



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TESIS

**ESTUDIO BIODIRIGIDO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Salvia clinopodioides* Y SU
EVALUACIÓN COMO DISUASORIOS DE LA ALIMENTACIÓN EN *Spodoptera frugiperda***

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. I. BRENDA LORENA SÁNCHEZ ORTIZ



TUTOR M en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

2011

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para la llevar acabo del presente trabajo por medio de la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Instituto de Química y al Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas, UNAM, por mi formación profesional.

A mi tutor M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por su ayuda para sacar adelante este proyecto. Le agradezco también por su amistad.

A la M. en C. Laura Lina García por la aportación de las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

A mi jurado, los Drs. Leovigildo Quijano, María Yolanda Ríos Gómez, José Fausto Rivero Cruz, Francisco Hernández Luis, Martha Lydia Macías Rubalcaba, por las aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por todo lo que nos ofrece y que pocas veces podemos aprovechar completamente, por ser como un segundo hogar.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y cariño, gracias por todo lo que he aprendido con ustedes.

A mi familia y amigos por su cariño, apoyo, comprensión y tiempo en cada momento de mi vida, los quiero mucho.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2-9 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, a cargo del M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

Fue presentado en modalidad de cartel bajo el título

“Evaluación de los extractos de *Salvia clinopodioides* Kunt (Labiatae) como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith”

En:

Simposio Interno 2010 del Instituto de Química UNAM del 8 al 10 de diciembre.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, **"QuimiUNAM 2010"** del 24 al 26 de noviembre.

45° CONGRESO MEXICANO DE QUIMICA 29° CONGRESO NACIONAL DE EDUCACION QUIMICA. Impartido del día 18 al 22 de Septiembre en la Riviera Maya Quintana Roo.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCION	2
2.- ANTECEDENTES	
2.1 Familia Lamiaceae.	11
2.2 Género <i>Salvia</i> .	14
2.3 <i>Salvia clinopodioides</i> .	19
2.3.1 Características botánicas.	20
2.4 <i>Spodoptera frugiperda</i> .	22
3.- HIPÓTESIS	28
4.- JUSTIFICACIÓN	29
5.- OBJETIVOS	30
5.1 Objetivos específicos.	
6.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	
PARTE 1.	
6.1.1 Colecta del material vegetal.	32
6.1.2 Extracción y fraccionamiento primario de las diferentes partes (tallos, hojas y flores) de la planta <i>Salvia clinopodioides</i> .	32
PARTE 2.	
6.2 Evaluación de la actividad antialimentaria de <i>Salvia clinopodioides</i>	38

6.2.1 Cría de la especie <i>Spodoptera frugiperda</i> .	38
6.2.2 Prueba de actividad biológica. Como disuasorios de la alimentación en un bioensayo de elección con <i>Spodoptera frugiperda</i> .	38
6.3 Aparatos, materiales y disolventes.	40
6.4 Esquema del procedimiento experimental	41
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1 Efecto de los extractos crudos de flores, hojas y tallos de <i>Salvia clinopodioides</i> en la alimentación de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	44
7.2 Efecto de las fracciones primarias de los extractos de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> en la alimentación de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	47
7.3 Efecto de las fracciones secundario de los extractos de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> en la alimentación de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	49
7.3.1 Discusión de espectros.	51
7.4 Efecto de las fracciones primario de los extractos de hojas de <i>Salvia clinopodioides</i> en la alimentación de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	54
8.- CONCLUSIONES	
Conclusiones	58
9.- PERSPECTIVAS	
Perspectivas	60
ANEXOS	
Preparación de la dieta artificial.	62

LISTA DE GRAFICOS

Gráfica 1. Índice antialimentario (IA) de extractos crudos de <i>Salvia clinopodioides</i> Kunt. A una concentración de 1000 ppm.	44
Gráfica 2. Área foliar consumida por <i>Spodoptera frugiperda</i> en el bioensayo con el extracto acetónico de flores.	45
Gráfica 3. Área foliar consumida por <i>Spodoptera frugiperda</i> en el bioensayo con el extracto acetónico de hojas.	45
Gráfica 4. Área foliar consumida por <i>Spodoptera frugiperda</i> en el bioensayo con el extracto acetónico de tallos	46
Gráfica 5. Índice antialimentario (IA) de las fracciones primarias obtenidas del extracto acetónico de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> .	48
Gráfica 6. Área foliar consumida por <i>Spodoptera frugiperda</i> en el bioensayo con la fracción 8 del extracto acetónico de flores.	49
Gráfica 7. Índice antialimentario (IA) de las fracciones secundaria obtenidas de la fracción 8 del extracto acetónico de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> .	50
Gráfica 8. Índice antialimentario (IA) de las fracciones primario obtenidas del extracto acetónico de las hojas de <i>Salvia clinopodioides</i> .	56

