importante, ya que las larvas neonatas o de primeros estadios son más sensibles a los aleloquímicos que estadios más avanzados (Champagne *et al.*, 1992). Otro factor a tener en cuenta en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas es la conveniencia y fiabilidad de los bioensayos. Éstos, deben ser baratos, rápidos, tener amplia aplicación respecto a los organismos de interés, ser reproducibles, tener validez estadística y requerir baja cantidad del compuesto de prueba. Una sola especie como modelo de ensayo no cumpliría todos los requisitos, por lo que es necesario considerar especies de insectos de distintos grupos taxonómicos (Alkofahi *et al.*, 1989). La respuesta del insecto al mismo compuesto químico puede diferir dependiendo de la selección de estímulo (sustrato), por lo que un compuesto puede ser inactivo cuando es mezclado en dieta artificial y efectivo como antialimentario si se aplica sobre tejido vegetal y viceversa (Schoonhoven, 1982).

Por lo tanto, se deben usar aquellos bioensayos que mejor simulen las condiciones de campo, referidas a los hábitos de alimentación del insecto (Jermy, 1990). Los ensayos de corta duración con discos foliares como sustrato, permiten una buena

evaluación de la actividad antialimentaria de los compuestos objeto de estudio (Coll, 1988; Kubo, 1993). Esta actividad, se evalúa mediante ensayos de preferencia (posibilidad de elegir entre discos foliares tratados y no tratados con los compuestos) y de no preferencia (sin posibilidad de elección). La situación de no preferencia es el caso más común en un sistema agrícola, pero los ensayos de preferencia permiten determinar la capacidad del insecto para la discriminación de sustancias (Schoonhoven, 1982)

Por otra parte, es importante estudiar los efectos de compuestos aleloquímicos sobre la fisiología nutricional de insectos (Beck y Reese, 1975). Estas investigaciones involucran el uso de índices nutricionales, entre los que se encuentran la tasa de consumo relativo (TCR), la tasa de incremento de peso (TIP) y la eficiencia de conversión del alimento ingerido a biomasa (ECI) (Waldbauer, 1968; Bowers et al., 1991). Además, la comparación de los índices nutricionales durante periodos de tratamiento y post-tratamiento permiten determinar si la actividad antialimentaria ocasionada por un aleloquímico es debida a su efecto disuasorio o si es consecuencia de un modo de acción tóxico (Gols et al., 1996).

Los insectos son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos exógenos para, haciéndolos normalmente más hidrofílicos y generalmente menos tóxicos, eliminarlos a través del sistema excretor. Se cree que esta habilidad evolucionó para detoxificar los metabolitos secundarios presentes en sus plantas huésped (Brattsten, 1988). Los principales sistemas metabólicos en insectos son bien conocidos, e incluyen mono-oxigenasas P-450, esterases y glutatión S-transferasas (Feyereisen, 1999; Ranson et al., 2002). Estas enzimas se encuentran mayoritariamente en el tubo digestivo (entrada natural de toxinas), cuerpo graso (tejido de acumulación de compuestos) y tubos de Malpigio (aparato excretor) (Scott, 1999). Los niveles constitutivos de estas enzimas son suficientes para detoxificar pequeñas cantidades de toxinas, pero se ha podido constatar que la producción de estas enzimas es inducida por la exposición a estos compuestos. Por ejemplo, larvas de *Manduca sexta* solo aumentan el consumo de comida que contiene nicotina después de incrementar la actividad de las enzimas P-450 en sus tubos digestivos (Snyder y Glendinning, 1996). Además, se ha podido comprobar utilizando *Leptinotarsa decemlineata* (Say) como modelo, la inducción de enzimas de detoxificación en respuesta a la ingestión de metabolitos secundarios que son tóxicos,

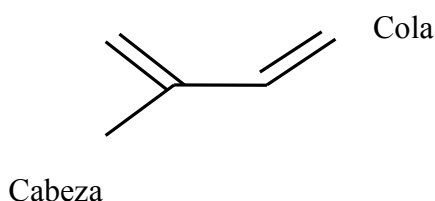
mientras que esta inducción no ocurría en compuestos que actúan como disuasorios de la alimentación Ortego et al. (1999).

## 1.2. TERPENOIDES

### 1.2.1 ESTRUCTURA, ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN EN PLANTAS

Los terpenoides son los metabolitos secundarios de vegetales que presentan una mayor diversidad estructural. Las unidades de cinco carbonos (isopreno) que se unen para formar los terpenoides lo pueden hacer en forma de cabeza-cola y también cola-cola (fig.1.1), de una forma completamente regular para la inmensa mayoría de las sustancias de este tipo. Esta regularidad en la unión de unidades isoprénicas, controlada por diversos sistemas enzimáticos, hace que, a pesar de la enorme diversidad estructural de los terpenoides, sus esqueletos hidrocarbonados pueden ser explicados de una manera racional en base a los conocimientos existentes sobre su biosíntesis.

Figura 1.1: Estructura del isopreno:  $[\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2]$



Los terpenoides, en función del número de isoprenos que posee su esqueleto hidrocarbonado, se clasifican en:

1. Hemiterpenos,  $\text{C}_5$
2. Monoterpenos,  $\text{C}_{10}$ : provenientes del difosfato geranilo y constituidos por dos unidades isoprénicas unidas cabeza-cola.
3. Sesquiterpenos,  $\text{C}_{15}$ : Provenientes del difosfato farnesilo, con tres unidades isoprénicas en unión cola-cabeza.

4. Diterpenos,  $C_{20}$  : Originados a partir de cuatro unidades de isopreno en uniones cola-cabeza y via el intermedio biosintético difosfato de geranylgeranilo.
5. Sestertepenos,  $C_{25}$ : Poseen cinco unidades isoprénicas en unión cola-cabeza.
6. Triterpenos,  $C_{30}$ : Biosintetizados a partir de dos unidades de difosfato de farnesilo, por lo que poseen una unión central cola-cola. Dentro de este grupo de terpenoides, podemos destacar los esteroides, esteroides y otros tipos de compuestos donde se incluyen las ecdisonas.
7. Tetraterpenos,  $C_{40}$ : También denominados carotenoides, provienen de una duplicación del difosfato de geranylgeranilo, por lo que estructuralmente su esqueleto hidrocarbonado está constituido por cuatro unidades isoprénicas en uniones cola-cabeza que se unen cola-cola con otras cuatro unidades isoprénicas encadenadas cabeza-cola.
8. Politerpenos,  $> C_{50}$ : son polímeros isoprénicos como el caucho y chicle.

Más de 25.000 compuestos isoprenoides han sido caracterizados y cientos de nuevas estructuras son descritas cada año (Mizutani, 1999). De entre las sustancias antialimentarias, los terpenoides son el grupo de compuestos aleloquímicos más importante y prometedor porque se encuentran en cantidades apreciables en plantas de diversas familias (Rodríguez-Hahn et al., 1994) y por su conocida actividad aleloquímica (Pickett, 1991; Camps y Coll, 1993).

Entre las plantas que han proporcionado mayor número de terpenoides activos frente a insectos, se encuentran las especies de las familias Meliaceae y Labiatae (Jacobson, 1989). Meliaceae es una familia que se caracteriza por la biosíntesis de triterpenos altamente oxidados comúnmente conocidos como tetranortriterpenoides, meliacinas o limonoides, de reconocida actividad frente a insectos (Taylor, 1981; Champagne et al., 1992). Por otra parte, las Labiadas contienen una alta variedad de compuestos terpénicos, incluyendo mono-, sesqui- y diterpenos (abietanos, kauranos, *neo-clerodanos*, etc) (Anderson et al., 1989, Rodríguez et al., 1999) así como otros

compuestos no terpénicos también activos, tales como glicósidos y flavonoides (Simmonds y Blaney, 1992).

### 1.2.2. DITERPENOS CLERODÁNICOS

Los diterpenos clerodánicos constituyen un numeroso grupo de sustancias aisladas de plantas superiores, de microorganismos y de organismos marinos. De los cerca de 900 diterpenos clerodánicos conocidos hasta ahora, unos 750 se han aislado de plantas superiores, especialmente de los géneros *Ajuga*, *Leonurus*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* y *Teucrium*, pertenecientes a la familia Labiatae (Merrit y Ley, 1992).

Estos compuestos han atraído el interés en los últimos años por su actividad biológica frente a algunas plagas que causan pérdidas económicas importantes. En una revisión hecha por Gebbinck (2002), se detalla la actividad antialimentaria de 382 diterpenos clerodánicos frente a diferentes especies de insectos. Estas plagas se encuentran principalmente dentro de los ordenes Lepidoptera (Simmonds y Blaney, 1992; Rodríguez et al., 1999), Ortoptera (Hanson et al., 1982) y Coleoptera (Ortego et al., 1995; López-Olguín et al., 1999). Sin embargo, una gran mayoría de los diterpenos *neo*-clerodánicos que se conocen no han sido ensayados frente a insectos (Rodríguez, 1997).

Dentro del género *Teucrium* (Labiatae) cabe resaltar la eriocephalina y la 19-acetilnaphalina con actividad antialimentaria frente a larvas de *S. littoralis* y *L. decemlineata* (Ortego et al., 1995; Simmonds et al., 1999; López-Olguín 1999).

Las ajugarinas, compuestos diterpénicos de tipo *neo*-clerodano se aislaron por primera vez en plantas del género *Ajuga* (Labiatae) (Kubo et al., 1976). Estos diterpenos han mostrado poseer ciertas propiedades biológicas, que en muchos casos se relacionan con actividades bioinsecticidas. Este es el caso de ajugarina I, y desacetilajugarina II que mostraron poseer una elevada actividad disuasoria frente a larvas de *S. littoralis* y *H. armigera* (Simmonds et al., 1989). Esta actividad parece estar asociada a la presencia de un grupo epóxido en el C<sub>4</sub> del anillo de decalina de la molécula



El género *Scutellaria* (Labiatae) es también una rica fuente de diterpenos *neo-clerodánicos* que poseen actividad antialimentaria (Anderson et al., 1989; Cole et al., 1990; Rodríguez et al., 1993; Cuñat et al., 1996; Muñoz et al., 1997; Merrit y Ley, 1992; Simmonds et al., 1992). De plantas pertenecientes al género *Scutellaria* se han extraído tres sustancias, jodrelinas A y B y scutalpina C, que son los *neo-clerodanos* que han mostrado la mayor actividad antialimentaria conocida hasta la fecha (Anderson et al., 1989; Cole et al., 1990; Muñoz et al., 1997).

### 1.2.3 SESQUITERPENOS: ARTEMISIIFOLINAS Y EUDESMANOS

Los sesquiterpenos constituyen un numerosísimo grupo de terpenoides con esqueleto hidrocarbonado de 15 carbonos y que proceden del difosfato de farnesilo. Son quizás los terpenoides que presentan una mayor variedad estructural y que se encuentran en todos los vegetales y otros seres vivos.

Las artemisiifolinas (sesquiterpenoides con esqueleto de germacrano) y los compuestos con esqueleto de eudesmano, son constituyentes frecuentes de plantas de la familia Compositae, la cual ha proporcionado un mayor número de este tipo de compuestos. También, pero en menor grado, se encuentran en las familias Scrophulariaceae, Aristolochiaceae y Valerianaceae, y con mucha menor frecuencia en otras familias botánicas.

De los diferentes sesquiterpenos que se han descrito (Fraga, 2003), algunos han mostrado tener actividad antialimentaria frente diversos grupos y especies de insectos. Así, se cita actividad del dihidro- $\beta$ -agarofurano (Gonzalez et al, 1992), y lactonas sesquiterpénicas (Srivastava, et al., 1990) frente a larvas de *S. littoralis*, y de diferentes sesquiterpenos de *Senecio palmensis* (Asteraceae) (Gonzalez-Coloma, 1995) y dialdehídos sesquiterpénicos como el polygodial y warbugaral (Gols et al., 1996) frente a larvas de *L. decemlineata*. En algunas especies de hepáticas también se han encontrado otros tipos de sesquiterpenos que tienen actividad antialimentaria frente a especies de lepidópteros y coleópteros (Perry, et al., 2003).

El sesquiterpeno artemisiifolina fue aislado por primera vez de *Ambrosia artemisiifolia* (Compositae) (Poter et al., 1970). La isabelina también se aisló en plantas

de este mismo género, pero de la especie *A. psilostachya* (Yoshioka et al., 1969). Estos sesquiterpenoides se han encontrado como constituyentes mayoritarios de *Staehelina dubia* L. (Compositae), (Jimeno et al, 2004).

Por otro lado, el sesquiterpenoide de eudesmano santonina, es un componente abundante en diversas especies del género *Santolina* (Compositae) y ha sido empleado reiteradamente como material de partida en síntesis de otros terpenoides, entre otras razones porque es un producto comercializado .

### 1.2.4 LIMONOIDES

Los limonoides o meliacinas son triterpenoides que carecen de cuatro de los 30 carbonos provenientes de seis unidades isoprenicas. En consecuencia, son sustancias con 26 carbonos a cuyo esqueleto hidrocarbonado le faltan cuatro carbonos de la parte de la cabeza de la última unidad de isopentenilo. Esta eliminación de una parte del esqueleto triterpénico originario, se produce por procesos biosintéticos de oxidación-ruptura de enlaces C-C, y los sistemas enzimáticos responsables de esta fragmentación.

Alrededor de 300 limonoides naturales han sido aislados a la fecha y son estructuralmente más diversos y abundantes en la familia Meliaceae que en cualquier otra. Recientemente, estos metabolitos secundarios han recibido mucha atención debido a su complejidad estructural y a su diversificada y alta actividad biológica (Isman et al., 1995).

La actividad biológica de los limonoides ha sido revisada por Champagne et al. (1992), donde se informa de los efectos de 78 limonoides, clasificados en 8 grupos estructurales, sobre la alimentación y el desarrollo en 8 órdenes de insectos. Se sabe que solo la azadiractina tiene efecto sobre más de 200 especies de insectos y ácaros (Saxena, 1989). Se ha comprobado que este limonoide afecta no sólo al comportamiento alimentario y oviposición, si no también a la fecundidad ya que interfiere en el proceso de síntesis de la ecdisona y de la hormona juvenil (Mordue y Blackwell, 1993). Por otra parte, en una revisión realizada por Schmitterer y Singh (1995), encontraron que de 450 a 500 especies de insectos ensayadas, 413 de ellas repartidas en 15 órdenes, mostraron

algún grado de susceptibilidad a productos del neem, donde los principios activos fueron principalmente limonoides.

Entre los limonoides que también han demostrado poseer actividad insecticida similar a la de la azadiractina, (Mordue y Blacwell, 1993) caben destacar los compuestos extraídos de semillas de *Trichila havanensis* (Meliaceae) que muestran actividad antialimentaria frente a larvas de *Spodoptera littoralis* (López-Olguín, 1997) y poseen actividad antialimentaria frente a larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata* (López-Olguín, 1998)

### 1.3. ESCARABAJO DE LA PATATA, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

#### 1.3.1 SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

La ubicación taxonómica de *L. decemlineata* es la siguiente (Balachowsky, 1963):

PHYLLUM:	Arthropoda
ORDEN:	Coleoptera
SUBORDEN:	Polyphaga
SUPERFAMILIA:	Phytophagoidea
FAMILIA:	Chrysomelidae
SUBFAMILIA:	Chrysomelinae
TRIBU :	Doryphorini (= Zygommini)
GÉNERO:	<i>Leptinotarsa</i>
ESPECIE:	<i>L. decemlineata</i> (Say, 1824)

El género *Leptinotarsa* Stal, 1858, tiene las sinonimias *Doryphora* Say, 1824; *Polygramma* DeJean, 1837; *Chrysomela* Stal, 1858 y *Myocoryna* Jacoby, 1883 (Jacques, 1988).

Los huevos son de forma ovoide. Recién puestos son de color amarillo claro que torna a anaranjado y rojizo a medida que se acerca la eclosión (Fig. 1.2a).

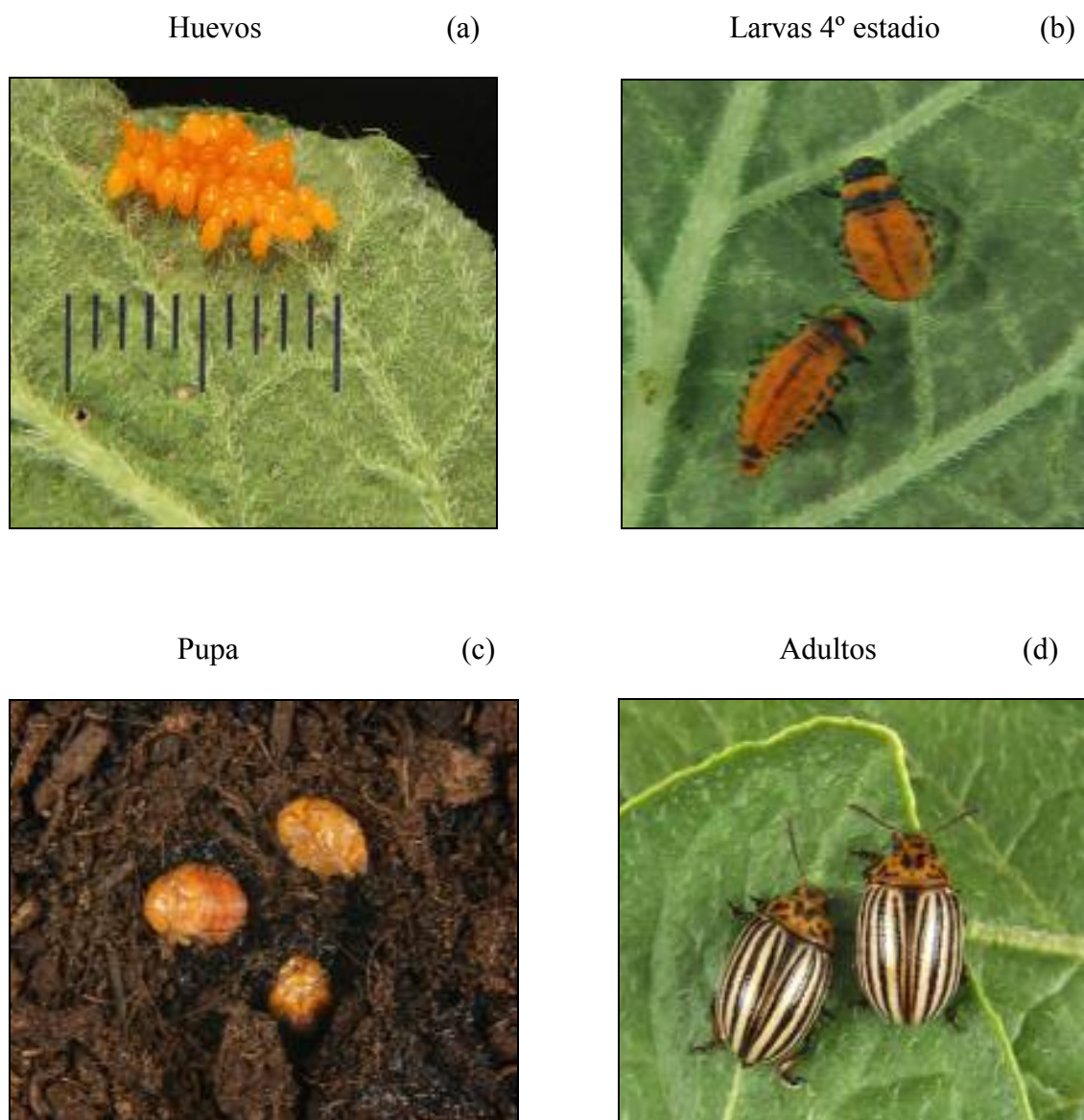
Las larvas son de color rojizo que pasan a un tono más claro en los últimos estadios, en los que se observa en la cabeza el anillo protorácico y dos filas de manchas negras en los costados del abdomen (Fig. 1.2b)

La pupa, de color amarillento y de tipo exarata, mide paroximadamente 8 mm (Grison, 1963) (Fig. 1.2c)

El adulto es un pequeño escarabajo de aproximadamente 1 cm de longitud. El color generalizado es amarillo pálido a ocráceo, con pequeñas manchas negras en la cabeza y protórax, entre las que destaca las de la parte media en forma de H. Los élitros son de tono amarillo pajizo, cada uno con cinco líneas negras longitudinales, a las que alude la denominación específica del insecto (Fig.1.2d). El nombre genérico *Leptinotarsa* se refiere a la extremada delgadez de sus tarsos, que obliga al adulto a apoyarse en toda la longitud de ellos durante la locomoción (Jacques, 1988).

### 1.3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El centro de origen de *L. decemlineata* parece ser el centro de México donde sus principales plantas hospedantes son *Solanum rostratum* y *S. angustifolium* (Solanaceae), probablemente también originarias de México (Whalen, 1979). Actualmente *L. decemlineata* se encuentra en América (Costa Rica, Guatemala, Cuba, México, Estados Unidos y sur de Canadá), Africa (Libia), Asia (Irán, China y Japón), en prácticamente toda Europa y en los países de la franja sur de la antigua Unión Soviética (CAB International, 1991).

Figura 1.2.: Ciclo biológico de *L. decemlineata*

### 1.3.3 BIOLOGÍA, DAÑOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA

Los adultos pasan el invierno en diapausa, enterrados en el suelo y emergen en primavera para alimentarse. Después del acoplamiento y tras alimentarse unos 5-10 días inician la puesta de huevos, que se realiza en plastones de 20 a 60, preferentemente sobre el envés de hojas de patata.

Los adultos viven en promedio 5 semanas y la hembra pone entre 500 y 1000 huevos durante ese tiempo. Entre los cuatro y ocho días, dependiendo de la temperatura,

sucede la eclosión y la larva empieza a alimentarse de las yemas foliares y hojas más tiernas. Las larvas pasan por cuatro estadios y completan su desarrollo en 10 a 20 días dependiendo de la temperatura (Ferro, 1985). Al final del cuarto estadio, la larva abandona la planta y se entierra en el suelo para pupar. Después de 8 a 12 días emergen los nuevos adultos (Jacques, 1988).

Los daños a la planta son ocasionados por la acción conjunta de larvas de diferentes estadios y adultos, y consisten en la destrucción de hojas y tallos tiernos, con la consiguiente paralización en el desarrollo de los tubérculos.

*L. decemlineata* es una especie defoliadora, que además de sus principales plantas hospedantes *S. rostratum*, *S. angustifolium* y la patata cultivada (*S. tuberosum*), ataca ocasionalmente a la berenjena (*S. melongena*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y otras especies de Solanáceas cultivadas y silvestres (Jacques, 1988).

#### 1.3.4. CONTROL Y ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS

*L. decemlineata* fue reconocida como plaga de la patata en el estado de Colorado USA en 1861 y desde entonces, se han usado diferentes métodos para su control. En los primeros años se utilizaron métodos domésticos poco satisfactorios, hasta el descubrimiento en 1871 de una mezcla a base de “verde de parís” (acetoarsenito de cobre), que resultó eficaz y enseguida se generalizó su empleo entre los agricultores. Luego se continuó hasta finales de los años 40 con los insecticidas arsenicales y con el DDT, que estuvo disponible a partir de 1945 (Casagrande, 1987).

La alta presión de selección ejercida sobre las poblaciones de *L. decemlineata* por los insecticidas, indujo el desarrollo de resistencia a los arsenicales en los Estados Unidos desde mediados de los años 40 y al DDT desde 1952. El primer país europeo donde se registró resistencia al DDT fue en España a partir de 1955 y posteriormente se detectó en otros países de Europa (Forgash, 1987). Desde entonces, en diversas partes del mundo muchas poblaciones de *L. decemlineata* han desarrollado resistencia a ciclodienos, organofosforados, carbamatos y piretroides (Georghiou y Mellon, 1983).

El desarrollo de resistencia y los efectos secundarios derivados del uso de insecticidas, ha estimulado el análisis e investigación de técnicas para el control de *L. decemlineata* como son entre otras el uso de variedades de patata resistentes y el control biológico (Ferro, 1985; Casagrande, 1987; Hare, 1990; Cappaert et al., 1991). Fruto de estas investigaciones se han comercializado patatas transgénicas resistentes a *L. decemlineata* que expresan la endotoxina Cry3A de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (patatas-Bt) (Feldman y Stone, 1997).

Entre las sustancias vegetales más prometedoras, los extractos y fracciones constituidas por mezclas ofrecen buenas perspectivas, ya que su efecto combinado es probablemente más estable que el efecto de los compuestos simples (Jermy, 1990). La búsqueda de sustancias de origen vegetal con nuevos modos de acción puede ser compatible con los sistemas del control integrado del escarabajo de la patata.

Se han evaluado extractos crudos y fracciones derivadas de distintas especies vegetales contra *L. decemlineata* con resultados prometedores. Hough-Goldstein (1990), informó que extractos acuosos de plantas de distintas familias con antecedentes de uso para control de otros insectos, ocasionaron una potente actividad antialimentaria. Cuñat et al. (1990), observaron que fracciones de extractos metanólicos o diclorometánicos obtenidos de 12 especies vegetales de la flora mediterránea española mostraron alta actividad ovicida.

Un buen número de compuestos puros también han sido evaluados. La rodojaponina III, un diterpeno aislado de *Rhododendron molle* (Ericaceae), mostró actividad antialimentaria, inhibición del desarrollo y actividad insecticida frente a larvas de *L. decemlineata* (Klocke y Kubo, 1991), en tanto que en ensayos de invernadero aplicado sobre el follaje a 150 ppm, protegió a las plantas con una reducción altamente significativa del índice de daño (Hu et al., 1993).

Del grupo de los sesquiterpenos, un bisaboleno y un silfineno aislados de *Senecio palmensis* (Asteraceae), mostraron alta actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata* y ensayos nutricionales indicaron que la inhibición de la alimentación fue el modo de acción primario del bisaboleno, en tanto que el silfineno mostró efecto antialimentario y tóxico combinados (González-Coloma et al., 1995).

También los sesquiterpenos polygodial y warburganal han mostrado alta actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata*, indicando que además del efecto disuasorio, estos compuestos tienen propiedades tóxicas que afectan el comportamiento de alimentación (Gols et al., 1996).

Otro tipo de compuestos que han sido evaluados frente a larvas de *L. decemlineata* son los diterpenos neo-clerodánicos eriocephalina, teucrina A, teucvina y teuscorolido. En ensayos de preferencia y no-preferencia con discos foliares de patata se determinó que los cuatro compuestos reducen significativamente el consumo de alimento de las larvas. En base al análisis de los índices de actividad antialimentaria, apoyado con los resultados de experimentos nutricionales, se concluyó que la teucrina A tiene un modo de acción tóxico (Ortego et al., 1995). Algunas scutalpinas extraídas de plantas de *Scutellaria alpina* (Labiatae) han mostrado tanto un modo de acción tóxico (scutalpina I) como disuasorio (scutalpina B) (López-Olguín, 1998).