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimiento experimental seguido en el estudio de <i>Salvia clinopodioides</i> Kunt	42
---	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de insecticidas de origen botánico.	6
Tabla 2. Ejemplos de diterpenos con actividad antialimentaria significativa contra <i>Spodoptera frugiperda</i> aislados de especies de la familia Lamiaceae.	12
Tabla 3. Ejemplos de diterpenos con actividad antialimentaria significativa	17

contra *Spodoptera frugiperda* aislados de especies del género *Salvia*.

Tabla 4. Ejemplos de compuestos de origen natural con actividad antialimentaria significativa.	18
Tabla 5. Clasificación taxonómica de <i>Salvia clinopodioides</i>	20
Tabla 6. Clasificación taxonómica de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	22
Tabla 7. Pesos de las partes secas de <i>Salvia clinopodioides</i> .	32
Tabla 8. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía flash (fraccionamiento primario) del extracto acetónico de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> . Sistema de elución Hex-AcOEt (9:1).	34
Tabla 9. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía flash (fraccionamiento secundario) de la fracción 8 del extracto acetónico de las flores <i>Salvia clinopodioides</i> . Sistema de elución Hex-AcOEt (9:1).	35
Tabla 10. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna (fraccionamiento primario) del extracto acetónico de las hojas de <i>Salvia clinopodioides</i> .	36
Tabla 11. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna (fraccionamiento primario) del extracto acetónico de los tallos de <i>Salvia clinopodioides</i> .	37
Tabla 12. Índice antialimentario (IA) (concentración de 1000 ppm) del extracto de las flores de <i>Salvia clinopodioides</i> .	47
Tabla 13. Índice antialimentario (IA) (concentración de 1000 ppm) de las fracciones obtenidas de la fracción 8 del extracto acetónico de Flor de <i>Salvia clinopodioides</i> .	50
Tabla 14. Índice antialimentario (IA) (concentración de 1000 ppm) del extracto de las hojas de <i>Salvia clinopodioides</i> .	55
Tabla 16. Ingredientes de la dieta artificial para <i>Spodoptera frugiperda</i> .	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Salvia clinopodioides</i> .	20
Figura 2. <i>Salvia clinopodioides</i> : 1.- Tallo, 2.- Planta colectada, 3, 4.- Inflorescencia.	21
Figura 3. <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith.	22
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	23
Figura 5. Huevecillos de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	24
Figura 6. <i>Spodoptera frugiperda</i> A) Larvas recién nacidas. B) Larva en 5 instar.	25
Figura 7. Pupa de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	26
Figura 8. Adulto de <i>Spodoptera frugiperda</i> . A) Hembra B) Macho	26
Figura 9. Daño causado por el gusano cogollero o <i>Spodoptera frugiperda</i> en las hojas de maíz.	27
Figura 10. Bioensayo de elección (<i>Spodoptera frugiperda</i>).	39

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. IR Fracción 5	63
Espectro 2. RMN ¹ H Fracción 5	64
Espectro 3. RMN ¹ H Fracción 5	65
Espectro 4. RMN ¹ H (D ₂ O) Fracción 5	66
Espectro 5. Masas, Fracción 5	67

ABREVIATURAS

Cromatografía en Columna Flash	CF
Cromatografía en Capa Delgada	CCD
Cromatografía en Capa Delgada Preparativa	CCDP
Porcentaje de Índice Antialimentario	% IA
Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	RMN ¹ H
Resonancia Magnética Nuclear de Carbono	RMN ¹³ C
Infrarojo	IR
Partes por millón	Ppm
Constante de acoplamiento	J
Microlitros	μL
Gramos	G
Miligramos	Mg
Milímetros	Mm
Mililitros	mL
Nanometros	nm

1.- INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

La explotación de los recursos agrícolas, forestales o ganaderos es para algunas personas la base económica de la supervivencia. Un ejemplo de ello es el caso de México, donde la agricultura juega un papel importante en la economía, sin embargo los rendimientos en los cultivos se llegan a ver afectados de manera importante principalmente por un complejo grupo de insectos fitófagos (*Spodoptera frugiperda*, *Diatrea grandiosella* y *Rhopalosiphum maidis*), que en un momento dado pueden constituir plagas importantes, cuando el número de organismos se incrementa de tal manera que ocasionan graves daños al ser humano, en sus cultivos, en sus bienes e incluso a otros animales. Estas plagas son responsables de la pérdida de más de 80 % del cultivo de cereales en México.¹

Aproximadamente 70000 especies de insectos constituyen plagas en el mundo, de las cuales solo el 10% son consideradas plagas importantes que producen pérdidas en la agricultura, valoradas en miles de millones de dólares.

Los insectos y los ácaros en particular causan un alto nivel de pérdidas de cosechas por dos razones primordiales.

- 1.- Por su efecto directo al consumir biomasa y debilitar la planta.
- 2.- Por los microorganismos asociados que los usan como vectores²

Lo que ha llevado al hombre a una constante lucha contra las plagas desde la antigüedad, empleado métodos radicales, que indiscriminadamente le originan graves perturbaciones al igual que al medio ambiente, tales como el uso de compuestos de arsénico, mercurio, incluyendo también hidrocarburos clorados, organofosforados, carbamatos, benzoilureas. Estos últimos usados especialmente en la segunda mitad del siglo XX, que se conoce como

¹Esquivel B, Sánchez AA y Aranda E. 2000 Natural Products of Agrochemical Interest from Mexican Labiatae. In: Shahidi F, Ho ChT, editors. Phytochemicals and Phytopharmaceuticals. Champaign Illinois USA. p 371-385.

²Echeverri LF, y Camilo MJ. 2009. Otras alternativas en la búsqueda de pesticidas naturales, insecticidas y repelentes de insectos de origen natural. En González CA, Burillo AJ, editores. Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural. 1 Ed Gobierno de Aragón, CYTED AREA -3.p 189-220.

“La Edad Dorada de la Investigación en insecticidas”,^{3,4,5} que implicó la búsqueda de sustancias con mecanismos de acción muy diferentes, al actuar sobre los canales iónicos, receptores nicotínicos y de acetilcolina, sistema respiratorio y sistema hormonal entre otros.⁶

Originándose así los pesticidas sintéticos que son un grupo diverso de sustancias químicas, en el cual están incluidos los insecticidas, fungicidas, herbicidas o acaricidas, los cuales tiene diferentes usos y aplicaciones, tanto domésticos como agrícolas, permitiendo con ello incrementar la producción, más el costo de la utilización de estos productos llega a incrementarse,⁷ tomando en cuenta que los residuos generan contaminación en suelos, mantos acuíferos, animales etc., al igual que representan un riesgo para la salud, tanto de productores como de consumidores, causando daños en el desarrollo y funcionalidad de los diferentes órganos y sistemas, que van desde alteraciones neurológicas, reproductivas, endócrinas o inmunológicas.^{8,9}

Es por ello que a pesar que los insecticidas naturales no son una panacea, ya que el empleo de extractos de algunas plantas para control de plagas se remonta a la época del imperio romano; los distintos modos en que actúan proporciona nuevas herramientas, que se incorporan a la metodología definida como “control bioracional” o “control integral de

³Stetter J, Lieb F. 2000 Innovation in crop protection trends in research. *AngewChemie Int. Ed Eng.* 39:1724-1744.

⁴Bonnemain J, Chollet J. 2003. L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. *CR Biologies.* 326:1-7.

⁵Casida JE, Quistad B. 1998. Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? *Ann Rev Entomol.* 4:1-16.

⁶Hilder VA, Boult D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance a critical review. *Crop Protection.* 18:177-191.

⁷Joaquín GM, Iván C, Lucía SA, Javier GL. 2009. Síntesis parcial de diterpenos abietatriénicos con posible actividad insecticida. En González CA, Burillo AJ, editores. *Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural.* 1 ed Gobierno de Aragón, CYTED AREA -3. p 141-150.

⁸Olea N, Molina MJ, García M, Oleas SM. 1996. Modern agricultural practices: The human price. In: *Endocrine disruption and reproductive effects in wildlife and humans.* Soto AM, Sonnenschein C, Colborn T. Eds. *Comments in Toxicology.* p 455.

⁹Parrón T, Hernández AF, Pla A, Villanueva E. 1996. *Hum Exp Toxicol.* 15:957.

plagas (IPM, por sus siglas en Ingles, integrated pest management)”,¹⁰ que se describen a continuación.

Estrategias en el control integral de plagas:

Control biológico: empleo de organismos vivos, con el fin de regular la población de otros organismos indeseables.