Diversos estudios han mostrado que la limonina y otros limonoides de plantas del género *Citrus* (Rutaceae), son potentes inhibidores de la alimentación y del desarrollo de *L. decemlineata*. En ensayos de preferencia y no-preferencia se ha observado una alta actividad antialimentaria y de inhibición del crecimiento a partir de concentraciones de 10 µg/disco foliar de limonina (Alford et al., 1987; Mendel et al., 1991a) de epilimonol y de diosfenol limonina (Liu et al., 1989, 1990). Los estudios del modo de acción han indicado que la limonina, obacunona y nomilina actúan como toxinas (Alford et al., 1987; Mendel et al., 1991a,b), en tanto que el epilimonol y la diosfenol limonina tienen un modo de acción antiapetitivo (Liu et al., 1990, 1991). Bentley et al. (1988, 1990) determinaron que los grupos epóxido y furánico de la limonina y otros limonoides relacionados, son importantes para que se manifieste alta actividad antialimentaria. También se ha estudiado el efecto de un extracto crudo con 78% de limonina y 18% de nomilina obtenido por Murray et al. (1993), sobre la colonización y oviposición de *L. decemlineata* (Murray et al., 1995), así como sobre la supervivencia y el desarrollo en condiciones de invernadero y campo (Murray et al., 1996). Estos resultados sugieren un alto potencial de los limonoides de *Citrus* para el control de esta plaga.



En ensayos de laboratorio y campo, extractos del “neem” causaron inhibición de la alimentación de larvas y adultos de *L. decemlineata* (Zehnder y Warthen, 1988; Schmutterer, 1990; Kaethner, 1992; Schmutterer, 1990), inhibición del desarrollo post-embrionario y reducción en la reproducción de adultos (Steets, 1976), reducción de la fecundidad (Schmutterer, 1990; Kaethner, 1992), efecto regulador del desarrollo (Schmutterer, 1990) y altos niveles de mortalidad (Steets, 1976; Zehnder y Warthen, 1988). Lopez-Olguín (1998) encontró que limonoides de *T. havanensis*, poseían un modo de acción similar a la azadiractina sobre larvas de *L. decemlineata*. Podemos concluir, que los limonoides, principales compuestos activos de estos productos vegetales, tienen un amplio potencial como agentes de control de esta plaga.

#### 1.4 GARDAMA, *Spodoptera exigua* (Hübner)

##### 1.4.1 SISTEMÁTICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

La ubicación taxonómica de *S. exigua* es la siguiente (Balachowsky, 1972):

PHYLLUM:	Arthropoda
ORDEN:	Lepidoptera
SUBORDEN:	Heteroneura: Ditrysia
SUPERFAMILIA:	Noctuoidea
FAMILIA:	Noctuidae
SUBFAMILIA:	Amphipyriinae
TRIBU:	Amphipyriini
GÉNERO:	<i>Spodoptera</i>
ESPECIE:	<i>S. exigua</i> (Hübner, 1808)

El nombre genérico tiene distintas sinonimias: *Laphygma* Gueneé, 1852; *Prodenia* Gueneé, 1852; *Rusidrina* Staudinger, 1892 (Gómez y Arroyo, 1981).

Los nombres vulgares de uso más generalizado son “gardama”, “rosquilla verde” y “gusano soldado de la remolacha” (Arroyo, 1995).

Los adultos (Fig. 1.3a) miden entre 25 y 30 mm de envergadura. Se caracterizan por tener las alas posteriores blancas semi-transparentes, surcadas por nervaduras oscuras. Las alas anteriores son gris parduscas o cenizas, con finas líneas transversales y presentan un dibujo reniforme y orbicular de color amarillo ocre pálido característico de la especie (Balachowsky, 1972).

Los huevos (Fig. 1.3b) miden de 0,35 a 0,37 mm. Son esféricos con la base plana y estrías longitudinales. Recién puestos son de un color blanco amarillento que vira a verde claro y finalmente a marrón oscuro cuando la larva está próxima a eclosionar. Son depositados en plastones de dos o tres capas cubiertos con escamas de la hembra (Gómez de Aizpurúa, 1992).

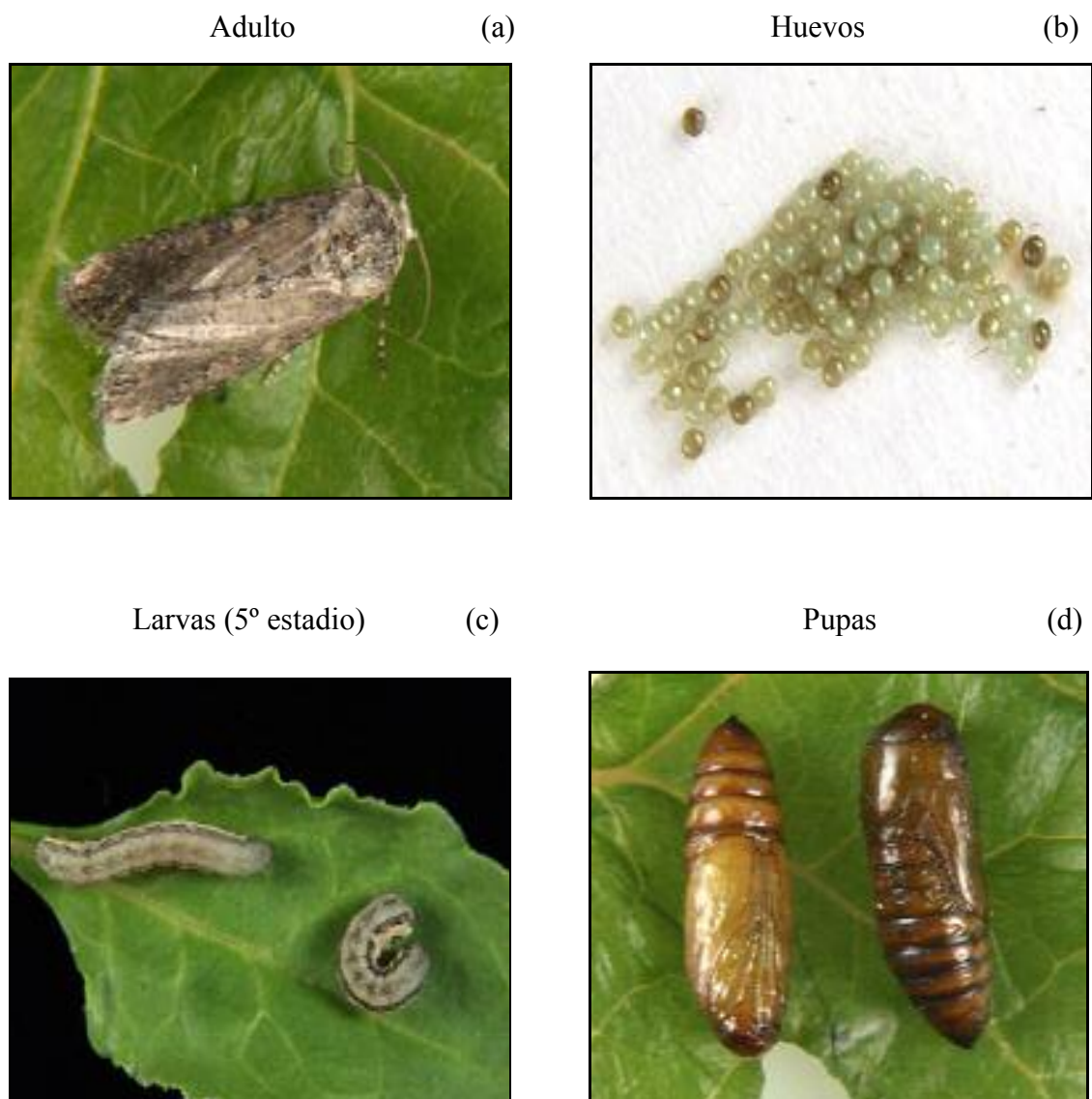
Las larvas (Fig. 1.3c) en su máximo desarrollo llegan a alcanzar hasta 3,6 cm de longitud. Son de tipo euriciforme, de color variable que depende de la alimentación, desarrollo y nivel de gregarismo. Pueden ser de colores claros en los primeros estadios, que se tornan a amarillo verdoso, gris oscuro o marrón pardusco a medida que se desarrollan. Presentan estigmas ocre amarillento bordeados por una línea oscura, líneas laterales de color amarillo claro a la altura de los estigmas y líneas dorsales de color verde oscuro (Balachowsky, 1972). La cabeza es ocre oscuro con reticulado pálido y placas adfrontales blanquecinas (Gómez de Aizpurúa, 1992).

Las pupas (Fig. 1.3d) miden aproximadamente un centímetro de longitud. Son fusiformes de color amarillento a marrón, con poco bajorrelieve pero bien dibujado. El cremaster está compuesto por dos finas espinas.

#### **1.4.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

Es una especie cosmopolita con distribución en África (costa del Mar Mediterráneo y mitad sur del continente), América (norte de México, los Estados Unidos, Islas Hawai y lugares localizados del sur de Canadá), Asia (sur de Asia, incluido Japón y Filipinas), Australia y Europa (Los Balcanes, orillas del Mar Negro, Italia, sur de Francia, toda la Península Ibérica (CAB International, 1972).

Figura 1.3: Ciclo biológico de *S. exigua*.



### 1.4.3 BIOLOGÍA, DAÑOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La emergencia de adultos ocurre durante la noche, horas en que desarrollan mayor actividad y durante el día permanecen ocultos en la vegetación en zonas próximas al suelo. El tiempo de maduración de los órganos genitales, tiempo de inicio del acoplamiento, inicio de la oviposición y la fecundidad varían con la época del año; así por ejemplo, el acoplamiento puede realizarse entre las 24 y 48 horas después de la

emergencia en primavera, mientras que en otoño el tiempo aumenta hasta los cinco días (Balachowsky, 1972).

La pupación se realiza en el suelo. El estado de pupa tiene una duración media de 10 días a 25 °C (Balachowsky, 1972).

*S. exigua* es una plaga polífaga, que ataca a más de 35 cultivos alrededor del mundo (Trumble et al., 1990). Se ha citado causando daños importantes en pimiento, patata, tabaco y soja (Yoshida y Parrela, 1992). En España se considera muy perjudicial en vid, tomate, pepino, alfalfa y en guisante (Gómez de Aizpurúa, 1992); así como en cultivos protegidos de pimiento y sandía en Almería (Marco y Viñuela, 1994). El daño principal es ocasionado por las larvas al alimentarse del follaje y tallos jóvenes de las plantas, lo que ocasiona reducciones significativas en los rendimientos.

#### 1.4.4 CONTROL Y ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ALELOQUÍMICOS

La frecuencia en el uso de insecticidas para el control de esta plaga en diversos cultivos, ha ocasionado que poblaciones de esta especie hayan desarrollado resistencia a distintos grupos de insecticidas, entre ellos a organoclorados, organofosforados y a algunos piretroides (Georghiou y Mellon, 1983), carbamatos (Brewer y Trumble, 1989) y recientemente se han observado niveles de tolerancia a las benzoilfenilureas diflubenzurón, hexaflumurón y teflubenzurón (Van Laecke y Degheele, 1991; Van Laecke et al., 1995). En España, se ha confirmado resistencia de *S. exigua* a lindano (Torres-Vila et al., 1998) y existen indicios de haber desarrollado resistencia al regulador del crecimiento flufenoxurón y a varios piretroides (Viñuela, 1998).

En este contexto, los extractos y fracciones de origen vegetal ofrecen buenas perspectivas debido a que su múltiple composición puede involucrar diferentes modos de acción y, por tanto retrasar el desarrollo de resistencia (Jermy, 1990). Existe abundante información acerca de la actividad antialimentaria de compuestos naturales sobre larvas de *S. littoralis* y *S. frugiperda* (Belles, et al., 1985; Bruno et al., 2000). Sin embargo, la utilidad de estos compuestos sobre *S. exigua* ha sido poco considerada.

Rodríguez-Saona y Trumble (1996), observaron que un extracto de aceite del fruto del aguacate fue tóxico sobre larvas de *S. exigua*. En ensayos de preferencia se observó una mayor proporción de larvas neonatas sobre dieta control que en dieta tratada a partir de 0,1% del extracto, indicando un claro efecto disuasorio del producto. Mediante un fraccionamiento dirigido, Rodríguez-Saona et al. (1997) aislaron e identificaron a uno de los compuestos activos como el persin (cetoalcohol graso). Aerts et al., (1992) evaluaron el efecto de extractos de hojas y raíces de *Cinchona ledgeriana* Moens (Rubiaceae) con alto contenido en alcaloides, sobre *S. exigua*. El extracto de hojas adicionado a la dieta, conteniendo alcaloides de tipo cinchofilina y en baja proporción al alcaloide 5-metoxitriptamina, ejerció un fuerte efecto negativo sobre el desarrollo de las larvas, mientras que los alcaloides presentes en el extracto de raíces no tuvieron efecto. Estudios específicos indicaron que los alcaloides de tipo cinchofilina fueron los principios activos y que su presencia en las hojas formaba parte de una estrategia defensiva de la planta frente a insectos fitófagos. Asimismo, se ha podido comprobar la toxicidad frente a esta especie del neem, observándose la mortalidad más alta durante la muda, lo que sugiere una actividad similar a la de un regulador del desarrollo (Prabhaker et al., 1986).

Al igual que con extractos vegetales, hay poca información sobre la actividad biológica de compuestos puros aislados de plantas frente a *S. exigua*. Zhang et al., (1993) evaluaron el efecto de los glucósidos triterpénicos chaparrina y chaparrinona aislados de *Castela tortuosa* (Simaroubaceae), sobre la supervivencia y el desarrollo de las larvas. Otros compuestos como furanocumarinas mostraron actividad antialimentaria en bioensayos de preferencia frente a larvas de *S. exigua* (Berdegué et al., 1997), mientras que el alcaloide cinchona redujo el crecimiento, retrasó el desarrollo y aumentó la mortalidad de larvas (Aerts et al., 1992). Lopez-Olguín (1998) encontró que algunos limonoides extraídos de plantas de *T. havanensis* mostraban actividad antialimentaria frente a esta especie, con un modo de acción tóxico. También comprobó que diterpenos *neo-clerodánicos* de *S. alpina* tenían una significativa actividad antialimentaria. De igual manera, Gebbinck et al. (2002) encontró que algunos derivados de ajugarinas poseían actividad antialimentaria frente a larvas de *S. exigua*.

## 1.5. OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS

Se ha evaluado la actividad insecticida de terpenoides de origen botánico y derivados hemisintéticos, que por su especificidad y menores efectos secundarios puedan eventualmente incluirse en programas de control integrado del escarabajo de la patata (*L. decemlineata*) y de la gardama (*S. exigua*). Se han escogido estas dos especies por su importancia económica y por sus distintos hábitos alimenticios, ya que el escarabajo de la patata es una especie oligófaga y la gardama es polífaga. Además, el hecho de que pertenezcan a dos de los órdenes (Coleoptera y Lepidoptera) con mayor número de especies fitófagas, hace que puedan servir como especies modelo.

Los objetivos concretos abordados son:

1. Determinación de la actividad antialimentaria de terpenoides naturales y hemisintéticos frente a larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua*.

2. Evaluación de la interacción estructura-actividad biológica en ambas plagas. Una vez determinada la actividad antialimentaria de los terpenoides estudiados, se ha analizado esta actividad en relación a los diferentes grupos funcionales de los compuestos.

3. Determinación del modo de acción (tóxica o disuasoria de la alimentación) de los terpenos que mostraron alta actividad insecticida.

4. Efectos sobre las enzimas de detoxificación en el tracto digestivo de larvas de *S. exigua* de un diterpeno con actividad tóxica y otro con actividad disuasoria de la alimentación.

# CAPÍTULO 2

## Material y Métodos

---

### 2.1. INSECTOS

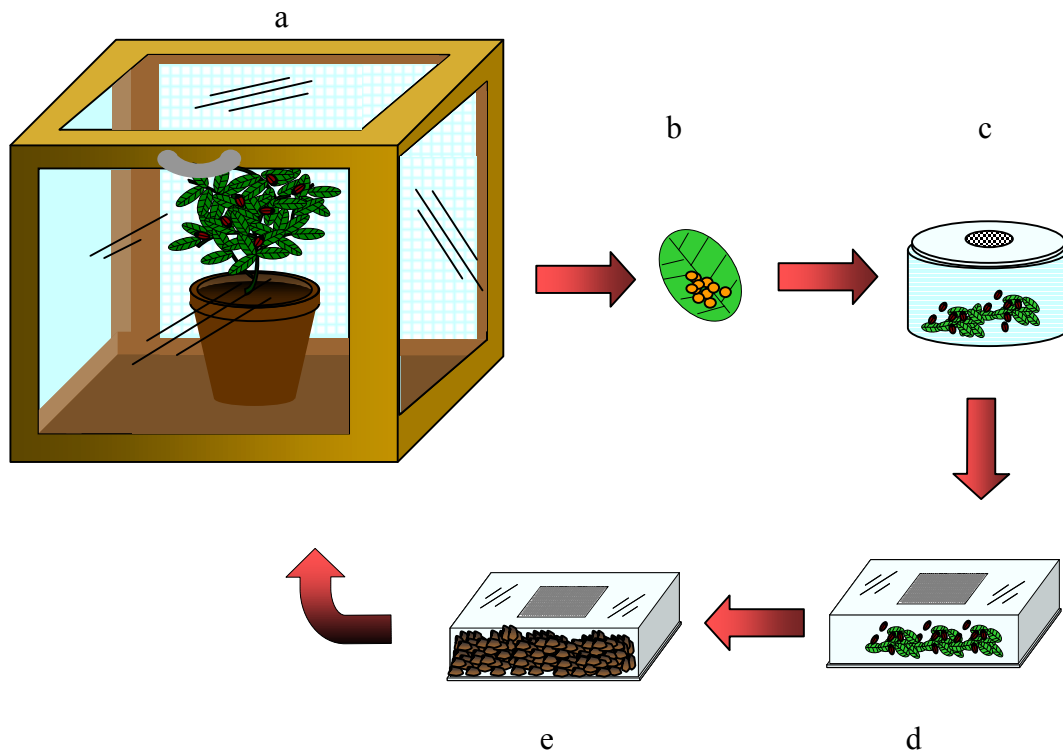
#### 2.1.1. CRÍA DE *L. decemlineata* EN LABORATORIO

Para los ensayos realizados con esta especie se contaba con una población de laboratorio, que se estableció a partir de aproximadamente 120 adultos recogidos en la provincia de Ávila y que anualmente se renovaba con la introducción de nuevos individuos de campo.

La población de laboratorio se mantuvo en una cámara climatizada a  $25\pm 2$  °C,  $>75$  % de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). Los adultos se alimentaron de plantas de patata situadas en jaulas de 70x50x50 cm con la base y el marco de madera, los lados y techo de cristal para permitir una buena iluminación y el fondo de tela de “visillo” para una correcta aireación (Fig.2.1a). Los huevos se recogían cortando las hojas de patata donde las hembras realizaban la puesta (Fig.2.1b) y se colocaban dentro de cajas cilíndricas de plástico con tapa de 11x 5 cm provistas de un orificio de 2 cm de diámetro cubierto con una tela metálica para permitir la ventilación, donde se mantenían hasta la eclosión (Fig.2.1c). Las larvas se alimentaban con hojas de patata en cajas de 21 x 16 x 4 cm durante todo su desarrollo (Fig.2.1d) y al llegar a prepupa se ponían en cajas de 21 x 14 x 10 cm,

con sustrato universal Flora gard, donde pasaban enterradas el estado pupal (Fig.2.1e).

Fig. 2.1: Cría de *L. decemlineata* en laboratorio



### 2.1.2. CRÍA DE *S. exigua* EN LABORATORIO

La población de *S. exigua* fue inicialmente establecida con unas 300 larvas procedentes del laboratorio del Profesor van der Meijden, (Universidad de Leiden, Países Bajos).

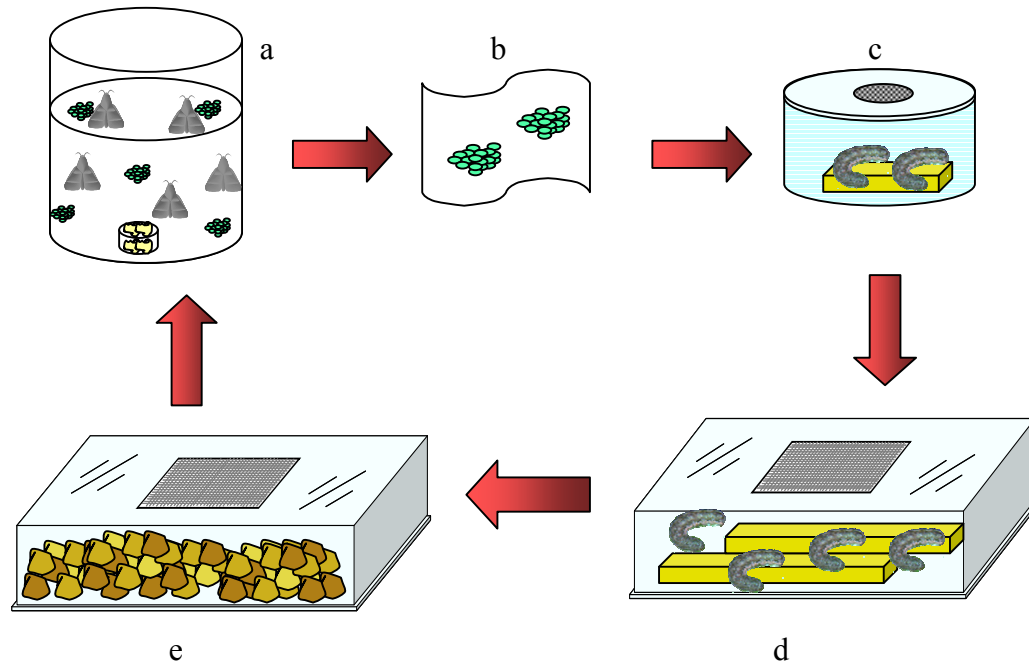
Los ponederos para los adultos consistieron en recipientes cilíndricos de plástico, de 15 cm de altura y 10 cm de diámetro, abiertos por la parte superior. Esta parte se tapaba con papel de filtro sujeto con una goma elástica. El interior del recipiente se forraba con papel de filtro donde las hembras realizaban las puestas. Los adultos se alimentaban de una solución de agua destilada y miel al 10% que se colocaba sobre algodón en pequeños recipientes de plástico, dentro de los ponederos



(Fig. 2.2a). Los huevos se recogían recortando la sección de papel donde se depositaban las puestas (Fig. 2.2b) y se ponían en cajas cilíndricas similares a las descritas anteriormente (Fig. 2.2c). Las larvas eclosionaban en estos recipientes y cuando alcanzaban el tercer estadio se trasladaban a cajas rectangulares de plástico de 25x18x10 cm (Fig 2.2d). Las larvas se alimentaron durante todo su desarrollo con una dieta semisintética, modificada a partir de Poitout & Bues (1970) por la adición de 0,63% (p/p) de la mezcla de sales minerales de Wesson (Sigma, San Louis, USA). Al alcanzar el último estadio larvario se añadía vermiculita a las cajas de cría para que las larvas se enterraran para pupar (Fig. 2.2e).

Todo el proceso de cría se realizó en una cámara climatizada a  $25\pm 2$  °C, >75% de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad).

Fig. 2.2: Cría de *S. exigua* en laboratorio.



## 2.2. MATERIAL VEGETAL

### 2.2.1. PLANTAS DE PATATA

Cada semana se sembraban tubérculos de patata, *Solanum tuberosum* var. Kennebec (Solanacea), en macetas de 20 cm de diámetro en la base por 25 cm de altura con sustrato universal Flora gard, y se mantenían a  $25\pm 1$  °C, >80 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 horas (luz:oscuridad), en una cámara Conviron S10H (Controlled Enviroments, Winnipeg, Canadá) (Fig. 2.3). Las plantas eran usadas para la cría de *L. decemlineata*, la puesta de huevos y la obtención de los discos foliares necesarios para los bioensayos.

**Fig. 2.3: Plantas de patata empleadas en la cría, mantenimiento y realización de bioensayos.**



### 2.2.2. PLANTAS DE REMOLACHA

Cada mes se sembraron semillas de remolacha azucarera, *Beta vulgaris* var. Roberta (Chenopodiaceae), en bandejas de (57x44x12) con sustrato universal Floragard, donde germinaban y se mantenían en las mismas condiciones que las plantas de patata (Fig. 2.4). Las plantas se utilizaban para la obtención de los discos foliares necesarios para los bioensayos de alimentación con larvas de *S. exigua*.

**Fig.2.4: Plantas de remolacha empleadas en la realización de bioensayos.**



### 2.3 OBTENCIÓN DE TERPENOIDES NATURALES Y DERIVADOS HEMISINTÉTICOS

Para el presente estudio fueron seleccionados tres grupos de terpenoides: diterpenos neo-clerodánicos, sesquiterpenos y limonoides. Dentro de cada grupo se utilizaron compuestos naturales que provenían de diferentes especies de plantas, y derivados hemisintéticos obtenidos por modificaciones estructurales de compuestos naturales abundantes.

La recolección del material vegetal y los procesos químicos para el aislamiento de los compuestos naturales y la obtención de los derivados hemisintéticos fueron realizados por el Profesor Benjamín Rodríguez en el Instituto de Química Orgánica (CSIC) de Madrid

### 2.3.1. DITERPENOS NEO-CLERODÁNICOS.

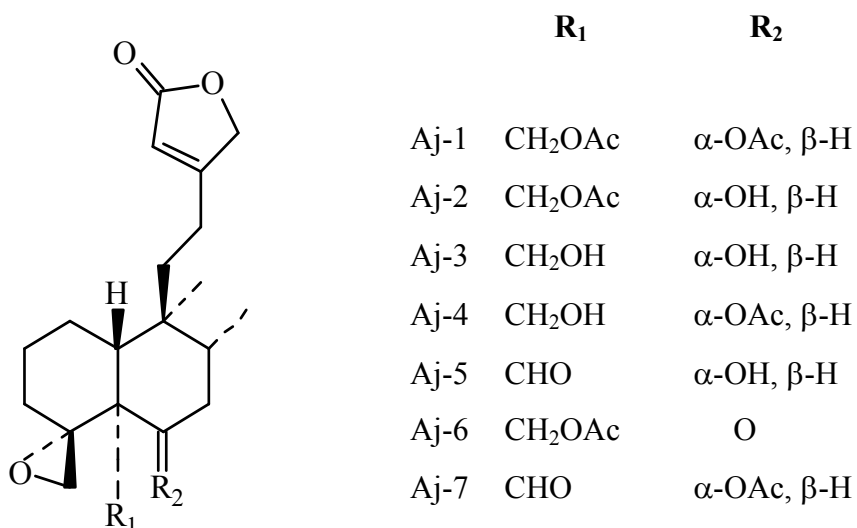
#### 2.3.1.1 AJUGARINAS Y TEUMASILENINAS.

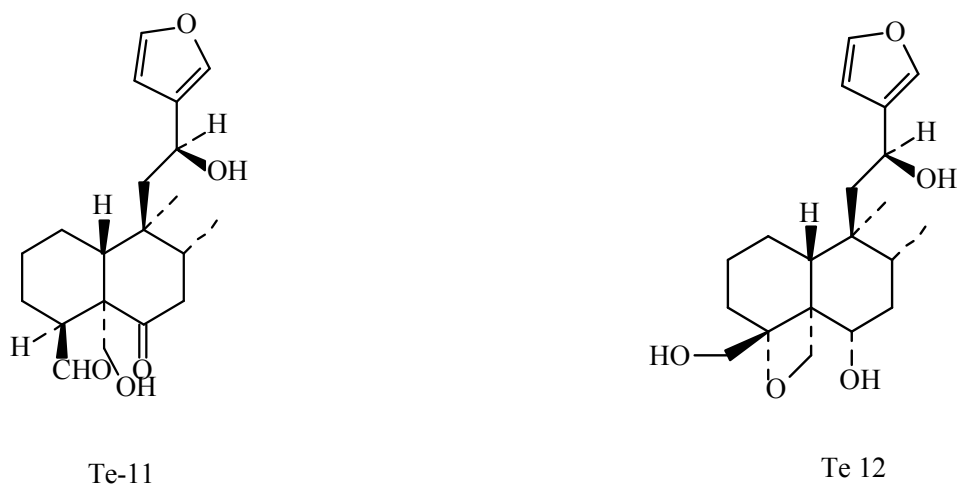
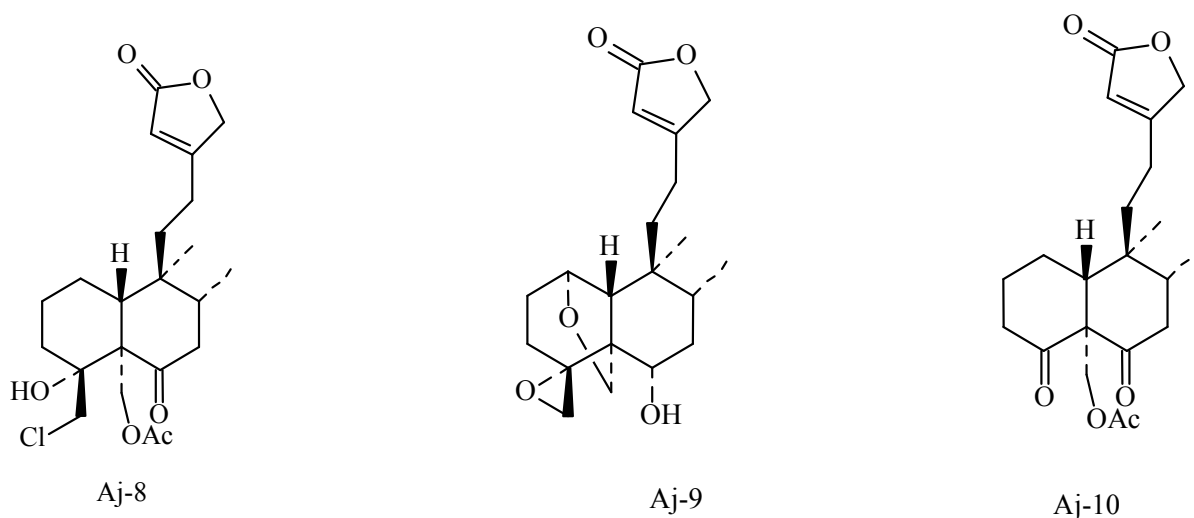
Desacetilajugarin II (**Aj-3**) y las teumasileninas A (**Te-11**) y C (**Te-12**) se obtuvieron mediante extracción acetónica de las partes aéreas de *Teucrium massiliense* L. (Labiatae) (Savona et al., 1984; Fontana et al., 1998). Las ajugarinas I (**Aj-1**) y II (**Aj-2**) se obtuvieron por tratamiento de la desacetilajugarin II con anhídrido acético/piridina, según el método descrito por Savona et al. (1984).

El resto de los compuestos (**Aj-4 -10**) son productos hemisintéticos obtenidos por modificaciones químicas a partir de las ajugarinas naturales descritas anteriormente.

Las estructuras químicas de las ajugarinas y teumasileninas empleadas se pueden observar en la figura 2.5.

**Fig. 2. 5: Estructura de las ajugarinas y teumasileninas utilizadas en los bioensayos.**



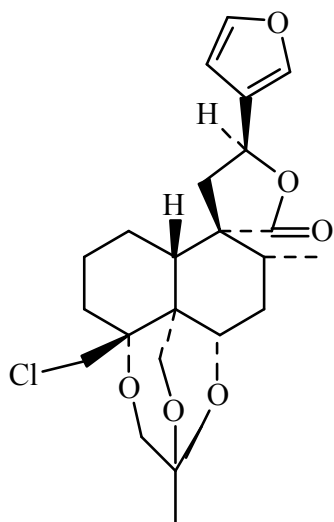


### 2.3.1.2. DERIVADOS DE 19-ACETILGNAPHALINA Y ERIOCEPHALINA.

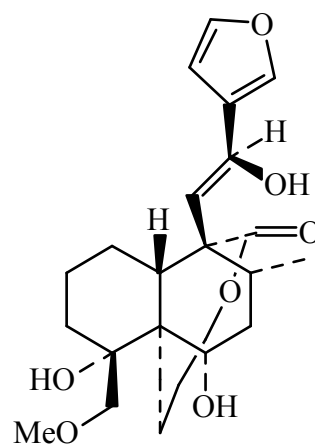
Los compuestos **M-1** a **M-5** (Fig. 2.6) se prepararon a partir de 19-acetilnaphalina (aislada de *Teucrium gnaphalodes* (Labiatae), Savona et al., 1979) por transformaciones químicas (Rodríguez et al, 1994). **M-6** (Fig. 2.6) se preparó a partir de **M-5** por tratamiento oxidativo con ácido *m*-cloroperbenzoico (M.C de la Torre, B. Rodríguez, resultados no publicados).

Los compuestos **M-7** a **M-10** (Fig. 2.6) se prepararon a partir de eriocephalina aislada de *Teucrium lanigerum* (Labiatae) (Fayos et al, 1979; Domínguez et al., 1991; Fernández-Gadea et al., 1984)

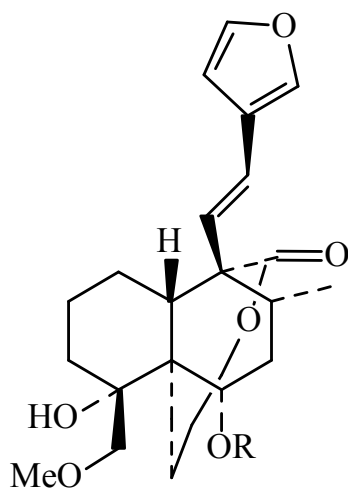
Fig. 2. 6: Estructura de derivados de 19-acetilgnaphalina y eriocephalina:



M-1



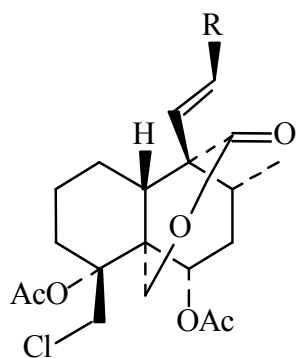
M-2



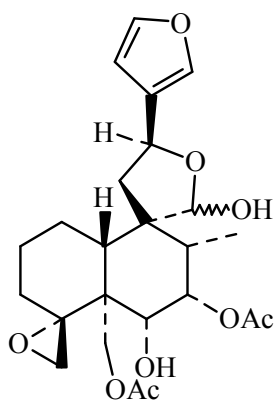
**R**

M-3 Ac

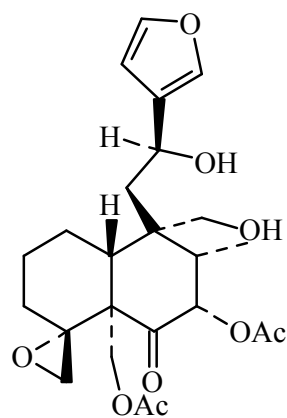
M-4 H



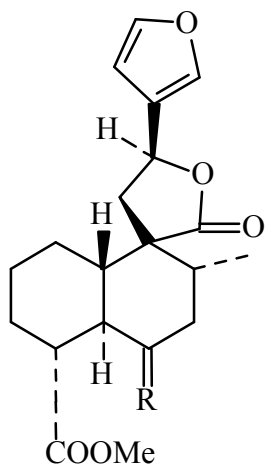
**R**  
M-5  $\beta$ -furilo  
M-6 COOMe



M-7



M-8

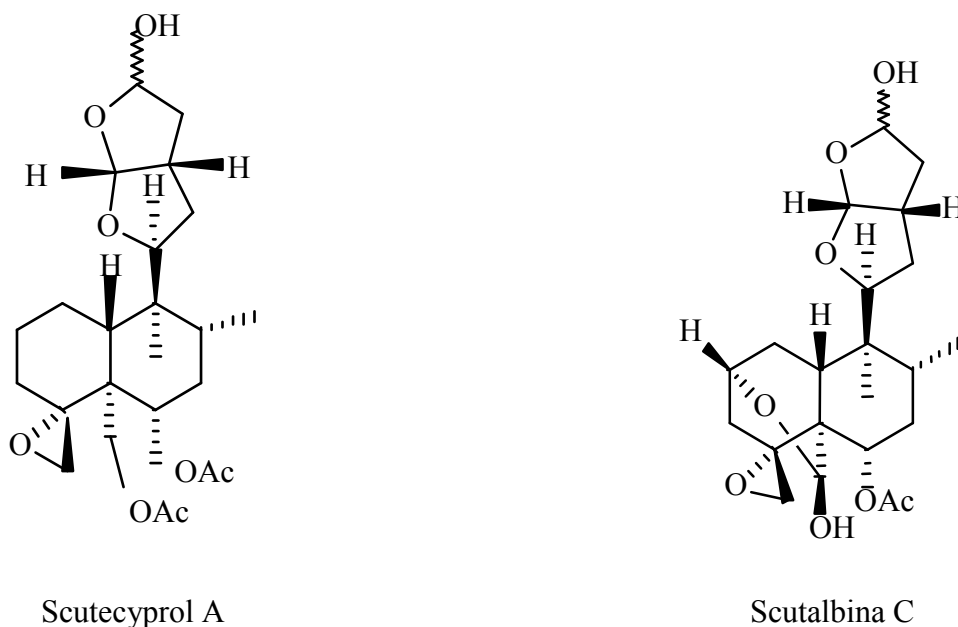


**R**  
M-9 O  
M-10 OH

### 2.3.1.3. SCUTECPROL A Y SCUTALBINA C.

Plantas de *Scutellaria valdiviana* (Clos) (Labiatae) fueron recolectadas en diciembre de 1999 cerca de Concepción (Chile). Se realizó una extracción acetónica de las partes aéreas de la planta y el extracto acetónico fue sometido a fraccionamiento cromatográfico en una columna de gel de sílice. Como eluyente se utilizó un gradiente de 100% éter de petróleo a 100% acetato de etilo, obteniéndose los compuestos naturales **scutecyprol A** (Bruno et al, 1996a) y **scutalbina C** (Bruno et al, 1996b) (Fig. 2.7).

Fig. 2.7: Estructura de los diterpenos neo-clerodánicos scutecyprol A y scutalbina C



### 2.3.2. SESQUITERPENOS.

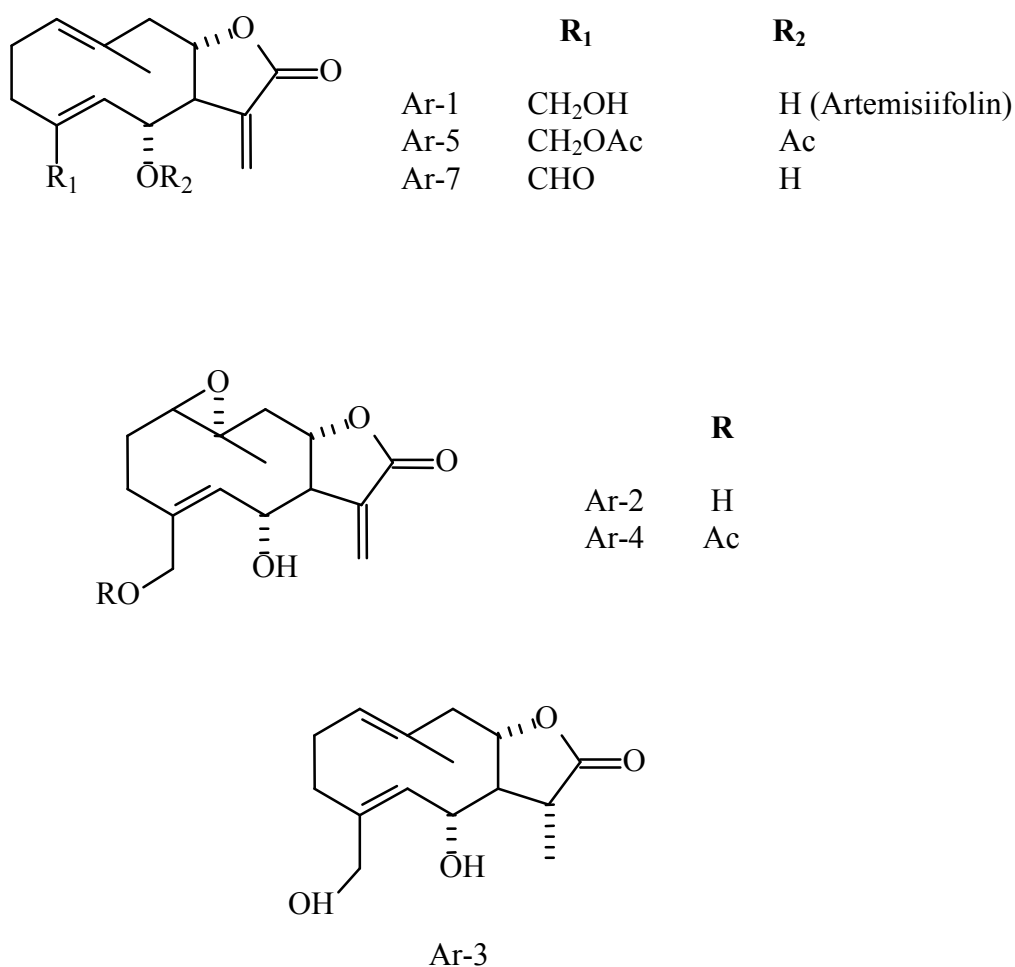
De la extracción acetónica de las partes aéreas de *Staehelina dubia* L. (Compositae) se obtuvieron los sesquiterpenos naturales artemisiifolin (**Ar-1**) y epoxiartemisiifolin (**Ar-2**). Del tratamiento de estos dos sesquiterpenos con anhídrido acético piridina se consiguieron los derivados **Ar-5** y **Ar-4** respectivamente. De una reducción de artemisiifolin con borohidruro sódico se

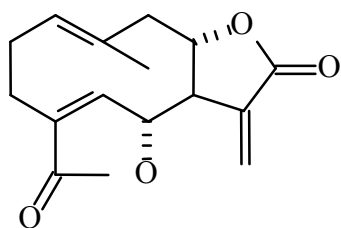


obtuvo el compuesto **Ar-3**. De la oxidación de **Ar-1** con dicromato de piridinio se obtuvo una mezcla de dos compuestos que se separaron por cromatografía en columna. Uno de esos derivados era la isabelina (**Ar-6**) (Tori et al, 1971), ya conocido como sustancia de origen natural, mientras que el otro responde a la estructura **Ar-7**, y se ha generado por oxidación parcial del grupo alcohólico primario a aldehído. (Jimeno et al , 2004)

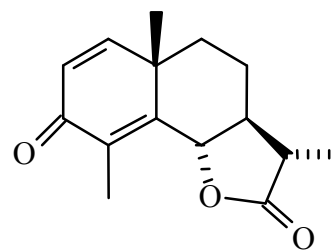
La santonina (**Ar-8**), compuesto natural que se encuentra en plantas del género *Atermisia* (Pinhey, et al, 1965), se compró a Fluka (ref, 84508). De la oxidación de santonina con ácido *m*-cloroperbenzoico se obtuvo el compuesto **Ar-10** y de la reducción con borohidruro sódico se consiguió el compuesto **Ar-9**. (de la Torre y Rodríguez, resultados no publicados).

**Fig. 2.8: Estructura de artemisiifolinas naturales y sus derivados**

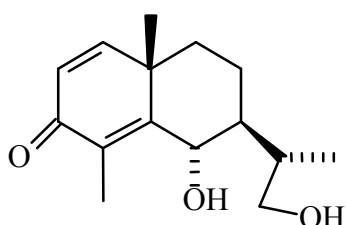




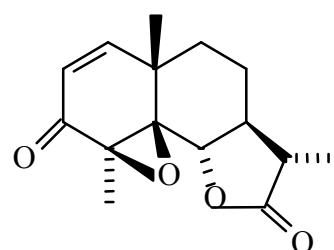
Isabelina (Ar-6)



Santonina (Ar-8)



Ar-9



Ar-10

### 2.3.3 LIMONOIDES.

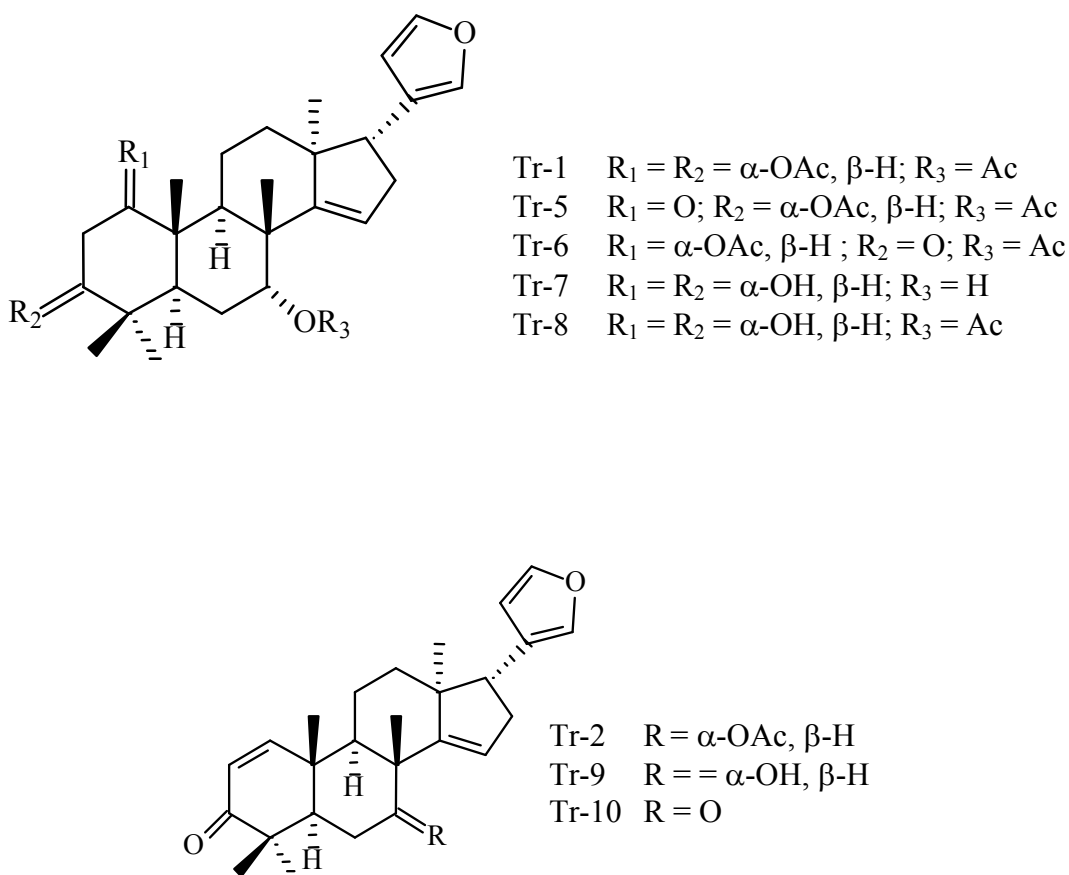
Del extracto acetónico de semillas de *Trichilia havanensis* Jacq. (Meliaceae) se obtuvieron grandes cantidades de 1,7- y 3,7-di-O-acetil-14,15-desoxihavanensinas y de azadirona (**Tr-2**) (Lavie et al, 1971).

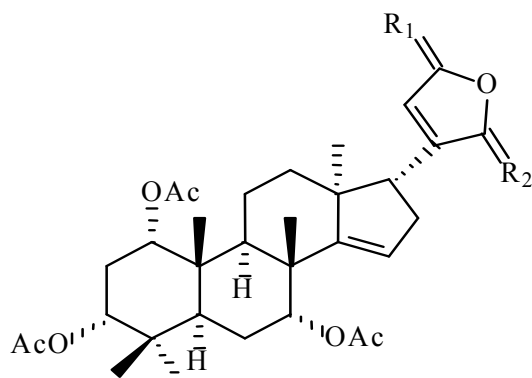
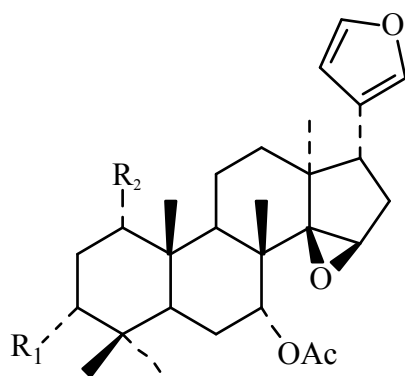
El tratamiento de 1,7-di-O-acetil-14,15-desoxihavanensina con anhídrido acético/piridina dio **Tr-1**, mientras que su oxidación con trióxido de cromo-piridina dio el derivado **Tr-6**. Por otro lado, la oxidación con el mismo reactivo de 3,7-di-O-acetil-14,15-desoxihavanensina proporcionó el derivado **Tr-5**. Cuando el compuesto **Tr-1** se oxidó con monoperoxifitalato de magnesio se obtuvo el derivado **Tr-3**, el cual se transformó en **Tr-4** por reducción con borohidruro sódico. La hidrólisis alcalina de **Tr-1** proporcionó los derivados **Tr-7** y **Tr-8**. Por tratamiento alcalino de azadirona (**Tr-2**) se obtuvo el derivado **Tr-9**, que posteriormente se oxidó (trioxido de cromo-piridina) al compuesto **Tr-10** (Rodríguez, 2003).

De los compuestos obtenidos (**Tr-1**, **Tr-3 a 10**) a partir de los componentes mayoritarios de *T. havanensis* [1,7- y 3,7-di-O-acetil-14,15-desoxihavanensinas y azadirona (**Tr-2**)], dos de ellos (**Tr-1** y **Tr-3**) son constituyentes minoritarios de esta especie botánica, mientras que la desacetilazadirona (**Tr-9**) y la 7-desacetil-7-oxoazadirona (**Tr-10**) son limonoides naturales aislados anteriormente de otras especies de Meliaceae. El resto de los derivados preparados (**Tr-4 a Tr-8**) son limonoides hemisintéticos que no han sido encontrados hasta ahora en fuentes naturales.

Los compuestos naturales 1,7-di-O-acetilhavanensina (**Tr-11**) y 3,7-di-O-acetilhavanensina (**Tr-12**), fueron obtenidos a partir de una extracción acetónica de las semillas de *T. havanensis* como detalla Lopez-Olguín (1998).

Fig. 2.9: Estructura de limonoides naturales y derivados



Tr-3  $R_1 = O$ ;  $R_2 = \alpha\text{-H}, \beta\text{-OH}$ ;Tr-4  $R_1 = O$ ;  $R_2 = H_2$ Tr-11  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = Ac$ Tr-12  $R_1 = Ac$ ;  $R_2 = OH$ 

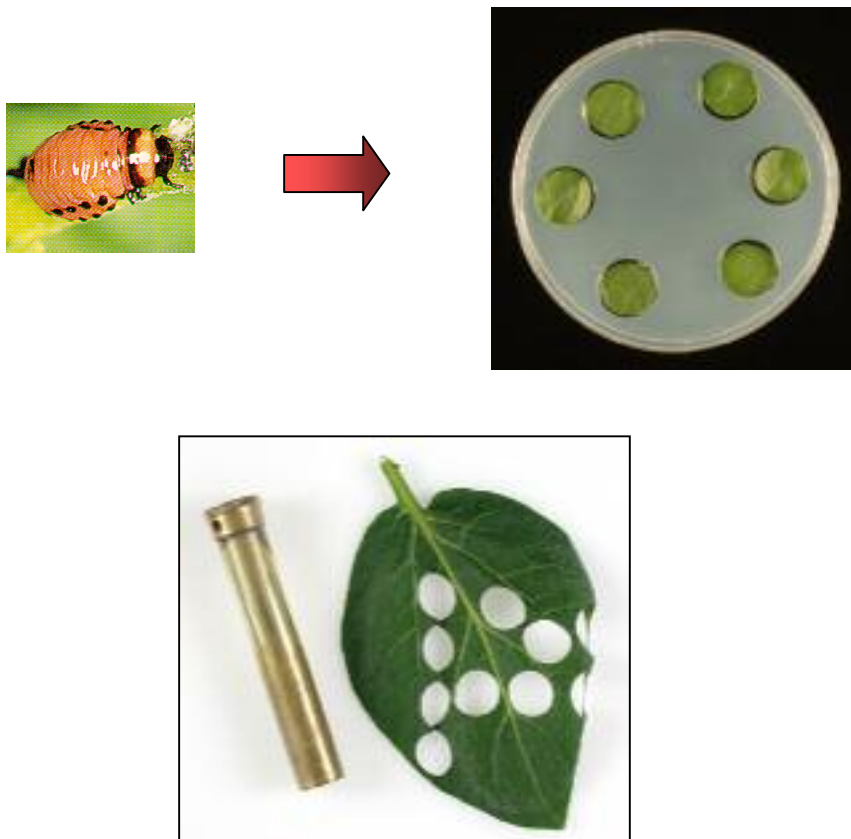
## 2.4. BIOENSAYOS

### 2.4.1. GENERAL

La actividad antialimentaria de extractos, compuestos purificados y derivados hemisintéticos se evaluó mediante ensayos de alimentación con discos foliares de la planta huésped, patata en el caso de *L. decemlineata* y remolacha para *S. exigua*. Entre los que mostraron mayor actividad, se seleccionaron tres compuestos para realizar ensayos nutricionales con el fin de evaluar sus efectos post-ingestivos.

En todos los casos, la unidad experimental (Fig. 2.10) consistió en una placa Petri de 15x90mm, con el fondo cubierto por una capa de unos 20ml de agar al 2.5%, para mantener frescos los discos foliares durante el ensayo (Escoubas et al., 1993). Sobre esta capa de agar se realizaron unos círculos con un sacabocados N° 17 (17 mm de diámetro) donde se colocaron los discos foliares de 15 mm diámetro. Los discos fueron tratados en superficie con 20  $\mu$ l del compuesto a evaluar, por medio de una pipeta Gilson 20  $\mu$ l (Gilson Medical Electronics, Francia). Una vez tratados todos los discos foliares y evaporado el solvente, se colocó dentro de cada placa una larva, mantenida en ayuno las 6 horas previas al ensayo, con un peso entre 42 - 46 mg para el caso de *L. decemlineata* (4° estadio) y entre 85 - 95 mg para *S. exigua* (5° estadio).