Control filogenético: el cultivo de diversas variedades de plantas que sean resistentes, tolerantes o menos susceptibles al ataque de plagas.

Prácticas culturales: disminución de la población de una plaga por medio de la preparación de suelo, manejo del agua, cultivos asociados, eliminación de hierbas hospederas perjudiciales, control de la época de siembra, etc.

Control mecánico y físico: construcción de barreras físicas, como el uso del fuego e instrumentos de labranza para abatir malezas.

Control por confusión sexual: basado en la manipulación de feromonas, generalmente producidas por las hembras para atraer a los machos.

Control químico: los insecticidas son y serán un elemento indispensable en los programas de fitoprotección, pues son versátiles, fácil de aplicar, eficaces y comercialmente atractivos, aunque sus serios inconvenientes sobre el ambiente y la salud limitan su utilidad y demandan un manejo juicioso.

Actualmente la búsqueda de métodos de protección de cultivos incluye no solo productos de plantas, sino que se han explorado otras alternativas como es el uso de bacterias, virus, nematodos entomopatógenos, organismos marinos y microorganismos que sean capaces de producir sustancias con actividad disuasoria de la alimentación contra insectos.

En el caso de las plantas, la presión de selección ejercida por los herbívoros determinó la aparición de diversos mecanismos de defensa tales como:

¹⁰ Talavera A. “Manejo de Plagas en Cultivos Agrícolas”. Gaceta Universitaria. UNAM.1999 Junio 28 México DF.

Mecanismos de defensa físicos: se caracteriza por la presencia de espinas y tricomas en las hojas, follaje fibroso o resinoso, cutícula y corteza endurecida, gruesa y suberizada, así como, paredes celulares lignificadas.

Mecanismos de defensa fenológicos: se refiere a las etapas del ciclo de vida de las plantas, las cuales se desfasan de los tiempos en que aparecen los herbívoros o patógenos.

Mecanismo de defensa de asociación: son relaciones mutualistas con diversos organismos, por ejemplo: hormigas, hongos y bacterias.

Mecanismos de defensa químicos: son de mucha importancia para las plantas, debido a que se centran en la síntesis de metabolitos secundarios entre los cuales podemos citar a los terpenos (mono, sesqui, di y triterpenos), flavonoides, alcaloides, iridoides, etc. Los cuales ayudan a la planta a repeler el ataque de insectos, modificando el comportamiento de alimentación (antialimentarios), alterando el ciclo de vida del insecto o atrayendo a enemigos de los mismos.¹¹ La evidencia acumulada indica que algunos metabolitos secundarios son importantes como parte de la defensa de los vegetales contra herbívoros. Por otro lado resulta cada vez más claro que estos mecanismos de defensas no están sustentados en un solo tipo de sustancia si no que las plantas generan una diversidad muy grande de diferentes grupos de metabolitos secundarios, los cuales son en esencia producto de millones de años de co-evolución plantas-depredadores (planta-insecto).¹ Estas interacciones son muy importantes y sutiles. La mayor parte de las veces las sustancias químicas de defensa “desalientan” la herbivoría en los insectos ya sea actuando como disuasivos de la alimentación o repelentes, evitando la oviposición o alterando el desarrollo de las larvas, en lugar de matarlos. Al entender dichos fenómenos es posible desarrollar sustancias más “amigables” con el medio ambiente, que pueden ser útiles en la protección de cultivos.¹

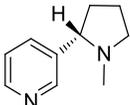
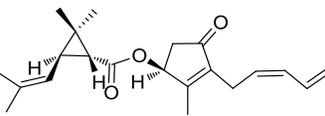
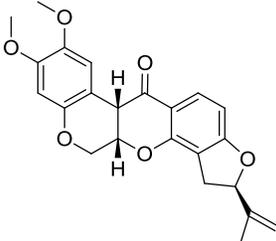
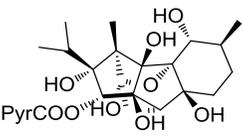
Las plantas poseen un arsenal de defensas físicas y químicas que le permiten sobrevivir de manera exitosa¹² a pesar del ataque y la presión de microorganismos, insectos, ácaros,

¹¹Anaya. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdés Eds. México.p.140.

¹²Wittstock U, Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens.Curr Op Plant Biol. 5:1-7.

moluscos, herbívoros e incluso de otras plantas. Este arsenal químico incluye una amplia variedad de metabolitos secundarios (Tabla 1) que se encuentran usualmente en órganos especializados (tricomas) o se producen y excretan al medio, como es el caso de la goma, látex, resinas y aceites esenciales. Algunos de estos mecanismos de defensa son constitutivos y otros son inducidos.