**Fig. 2.10: Unidad experimental utilizada en los bioensayos de alimentación.**



Se realizaron 10 repeticiones para los ensayos de actividad antialimentaria y 20 para los ensayos nutricionales. Las placas se colocaron al azar dentro de una cámara de crecimiento (MLR-350T, Sanyo, Japón), a una temperatura de  $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,  $>70\%$  de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 : 8 horas (luz : oscuridad)

#### **2.4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA**

La actividad antialimentaria se evaluó mediante ensayos de alimentación de corta duración, en condiciones de preferencia (con posibilidad de elección entre discos tratados y sin tratar) y no-preferencia (sin posibilidad de elección).

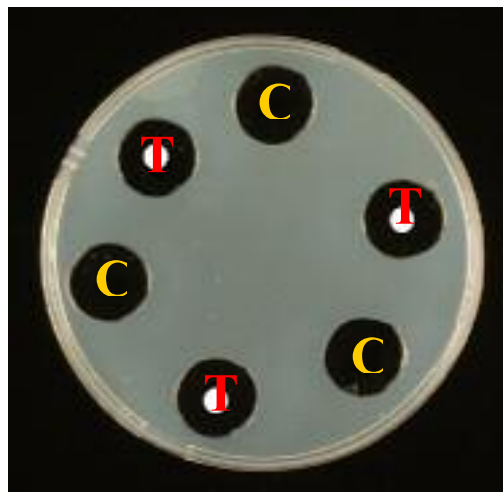
La concentración de los productos ensayados (peso del producto/peso fresco del disco foliar), fue de 5000 ppm en el caso de los extractos y de 1000 ppm para los compuestos puros y los derivados hemisintéticos.

Los datos de ingestión de los discos foliares se determinaron en peso seco. El peso seco inicial se estimó pesando los discos foliares en fresco y aplicándoles un factor de conversión de peso fresco a peso seco obtenido, en cada ensayo, con 10 grupos de seis discos foliares. El peso seco al final del ensayo se obtuvo secando los discos foliares no consumidos en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas y pesándolos posteriormente.

##### **2.4.2.1. ENSAYOS DE PREFERENCIA**

Este ensayo permite evaluar el efecto disuasorio para la alimentación de los compuestos. Se colocaron dentro de cada placa, seis discos foliares. A tres de los discos se les aplicó, de forma homogénea,  $20\ \mu\text{l}$  de una solución que contenía el producto a ensayar (discos tratados = T) y a los otros tres discos, se les aplicó únicamente  $20\ \mu\text{l}$  del solvente (discos control = C). Discos tratados y discos control se alternaron dentro de cada placa de forma que el insecto podía elegir entre discos foliares tratados y no tratados (Fig. 2.11). El ensayo finalizaba cuando la larvas consumían alrededor del 50% de los discos foliares.

**Fig. 2.11: Disposición de los discos foliares tratados (T) y no tratados (C) en las placas Petri empleadas en los ensayos de preferencia**



El **índice de disuasión (ID)** se calculó mediante la ecuación:

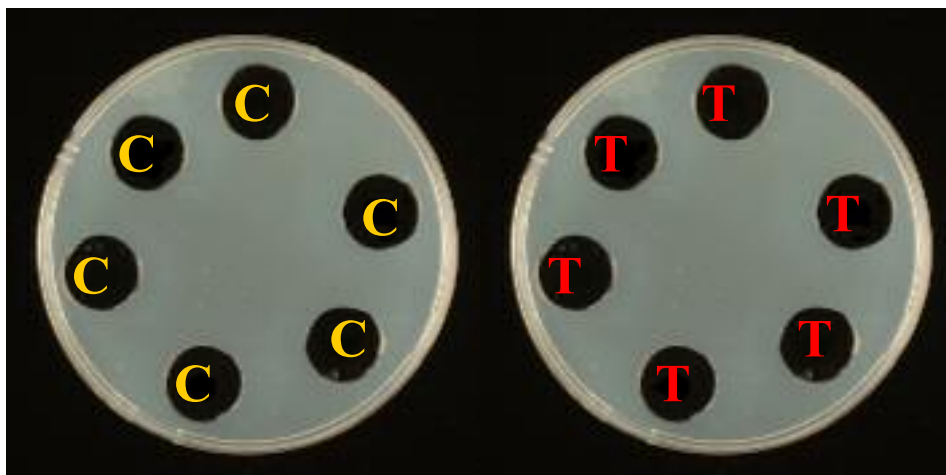
$$\text{ID} = [(C-T)/(C+T)] \times 100\%$$

Donde C = ingestión de discos foliares testigo y T = ingestión de discos foliares tratados. (Blaney *et al.*, 1987)

#### 2.4.2.2. ENSAYOS DE NO-PREFERENCIA

Este ensayo evalúa el potencial antiapetitivo de los compuestos para inhibir la alimentación del insecto en situaciones de no-elección. Los seis discos foliares se trataron con el producto de ensayo (tratamiento = T) ó únicamente con el solvente (placas testigo= C) (Fig. 2.12). El ensayo se dio por finalizado cuando las larvas habían ingerido el 75% de los discos foliares en las placas testigo.

Fig. 2.12. Disposición de los discos foliares tratados (T) y no tratados (C) en las placas Petri empleadas en los ensayos de no preferencia.



El **índice antiapetitivo (IA)**, se obtuvo de acuerdo con Bentley *et al.* (1984), mediante la ecuación:

$$IA = [(C-T)/C] \times 100\%$$

Donde: C = ingestión de discos foliares testigo y T = ingestión de discos foliares tratados.

#### 2.4.3. ENSAYOS NUTRICIONALES

Se han realizado ensayos para calcular los índices nutricionales con algunos de los compuestos que mostraron mayor actividad antialimentaria, con el fin de evaluar sus efectos sobre la fisiología de las larvas y confirmar su modo de acción (tóxico o antiapetitivo). Concretamente, se han ensayado **Te-11** y **Te-12** frente a *L. decemlineata* y **scutecyprol A** frente a *S. exigua*. En estos ensayos, se determinó el consumo y crecimiento de larvas alimentadas con discos foliares tratados (periodo de tratamiento) y posteriormente alimentadas con discos foliares no tratados (periodo de post-tratamiento), para evaluar los efectos post-ingestivos del compuesto.

Durante el periodo de tratamiento, se colocaron 8 discos foliares en una placa Petri y se trataron con unas concentraciones de 0, 100, 300 o 1000 ppm del producto.



Después de evaporado el solvente, una larva de 5° estadio de *S. exigua* o de 4° estadio de *L. decemlineata* se colocaba dentro de cada placa. La duración de los ensayos fue de 20 horas para *L. decemlineata* y de 12 horas para *S. exigua*. Dicha duración se definió tomando en consideración el consumo medio de discos foliares de las larvas testigo y la capacidad de recuperación de larvas que se habían mantenido en ayuno durante el periodo de tratamiento. Al final de este periodo, 10 larvas por tratamiento se pasaron a placas con 8 discos foliares sin tratar (periodo de post-tratamiento) y otras 10 larvas se congelaron para un estudio posterior de sus actividades enzimáticas.

Los datos de ingestión se determinaron en peso seco, siguiendo el procedimiento descrito en los ensayos de actividad antialimentaria. El incremento de peso de las larvas se determinó como la diferencia entre el peso seco final y el peso seco inicial, estimados utilizando los modelos de conversión peso fresco a peso seco desarrollados por López-Olguín (1998) para estas mismas especies.

*Modelo estimado para larvas de L. decemlineata :*

$$\text{Peso seco} = 1,82920 + 0,10456 (\text{Peso fresco}) + 0,00054 (\text{Peso fresco})^2 ; r^2 = 0.95$$

*Modelo estimado para larvas de S. exigua :*

$$\text{Peso seco} = 3,28950 + 0,09680 (\text{Peso fresco}) + 0,00019 (\text{Peso fresco})^2 ; r^2 = 0.91$$

#### 2.4.3.1. CÁLCULO DE ÍNDICES NUTRICIONALES

La *tasa de consumo relativo (TCR)* y la *tasa de incremento de peso de la larva (TIP)* se determinó mediante las siguientes ecuaciones (Farrar *et al.*, 1989):

$\text{TCR} = (\text{Ing}/\text{PiLxT})$ ; donde: Ing = consumo de disco foliar durante el periodo de ensayo (mg de peso seco), PiL = peso inicial de la larva (mg de peso seco) y T = tiempo de duración del ensayo (días).

$\text{TIP} = (\Delta\text{P}/\text{PiLxT})$ ; donde:  $\Delta\text{P}$  = incremento de peso de la larva durante el periodo de ensayo (mg de peso seco). PiL y T, igual que en TCR.

El *consumo relativo del producto (CRP)* se determinó, de acuerdo a Liu *et al.* (1990), mediante la ecuación:

$CRP = TCR \times D$ ; donde: TCR = tasa de consumo relativo y D es la dosis del producto ( $\mu\text{g}$  del producto/mg de peso seco de disco foliar).

La *eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI)*, calculada para el periodo de post-tratamiento, se determinó como el cociente de la TIP sobre la TCR (Waldbauer, 1968).

## 2.5. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Estos ensayos se realizaron con larvas de *S. exigua* que fueron congeladas al finalizar los periodos de tratamiento y post-tratamiento en ensayos nutricionales. Concretamente, se han utilizado larvas alimentadas con Scutecyprol A en los ensayos nutricionales que hemos realizado con este compuesto, y larvas alimentadas con una mezcla de limonoides (1,7-di-O-acetilhavanensina y 3,7-di-O-acetilhavanensina) que provenían de un estudio anterior realizado con la misma metodología en nuestro laboratorio (López-Olguín, 1998).

### 2.5.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Todos los substratos utilizados procedían de Sigma Chemical Co. (St Louis, USA) Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Hitachi, Ltd., Tokio, Japón) Para el resto de material y equipos, su procedencia se indica en el apartado correspondiente.

### 2.5.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Al finalizar los periodos de tratamiento y post-tratamiento, se diseccionaron 10 larvas por dosis de ensayo y se extrajeron los tubos digestivos medios que fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cada tubo digestivo fue homogeneizado en  $500\mu\text{l}$  ClNa  $0,15\text{ M}$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , centrifugado a  $10.000\text{ g}$  durante 5 minutos en una microcentrífuga

BECKMAN Microfuge 11 (Beckman Instruments, Inc., California, USA), y los sobrenadantes resultantes fueron congelados individualmente para disponer de 10 muestras por dosis en los ensayos de actividad enzimática (Fig. 2.13).

**Fig. 2.13. Ensayos enzimáticos realizados con larvas de *S. exigua* al finalizar los periodos de tratamiento y post-tratamiento.**



**Larvas de *S. exigua***

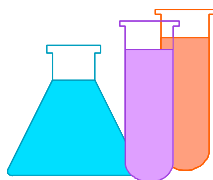


**Disección y homogeneizado de tubos digestivos**

**Extractos de tubo digestivo**



**Ensayos enzimáticos (enzimas de detoxificación)**



- **Glutación S-transferasa (GST)**  
**CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenceno)**
- **Esterasa**  
**1-NA (1-naftil acetato)**
- **Monooxigenasa**  
**citocromo c**

### 2.5.3. VALORACIÓN DE PROTEÍNA

La valoración de proteína en los extractos digestivos se llevó a cabo según el procedimiento de Bradford (1976), utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar.

### 2.5.4. TAMPONES

Todos los tampones se prepararon a la concentración 0,1 M y contenían ClNa 0,15 M

Rango de pH	Tampón utilizado
5,0-6,0	Citrato
6,0-9,0	Tris-HCl
9,0-11,0	Glicina-NaOH

### 2.5.5. CONDICIONES GENERALES

Los ensayos enzimáticos se dirigían a determinar la actividad de los extractos digestivos frente a sustratos de conocida especificidad para las principales enzimas de detoxificación en insectos. El primer paso que se realizó con cada sustrato fue fijar las condiciones (pH óptimo, cantidad de extracto y tiempo de la reacción) que garantizaran trabajar en la fase donde la formación del producto de la reacción es de tipo lineal. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se utilizaron blancos para considerar la degradación espontánea de los sustratos.

### 2.5.6. ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

La actividad Glutatión S-transferasa fue determinada usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato, siguiendo el procedimiento de Habig et al. (1974). Muestras de 30µl de extracto digestivo fueron disueltas en 1 ml de tampón Tris-HCl 0,1mM, ClNa 0,15mM, pH 8,5, conteniendo glutatión reducido 5mM. La mezcla fue preincubada durante 15 minutos a 30 °C y la reacción se inició al añadir 50µl de la solución de CDNB (2mg/200µl etilen glicol + 800µl agua). El incremento en absorbancia a 340nm se registró durante 2 minutos para determinar los nanomoles

de sustrato conjugado/min/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Habig et al., 1974).

### **2.5.7. ACTIVIDAD ESTERASA**

La actividad esterasa fue determinada usando 1-naftil acetato (1-NA) como sustrato, según el procedimiento descrito por Gomori (1953). La reacción se inicia al añadir  $20\mu\text{l}$  de extracto digestivo (diluido 1/50) a una mezcla de reacción de 1 ml que contiene: tampón Tris-HCl  $0,1\text{mM}$ , ClNa  $0,15\text{mM}$ , pH 7.0; y el sustrato 1-NA  $0,25\text{mM}$  (añadido en  $1\mu\text{l}$  de etanol). Esta mezcla de reacción fue incubada durante 1 hora a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . La reacción se paraba con  $500\mu\text{l}$  de una solución que contenía  $0,4\text{mg}$  de sal de “Fast Blue B” y  $15 \text{ mg}$  de SDS/ml y se mantenía durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a  $10.000\text{g}$  durante 5 minutos y se determinó la absorbancia del sobrenadante a  $600\text{nm}$ . La actividad específica se calculó como nmoles de sustrato hidrolizado/min/mg de proteína utilizando 1-naftol (producto de la reacción) como standard.

### **2.5.8. ACTIVIDAD MONOOXIGENASA**

La actividad monooxigenasa fue determinada por la reducción del citocromo c por NADPH citocromo P450 reductasas, de acuerdo a Masters et al. (1965). Muestras de  $15\mu\text{l}$  de extracto digestivo fueron disueltas en  $900\mu\text{l}$  de tampón Glicina  $0,1\text{mM}$ , NaCl  $0,15\text{mM}$ , pH 9.0, que contiene un sistema generador de NADPH (NADP  $0,5\text{mM}$ , glucosa 6-fosfato  $2,5\text{mM}$ , y  $0,25$  unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa). La mezcla fue preincubada durante 15 minutos a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  y la reacción se inició al añadir  $100\mu\text{l}$  de la solución de citocromo c ( $6,2\text{mg/ml}$  ClNa  $0,15\text{M}$ ). La actividad específica, calculada como nmoles de sustrato reducido/min/mg de proteína, se determinó midiendo los cambios de absorbancia a  $550\text{nm}$  durante 5 minutos, usando un coeficiente de extinción molar para la forma reducida del citocromo c de  $27,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Margoliash and Frohwirt, 1959).

## **2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La comparación entre medias de los índices nutricionales analizados se realizó mediante la prueba de Student-Newman-Keuls ( $p \leq 0,05$ ). En el periodo de post-tratamiento se utilizó el peso inicial de la larva como covariable, puesto que se observó un efecto significativo del peso inicial de las larvas sobre los parámetros nutricionales.

Para el análisis de las actividades enzimáticas se utilizó el análisis de covarianza, considerando la cantidad de proteína como covariable, al encontrarse un efecto significativo de esta variable sobre las actividades específicas. La comparación de las medias de los tratamientos respecto al control se realizó utilizando el test de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

# CAPÍTULO 3

## Actividad antialimentaria de terpenoides frente a larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua*

---

Se ha determinado la actividad antialimentaria de tres grupos de terpenoides (diterpenos *neo*-clerodánicos, limonoides y sesquiterpenos) frente a dos plagas de insectos que responden a dos hábitos de alimentación distintos, *S. exigua* como insecto generalista y *L. decemlineata* como especialista.

Dicha actividad se determinó mediante ensayos de preferencia (elección entre discos foliares tratados y no tratados) y no preferencia (sin posibilidad de elección), lo que permite calcular el índice de disuasión (ID) y antiapetitivo (IA) respectivamente. Se ha considerado que los compuestos estudiados poseían actividad antialimentaria cuando alguno de los dos índices era igual o superior al 50%. De este modo, cuando el índice de disuasión es alto y el antiapetitivo bajo, se puede hablar de un efecto disuasorio de la alimentación. Por el contrario, cuando el índice de disuasión es bajo y el antiapetitivo alto, sugiere un modo acción tóxico. En el caso de que los dos índices sean elevados, el efecto puede ser disuasorio y/o tóxico. En cualquier caso, es aconsejable utilizar técnicas complementarias que nos permitan determinar los efectos post-ingestivos del compuesto para confirmar su modo de acción.

Asimismo, se comparó la actividad dentro de cada grupo de compuestos en función de la modificación de sus grupos funcionales para tratar de establecer la relación estructura-actividad. Las estructuras de todos los compuestos ensayados están reflejadas en el anexo I.

### 3.1 DITERPENOS CLERODÁNICOS

#### 3.1.1 AJUGARINAS Y TEUMASILENINAS.

Las ajugarinas I (**Aj-1**), II (**Aj-2**) y la desacetilajugarina II (**Aj-3**) son neoclerod-13-en-15,16-olidos que poseen un anillo  $\beta$ -sustituido de  $\gamma$ -lactona con  $\alpha,\beta$ - insaturado. Estos compuestos han mostrado poseer actividad insecticida frente a larvas de lepidopteros como *S. littoralis* (Kubo et al., 1976; Simmonds et al., 1989; Cole et al., 1990, Simmonds and Blaney, 1992; Bremmner et al., 1998), *S. frugiperda* (Simmonds and Blaney, 1992; Bruno et al., 2000), *S. exempta* (Kubo et al., 1976) y *Helicoverpa armigera* (Simmonds et al., 1989; Bruno et al., 2000).

Se ha ensayado la actividad antialimentaria de tres ajugarinas de origen natural (**Aj-1**, **Aj-2** y **Aj-3**) y siete derivados hemisintéticos (**Aj-4-10**), con diferentes funcionalidades en el anillo de decalina, así como de las teumasileninas A (**Te-11**) y C (**Te-12**), con el propósito de determinar cómo los diferentes grupos funcionales de estos compuestos pueden influir en el comportamiento alimentario de las larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua* (Tabla 3.1, anexo I).

La ajugarina I (**Aj 1**) y los derivados hemisintéticos **Aj-4**, **Aj-8** y **Aj-10** mostraron actividad disuasoria frente a larvas de *S. exigua* en ensayos de preferencia. La desacetilación en C-19 (**Aj-4**) disminuyó el índice antiapetitivo y no se observó actividad antialimentaria cuando un grupo  $\alpha$ - hidroxilo (**Aj-2**) o cetona (**Aj-6**) se encontraban en el C-6, o cuando los hidroxilos C-6 $\alpha$  y C-19 estaban desacetilados (**Aj-3**). La transformación del grupo acetato del C-19 en un aldehído (**Aj-5** y **Aj-7**) o en un 1 $\alpha$ , 19-éter (**Aj-9**) junto con la desacetilación en C-6  $\alpha$  en el caso de **Aj-5** y **Aj-9**, también causaron pérdidas de actividad. Estos resultados sugieren que los grupos



acetato en C-19 y C-6 $\alpha$  juegan un importante papel en la actividad disuasoria de la ajugarina I (**Aj-1**) frente a *S. exigua*.

La ajugarina 1 (**Aj-1**) también mostró actividad antiapetitiva frente a *S. exigua* en ensayos de no preferencia, sin embargo, cuando el grupo acetato del C-19 se mantenía y la funcionalidad del C-6 era una cetona y el 4 $\alpha$ , 18-epóxido era reemplazado por una clorhidrina (**Aj-8**) o era eliminado dando el derivado 18-nor-4-oxo (**Aj-10**), se observaba un aumento en el índice de disuasión y una reducción del índice antiapetitivo.

Las teumasileninas A (**Te-11**) y C (**Te-12**), que poseen un anillo sustituido de  $\beta$ -furilo en vez de un anillo  $\beta$ -sustituido de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturado, muestran actividad antialimentaria, tanto en ensayos de preferencia como de no preferencia, frente a larvas de último estadio de *L. decemlineata*, pero no frente a larvas de *S. exigua* (Tabla 3.1) (Anexo I) Estos resultados indican que la acción antialimentaria en larvas de *L. decemlineata* puede estar asociada con la presencia del anillo de furano en la molécula del compuesto activo (**Te-11** y **Te-12**) mientras que en el resto de los compuestos no juega un papel importante en el efecto biológico. El grupo 12S-hidroxilo de **Te 11** y **Te 12**, sin embargo, puede ser una característica estructural importante para el modo de acción de esos compuestos a nivel molecular, porque ese hidroxilo modifica drásticamente la reactividad del furano.

Estos datos sugieren que mínimos cambios en la estructura de las moléculas pueden llevar a provocar grandes variaciones en su actividad. Así, cambios en el anillo de decalina hacen que cambien la actividad antialimentaria tal y como había sugerido Kubo et al. (1983). Además, se observan diferentes tipos de actividad antialimentaria (actividad disuasoria y/o actividad antiapetitiva) dependiendo de sus grupos funcionales.

De acuerdo con los índices obtenidos, las ajugarinas **Aj-4**, **Aj-8** y **Aj-10** actúan predominantemente como compuestos disuasorios frente a larvas de *S. exigua*, mientras que **Aj-1** tiene un efecto disuasorio pero no se descarta un posible efecto tóxico. En el caso de las teumasileninas (furoneoclerodanos) hemos obtenido resultados similares a los observados por Simmonds y Blaney (1992), ya que ellos tampoco obtuvieron

actividad antialimentaria de diferentes furoneoclerodanos frente a lepidópteros como *S. littoralis* y *S. frugiperda*.

**Tabla 3.1. Actividad antialimentaria de ajugarinas y teumasileninas naturales y derivados hemisintéticos sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.**

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
Aj-1	<b>70,0 ± 6,8</b>	<b>67,9 ± 17,2</b>	5,3 ± 6,3	26,8 ± 8,6
Aj-2	8,3 ± 9,8	25,1 ± 9,8	-12,7 ± 9,0	32,0 ± 17,7
Aj-3	-22,4 ± 7,5	9,7 ± 6,6	11,3 ± 8,4	13,7 ± 11,8
Aj-4	31,0 ± 9,2	<b>57,2 ± 9,1</b>	5,3 ± 5,6	26,8 ± 5,4
Aj-5	24,5 ± 14,1	38,5 ± 13,8	9,3 ± 17,6	46,1 ± 8,0
Aj-6	34,3 ± 23,0	25,8 ± 12,2	-9,2 ± 7,6	39,9 ± 7,1
Aj-7	14,9 ± 16,8	39,5 ± 8,8	16,1 ± 5,5	8,6 ± 11,6
Aj-8	30,0 ± 16,6	<b>91,4 ± 6,3</b>	29,4 ± 11,7	33,1 ± 16,3
Aj-9	-16,1 ± 19,2	26,1 ± 14,2	5,5 ± 12,9	28,5 ± 12,6
Aj-10	9,9 ± 19,6	<b>72,9 ± 13,4</b>	-13,8 ± 6,3	36,4 ± 16,0
Te-11	-26,3 ± 9,6	10,5 ± 10,5	<b>75,6 ± 8,6</b>	<b>88,2 ± 6,4</b>
Te-12	15,9 ± 7,3	13,7 ± 9,1	<b>67,6 ± 12,3</b>	<b>73,7 ± 19,7</b>

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo = [(Dc-Dt)/Dc]\*100% ± error estándar (n=10). Dc: consumo foliar en el control; Dt: consumo foliar en los discos tratados (ensayos de no-preferencia).

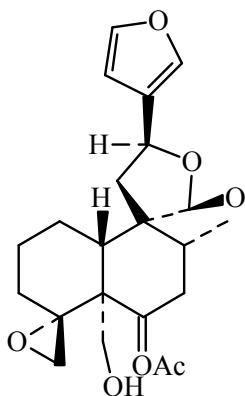
<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación = [(Dc-Dt)/(Dc+Dt)]\*100% ± error estándar (n=10). Dc y Dt son el consumo foliar de de discos control y tratados, respectivamente, dentro de cada placa (ensayos de preferencia).

### 3.1.2 DERIVADOS DE 19-ACETILGNAPHALINA

El compuesto 19-acetilgnaphalina (Fig. 3.1) es un diterpenoide *neo*-clerodánico que posee un anillo furánico, una  $\gamma$ -lactona, un epóxido en posiciones 4 $\alpha$ ,18, un acetoxilo en C-19 y una cetona en C-6.

Algunos estudios muestran que posee una clara actividad tóxica frente a larvas de *L. decemlineata* (López-Olguín et al., 1999). También se ha encontrado actividad disuasoria frente a larvas de *S. littoralis* y *S. frugiperda* en condiciones de preferencia (Simmonds y Blaney, 1992).

Figura 3.1: estructura de 19-acetilgnaphalina



Para conocer la especificidad de acción y cuáles son los grupos funcionales responsables de la actividad antialimentaria, se han ensayado varios derivados estructurales de este compuesto (**M-1** – **M-6**) frente a larvas de *S. exigua* y de *L. decemlineata* (Tabla 3.2) (Anexo I)

Los compuestos **M-1** y **M-2** mostraron actividad antialimentaria frente a las dos especies seleccionadas, mientras que **M-5** y **M-6** sólo tuvieron actividad frente a *L. decemlineata* y **M-3** y **M-4** no presentaron actividad para ninguna de las dos especies .

El compuesto **M-1**, posee un efecto disuasorio para *S. exigua*, y actividad antiapetitiva y disuasoria para *L. decemlineata*. Por el contrario, **M-2** es antiapetitivo para *L. decemlineata* y posee los dos tipos de actividades para *S. exigua*, estas disminuyendo estas actividad drásticamente cuando en el C-12 desaparece el grupo

hidroxilo (M-4). La presencia de un grupo acetato en el C-6 (M-3, M-5 y M-6) hace que se reduzca la actividad antialimentaria frente a *S. exigua*, siendo incluso fagoestimulante frente a esta especie cuando los C-4 y C-18 pasan de grupos hidroxilo y metoxilo a acetoxilo y cloro (M-5) respectivamente. Por otro lado, mientras que M-5 tiene actividad tanto en condiciones de preferencia como de no-preferencia frente a larvas de *L. decemlineata*, cuando en C-13 se sustituye el β-furilo por un grupo carboximetilo (M-6), disminuye drásticamente la actividad antiapetitiva. A la vista de estos resultados, queda patente que los cambios que se producen en los grupos funcionales de los compuestos, hacen que la especificidad y el tipo de actividad sea variable (Rodríguez et al., 1994).

**Tabla 3.2. Actividad antialimentaria de derivados hemisintéticos de 19-acetilnaphalina, sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.**

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
M-1	19,3 ± 18,1	<b>77,5 ± 3,2</b>	<b>79,4 ± 11,4</b>	<b>50,7 ± 18,5</b>
M-2	<b>51,5 ± 10,6</b>	<b>87,5 ± 3,5</b>	<b>91,3 ± 4,6</b>	19,2 ± 6,5
M-3	4,7 ± 7,8	15,3 ± 12,2	39,4 ± 11,8	18,3 ± 14,3
M-4	-16,6 ± 25,4	18,9 ± 24,9	25,3 ± 6,9	9,4 ± 13,7
M-5	-63,4 ± 28,0	29,8 ± 11	<b>57,9 ± 7,4</b>	<b>68,2 ± 21,8</b>
M-6	-9,5 ± 4,8	-15,0 ± 24,6	25,3 ± 6,9	<b>72,8 ± 11,9</b>

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo. (Ensayos de preferencia). Calculado como en tabla 3.1.

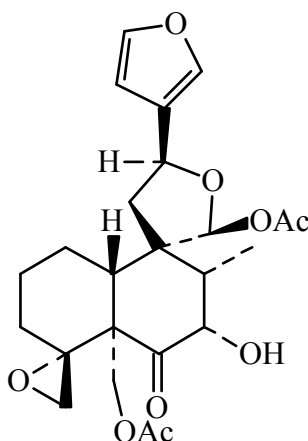
<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación. (Ensayos de no preferencia) Calculado como en tabla 3.1.

### 3.1.3 DERIVADOS DE ERIOCEPHALINA

La eriocephalina (Fig. 3.2) es un diterpenoide *neo*-clerodánico que, como la 19-acetilnaphalina, posee el 4 $\alpha$ ,18 epóxido, el 19-acetoxilo, el anillo furánico y la cetona en C-6, pero que además tiene un grupo hidroxilo en C-7 $\alpha$  y un hemiacetal acetilado (carbonos C-9, C-11, C-12 y C-20) en lugar de la  $\gamma$ -lactona de la 19-acetilnaphalina

Se han citado trabajos donde se observa una actividad tóxica frente a larvas de *L. decemlineata* (López-Olguín et al., 1999) y un índice elevado de disuasión frente a larvas de *S. littoralis* (De la Torre et al., 1994, Simmonds y Blaney, 1992) y larvas de *S. frugiperda* (Simmonds y Blaney, 1992),

Figura 3.2: Estructura de la eriocephalina



Los índices antialimentarios obtenidos para los derivados (**M-7**, **M-8**, **M-9** y **M-10**) de eriocephalina se detallan en la tabla 3.3 (Anexo I)

Para la especie generalista, se encontró actividad antiapetitiva con el compuesto **M-9**, pero cuando en C-6 la cetona se redujo a  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H (**M-10**), dicha actividad disminuía drásticamente. Para los compuestos **M-7** y **M-8** no se observó actividad antialimentaria frente a este insecto.

Para el caso del especialista *L. decemlineata* se encontraron actividades disuasorias y antiapetitivas elevadas con los compuestos **M-9** y **M-10**. Cuando en C-6 existe un alcohol ecuatorial ( $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H) (**M-7** y **M-10**), aumenta tanto el índice

antiapetitivo como el índice disuasorio con respecto a **M-8**, que posee una cetona en C-6. Por otro lado, cuando el 4 $\alpha$ ,18 epóxido se sustituye por un carboximetoxilo aumentan las actividades antiapetitiva y disuasoria independientemente de que el grupo en el carbono 6 sea un alcohol (**M-10**) o una cetona (**M-9**)

**Tabla 3.3. Actividad antialimentaria de derivados hemisintéticos de eriocephalina sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.**

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
M-7	2,7 ± 24,1	40,3 ± 11	<b>76,4 ± 8,9</b>	43,1 ± 14,3
M-8	29,5 ± 11,1	25,2 ± 7,6	25,9 ± 7,7	28,7 ± 7,7
M-9	<b>57,3 ± 6,7</b>	28,6 ± 13,5	<b>87,3 ± 8,8</b>	<b>83,7 ± 19,3</b>
M-10	12,5 ± 14,2	32,3 ± 10,3	<b>94,3 ± 3,5</b>	<b>86,2 ± 7,4</b>

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo. (Ensayos de preferencia). Calculado como en tabla 3.1.

<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación. (Ensayos de no preferencia) Calculado como en tabla 3.1.

### 3.1.4 SCUTECYPROL A Y SCULTABINA C

La actividad antialimentaria de un extracto acetónico de las partes aéreas de *S. valdiviana* y de los diterpenos *neo*-clerodánicos **scutecyprol A** y **scultabina C**, presentes en diferentes especies del género *Scutellaria* (Bruno et al., 1996a; Bruno et al., 1996b), fueron ensayadas frente a larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua* (Tabla 3.4) (Anexo I).

Tanto los ensayos de preferencia como los de no preferencia mostraron que el extracto acetónico de *S. valdiviana* y la **scultabina C** tienen actividad antialimentaria frente a ambas especies, mientras que el scutecyprol A, actúa como un potente disuasorio de la alimentación frente a larvas de *S. exigua*, pero carece de actividad antiapetitiva frente a larvas de *L. decemlineata*. La pérdida de actividad frente a *L.*

*decemlineata* podría estar asociada a la sustitución de la función hemiacetal entre C-2 y C-19 de la **scutalbina C** por un grupo acetoxilo en C-19, como ocurre en el **scutecyprol A**. Además, como resultado de este cambio aumenta considerablemente la actividad en condiciones de preferencia frente a *S. exigua*, si bien se observa una disminución de la actividad en condiciones de no-preferencia.

Nuestros resultados con **scutecyprol A** y **scutalbina C** no coinciden con los obtenidos por Bruno et al. (1999, 2000), ya que estos no encontraron actividad antialimentaria con estos compuestos frente a los lepidópteros *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Pieris brassicae* y *Helicoverpa armigera*. Esta diferencia puede ser debida a que la dosis que usaron fue más baja (100 ppm) o bien a una mayor susceptibilidad de *S. exigua* frente a estos compuestos en comparación los otros lepidópteros.

**Tabla 3.4. Actividad antialimentaria del extracto acetónico de las partes aéreas de *S. valdiviana* y los diterpenos *neo-clerodánicos* scutecyprol A y scutalbina sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.**

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
Extracto	<b>52,1 ± 15,9</b>	<b>78,7 ± 7,6</b>	<b>73,1 ± 19,5</b>	<b>67,6 ± 14,0</b>
Scutecyprol A	48,4 ± 11,5	<b>91,4 ± 5,6</b>	10,8 ± 11,2	-1,1 ± 11,5
Scutalbina C	<b>61,8 ± 12,3</b>	35,9 ± 12,4	<b>67,1 ± 22,2</b>	<b>51,0 ± 20,9</b>

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo. (Ensayos de preferencia). Calculado como en tabla 3.1.

<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación. (Ensayos de no preferencia) Calculado como en tabla 3.1.

### 3.1.5. ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NEO-CLERODANOS.

Una vez realizado el estudio con 25 diterpenos, de los cuales 23 son *neo-clerodanos* y 2 son *furoneoclerodanos* (**Te-11** y **Te-12**), y analizados los grupos funcionales de los compuestos que poseen actividad, se puede establecer algún tipo de

relación entre estructura y actividad. Diferentes estudios con *neo*-clerodanos muestran que el grupo epóxido en los carbonos 4 y 18 es un factor determinante en la actividad de estos compuestos (Geuskens et al., 1982; Gebbinck, 2002). La importancia de la presencia del grupo epóxido en los carbonos 4 y 18 queda patente en los compuestos **Aj-1**, **Aj-4**, **scutecyprol A** y **scutalbina C** frente a larvas de *S. exigua* y **M-7**, **M-8** y **scutalbina C** para *L. decemlineata*; aunque no es imprescindible Govindachari, (1995) ya que los compuestos **Aj-8**, **Aj-10**, **M-1**, **M-5** , **M-9** y **M-10** no teniendo un grupo epóxido, presentaron actividad tanto en larvas de *S. exigua* como de *L. decemlineata*. Otro factor importante a tener en cuenta son las funciones que aparecen sobre C-6 y C-19, las cuales determinan cambios en la actividad antialimentaria (Rodríguez, 1994; Lopez-Olguín, 1999). En nuestro caso, se observa que los grupos cetona o acetato incrementan la actividad antialimentaria, especialmente de tipo disuasoria, en larvas de *S. exigua*, perdiéndose actividad cuando se sustituye por un grupo hidroxilo, como ya ha sido documentado por Rodríguez (1994) frente a larvas de *S. littoralis*.

### 3.2 SESQUITERPENOS: ARTEMISIIFOLINAS Y EUDESMANOS

Las artemisiifolinas (**Ar 1-7**) son sesquiterpenos de tipo germacrano, que por poseer agrupamientos lactónicos se denominan germacranolidas. Por otro lado, **Ar-8-10** son sesquiterpenos del tipo eudesmano, siendo la santonina (**Ar-8**) y la **Ar-10** eudesmanolidas por poseer una funcionalidad lactónica.

Se ha visto que algunos sesquiterpenos presentan actividad antialimentaria frente a insectos especialistas como *L. decemlineata* (Gonzalez-Coloma et al., 1995) y generalistas como *S. littoralis* (Srivastava et al., 1990).

De los sesquiterpenoides que se probaron, cuatro son naturales (artemisiifolina (**Ar-1**), 1,10-epoxiartemisiifolina (**Ar-2**), isabelina (**Ar-6**) y santonina (**Ar-8**) y el resto son derivados hemisintéticos (**Ar-3,4,5,7,9,y 10**).

En la tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos de los bioensayos con estos compuestos frente a larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.



En el caso de *S. exigua*, sólo se observaron valores por encima del 50% para el índice disuasorio en el caso del compuesto natural santonina (Ar-8) y para el índice antiapetitivo con su derivado hemisintético Ar-10. Con el resto de los compuestos no se observó actividad antialimentaria por encima del 50% frente a esta especie, aunque sí hubo un aumento notable en el índice antiapetitivo cuando C-15 y C-6 de Ar-2 pasaban de ser grupos hidroxilos a acetatos (Ar-4). Cuando se mantenía el hidroxilo de C-6 pero se pasaba de un aldehído (Ar-1) a un CHO (Ar-7) se mantenían los índices, pero si se acetilaban los hidroxilos de Ar-1 como en C-15 de Ar-5, disminuía drásticamente el índice de disuasión.

En el caso de *L. decemlineata* podemos deducir actividades diferentes en función de los distintos grupos funcionales de los compuestos estudiados. Tanto para la artemisiifolina (Ar-1) como para Ar-5 el IA es superior al 50% por lo que la acetilación de los hidroxilos no influye en la actividad de estos compuestos. Sin embargo, cuando el alcohol primario de Ar-1 (C-15) se oxida a aldehído (CHO) como en Ar-7, el índice antiapetitivo desciende y aumenta el índice disuasorio. Ar-2 posee elevada actividad para ambos índices, pero estos se ven reducidos significativamente cuando los hidroxilos se esterifican formando un diacetato (Ar-4).

Los carbonos C-6 y C-15 parecen jugar un importante papel en la actividad de los sesquiterpenos estudiados en este trabajo, ya que dependiendo de los grupos funcionales que tengan, la actividad aumenta o disminuye. Passereiter e Isman (1977), encontraron actividad antialimentaria frente a larvas de *S. litura*, en sesquiterpenos de tipo germacrano, cuando alguno de estos carbonos poseía un grupo hidroxilo. En nuestro caso, también hemos observado que actividad en algunos de los sesquiterpenos que poseen estos grupos hidroxilos y que la presencia de cetonas no es determinante para la aparición de actividad antialimentaria. González et al. (1997) llegaron a la conclusión de que la actividad de los sesquiterpenoides frente a larvas de *S. littoralis* aumentaba en condiciones de no preferencia cuando se aumentaban los grupos acetatos. Sin embargo, en nuestros resultados esto sólo ocurre con el compuesto Ar-5 frente a larvas de *L. decemlineata* y en condiciones de preferencia.

Tabla 3.5. Actividad antialimentaria de artermisiifolín, santonina y algunos de sus derivados hemisintéticos sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
Ar-1	31,1 ± 11,7	30,2 ± 21,2	<b>55,3 ± 4,8</b>	26,6 ± 9,1
Ar-2	0,2 ± 7,5	-8,7 ± 18,1	<b>99,1 ± 0,8</b>	<b>56,2 ± 14,6</b>
Ar-3	15,1 ± 7,1	14,2 ± 3,4	45,2 ± 12,2	28,6 ± 12,2
Ar-4	30,5 ± 12,0	-9,1 ± 8,6	-0,4 ± 16,4	8,2 ± 17,7
Ar-5	24,1 ± 11,4	6,1 ± 10,4	<b>58,7 ± 18,8</b>	26,6 ± 9,1
Ar-6	13,8 ± 7,5	26,3 ± 6,5	26,1 ± 11,3	14,6 ± 5,8
Ar-7	44,8 ± 10,6	27,7 ± 11,7	32,8 ± 8,3	<b>56,3 ± 20,1</b>
Ar-8	23,5 ± 8,7	<b>55,5 ± 10,3</b>	47,6 ± 10,1	33,9 ± 9,4
Ar-9	26,0 ± 6,9	2,1 ± 10,1	8,4 ± 18,1	37,6 ± 9,0
Ar-10	<b>57,3 ± 6,8</b>	11,2 ± 9,3	13,2 ± 16,18	10,1 ± 5,8

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo. (Ensayos de preferencia). Calculado como en tabla 3.1.

<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación. (Ensayos de no preferencia) Calculado como en tabla 3.1.

### 3.3 LIMONOIDES

Un elevado número de tetranortriterpenoides de tipo limonoide han sido aislados de distintas meliáceas. Algunos de esos compuestos han mostrado tener actividad biológica, especialmente frente a insectos (Schmutterer y Ascher, 1987). Del género *Trichilia* se han aislado limonoides que han demostrado tener actividad antialimentaria frente a plagas de insectos, tanto generalistas como especialistas (Lopez-Olguín, 1998; Nakatani et al., 1984; Mikolajczak y Reed, 1987; Huang et al., 1996).

Se han ensayado 4 compuestos naturales (**Tr-1**, **Tr-3**, **Tr-9** y **Tr-10**), obtenidos del extracto acetónico de semillas de *T. havanensis*, y 6 derivados hemisintéticos (Tabla 3.6) (Anexo I).

Para el caso de *S. exigua*, solo se vio actividad con los compuestos **Tr-2** y **Tr-9**, en ambos caso para el índice antiapetitivo. Cuando el grupo  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H en C-7 (**Tr-9**) en sustitución por  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H (**Tr-2**) o por un grupo cetona (**Tr-10**) disminuían tanto el IA como el ID.

Para *L. decemlineata*, vemos actividad en el IA de **Tr-1**, pero cuando el C-1 es una acetona (**Tr-5**) esta actividad desaparece, y cuando en C-3 hay una cetona (**Tr-6**) la IA disminuye ligeramente. Si C-1 y C-3 se desacetilan (**Tr-8**) la actividad se mantiene, pero si además se desacetila C-7 (**Tr-7**) esta actividad disminuye. Los compuestos **Tr-3** y **Tr-4** fueron activos tanto en condiciones de preferencia como de no preferencia, pero cuando C-21 pasaba de  $\alpha$ -H,  $\beta$ -OH (**Tr-3**) a H<sub>2</sub> (**Tr-4**) disminuía el índice antiapetitivo y se mantenía el índice de disuasión. Por el contrario, cuando en C-21 se mantenía el  $\alpha$ -H,  $\beta$ -OH, pero se sustituía el C-3 por una cetona y se desacetilaba el C-1 (**Tr-2**), se mantenía un alto índice antiapetitivo, pero disminuía ligeramente el disuasorio. Otro compuesto que presentaba altos índices antialimentarios es **Tr-10**, pero cuando el C-7 pasaba de cetona (**Tr-10**) al agrupamiento  $\alpha$ -OH,  $\beta$ -H (**Tr-9**) disminuía ligeramente IA y pasaba a la mitad el ID y cuando en C-7 existía un agrupamiento  $\alpha$ -OAc,  $\beta$ -H (**Tr-8**), más o menos se mantenía el IA y disminuía ID con respecto a **Tr-10**.

Los limonoides ensayados presentaron menor actividad frente a larvas de *S. exigua* que en larvas de *L. decemlineata*, lo que concuerda con los resultados encontrados por López-Olguín (1998) utilizando estas dos mismas especies. De los 10 limonoides estudiados solo dos (**Tr-2** y **Tr-9**) dieron actividad antiapetitiva frente a *S. exigua*. Estos dos compuestos poseen en su C-3 un grupo cetona, por lo que se puede relacionar este grupo funcional con el aumento de actividad, (Lopez-Olguín, 1998).

Simmonds et al. (1990) observaron que los C-1 y C-3 que poseían grupos hidroxilo incrementaban el efecto inhibitor del desarrollo frente a larvas de *S. frugiperda*, *S. littoralis* y *H. armigera*. De igual manera, López-Olguín (1998) sugiere que la funcionalidad en C-3, ya sea hidroxilo o cetona, son los principales responsables de

actividad en *L. decemlineata*. La importancia de los grupos funcionales en los carbonos C-1 y C-3 se ve refrendada por nuestros resultados, ya que los compuestos que presentan índices antialimentarios más altos frente a larvas de *L. decemlineata* son aquellos que poseen grupos hidroxilo o cetona en estos carbonos. Por otro lado, la presencia de un grupo epóxido en posición C-14-15 contribuye al aumento de actividad (Bentley et al., 1988 y Mendel et al., 1993; López-Olguín, 1998). Sin embargo, el grupo epoxido no parece ser imprescindible, ya que aunque ninguno de los compuestos que hemos ensayado poseía este grupo funcional muchos de ellos fueron activos, hecho que apoya lo obtenido por Govindachari (1995) donde el grupo epóxido no tuvo influencia frente a larvas de *S. litura*.

**Tabla 3.6. Actividad antialimentaria de componentes de *T. havanensis* y algunos derivados hemisintéticos sobre larvas de *S. exigua* y *L. decemlineata*.**

PRODUCTO 1000 ppm	<i>Spodoptera exigua</i>		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	IA <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>
Tr-1	29,5 ± 11,1	26,6 ± 13,5	<b>53,0 ± 13,2</b>	38,7 ± 13,9
Tr-2	<b>51,4 ± 16,9</b>	-4,6 ± 10,9	<b>79,1 ± 6,1</b>	45,9 ± 13,6
Tr-3	46,2 ± 16,2	-7,2 ± 11,9	<b>85,3 ± 4,7</b>	<b>53,8 ± 14,4</b>
Tr-4	23,6 ± 18,3	34,7 ± 14,7	<b>54,1 ± 16,3</b>	<b>59,0 ± 29,2</b>
Tr-5	37,4 ± 17,1	30,2 ± 14,0	1,4 ± 15,2	15,5 ± 18,1
Tr-6	2,8 ± 14,9	18,4 ± 11,5	46,8 ± 10,5	6,2 ± 8,4
Tr-7	33,0 ± 12,4	40,4 ± 12,5	27,4 ± 17,3	38,0 ± 16,9
Tr-8	41,1 ± 14,6	30,5 ± 10,1	<b>68,0 ± 16,7</b>	26,9 ± 13,5
Tr-9	<b>64,0 ± 10,9</b>	37,2 ± 17,2	<b>60,4 ± 14,8</b>	32,2 ± 13,8
Tr-10	48,1 ± 11,3	15,1 ± 17,9	<b>82,1 ± 17,0</b>	<b>63,5 ± 12,3</b>

<sup>1</sup> Índice Antiapetitivo. (Ensayos de preferencia). Calculado como en tabla 3.1.

<sup>2</sup> Índice de Disuasión de la alimentación. (Ensayos de no preferencia) Calculado como en tabla 3.1.

### 3.4. DISCUSIÓN

En general, se considera que los insectos especialistas son menos susceptibles a los aleloquímicos vegetales producidos por sus plantas huésped., mientras que los generalistas son capaces de adaptarse a un mayor número de compuestos de diferentes plantas (Shoonhoven, 1982). Nosotros hemos analizado tres grupos diferentes de terpenoides frente a una especie polífaga *S. exigua* y una oligófaga *L. decemlineata*. Dentro de cada uno de los grupos de terpenoides se observó que había más productos con actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata* que frente a larvas de *S. exigua*. La única excepción corresponde a los grupos de las ajugarinas y de los eudesmanos, que sólo fueron activas frente a larvas de *S. exigua*. Resultados similares fueron obtenidos por Blaney et al. (1988) cuando evaluaron la actividad antialimentaria de 23 diterpenos *neo-clerodánicos* naturales y sintéticos frente a larvas de *S. exempta*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. armigera* y *H. virescens*. También observaron que la especie oligófaga *S. exempta* fue más susceptible que las especies polífagas. Asimismo, se ha visto que los extractos de neem y su constituyente principal la azadiractina inhiben significativamente la alimentación de las larvas de varias especies de lepidópteros como *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. virescens*, *H. zea*, *H. armigera* y *Mamestra brassicae*, siendo las especies oligófagas más susceptibles que las polífagas (Blaney et al., 1990; Smutterer, 1990; Ascher, 1993). En trabajos realizados por Geuskens et al. (1982) se observó que la alimentación de la especie oligófaga *Pieris brassicae* L. fue inhibida por dos diterpenos clerodánicos que no afectaron a los insectos polífagos *S. littoralis* y *S. exigua*.

El menor número de compuestos con actividad frente a insectos polífagos puede deberse a que la polifagia supone una mayor flexibilidad funcional de sus sistemas de detoxificación frente a metabolitos secundarios de plantas. Así, Blum (1992), considera que los insectos herbívoros generalistas pueden ingerir una variedad de productos vegetales tóxicos que pueden procesar con eficacia e indica que la detoxificación es uno de los principales mecanismos para sobrevivir a estos aleloquímicos. Recientemente, se ha podido demostrar que los sistemas de detoxificación en el generalista *H. zea* son capaces de metabolizar un mayor número y variedad de aleloquímicos que este mismo tipo de enzimas en *Papilio polyxenes*, cuya dieta está restringida a tan solo dos familias

de plantas (Xianchun et al., 2004). En este sentido, van Laecke et al. (1995), observaron altos niveles de enzimas de detoxificación en el tubo digestivo de *S. exigua*, por lo que sugieren que este es un factor que puede contribuir en una reducción de susceptibilidad a un amplio rango de insecticidas.

Por otra parte, es importante resaltar que de los 15 compuestos naturales analizados, 12 de ellos presentaban actividad antialimentaria frente alguna de las dos especies de insectos. Por el contrario, aproximadamente la mitad de los compuestos hemisintéticos carecían de actividad. Asimismo, en un estudio realizado por López-Olguín et al. (1999) con 10 *neo*-clerodano diterpenos aislados de *Teucrium* y 10 de sus derivados estructurales, se pudo comprobar que de los 12 compuestos con actividad frente a larvas de *L. decemlineata* 9 de ellos eran compuestos naturales. Estos resultados ilustran la eficacia de las plantas en la síntesis de defensas químicas frente a herbívoros y sugieren que la estructura global de la molécula es importante para mantener la actividad biológica.

Los mecanismos de defensa de las plantas frente a insectos se deben en muchos casos a varios compuestos metabólicamente relacionados que actúan conjuntamente con diferentes espectros de actividad (Jermy, 1990). Además, el impacto de un determinado aleloquímico sobre la fisiología de un insecto depende tanto de la identidad y cantidad de ese compuesto, como de las identidades y cantidades de otros aleloquímicos presentes (Duffey y Stout, 1996). Nuestros resultados ponen de manifiesto como el extracto de *S. valdiviana* fue más activo que los compuestos puros (scutecyprol A y C) para ambas especies de insectos. Además, de los 28 compuestos ensayados que mostraron algún tipo de actividad, sólo 6 fueron activos para ambas especies, siendo mínimos cambios en la estructura de las moléculas responsables de cambios de especificidad. De hecho, los productos comerciales del neem son en su mayoría formulaciones estandarizadas de extractos o aceite de semillas con un determinado contenido de azadiractina y otros limonoides que contribuyen de manera importante a incrementar su eficacia (Parmar, 1995; Stark y Walter, 1995). De aquí la importancia de dedicar mayor atención a las mezclas de compuestos que, además de ofrecer importantes ventajas prácticas por su facilidad de obtención y bajo coste, en muchos

casos resultan más efectivas que los compuestos puros y su efecto combinado podrían retrasar la aparición e resistencia.

Las plantas han sido, y continúan siendo, una de las fuentes tradicionales de compuestos naturales con actividad frente a insectos. Estudios comparativos entre productos naturales y sintéticos sugieren que determinadas propiedades estructurales son responsables de su amplio rango de actividades biológicas (Henkel et al., 1999; Stahura et al., 2000). Los compuestos naturales contribuyen al desarrollo de estrategias para el control de plagas a diferentes niveles: a) por sí mismos como extractos crudos o en su forma purificada, como el neem y las piretrinas; b) como material de partida para la síntesis de derivados hemisintéticos, como la dihidroazadiractina; 3) como estructura modelo para la síntesis de análogos, como los piretroides; y d) como herramientas para el descubrimiento de nuevos modos de acción (Ujváry, 2002).

# CAPÍTULO 4

## Modo de acción de terpenoides en larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua*

---

Con el objetivo de establecer el modo de acción de algunos de los compuestos que mostraron mayor actividad, se realizaron ensayos nutricionales para evaluar el efecto de estos compuestos sobre el consumo y el crecimiento de las larvas y para distinguir si su actividad antialimentaria podía deberse a un efecto disuasorio de la alimentación o a un efecto tóxico post-ingestivo (Blau et al., 1978)

Los índices calculados en los ensayos nutricionales fueron, Tasa de Consumo Relativo (TCR), que indica el consumo de las larvas en relación a su peso inicial y al tiempo de duración del ensayo; Tasa de Incremento de Peso (TIP), donde se muestra el incremento del peso de las larvas en relación a su peso inicial por unidad de tiempo; Consumo Relativo del Producto (CRP), cantidad de producto ingerido por la larva en función de la TCR y de la dosis aplicada a los discos foliares.; y por último la Eficiencia de Conversión del alimento Ingerido (ECI), que fue calculada para el periodo de post-tratamiento y que indica que cantidad de alimento es utilizado para el crecimiento en peso de la larva (Waldbauer, 1968).

Estos índices se calcularon durante un periodo en el que la larva se alimentaba con discos foliares tratados con los compuestos a ensayar a diferentes dosis (periodo de tratamiento) así como durante el periodo inmediatamente posterior en que se alimentaban sobre discos no tratados (periodo de post-tratamiento), para determinar los posibles efectos post-ingestivos de los compuesto sobre las larvas. Así mismo, en el periodo de post-tratamiento, se incluye un grupo de larvas mantenidas en ayuno durante



el periodo de tratamiento, simulando un 100% de actividad antialimentaria. (Blau et al., 1978). Cuando en el periodo de post-tratamiento el consumo y el crecimiento de las larvas tratadas es similar al de las mantenidas en ayunas se infiere que no hay efectos post-ingestivos y que el compuesto actúa como un disuasorio de la alimentación. Por el contrario, cuando en el periodo de post-tratamiento el consumo o el crecimiento de las larvas tratadas son inferiores al de las larvas mantenidas en ayuno se concluye que hay un efecto post-ingestivo debido al efecto tóxico del compuesto (Blau et al., 1978).

De entre los compuestos ensayados (capítulo 3), se seleccionaron tres en función de su potente actividad antialimentaria y la disponibilidad del producto para tratar de determinar el modo de acción que presentaban. Para *L. decemlineata* se utilizaron los diterpenos teumassilenina A (**Te-11**) y teumassilenina C (**Te-12**). En el caso de *S. exigua* estudiamos el *neo*-clerodano **scutecyprol A**.

#### 4.1 LEPTINOTARSA DECEMLINEATA

Los diterpenos furoneoclerodanos teumassilenina A (**Te-11**) y teumassilenina C (**Te-12**) fueron dos de los compuestos con más actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata*, tanto en ensayos de preferencia como de no preferencia. Estos resultados no permitían diferenciar entre un modo de acción tóxico o disuasorio, por lo que se calcularon los índices nutricionales tanto en tratamiento como en post-tratamiento para permitir diferenciar su modo de acción.

##### 4.1.1 TEUMASSILENINA A

Los resultados obtenidos tanto en el periodo de tratamiento como en el de post-tratamiento se detallan en la tabla 4.1.

Para el periodo de tratamiento, las tres concentraciones de teumassilenina A (**Te-11**) (100, 300 y 1000), redujeron significativamente las tasas de consumo relativo (TCR) con respecto al control. La tasa de incremento de peso (TIP) solo se redujo significativamente para la concentración de 1000 ppm. Para el consumo y el crecimiento la respuesta fue dosis-dependiente, registrándose una relación inversa de la TCR y TIP con respecto al consumo relativo del producto (CRP).

Esta reducción puede deberse a un efecto disuasorio o tóxico del compuesto, por lo que debemos analizar los resultados obtenidos para el periodo de post-tratamiento para determinar si se aprecian efectos post-ingestivos.

Las larvas que se mantuvieron en ayunas en el periodo de tratamiento y se alimentaron en el de post-tratamiento tienen una TCR, TIP y ECI que no difieren significativamente del control. Esto significa que pese a que estuvieron privadas de alimento durante la fase de tratamiento (simulación 100% de la actividad antialimentaria), al volver a alimentarse, se recuperan normalmente.

Sin embargo, se observa una disminución de TCR y TIP en las larvas que estuvieron sometidas a 1000 ppm y del TIP y ECI de las tratadas con 300 ppm con respecto al control. Esto significa que estas larvas no han sido capaces de recuperarse en el periodo de post-tratamiento debido al efecto post-ingestivo de la teumassilenina A, lo que nos indica que este compuesto a concentraciones de 300 y 1000 ppm posee un modo de acción tóxico frente a larvas de *L. decemlineata*.

**Tabla 4.1. Índices nutricionales de larvas de *L. decemlineata* alimentadas con discos foliares de patata tratados con teumassilenina A durante 20 horas (periodo de tratamiento) y no tratados otras 20 horas (periodo de post-tratamiento).**

**Periodo de tratamiento**

Concentración Ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	CRP <sup>4</sup>
0	43,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,08 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
100	45,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,14 <sup>b</sup>
300	44,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,71 ± 0,37 <sup>c</sup>
1000	45,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,10 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,05 <sup>b</sup>	13,5 ± 1,2 <sup>d</sup>

**Periodo de post-tratamiento**

Concentración Ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	ECI <sup>5</sup>
0	70,8 ± 3,3 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>a</sup>
100	65,6 ± 3,5 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>a</sup>
300	69,2 ± 4,8 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>
1000	60,8 ± 4,6 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,05 <sup>a</sup>
Ayuno (20 h)	43,2 ± 2,6 <sup>b</sup>	1,81 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Peso fresco inicial (mg) de la larva ± error estándar al inicio de cada periodo.

<sup>2</sup> Tasa de Consumo Relativo = (Ing/PiL x T) ± error estándar; donde Ing = consumo de disco foliar durante el periodo de ensayo (mg de peso seco), PiLs = Peso inicial de la larva (mg de peso seco) y T = periodo del ensayo (días).

<sup>3</sup> Tasa de Incremento de Peso = (ΔP/PiL x T) ± error estándar; donde ΔP = incremento de peso de la larva durante el periodo de ensayo (mg de peso seco).

<sup>4</sup> Consumo Relativo del Producto = (TCR x D) ± error estándar; donde D= dosis del compuesto (μg del compuesto/mg de peso seco de disco foliar).

<sup>5</sup> Eficiencia de Conversión del alimento Ingerido = (TIP/TCR) ± error estándar.

Dentro de cada columna, las medias con la misma letra no difieren significativamente (Student-Newman-Keuls, p≤0,05). n=20 en el periodo de tratamiento y n= 10 en el periodo de post-tratamiento.

#### 4.1.2 TEUMASSILENINA C

Para el caso de la teumassilenina C, en el periodo de tratamiento, podemos ver una reducción significativa en la tasa de consumo relativo según se va aumentando la dosis, así como una reducción en la tasa de incremento de peso. Para el consumo y el crecimiento la respuesta fue dosis-dependiente, registrándose una relación inversa de la TCR y TIP con el CRP.

En el periodo de post-tratamiento no se aprecian diferencias significativas entre las larvas que fueron sometidas a diferentes dosis del producto y las control, así como las que estuvieron en ayuno, por lo que podemos concluir que no hay un efecto post-ingestivo del producto, por lo que el modo de acción de este compuesto es de tipo disuasorio

Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Índices nutricionales de larvas de *L. decemlineata* alimentadas con discos foliares de patata tratados con teumassilenina C durante 20 horas (periodo de tratamiento) y no tratados otras 20 horas (periodo de post-tratamiento).

*Periodo de tratamiento*

Concentración Ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	CRP <sup>4</sup>
0	44,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,41 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,07 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
100	44,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,28 ± 0,13 <sup>b</sup>
300	44,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,91 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,14 ± 0,38 <sup>c</sup>
1000	44,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,06 <sup>c</sup>	15,1 ± 1,3 <sup>d</sup>

*Periodo de post-tratamiento*

Concentración Ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	ECI <sup>5</sup>
0	72,3 ± 3,7	1,81 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,07 <sup>a</sup>
100	68,8 ± 2,6	1,87 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,07 <sup>a</sup>
300	71,6 ± 0,9	1,76 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,05 <sup>a</sup>
1000	59,2 ± 4,0	1,89 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>a</sup>
Ayuno (20 h)	46,8 ± 0,8	1,99 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>

1,2,3,4 y 5: Como en tabla 4.1.

## **4.2 SPODOPTERA EXIGUA**

Se seleccionó el *neo*-clerodano **scutecyprol A**, uno de los compuestos que en ensayos de preferencia dio un ID del 91% y con un IA del 43% (en no preferencia), por lo que sugiere un modo de acción disuasorio, si bien no era descartable cierta actividad tóxica.

### **4.2.1. SCUTECYPROL A**

Los resultados obtenidos tanto para el periodo de tratamiento como el de post-tratamiento se detallan en la tabla 4.3.

En el periodo de tratamiento se observa una reducción significativa con respecto al control, tanto en la tasa de consumo relativo (TCR) como en la tasa de incremento de peso (TIP). Según aumenta el CRP se reducen ambas tasas.

En el periodo de post-tratamiento, no hay diferencia entre las distintas concentraciones y tampoco con las larvas en ayuno. Esto implica que las larvas son capaces de recuperarse de los efectos producidos por la ingestión del scutecyprol A en la fase de tratamiento y que por tanto, este compuesto tiene un modo de acción disuasorio frente a larvas de *S. exigua*.

**Tabla 4.3. Índices nutricionales de larvas de *S. exigua* alimentadas con discos foliares de remolacha tratados con scutecyproil A durante 12 horas (periodo de tratamiento) y no tratados otras 12 horas (periodo de post-tratamiento).**

**Periodo de tratamiento**

Concentración ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	CRP <sup>4</sup>
0	77,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
100	77,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,67 ± 0,16 <sup>b</sup>
300	77,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,34 ± 0,26 <sup>b</sup>
1000	76,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,09 ± 0,07 <sup>c</sup>	2,72 ± 0,83 <sup>b</sup>

**Periodo de post-tratamiento**

Concentración ppm	PiL <sup>1</sup>	TCR <sup>2</sup>	TIP <sup>3</sup>	ECI <sup>5</sup>
0	106.2 ± 3.0 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>
100	103.2 ± 3.9 <sup>a</sup>	1.57 ± 0,21 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.08 <sup>a</sup>
300	79.0 ± 3.1 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.67 ± 0,07 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>
1000	78.8 ± 4.4 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.06 <sup>a</sup>
Ayuno (12 h)	62.7 ± 1.8 <sup>c</sup>	1.91 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>

1,2,3,4 y 5: Como en tabla 4.3.

### 4.3 DISCUSIÓN

La actividad antialimentaria de los diterpenos *neo*-clerodanos ha sido asociada a un efecto tóxico, disuasorio de la alimentación, o al efecto combinado de estos dos modos de acción (Simmonds et al., 1989; Ortego et al., 1995; Rodríguez, 1997). Los diterpenos *neo*-clerodanos teumassilenina A y teumassilenina C mostraron índices antiapetitivo y disuasorio elevados frente a larvas de *L. decemlineata*, por lo que no se podía saber *a priori* si actuaban como tóxicos o como disuasorios de la alimentación. El modo de acción de estos compuestos fue determinado con la ayuda de los índices nutricionales para verificar si presentaban efectos post-ingestivos. Las reducciones del consumo, el crecimiento y la eficiencia de conversión del alimento ingerido en larvas alimentadas con teumassilenina A en el periodo de post-tratamiento sugieren un modo de acción tóxico en las larvas de esta especie. Por el contrario, las larvas alimentadas con teumassilenina C se recuperan durante este periodo, al igual que las larvas que estuvieron en ayuno, indicando que actúa como disuasorio de la alimentación. Estos resultados ponen de manifiesto como pequeños cambios estructurales, en este caso la transformación del aldehído y el hidroxilo de los carbonos 4 y 5 en un epóxido, pueden modificar el modo de acción de estos compuestos. Asimismo, López-Olguin (1998) determinó que el *neo*-clerodano scutalpina B es un potente disuasorio de la alimentación para *L. decemlineata*, mientras que el estructuralmente relacionado scutalpina I tiene un modo de acción tóxico en esta misma especie. En cuanto al otro compuesto estudiado, el *neo*-clerodano scutecyprol A, nuestros resultados con índices nutricionales confirman que este compuesto tiene un modo de acción disuasorio frente a larvas de *S. exigua*.

La abundancia en plantas de terpenoides de las más variadas estructuras ha permitido su extracción, identificación estructural y evaluación como plaguicidas. La actividad antialimentaria de algunos *neo*-clerodanos y otros terpenoides se ha asociado a los efectos de estos compuestos sobre los quimiorreceptores del aparato bucal, así como a sus efectos post-ingestivos sobre otros órganos diana (Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993); O. Koul et al., 1996); Ortego et al., 1998). Sin embargo, los mecanismos de acción y el metabolismo de la mayoría de estos compuestos no son conocidos o están restringidos a unas pocas especies. Es por tanto necesario profundizar en el conocimiento a nivel bioquímico, molecular y fisiológico del modo de acción de estos



compuestos con el objeto de optimizar su eficacia y especificidad, así como racionalizar sus aplicaciones.

# CAPÍTULO 5

## Efectos de terpenoides tóxicos y disuasorios sobre enzimas de detoxificación en larvas de *S. exigua*

---

Los insectos son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos exógenos, entre los que se encuentran los metabolitos secundarios presentes en sus plantas-huesped, por medio de la actividad de sus enzimas de detoxificación, (Ahmad et al., 1986; Brattsten, 1988). Aproximadamente 20 sistemas enzimáticos están implicados en la detoxificación de aleloquímicos en insectos (Terriere, 1984). Los más importantes son las monooxigenasas, la glutatión-S-transferasas y las esterasas (Feyereisen, 1999; Ranssem et al., 2002). La actividad de las enzimas de detoxificación está relacionada con el nivel de consumo del insecto dentro de cada estadio larvario (Wilkinson y Brattsten, 1972) y con las diferentes estrategias de alimentación de los insectos herbívoros (Mullin, 1985). Además, se ha podido constatar que la producción de estas enzimas es inducible (Snyder y Glendinning, 1996) y están implicadas en la aparición de resistencia (Soderlund y Bloomquist, 1990).

Las enzimas de detoxificación son energéticamente costosas, por lo que una estrategia común en insectos es producir estas enzimas en proporción a la cantidad de xenobiotas a los que debe hacer frente (Berenbaum y Zangerl, 1994). Asimismo, es esperable que el insecto intente eliminar mediante la inducción de enzimas de detoxificación los metabolitos secundarios que sean tóxicos, mientras que esta inducción no sería necesaria para aquellos compuestos que sólo sean disuasorios de la

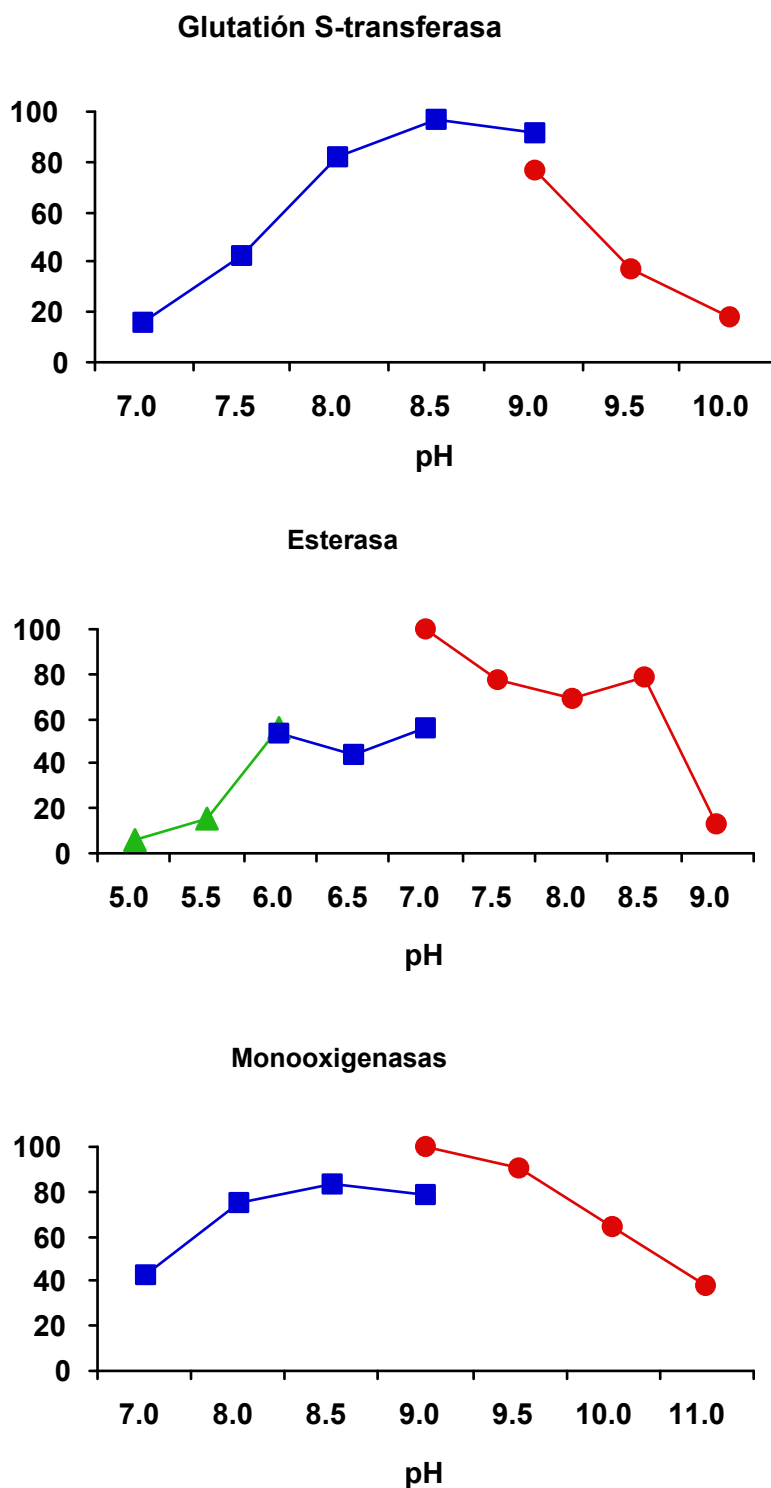
alimentación. Ortego et al. (1999) comprobaron que las actividades de las enzimas de detoxificación presentes en el tracto digestivo de larvas de *L. decemlineata* variaban irreversiblemente cuando el insecto era alimentado con una mezcla de limonoides con modo de acción tóxico, mientras que por el contrario no había ninguna variación en la actividad enzimática cuando se alimentaban con hojas de patata tratadas un *neoclerodano* diterpeno con modo de acción disuasorio.

Nuestro objetivo es comprobar si esta respuesta enzimática dependiente del modo de acción del metabolito secundario al que están expuestos también ocurre en larvas de *S. exigua*. Para ello hemos seleccionado el **scutecyprol A** (Anexo I), un diterpeno *neoclerodano* con una potente actividad como disuasorio de la alimentación frente a larvas de *S. exigua* (Capítulo 3.1.4) y que no mostraba efectos post-ingestivos (Capítulo 4.2.1). De entre los compuestos que hemos ensayado frente a este lepidóptero, no encontramos ninguno que pudiera utilizarse como representativo de un modo de acción exclusivamente tóxico, por lo que decidimos utilizar una mezcla de limonoides (1,7-di-O-acetilhavanensina y 3,7-di-O-acetilhavanensina, **Tr-11** y **Tr-12** respectivamente en Anexo I) aislados a partir de extractos de semillas de *Trichilia havanensis* (Meliaceae), que mostró un modo de acción tóxico frente a larvas de *S. exigua* (López-Olguín, 1998).

### 5.1. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE DETOXIFICACIÓN EN LARVAS DE *S. EXIGUA*

Las actividades enzimáticas en los extractos digestivos de *S. exigua* fueron analizadas mediante un sistema discontinuo de tampones en el rango de pH 5,0-11,0, lo que permitió determinar el pH óptimo para cada actividad. (Figura 5.1). Los resultados de estos análisis muestran que la actividad frente a CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), sustrato general de glutatión S-transferasas (GST), presenta un perfil ligeramente alcalino, con un pH óptimo a 8,5. Utilizando citocromo c como sustrato de monooxigenasas también se obtuvo un perfil básico, siendo la actividad máxima ligeramente más alcalina, en el rango de pH 8,5-9,0. Para la actividad esterasa utilizamos el sustrato 1-NA (1-naftil acetato), que presentaba tres picos de actividad a pH 6,0, 7,0 y 8,5, siendo el óptimo a pH 7,0. Estos resultados son acordes con el pH fisiológico del tubo digestivo y con los encontrados en larvas de numerosas especies de lepidópteros (Brattsten et al., 1980; Weinhold et al., 1990; Ortego et al., 1998).

Fig. 5.1. Efecto del pH sobre la hidrólisis de substratos específicos de Glutathion S-Transferasas (CDNB), Esterasas (1-NA) y monooxigenasas (citocromo c), por extractos digestivos de larvas de *S. nonagrioides*.



Los datos representan la media de tres repeticiones con un error estándar inferior al 5%. Los tampones de reacción fueron: 0,1 M citrato (▲), 0,1 M Tris-HCl (■), 0,1 M Glicina-NaOH (●).

En la tabla 5.1 se indica el pH óptimo y las actividades específicas para cada uno de los sustratos ensayados con los extractos digestivos de *S. exigua*. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Van laecke et al. (1995) utilizando una población de laboratorio de esta misma especie (579 nmol/min/mg para CDNB y 867 nmol/min/mg para 1-NA). Estas enzimas parecen estar implicadas en la resistencia de poblaciones de *S. exigua* a diferentes tipos de insecticidas (Van Laecke et al., 1995; Smagghe et al., 2003; Natsuhara et al., 2004)

**Tabla 5.1. Características de las enzimas de detoxificación presentes en extractos digestivos de larvas de *S. exigua*.**

Tipo de actividad	Substrato	pH óptimo	Actividad específica <sup>1</sup>
GST	CDNB	8,5	301 ± 18
Esterasa	1-NA	7,0	1089 ± 21
Monooxigenasa	Citocromo c	9,0	57 ± 4

<sup>1</sup> Actividad específica como nmoles de sustrato conjugado (Glutación S-transferasa), hidrolizado (Esterasa), o reducido (Monooxigenasa)/min/mg de proteína). Los valores son las medias ± error estándar (n = 3)

## 5.2 EFECTOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN EN LARVAS DE *S. EXIGUA*.

Estos ensayos se realizaron utilizando larvas de *S. exigua* que fueron congeladas al finalizar los periodos de tratamiento y post-tratamiento en ensayos nutricionales. En el caso del scuteciprol A se utilizaron las larvas ensayadas en el capítulo 4, mientras que las larvas alimentadas con la mezcla de limonoides (1,7-di-O-acetilhavanensina y 3,7-di-O-acetilhavanensina de *Trichilia havanensis*) provenían de estudios anteriores realizados con la misma metodología en nuestro laboratorio (López-Olguín, 1998).

La actividad específica de las enzimas estudiadas resultó dependiente del peso de la larva y de la cantidad de proteína del extracto. Concretamente, se aprecia una correlación negativa entre el contenido en proteína del extracto y las actividades

específicas de monooxigenasas ( $r^2=0.562$ ,  $p\leq 0.0001$ ), glutatión S-transferasas ( $r^2=0.312$ ,  $p\leq 0.0001$ ) y esterasas ( $r^2=0.213$ ,  $p\leq 0.0001$ ). De acuerdo con estos resultados, y dado que el peso de las larvas y el contenido en proteína de los extractos variaba dependiendo del tratamiento al que habían estado sometidas las larvas, estas diferencias fueron consideradas en el análisis usando el contenido en proteína de los extractos como covariable.

Se han analizado las actividades enzimáticas de larvas de *S. exigua* alimentadas con discos foliares de remolacha tratados con diferentes dosis del compuesto a ensayar durante 12 horas (periodo de tratamiento) y con discos foliares de remolacha no tratados durante las siguientes 12 horas (periodo de post-tratamiento). Además, se incluye en los ensayos un grupo de larvas que se mantuvieron en ayuno durante el periodo de tratamiento y se alimentaron con discos foliares no tratados durante el periodo de post-tratamiento. No se aprecian diferencias significativas entre las larvas control y las sometidas a ayuno para ninguna de las actividades enzimáticas analizadas, tanto en el periodo de tratamiento como en el de post-tratamiento (Tablas 5.2 y 5.3). Esto nos indica que la simulación del 100% de actividad antialimentaria (ayuno) no tiene ningún efecto sobre la actividad de las enzimas de detoxificación. En consecuencia, si se detectan cambios de actividad enzimática en larvas que han ingerido metabolitos secundarios, estos se deberán a los efectos post-ingestivos de estos compuestos.

Larvas alimentadas con discos foliares que contenían scutecyprol A consumían y crecían menos que los controles durante el periodo de tratamiento, pero se recuperaban durante el periodo de post-tratamiento (Capítulo 4, Tabla 8). El análisis de las actividades enzimáticas de estas larvas demuestra que el consumo de scutecyprol A no afecta a la actividad de glutatión S-transferasas, esterasas y monooxigenasas durante los periodos de tratamiento y post-tratamiento (Tabla 5.2). En general, se observa un ligero aumento de las tres actividades según aumenta la dosis, siendo aún más elevadas en el caso de larvas mantenidas en ayuno. Este aumento es debido a la correlación negativa entre la actividad y el tamaño de las larvas, no habiendo diferencias significativas debido al efecto del tratamiento (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Actividades enzimáticas de larvas de *S. exigua* alimentadas con discos foliares de remolacha tratados con Scutecyprol A durante 12 horas (periodo de tratamiento) y no tratados otras 12 horas (periodo de post-tratamiento).

**Periodo de tratamiento**

Concentración ppm	GST <sup>1</sup> (CDNB)	Esterasa <sup>2</sup> (1-NA)	Monooxigenasa <sup>3</sup> (citocromo c)
0	258 ± 23	669 ± 61	59 ± 7
100	254 ± 17	651 ± 120	83 ± 9
300	346 ± 33	643 ± 83	52 ± 12
1000	355 ± 35	407 ± 69	47 ± 15
Ayuno (12 h)	365 ± 30	854 ± 68	52 ± 11

**Periodo de post-tratamiento**

Concentración ppm	GST <sup>1</sup> (CDNB)	Esterasa <sup>2</sup> (1-NA)	Monooxigenasa <sup>3</sup> (citocromo c)
0	285 ± 16	673 ± 49	73 ± 10
100	306 ± 22	759 ± 47	77 ± 8
300	270 ± 31	956 ± 219	92 ± 9
1000	302 ± 37	957 ± 106	103 ± 19
Ayuno (12 h)	342 ± 18	921 ± 186	73 ± 12

<sup>1</sup> Actividad específica de Glutación S-transferasas utilizando CDNB como sustrato (nmoles de sustrato conjugado/min/mg de proteína).

<sup>2</sup> Actividad específica de Esterasas utilizando 1-NA como sustrato (nmoles de sustrato hidrolizado/min/mg de proteína).

<sup>3</sup> Actividad específica de Monooxigenasas utilizando citocromo c como sustrato (nmoles de sustrato reducido/min/mg de proteína).

\* Significativamente distinto del control (Dunnett, p≤0,05). n=10 en los periodos de tratamiento y post-tratamiento.

Larvas alimentadas con discos foliares que contenían la mezcla de limonoides consumían y crecían menos que los controles, tanto en el periodo de tratamiento como en el de post-tratamiento (López-Olguín, 1998). Los ensayos enzimáticos realizados con estas larvas muestran que el consumo de la mezcla de limonoides afecta a diferentes actividades enzimáticas (Tabla 3). La actividad glutatión S-transferasa se incremento de forma significativa durante el periodo de tratamiento a concentraciones de 300 y 1000ppm, permaneciendo estos niveles de actividad elevados durante el periodo de post-tratamiento a 1000ppm. Por el contrario, la actividad esterasa se redujo significativamente durante el periodo de tratamiento en larvas tratadas a 1000ppm, si bien estas recuperaron su actividad normal durante el periodo de post-tratamiento. En cuanto a la actividad monooxigenasa, no se aprecia ningún tipo de efecto a las dosis ensayadas.



Tabla 5.3. Actividades enzimáticas de larvas de *S. exigua* alimentadas con discos foliares de remolacha tratados con una mezcla de 1,7-di-O-acetilhavanensina y 3,7-di-O-acetilhavanensina de *Trichilia havanensis* durante 12 horas (periodo de tratamiento) y no tratados otras 12 horas (periodo de post-tratamiento).

*Periodo de tratamiento*

Concentración ppm	GST <sup>1</sup> (CDNB)	Esterasa <sup>2</sup> (1-NA)	Monooxigenasa <sup>3</sup> (citocromo c)
0	293 ± 65	867 ± 84	73 ± 7
100	392 ± 67	702 ± 120	73 ± 14
300	545 ± 96 *	546 ± 159	72 ± 15
1000	570 ± 85 *	492 ± 63 *	97 ± 16
Ayuno (12 h)	334 ± 57	915 ± 126	101 ± 9

*Periodo de post-tratamiento*

Concentración ppm	GST <sup>1</sup> (CDNB)	Esterasa <sup>2</sup> (1-NA)	Monooxigenasa <sup>3</sup> (citocromo c)
0	312 ± 55	537 ± 84	62 ± 11
100	385 ± 56	480 ± 36	55 ± 7
300	387 ± 50	510 ± 42	74 ± 23
1000	485 ± 57 *	555 ± 72	62 ± 7
Ayuno (12 h)	299 ± 20	552 ± 63	91 ± 9

1, 2 y 3 como en Tabla 5.2.

\*Significativamente distinto del control (Dunnett,  $p \leq 0,05$ ).  $n=10$  en los periodos de tratamiento y post-tratamiento.

### 5.3. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que los efectos de los compuestos ensayados sobre las actividades enzimáticas en larvas de *S. exigua* se ajustan a su modo de acción. Así, la mezcla de limonoides, con un modo de acción tóxico, afecta a la actividad de las enzimas de detoxificación en los periodos de tratamiento y post-tratamiento. Por el contrario, el scutecepyrol A, con un modo de acción disuasorio de la alimentación, no tiene ningún efecto sobre estos procesos enzimáticos. Resultados similares fueron obtenidos por Ortego et al. (1999), al analizar los efectos de terpenoides con diferentes modos de acción sobre las actividades de las enzimas de detoxificación presentes en el tracto digestivo de larvas de *L. decemlineata*. scutalpina-B, un neo-clerodano aislado de *Scutellaria alpina* (Labiatae) que exhibe una potente actividad como disuasorio de la alimentación frente a larvas de *L. decemlineata*, no tuvo ningún efecto sobre las actividades enzimáticas. Sin embargo, cuando emplearon la misma mezcla de limonoides que hemos usado en nuestros ensayos, y que también resulta tóxica frente a larvas de *L. decemlineata*, obtuvieron efectos post-ingestivos sobre algunos procesos bioquímicos. Concretamente, una reducción de la actividad esterasa y un incremento de las actividades de glutatión S-transferasas y monooxigenasas. Podemos, por tanto, deducir que la respuesta metabólica en función del efecto post-ingestivo del compuesto es un fenómeno que ocurre en especies pertenecientes a diferentes órdenes de insectos y con diferentes hábitos alimenticios.

La inducción de los sistemas metabólicos de detoxificación juegan un importante papel en la adaptación de los insectos a sus plantas huésped. Estudios recientes han demostrado que en las especies de mariposas del género *Papilio* que se alimentan de plantas que contienen furanocumarinas se inducen monooxigenasas concretas que son responsables de metabolizar estas fitotoxinas, mientras que estos genes no se inducen en las especies que se alimentan sobre plantas que no contienen estos compuestos (Weimin et al., 2003). Información relativa al papel de las enzimas de detoxificación implicadas en la inactivación de terpenoides es escasa. Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad glutatión S-transferasa como respuesta al consumo de la mezcla de limonoides, sugiriendo que estas enzimas pueden estar implicadas en su detoxificación en larvas de *S. exigua*. Ortego et al. (1999) demostraron que en larvas de *L. decemlineata* tanto glutatión S-transferasas como monooxigenasas se inducían en respuesta al consumo de esta mezcla de limonoides. Además, la

toxicidad de extractos de semillas del neem sobre larvas de *L. decemlineata* y *Plutella xylostella* aumenta cuando se añade el inhibidor de monooxigenasas piperonil butóxido (Zehnder y Warthen, 1988), indicando que el bloqueo de la inactivación metabólica de los limonoides vía monooxigenasas puede ser responsable del efecto sinérgico.

Los sistemas enzimáticos de detoxificación en insectos pueden ser inhibidos por algunos de los metabolitos secundarios producidos por plantas (Yu, 1984). Entre los compuestos que han mostrado esta actividad se encuentran algunos terpenoides. Así, los triterpenoides stigmasterol y sitosterol y el tetraterpeno  $\beta$ -caroteno inhiben la actividad monooxigenasa en larvas de *S. frugiperda* (Yu, 1983). Además, Smirle et al. (1996) mostraron que la ingestión de extractos del neem reducen significativamente la actividad esterasa en larvas y adultos de *Choristoneura rosaceana*. Nuestros resultados también muestran una disminución de la actividad esterasa en larvas de *S. exigua* como consecuencia de la ingestión la mezcla de limonoides, e idénticos resultados fueron obtenidos cuando larvas de *L. decemlineata* fueron alimentadas con hojas de patata tratadas con esta misma mezcla de limonoides (Ortego et al., 1999). Otros metabolitos secundarios que son capaces de inhibir la actividad esterasa en insectos son el ácido hidroxámico DIMBOA (Yan et al., 1995; Ortego et al., 1998) el compuesto polifenólico gossipol y la cumarina umbeliferona (Brattsten, 1987). Se ha sugerido que compuestos que reducen la actividad de las enzimas de detoxificación pueden ser útiles en el control de poblaciones de insectos que han desarrollado resistencia metabólica a insecticidas como resultado de un aumento de las actividades enzimáticas (Smirle et al., 1996). Sin embargo, nuestros resultados no permiten diferenciar si la disminución de la actividad esterasa se debe a que la mezcla de limonoides actúan como inhibidores específicos de esta actividad enzimática o a un reajuste por parte del insecto para compensar el gasto metabólico derivado de la inducción de las otras actividades enzimáticas.

# Conclusiones

---

De los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir:

1. Terpenoides de origen botánico y hemisintéticos presentan actividad antialimentaria frente a larvas de *L. decemlineata* o de *S. exigua*. Las ajugarinas (diterpenos *neo*-clerodánicos) y los sesquiterpenos eudesmanos fueron específicos de *S. exigua*; mientras que las teumasileninas (diterpenos *neo*-clerodánicos) y las artemisiifolinas (sesquiterpenos) lo fueron de *L. decemlineata*; y los derivados de 19-acetilnaphalina y eriocephalina, el scuteocyprol A y la scutalbina C (diterpenos *neo*-clerodánicos), así como los limonoides presentaron actividad antialimentaria frente a ambas especies.
2. La presencia del anillo de decalina, grupo epóxido entre C-4 y C-18, y las funciones que aparecen sobre C-6 y C-19 son determinantes de la actividad en los diterpenos *neo*-clerodánicos. Los carbonos C-6 y C-15 parecen jugar un importante papel en la actividad de los sesquiterpenos. La funcionalidad en C-1 y C-3, ya sea hidroxilo o cetona, son los principales responsables de actividad en los limonoides, mientras que el grupo epóxido en posición C-14-15 no parece ser imprescindible.
3. Mínimos cambios en la estructura molecular de los compuestos ensayados son los causantes de cambios en el tipo de actividad antialimentaria (actividad disuasoria y/o actividad antiapetitiva), así como de su especificidad por alguna de las dos especies.
4. En general, las larvas del insecto especialista (oligófago) *L. decemlineata* son más susceptibles frente a los terpenoides ensayados que las del generalista (polífago) *S.*

*exigua*. La única excepción corresponde a los grupos de las ajugarinas y los eudesmanos, que sólo son activas frente a larvas de *S. exigua*.

5. Un alto porcentaje de los compuestos naturales ensayados muestran actividad antialimentaria contra alguna de las dos especies de insectos, mientras que alrededor de la mitad de los compuestos hemisintéticos carecen de actividad. Estos resultados sugieren que la estructura global de la molécula determina la actividad biológica.

6. La comparación de los índices nutricionales en los periodos de tratamiento y post-tratamiento confirman que la teumasilenina A tiene un modo de acción tóxico en larvas de *L. decemlineata*, mientras que teumasilenina C y scuteocyprol A actúan como disuasorios de la alimentación frente a larvas de *L. decemlineata* y *S. exigua*, respectivamente.

7. El pH óptimo y la actividad específica de las principales actividades enzimáticas de detoxificación (mono-oxigenasas P-450, esterases y glutatión S-transferasas) presentes en el tubo digestivo de larvas de *S. exigua* son acordes a los obtenidos con otras especies de lepidópteros.

8. La respuesta metabólica en larvas de *S. exigua* expuestas a metabolitos secundarios es función del efecto post-ingestivo del compuesto. Así, una mezcla de limonoides con un modo de acción tóxico afecta a la actividad de las enzimas de detoxificación. Por el contrario, el scuteocyprol A, con un modo de acción disuasorio de la alimentación, no tiene ningún efecto sobre estos procesos enzimáticos.

# Bibliografía

---

- Aerts, R. J., A. Stoker, M. Boishuizon, I. Jaarsma, M. Van der Heuvel, E. Van der Meijden y R. Verpoorte. 1992. Detrimental effect of “cinchona” leaf alkaloids on larvae of the polyphagous insect *Spodoptera exigua*. *J. Chem. Ecol.* 18: 1955-1964.
- Agrawal, A. A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* 279: 1201-1202.
- Agrawal, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 329-335.
- Alford, A. R., J. A. Cullen, R. H. Storch y M.D. Bentley. 1987. Antifeedant activity of limnoids against the Colorado potato beetle. (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 575-578.
- Anderson, J. C., W. M. Blaney, M. D. Cole, L. L. Fellows, S. V. Ley, R. N. Sheppard y M. S. J. Simmonds. 1989. The structure of two new clerodane diterpenoid potent insect antifeedants from *Scutellaria woronowii* (Juz); jodrellin A & B. *Tetrahedron Letters* 30, 4737-4740.
- Arroyo, V. M. 1995. *Nombres vulgares de insectos de interés agrícola*. MAPA, Madrid. 155 pp.
- Ascher S.K.R. 1993. Non conventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Arch. Insect. Physiol.* 22: 433-449.
- Ave D. A., P. Gergoy y W. Tingey. 1987. Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. *Entomol. Exp. Appl.* 44: 131-138.
- Bahena, J. F., M. González, E. Viñuela y P. del Estal. 1998. Establecimiento de la especie huésped óptima para la cría en laboratorio del parasitoide de noctuidos *Hyposoter didymator*. *Bol. San. Veg. Plagas* 24: 465-472 .
- Balachowsky, A. S. 1963. *Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome I. Coléoptères*. 2º Volume. Ed. Masson et C<sup>ie</sup>. Paris. 1391 pp.
- Balachowsky, A. S. 1972. *Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome II. Lépidoptères*. 2º Volume. Ed. Masson et C<sup>ie</sup>. Paris. 1634 pp.

- Balandrin, M., J. A. Klocke. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228, 1154-1160.
- Beck, S. D. y J. C. Reese. 1975. Insect-plant interactions: nutrition and metabolism. *En* Wallace, J. W. y R. L. Mansell (eds.). Biochemical interaction between plants and insects. *Rec. Adv. Phytochem.* 10: 41-75.
- Bellés, X., F. Camps, J. Coll y M. D. Piulachs. 1985. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera). *J. Chem. Ecol.* 11: 1439-1445.
- Bentley, M. D., D. E. Leonard, W. F. Stoddard y L. H. Zalkow. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 77: 393-397.
- Bentley, M. D., M. S. Rajab, A. A. Alford, M. J. Mendel y A. Hassanali. 1988. Structure-activity studies of modified *Citrus* limonoids as antifeedants for Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol. Exp. Appl.* 49: 189-193.
- Bentley, M. D., M. S. Rajab, M. J. Mendel y A. R. Alford. 1990. Limonoid model insect antifeedants. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1400-1403.
- Berenbaum, M. R. 1991. Coumarins. Pp. 221-249 en: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal, G. y Berenbaum, M. (eds.), Academic Press, San Diego.
- Berenbaum, M. B. y G.A. Rosenthal. 1992. *Plant Secondary Metabolites: Vol. 1. The Chemical Participants*. Academic Press, New York.
- Blaney, W. 1987. An electrophysiological and behavioural properties of natural and synthetic drimare related compounds. *Physiol. Entomol.* 12: 281-291.
- Blaney, W. M., M. S. J. Simmonds, S. V. Ley y P. S. Jones. 1988. Insect antifeedants: a behavioural and electrophysiological investigation of natural and synthetically derived clerodane diterpenoids. *Entomol. Exp. Appl.* 46: 267-274.
- Blaney, W. M., M. S. J. Simmonds, S. V. Ley, J. C. Anderson y P. L. Toogood. 1990. Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 55: 149-160.
- Blau, P. A., P. Feeny, L. Contardo y D. S. Robson. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars: A contrast in toxicity and tolerance. *Science* 200: 1296-1298.
- Bloomquist, J. R. 1996. Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 163-90.
- Blum, M. S. 1992. Ingested allelochemicals in insect wonderland: a menu of remarkable functions. The virtuosity of insects in adaptively utilizing plant compounds. *Am. Entomol.* 38: 222-234.
- Boulter, D. (1993). Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* 34: 1453-1466.

- Bowers, M. D., N. E. Stamp y E. D. Fajer. 1991. Factors affecting calculation of nutritional indices for foliage-fed insects: an experimental approach. *Entomol. Exp. Appl.* 61: 101-116.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brattsten, L. B., S. L. Price, y C. A. Gunderson. 1980. Microsomal oxidases in midgut and fatbody tissues of a broadly herbivorous insect larva, *Spodoptera eridania* Cramer (Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 231-237.
- Brattsten, L.B., 1987. Inducibility of metabolic insecticide defenses in boll weevils and tobacco budworm caterpillars. *Pest. Biochem. Physiol.* 27, 13-23.
- Brewer, M. J. y J. T. Trumble. 1989. Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1520-1526.
- Bruno, M., C. Fazio, y N. A. Arnold. 1996a. Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria cypria*. *Phytochemistry* 42: 555-557.
- Bruno, M., F. Piozzi, B. Rodríguez, M. C. Delatorre, , N. Vassallo, y O. Servettaz, 1996b. Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria altissima* and *S. albida*. *Phytochemistry* 42a: 1059-1064.
- Bruno, M., F. Piozzi, A. M. Maggio, y M. S. J. Simmonds. 2002. Antifeedant activity of neoclerodane diterpenoids from two Sicilian species of *Scutellaria* . *Biochem. System. Ecol.* 30 (8): 793-799.
- Burballa, A., M. J. Sarasúa y J. Avilla. 1995. Alimentación, mortalidad y desarrollo de *Cydia pomonella* (L.) y de *Cacoecimorpha pronubana* (Hübner) sobre dieta con extracto de neem incorporado. *Bol. San. Veg. Plagas* 21: 425-437.
- Cappaert, D. L., F. A. Drummond y P. A. Logan. 1991. Incidence of natural enemies of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on a native host in México. *Entomophaga* 36: 369-378.
- Casagrande, R. A. 1987. The Colorado potato beetle: 125 years of mismanagement. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 33: 142-150.
- Casida, J. E. 1983. Development of synthetic insecticides from natural products: case history of pyretroids from pyrethrins. Pp. 109-123 en: *Natural Products For Innovative Pest Management*. Whitehead, D. y Bowers, W.S. (eds.), Pergamon Press, Oxford.
- Casida, J. E. y G. B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1-16.
- Cassier, P., D. Baghdassarian-Chalaye, N. De Besse, M. Papillon, L. Baldaia y P. Porcheron. 1988. Ecdysteroids and activation of epidermal cells in locust. *J. Insect Physiol.* 34: 669-673.
- Champagne, D. E., O. Koul, M. B. Isman, G. G. E. Scudder y G. H. N. Towers. 1992. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry* 31: 377-394.



- Chen, C. C., Y. J. Dong, L. L. Cheng y R. F. Hou. 1996. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Guava. *J. Econ. Entomol.* 89: 462-466.
- Cole, M.D., J. C. Anderson, W. M. Blaney, L. E. Fellows, S. V. Ley, R.N. Sheppard y M. S. J. Simmonds. 1990. Neo-clerodane insect antifeedants from *Scutellaria galericulata*. *Phytochemistry* 29: 1793-1796.
- Cole, M.D., P. D. Bridge, J. E. Dellar, L. E. Fellows, M. C. Cornish y J.C. Anderson, 1991. Antifungal activity of neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria*. *Phytochemistry* 30: 1125-1127.
- Cornell, H.V. y B. A. Hawkins. 2003. Herbivore responses to plant secondary compounds: A test of phytochemical coevolution theory. *The American naturalist* 161: 507-522.
- Croteau, R. 2000 Natural products (Secondary metabolites). Chapter 24. En: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Buchanan, B.; Grissem, W. y Jones, R. (eds.) American Society of Plants Physiologists.
- Cuñat, P., E. Primo, I. Sanz, M. D. Garcerá, M. C. March, W. S. Bowers y R. Martínez-Pardo. 1990. Biocidal activity of some Spanish Mediterranean plants. *J. Agric. Food Chem.* 38: 497-500.
- Cuñat, A. C., D. Díez-Martín, S. V. Ley, y F. J. Montgomery. 1996. Synthetic studies towards the clerodane antifeedant jodrellin A: preparation of a polycyclic model compound with antifeedant activity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1: 611-620.
- Danielson, P.B, R. J. Macintyre, y J. C. Fogleman. 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10797–10802.
- Deverall. B. J., 1979. *Defence mechanisms of plants*. Cambridge University Press.
- Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843–847
- Domínguez, G., M. C. de la Torre, B. Rodríguez. 1991. Transformation of Neoclerodane Diterpenoids into 1-Norneoclerodane Derivates. *Journal of Organic Chemistry* 56: 6595-6600
- Duffey, S. S y M. J. Stout, 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 3-37.
- Duke, S.O. 1990. Natural pesticides from plants. Pp. 511-517 en: *Advances in New Crops*. Janick, J. y Simon, J.E. (eds.). Timber Press, Portland.
- Erickson, J.M. y P. Feeny. 1974. Sinigrin: A chemical barrier to the black Swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*. *Ecology* 55: 103-111.
- Escoubas, P., L. Lajide, y J. Mitzutani. 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomol. Exp. Appl.* 66: 99-107.
- Farrar, R. 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 593-598.

- Fayos, J., M. Martínez-Ripoll, M. Paternostro, F. Piozzi, B. Rodríguez y G. Savona. 1979. New Clerodane Diterpenoid from *Teucrium eriocephalum*. *Journal of Organic Chemistry* 44: 4992.
- Feeny, P. 1992. The evolution of chemical ecology: Contributions from the study of herbivorous insects. Pp 1-35 en: *Herbivores. Their interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosental, G.A. y Berenbaum, M.R. (eds.), Academic Press, New York.
- Feldman, J. y T. Stone. 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the Cry3A endotoxin. Pp. 49-61 en: *Advances in insect control; the role of transgenic plants*. Carozzi N. y M. Koziel (eds.). Taylor & Francis Ltd. London.
- Fellows, L. E., S. V. Evans, R. J. Nash y E. A. Bell. 1986. Polyhydroxy plant alkaloids as glycosidase inhibitors and their possible ecological role. Pp. 72-78 en: *Natural Resistance of plants to Pests*. Gree, M. B. y Hedin, P. A. (eds), American Chem. Soc., Washington.
- Felton, G. W., K. K. Donato, R. M. Broadway y S. S Duffey. 1992. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of diatar protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 38: 277-285.
- Fernández-Gadea, F., B. Rodríguez, G. Savona, y B. Piozzi. 1984. Isoeriocephalin and 20-deacetyleriocephalin, neoclerodane diterpenoids from *Teucrium lanigerum*. *Phytochemistry* 23: 1113-1118.
- Ferro, D. N. 1985. Pest status and control strategies of the Colorado potato beetle. En Ferro, D. N. y R. Hurley (eds.). *Proceedings of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVII Int. Congr. Entomol. Massachusetts Exp. Stat. Res. Bull.* 704: 1-8.
- Fidantsef, A. L., M.J. Stout, J. S Thaler, S. S. Duffey y R. M. Bostock. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 97-114.
- Fontana, G. 1998. Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium massiliense*. *Journal of Natural Products* 61: 1242-1247.
- Forgash, A. J. 1987. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle. En: Ferro, D. N. y R. Hurley (eds.). *Proceedings of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVII Int. Congr. Entomol. Massachusetts Exp. Stat. Res. Bull.* 704: 33-52.
- Fraga, B. M. 2003. Natural sesquiterpenoids. *Natural Products Report* 20: 392-413.
- Frazier, J.L. The perception of plant allelochemicals that inhibit feeding. Pp. 1-42 en: *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*. L.B. Brattsten y S. Ahmad (eds.) Plenum Press, New York.
- Gebbinck, E.A., B. J. M. Jansen y A. de Groot. 2002. Insect antifendant activity of clerodane diterpenes and realted model compounds. *Phytochemistry* 61: 737-770.

- George, J., H. P. Bais y G. A. Ravishankar. 2000. Biotechnological production of plant-based insecticides. *Critical Reviews In Biotechnology* 20: 49-77.
- Georghiou, G. P. 1990. Overview of insecticide resistance. Pp. 19-41 en: *Managing resistance to agrochemicals*. M. B. Green, H. M. LeBaron y W. K. Moberg (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Georghiou, G. P. y R. B. Mellon. 1983. Pesticide resistance in time and space. Pp. 1-44 en: *Pest resistance to pesticides*. Georghiou, G. P. y T. Saito (eds.). Plenum Press. N. Y.
- Geuskens, R. B. M., J. M. Luteijn y L. M. Schoonhoven. 1982. Antifeedant activity of some ajugarin derivatives in three lepidopterous species. *Experientia* 39: 403-404.
- Gols, G. J. Z., J. J. A. van Loon y L. Messchendorp. 1996. Antifeedant and toxic effects of drimanens on Colorado potato beetle larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 69-76.
- Gómez, M. R. y M. Arroyo. 1981. *Catálogo sistemático de los lepidópteros ibéricos. (I) Macrolepidoptera*. Min. Agric. y Pesca. INIA. Madrid. 499 pp
- Gómez de Aizpurúa, C. 1992. *Biología y Morfología de las orugas. Noctuidae. Tomo X*. Boletín de Sanidad Vegetal. Fuera de serie 10. MAPA. 230 pp.
- Gomori, G. 1953. Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 445-453.
- González, A. G., I. G. Jiménez, A. G. Ravelo, , X. Bellés, y M. D. Piulachs. 1992. Antifeedant activity of dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae against *Spodoptera littoralis*. *Biochem. System. Ecol.* 20: 311-315.
- González-Coloma, A., M. Reina, R. Cabrera, P. Castañera y C. Gutiérrez. 1995. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *J. Chem. Ecol.* 21: 1255-1270.
- González-Coloma, A., C. Gutiérrez, , J. M. Miguel del Corral, , M. Gordaliza, , M. L. de la Puente y A. San Feliciano. 2000. Structure and species-dependent insecticidal effects of neo-clerodane diterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3677-3681.
- Govindachari, T. R., N. S. Narasimhan, G. Suresh, P. D. Partho, G. Gopalakrishnan y G.N. Krishna Kumari. 1995. Structure-related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. *J. Chem. Ecol.* 21: 1585-1600.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, y W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Harborne, J.B. (1982). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, New York.
- Henkel, T., R. M. Brunne, H. Müller y F. Reichel. 1999 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38:643-647.
- Hough-Goldstein, J. A. 1990. Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 19: 234-238

- Hu, M. Y., J. A. Klocke, S. F. Chiu y I. Kubo. 1993. Response of five insect species to a botanical insecticide, rhodojaponin III. *J. Econ. Entomol.* 86: 706-711.
- Huang, R.C., K. Tadera, F. Yagi, Y. Minami, H. Okamura, T. Iwagawa y M. Nakatani. 1996. Limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 43 (3): 581-583.
- Isman, M. B., O. Koul, A. Luckzynski y J. Kaminsky. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationships to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1406-1411.
- Isman, M. B., J. T. Arnason y G. H. N. Towers. 1995. Chemistry and biological activity of ingredients of other species of Meliaceae. Pp. 652-666. en: *The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. Schmutterer, H. (ed.). VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Isman, M. B. 1997. Neem and other Botanical insecticides: Barriers to comercialization. *Phytoparasitica* 25 (4): 339-344.
- Jackson, W. P., y S. V. Ley. 1981. Synthesis of substituted cis-decalins as potential insect antifeedants. *Journal of the Chemical Society, Perkin 1*: 1516-1519.
- Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. Pp 1-10 en: *Insecticides of plant Origin*. Arnason, J.T.; Philogene, B.J. y Moran, P. (eds.), A.C.S. Symposium Series 387. American Chemical Society, Washintong D.C.
- Jacques, R. L. Jr. 1988. *The potato beetles. The genus Leptinotarsa in North America (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Flora & fauna handbook No. 3. E. J. Brill. New York. 144 pp.
- Jansen, B. J. M. y A. de Groot. 1991. The occurrence and biological activity of drimane sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 8: 309-318
- Jermy, T. 1990. Prospects of antifeedant approach to pest control. A critical review. *J. Chem. Ecol.* 16: 3151-3160.
- Jimeno, M. L., M. C. Apreda-Rojas, F. H. Cano y R. Rodríguez. 2004. NMR and x-ray conformational study of artemisiifolin and three other related germacranolides. *Magnetic Resonance in Chemistry* 42: 474-483.
- Jones, P.S., S. V. Ley, E. E. Morgen y D. Santafianos. 1989. The chemistry of the neem tree. Pp. 19-45 en: *Focus of Phytochemicals-Pesticides*, M. Jacobson (ed.), CRC Bocaraton, FL.
- Kaethner, M. 1992. Fitness reduction and mortality effects of neem-based pesticides on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae). *J. Appl. Entomol.* 113: 456-465.
- Klocke, J. A. y I. Kubo. 1991. Defense of plants through regulation of insect feeding behavior. *Flo. Entomol.* 74: 18-23.
- Kojima, Y., y Kato, N. 1981a. Stereocontrol and biological activity of antifeeding substances with perhydrofurol [2,3-b]furan ring system. *Nippon Kagaku Kaishi*, 712-720.

- Kojima, Y., y N. Kato. 1981b. Stereocontrolled synthesis of clerodin homolg-a syntentic approach to structure-activity relationships. *Tetrahedron* 37: 2527-2538.
- Koul, O., J. S. Shankar y R. S. Kapil. 1996. The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 43-50.
- Kubo, I., Y. Fukuyama y A. Chapyra. 1983. Structure of ajugarin-V. *Chemistry Letters*, 223-224.
- Liu, Y. B., A. R. Alford y M. D. Bentley. 1989. Effects of epilimonol and starvation on feeding and oviposition by *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol. Exp. Appl.* 53: 39-44.
- Liu, Y.B., A. R. Alford, M. S. Rajab y M. D. Bentley. 1990. Effects and modes of action of *Citrus* limonoids against *Leptinotarsa decemlineata*. *Physiol. Entomol.* 15: 37-45.
- Liu, Y.-B., A. R. Alford y M. D. Bentley. 1991. A study on mode of antifeedant effects of epilimonol against *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol. Exp. Appl.* 60: 13-18.
- López-Olguín, J. 1997: Actividad de *Trichilia havanensis* J. sobre larvas de *Spodoptera littoralis*. *Bol. San. Veg. Plagas* 23, 3-10.
- López-Olguín, J. 1998. *Actividad de productos de Trichilia havanensis (Jacq.) y Scutellaria alpina subesp. javalambrensis (Pau), sobre Leptinotarsa decemlineata (Say) y Spodoptera exigua (Hübner)*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- López-Olguín, J., M. C. de la Torre, F. Ortego, P. Castañera y B. Rodríguez. 1999. Structure-activity realtionships of natural and synthetic neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* against Colorado potato beetle. *Phytochemistry* 50: 749-753.
- Lowery, D. T. y M. B. Isman. 1993. Antifeedant activity of extracts from neem, *Azadirachta indica*, to strawberry aphid, *Chaetosiphon fragaefolii*. *J. Chem. Ecol.* 19: 1761-1773.
- Lowery, D. T. y M. B. Isman. 1996. Inhibition of aphid (Homoptera: Aphididae) reproduction by neem seed oil and azadirachtin. *J. Econ. Entomol.* 89: 602-607.
- Luteijn, J. M. y A. E. de Groot. 1981. Stereospecific synthesis of 9 $\alpha$ -(acetoxymethyl)-8 $\alpha$ ,8'-epoxy-3 $\alpha$ ,4,4-trimethyl-trans-decalin-1 $\alpha$ -olacetate, a model for the investigation of structure-activity relationships of the insect antifeedant neoclerodanes. *Journal of Organic Chemistry* 47, 3448-3452.
- Marco, V. y E. Viñuela. 1994. Effects of hexaflumuron on fecundity, fertility and longevity of *Ephesia kuehniella* and *Spodoptera exigua*. *Med. Fac. Landboww. Univ. Gent* 59/2: 457-463.
- Margoliash, E. y N. Frohwirt. 1959. Spectrum of horse-heart cytochrome c. *Biochem. J.* 71: 570-572.
- Masters, B. S. S., H. Kamin, Q. H. Gibson, y C. H. Williams, Jr. 1965. Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 240: 921-931.

- McLaren, J. S. 1986. Biologically active substances from higher plants: status and future potential. *Pestic. Sci.* 17: 559-578
- Mendel, M. J., A. R. Alford y M. D. Bentley. 1991a. A comparison of the effects of limonin on Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* y fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, larval feeding. *Entomol. Exp. Appl.* 58: 191-194.
- Mendel, M. J., A. R. Alford, M. S. Rajab y M. D. Bentley. 1991b. Antifeedant effects of *Citrus* limonoids differing in A-ring structure on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 84: 1158-1162
- Merritt, A. T. y S. V. Ley. 1992. Clerodane diterpenoids. *Natural Products. Reports.* 9: 243-287.
- Metcalf, R. L. 1993. An increasing public concern. Pp. 426-430. En: *The pesticide question. environment, economics and ethics*. Pimentel, D. y H. Lehman (eds.). Chapman and Hall. N. Y.
- Metcalf, R.L. 1995. Rotenoids. En: *Organic Insecticides. Their Chemistry and mode of action*. Wiley (Interscience), New York.
- Mikolajczak, K. L. y D. K. Reed. 1987. Extractives of seeds of the meliaceae effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.) and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.* 13: 99-111.
- Miyoshi, M. 1998. Structure-activity relationships of some Complex I inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1364: 326-244.
- Mizutani, J. 1999. Selected Allelochemicals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 653-671.
- Molish, H. 1937. *Die Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie*. Gustav Fischer, Jena.
- Mordue (Luntz), A.J. y A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39: 903-924.
- Muñoz, D. M., M. C. De la Torre, B. Rodríguez, M. S. J Simmonds y W. M. Blaney. 1997. Neo-clerodane insect antifeedants from *Scutellaria alpina* subsp *javalambrensis*. *Phytochemistry* 44: 593-597.
- Murray, K. D., A. R. Alford, E. Groden, F. A. Drummond, R. H. Storch, M. D. Bentley y P. M. Sugathapala. 1993. Interactive effects of an antifeedant used with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* delta endotoxin on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1793-1801.
- Murray, K. D., E. Groden, F. A. Drummond, A. R. Alford, S. Conley, R. H. Storch y M. D. Bentley. 1995. Citrus limonoid effects on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) colonization and oviposition. *Environ. Entomol.* 24: 1275-1283.
- Murray, K. D., E. Groden, F. A. Drummond, A. R. Alford, R. H. Storch y M. D. Bentley. 1996. Citrus limonoid effects on Colorado potato beetle larval survival and development. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 503-510.

- Murray, K. D., S. Hasegawa. y A. R. Alford, 1999. Antifeedant activity of citrus limonoids against Colorado potato beetle: comparison of aglycones and glucosides. *Entomol. Exp. Appl* 92: 331-334.
- Nakanishi, K, T. Goto, S. Ito, S. Natosi y S. Nozoe. 1974. Natural Products Chemistry. Academic Press, Inc; Tokyo, 1: 4
- Nakataki, M., T. Iwashita, H. Naoki y T. Hase. 1985. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. *Phytochemistry* 24: 195-196.
- Natsuhara, K; Shimada, K; Tanaka y T; Miyata. 2004. Phenobarbital induction of permethrin \*detoxification\* and phenobarbital metabolism in susceptible and resistant strains of the \*beet\* armyworm Spodoptera exigua (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79: 33-4.
- Oballe, R., E. Vargas-Osuna, J. R. M. Lyra, H. K. Aldebis y C. Santiago-Álvarez. 1995. Secuencia de aparición de parasitoides en poblaciones larvarias de lepidópteros que atacan al algodón en el Valle del Guadalquivir. *Bol. San. Veg. Plagas* 21: 659-664
- Ortego F., B. Rodríguez y P. Castañera (1995). Effects of the neoclerodane diterpenes form Teucrium on the feeding behavior of Colorado potato beetle larvae. *J. Chem. Ecol.* 21:1375-1386.
- Ortego, F., M. Ruíz, y P. Castañera. 1998. Effect of DIMBOA on growth and digestive physiology of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Insect Physiology* 44: 95-101.
- Ortego F., J. López Olguín, M. Ruiz, y P. Castañera. 1999. Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. *Pest. Biochem. Physiol.* 63 : 76-84.
- Parmar, B. S. 1995. Results with commercial neem formulations produced in India. pp. 453-470. En: *The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. Schmutterer, H. (ed.). VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Pascual, N., M. P. Marco y X. Bellés. 1990. Azadirachtin induced imaginal moult deficiencies in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored. Prod. Res.* 26: 53-57.
- Pelah, D., Z. Abramovich, A. Markus y Z. Wiesman. 2002 The use of comercial saponin from *Quillaja saponaric* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 407-409
- Perry, N. B. , E. J Burgess, L. M. Foster, y P. J. Gerard. 2003. Insect antifeedant sesquiterpene acetals from the liverwort *Lepidolaena clavigera*. *Tetrahedron Letters* 44: 1651-1653.
- Pickett, J. A. 1991. Lower terpenoids as natural insect control agents. En: *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Harborne, J.B. & Tomas-Barberan, F.A. (eds). Proc. Phytochemistry Soc. Europe, 31.Clarendon Press, Oxford. 297-313.

- Pinhey, J.T., et al, 1965.. Australian Journal of Chemistry 18: 543-
- Piozzi, F., B. Rodríguez y G. Savona. 1987. Advances in the chemistry of the furanoditerpenoids from *Teucrium* species. *Heterocycles* 25: 807-841.
- Poitout, S. y R. Bues. 1970. Élevage de plusieurs espèces de lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel simplifié. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 2: 79-91.
- Prabhaker, D. E., D. L. Coudriet, A. N. Kishaba y D. E. Meyerdirk. 1986. Laboratory evaluation of neem-seed extract against larvae of the cabbage looper and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 39-41.
- Rahardja, U. y M. E. Whalon. 1995. Inheritance of resistance to CryIII $\delta$ -endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 21-26.
- Rehr, S. S. , A. Bell, D. H. Janzen y P. Feeny. 1973 Insecticidal amino acids in legume seeds. *Biochemical Systematics and Ecology* 1: 63-67.
- Rembold, H., H. Foster, C. Czoppelt, P. J. Rao y K. P. Sieber. 1984. The azadirachtins, a group of insect growth regulators from the neem tree. Pp. 153-157. En Schmitterer H. y K. R. S. Ascher (eds.). *Proc. 2nd Int. Neem Conf.* GTZ, Eschborn, Germany.
- Rhoades, D.F. 1979. Evolution of plant Chemical Defense against herbivores. En: *Herbivores: Their interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal and Janzen (eds) Academic Press, Inc.
- Rodríguez, B., M. C. de la Torre, A. Perales, P. Malakov, G. Y. Papanov, M. S. Simmonds y W. M. Blaney. 1994. Oxirane-opening reactions of some 6,19-oxygenated 4 $\alpha$ ,18-epoxy-*neo*-clerodanes isolated from *Teucrium*. Biogenesis and antifeedant activity of their derivatives. *Tetrahedron* 50: 5451-5468.
- Rodríguez, B. 1997. Diterpenos de tipo clerodano y su actividad antialimentaria. Pp. 67-73 en: *Insecticidas de origen natural y protección integrada y ecológica en agricultura. Serie congresos 10*. Pascual- Villalobos, M. J. (coord.). Consejería de Medio Ambiente , Agricultura y Agua. Murcia, España.
- Rodríguez, B., M. C. de la Torre, M. S. Simmonds, y W. M. Blaney. 1999. From a phagostimulant natural product to semisynthetic antifeedants against *Spodoptera littoralis* larvae: chemical transformations of the neoclerodane diterpenoid scutegalín B. *Journal of Natural Products* 62: 594-600.
- Rodríguez, B. 2003. Spectral assignments and reference data. *Magnetic resonance in chemistry* 41: 206-212.
- Rodríguez-Hahn, L., B. Esquivel y J. Cárdenas. 1994. Clerodane Diterpenoids in Labiatae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 63: 107-196.
- Rodríguez-Hahn, L., B. Esquivel y J. Cárdenas. 1995. Neo-clerodane diterpenoids from american *Salvia* species. Cap. 12 en: *Phytochemistry of Medicinal Plants*. J.T. Anason et al. (eds.), Plenum Press, New York.
- Rodríguez-Hahn, L., J. Cárdenas y C. Arenas. 1996. Trichavensin, a prierianin derivative from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry* 43: 457-459.



- Rodríguez-Saona, C. y J. T. Trumble. 1996. Toxicity, growth y behavioral effects of an oil extracted from idioblast cells of the avocado fruit on the generalist herbivore beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1571-1576.
- Rodríguez-Saona, C., J. G. Millar y J. T. Trumble. 1997. Growth inhibitory, insecticidal y feeding deterrent effects of (12Z,15Z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene, a compound from avocado fruit, to *Spodoptera exigua*. *J. Chem. Ecol.* 23: 1819-1831.
- Ryals, S. y E. Ward. 1994. Systemic acquired-resistance. *Plant Physiol.* 104: 1109-1112.
- Ryan, C. A. y D. S. Moura. 2002. Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 6519-6520.
- Sacchettini, J. C. y C. D. Poulter. 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science* 277:1788-1789.
- Savona, G., M. Paternostro y F. Piozzi. 1979. New furanoid diterpenes from *Teucrium gnaphalodes* L'Her. *Tetrahedron* 4: 379-382.
- Savona, G., F. Piozzi, O. Servettaz, B. Rodriguez, F. Fernández-Gadea y M. Martín-Lomas. 1984. A neo-clerodane glucoside and neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium flavum* subs. *Glaucum*. *Phytochemistry* 23: 843-848.
- Saxena, R. C. 1989. Insecticides from neem. Pp. 110-135 en: *Insecticides of plant origin*. Arnason. J. T., B. J. R. Philogene y P. Moran (eds.). A.C.S. Symposium Series 387. American Chemical Society, Washington D.
- Schlüter, U. 1985. Occurrence of weight gain reduction and inhibition of metamorphosis and storage protein formation in last instars of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*, after injection of azadirachtin. *Entomol. Exp. Appl.* 39: 191-195.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Ann. Rev. Entomol.* 35: 271-297.
- Schmutterer, H. (ed.). 1995a. *The Neem Tree Azadirachta indica A. Juss. y Other Meliaceous Plants. Source of Unique Natural Products for Integrated Pest management, Medicine, Industry and Other Purposes*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim. 691 pp.
- Schmutterer, H. 1995b. Side effects of beneficials and other ecologically important non-target organisms. pp 495-503. En Schmutterer, H. (ed.). *The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Schmutterer, H. y R. P. Singh. 1995. List of insect pests susceptible to neem products. pp 326-365. En Schmutterer, H. (ed.). *The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes*. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim

- Schmutterer, H. y K. R. S. Ascher (Eds). 1987. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and the other tropical plants. En: *Proceedings of the 3rd, International Neem Conference*. GTZ, Eschborn, Germany.
- Schoonhoven, L.M. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* 31: 57-69.
- Scriber, J.M. y F. Slansky. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 183-211.
- Scriber, J. M. y F. Slansky. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 183-211.
- Simmonds, M. S. J., W. M. Blaney, S. V. Ley, G. Savona, M. Bruno y B. Rodríguez. 1989. The antifeedant activity of clerodane diterpenoids from *Teucrium*. *Phytochemistry* 28: 1069-1071.
- Simmonds, M. S. J., W. M. Blaney, F. D. Monache y G. B. M. Bettolo. 1990a. Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *J. Chem. Ecol.* 16: 365-380.
- Simmonds, M. y W. Blaney. 1992. Labiate-insect interactions: Effects of Labiate-derived compounds on insect behaviour. Pp. 375-392 en : *Advances in labiate science*. Eds. Harley R. y Reynolds T. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Simmonds, M. S. J. y W. M. Blaney. 1996. Azadirachtin: Advances in understanding its activity as an antifeedant. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 23-26.
- Simmonds, M. 1997. Actividad antiinsectos en plantas: insecticidas y modificadores del comportamiento. Pp. 11-25 en: *Insecticidas de origen natural y protección integrada y ecológica en agricultura. Serie congresos 10*. Pascual Villalobos, M.J. (coord.) Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia, España.
- Slesak, E., M. Slesak y B. Gabrys. 2001. Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. *J. Chem. Ecol.* 27, 2529-2543.
- Smagghe, G., S. Pineda, B. Carton, P. Del Estal, F. Budia y E. Viñuela. 2003. Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 59: 1203-1209.
- Smirle, M. J., D. T. Lowery y C. L. Zurowski. 1996. Influence of neem oil on detoxication enzyme activity in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Pest. Biochem. Physiol.* 56, 220.
- Soulé S., C. Guéntner, A. Vazquez, V. Argandona y P. Moyna, F. Ferreira. 2000. An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochemistry* 55: 217-222
- Srivastava, R. P., P. Proksch y V. Wray. 1990. Toxicity and antifeedant activity of a sesquiterpene lactone from *Encelia* against *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 29: 3445-3448.

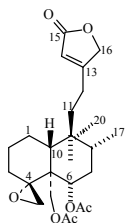
- Stahura, F. L., J. W. Godden, L. Xue y J. Bajorath. 2000. Distinguishing between natural products and synthetic molecules by the scriptor Shannon entropy analysis and binary QSAR calculations. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40:1245-1252.
- Steets, R. 1976. Zur Wirkung eines gereinigten Extraktes aus Früchten von *Azadirachta indica* A. Juss auf *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae). *Z. Angew. Entomol.* 82: 169-176.
- Sultana, I., C. Hosokawa, K. Nishimura, I. Ikeda e Y. Ozoe. 2002. Benzylidene anabaseines act as high-affinity agonists for insect niconitic acetylcholine receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 637-643.
- Szentesi, A. y T. Jermy. 1985. Antifeedants of the Colorado potato beetle: an overview and outlook. En: Ferro, D. N. y R. Hurley (eds.). Proceedings of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVII Int. Congr. Entomol. Massachusetts Exp. Stat. Res. Bull. 704: 17-28.
- Taylor, D. A. H. 1981. Chemotaxonomy: The occurrence of limonoids in the Meliaceae. Pp 450-459. En: Flora Neotropica: monograph 28. A monograph of neotropical Meliaceae. Eds. Pennington, T.D. The New York Botanical Garden, N.Y.
- Tori, K., Horibe, I., Yoshioka, H. Mabry, T.J. *J. Chem. Soc* 1971: 1084-1088.
- Torres-Vila, L. M., M. C. Rodríguez -Molina, A. Lacasa, M. Mejias y M. Guerrero. 1998. Susceptibilidad a 20 insecticidas de *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua* en las Vegas de Gadiana (Extremadura). *Bol. San. Veg. Plagas* 24: 353-362.
- Trumble, J. T., W. Dercks, C. F. Quiros y R. C. Deier. 1990. Host plant resistance and linear furanocoumarin content of *Apium* accessions. *J. Econ. Entomol.* 83: 519-
- Turlings TCJ, L J. Houghrin y P.J. McCall. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4169-4174.
- Ujváry, I. 2002. Transforming Natural Products into Natural Pesticides –Experience and Expectations. *Phytoparasitica* 30: 1-4.
- Van Laecke, K. y D. Degheele. 1991. Detoxification of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 40: 181-190.
- Van Laecke, K., G. Smagghe y D. Degheele. 1995. Detoxifying enzymes in greenhouse and laboratory strain of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 777-781.
- Viñuela, E., U. Händel y H. Vogt. 1996. Evaluación en campo de los efectos secundarios de dos plaguicidas de origen botánico, una piretrina natural y un extracto de neem, sobre *Chrysoperla carnea* Steph. (Neuroptera: Chrysopidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 22: 97-106.
- Viñuela, E., A. Adán, M. González, F. Budia, G. Smagghe y P. Del Estal. 1998. Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas de origen natural el el chinche depredador *Podisus maculiventris*. *Bol. San. Veg. Plagas* 24:57-65.

- Völlinger, M. 1995. Studies of the probability of development of resistance of *Plutella xylostella* to neem products. Pp 477-483 en: *The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine industry and other purposes*. Schmutterer, H. (ed.). VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim
- Waldbauer, G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.
- Weimin, L., A. Schuler, y M. R. Berenbaum. 2003. Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 14593-14598
- Weinhold, L.C., S. Ahmad, y R.S.Pardini.1990. Insect glutathione-S-transferase: A predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B, 355-363
- Whalen, M. D. 1979. Speciation in *Solanum*, section *Androceras*. Pp. 581-596 en: *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Hawkes, J. G., R. N Lester y A. D. Skelding (eds.). Academic Press. New York.
- Whalon, M. E., D. L. Miller, R. M. Hollingworth, E. J. Grafius y J. R. Miller. 1993. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 86: 226-233.
- Wheeler, D. A. y M. B. Isman. 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomol. Exp. Appl.* 98: 9-16.
- Wheeler, D. A., M. B. Isman, , P. E. Sanchez-Vindas, y J. T. Arnason. 2001. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 347-358.
- Whittaker, R.H. y P.P. Feeny, 1971. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science* 171: 757-770.
- Wink, M, T: Scmeller y B. Latz.Brüning. 1998. Modes of action of allelochemical alkaloids : Interaction with neuroreceptors, DNA nad othe molecular targets. *J. Chem. Ecol.* 24: 1881-1937.
- Wink, M. 2000. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. Pp. 3-129 en: *Bioactive Natural Products*. Atta-Ur-Rahman, X. (ed.). Elsevier.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Xianchun L., J. Baudry, M. R. Berenbaum y M. A. Schuler. 2004. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2939-2944.
- Xie, Y. S., M. B. Isman, P. Gunning, S. Mackinnon, J. T. Arnason, D.R Taylor, P. Sanchez, C.Hasbun, y G. H. N. Towers. 1994. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the Limonoid Hirtin against Lepidopteran larvae. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 129-136.

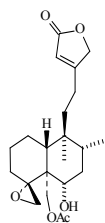
- Yan, F., C. Xu, S. Li, C. Lin, y J. Li. 1995. Effects of DIMBOA on several enzymatic systems in Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *J. Chem. Ecol.* 21, 2047-2056.
- Yoshida, H. A. y M. P. Parrella. 1992. Development and use of selected *Chrysanthemum* cultivars by *Spodoptera exigua* (Lep. Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 2377-2382.
- Yu, S. J., 1983. Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plants in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19, 330-336.
- Yu, S. J., 1984. Interactions of allelochemicals with detoxication enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 60-68.
- Zehnder, G. y J. D. Warthen. 1988. Feeding inhibition and mortality effects of neem-seed extract on the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J. Econ. Entomol.* 81: 1040-1044.
- Zhang, M., S. K. Chaudhuri y I. Kubo. 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *J. Chem. Ecol.* 19: 1109-1118.

# **Anexo I**

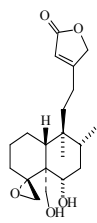
**Estructuras de los compuestos utilizados  
en esta tesis.**



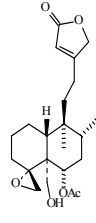
**Aj-1**



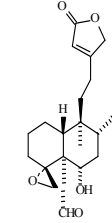
**Aj-2**



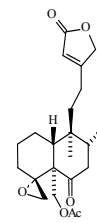
**Aj-3**



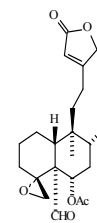
**Aj-4**



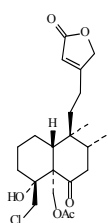
**Aj-5**



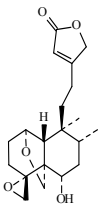
**Aj-6**



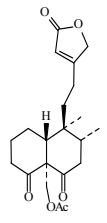
**Aj-7**



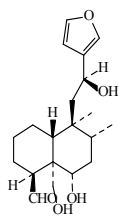
**Aj-8**



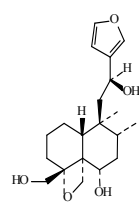
**Aj-9**



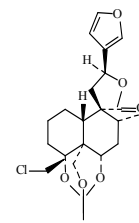
**Aj-10**



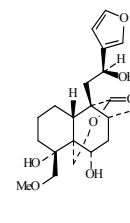
**Te-11**



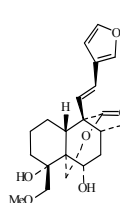
**Te-12**



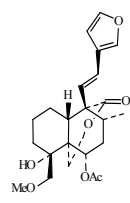
**M-1**



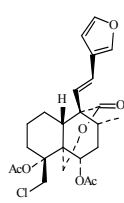
**M-2**



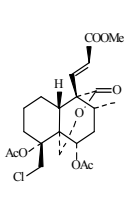
**M-3**



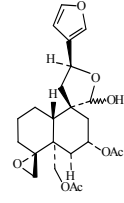
**M-4**



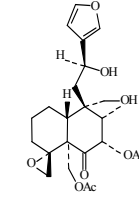
**M-5**



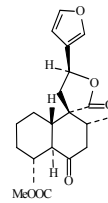
**M-6**



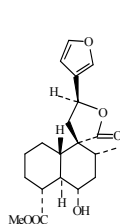
**M-7**



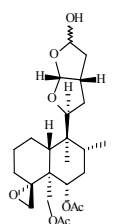
**M-8**



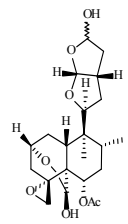
**M-9**



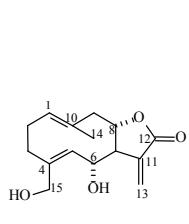
**M-10**



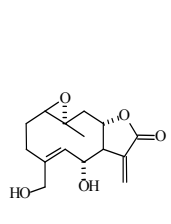
**Scuteceprol A**



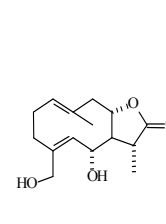
**Scutalbina C**



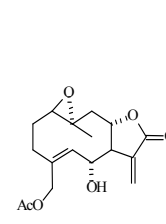
**Ar-1**



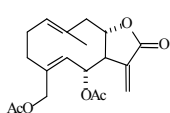
**Ar-2**



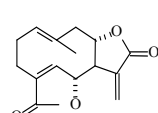
**Ar-3**



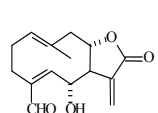
**Ar-4**



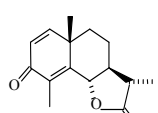
**Ar-5**



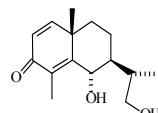
**Ar-6**



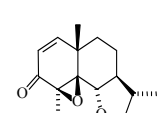
**Ar-7**



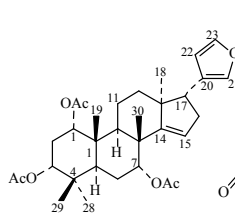
**Ar-8**



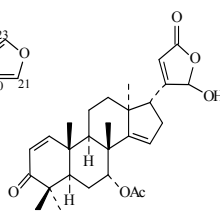
**Ar-9**



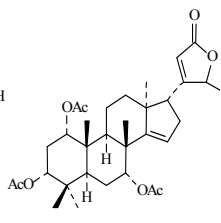
**Ar-10**



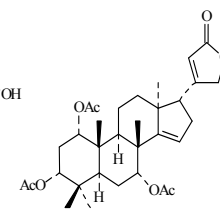
**Tr-1**



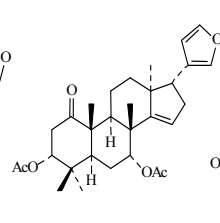
**Tr-2**



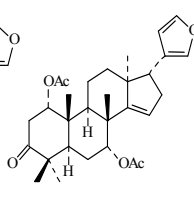
**Tr-3**



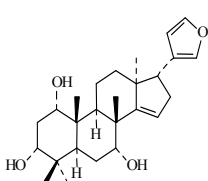
**Tr-4**



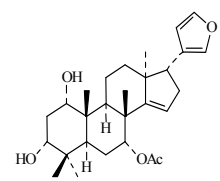
**Tr-5**



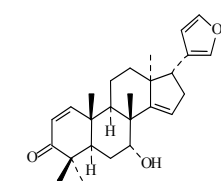
**Tr-6**



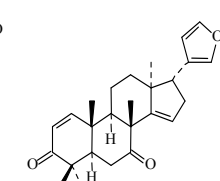
**Tr-7**



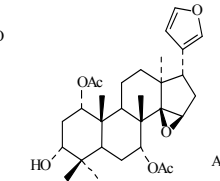
**Tr-8**



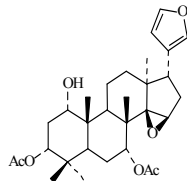
**Tr-9**



**Tr-10**



**Tr-11**



**Tr-12**