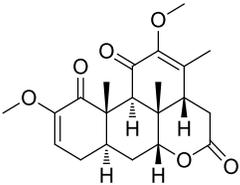
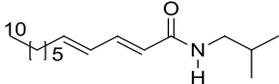
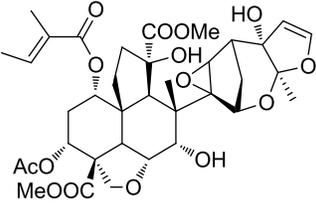
Tabla 1. Ejemplos de insecticidas de origen botánico

METABOLITOS SECUNDARIOS	NOMBRE	PLANTA DE LA QUE FUE OBTENIDO
	Nicotina ¹³	Familia: Solanaceae <i>Nicotiana tabacum</i>
	Piretrina I ^{14,13}	Familia: Compositae <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
	Rotenona ¹³	Familia: Leguminosae <i>Derris y Lonchocarpus</i>
	Ryanodina ¹³	Familia: Flacurtiaceae <i>Ryania</i>

¹³Coll Tolledano J, Esquivel B, Gutierrez Luis J, Gozalez Coloma Azucena y Burillo Alquezar J. 2009. Introduccion. En González CA, Burillo AJ, editores. Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural. 1 Ed Gobierno de Aragón, CYTED AREA -3. p 11-17.

¹⁴Casida JE. Pyrethrum. 1973. The Natural Insecticide. Academic Press. EU.

Continuación de la Tabla 1

	<p>Quassina¹³</p>	<p>Familia : Simarubaceae <i>Quassia amara</i></p>
	<p>Pellitorina¹³</p>	<p>Familia: Asteraceae <i>Anacyclus pyrethrum</i></p>
	<p>Azaridactina^{15,13}</p>	<p>Familia: Meliaceae <i>Azadirachta indica</i></p>

Los insecticidas han sido para el hombre un medio y un modelo para controlar diversos organismos que atacan cosechas importantes, lograr así incrementar la productividad del campo y suplir la demanda de alimentos de una población que crece en proporciones geométricas, necesitando nuevos métodos para contrarrestar los efectos dañinos de plagas y patógenos.²

Sin embargo no todos los insectos constituyen plagas, por lo que la investigación y desarrollo de agentes para el control de plagas ha de seguir ciertas pautas.¹⁶

- 1) No debe ser fitotóxico.
- 2) No debe ser tóxico al hombre, animales, insectos útiles y otros organismos.
- 3) Ser activo a baja concentración.
- 4) Ser razonablemente persistente cuando sea aplicado a un cultivo.

¹⁵ Yamasaki RB, Klocke JA.1987. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.35:467-471.

¹⁶ Van Beek T, de Groot AA. 1986. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 105:513-527.

- 5) No debe descomponerse en sustancias tóxicas o de mal sabor.
- 6) Debe ser fácilmente absorbido por la planta y distribuirse por el vegetal.
- 7) Ser fácilmente aplicable.
- 8) Debe de ser de bajo costo y fácilmente asequible.
- 9) Ser compatible con otras formas de control de plagas.
- 10) No debe afectar el sabor, el olor o la apariencia de las partes de la planta (hojas o frutos).
- 11) No debe provocar resistencia en los insectos.
- 12) Debe ser estable por mucho tiempo.

En la actualidad existen insecticidas de origen natural cuyo efecto letal se produce como resultado de la interacción con determinados mecanismos enzimáticos o los reguladores del desarrollo y muda, al ser ingeridos en el estadio larval, si bien, no acaban con la totalidad de los insectos pero pueden causar trastornos importantes en el desarrollo posterior de su ciclo de vida. Entre los distintos tipos de sustancias que componen este concepto amplio de insecticida se pueden citar, además de los compuestos que muestran una acción tóxica directa, aquellos que actúan indirectamente. Por su acción pueden describirse como reguladores de la muda, morfogénesis y comportamiento. Así en este grupo se incluyen los agonistas o antagonistas de la hormona juvenil (juvenoides) o de muda (ecdisteroides), feromonas (sexuales, de pista, agregación), disuasorios (de alimentación, de oviposición).¹⁷

Un ejemplo de plantas que presentan compuestos con este tipo de actividades son los pertenecientes al género *Salvia* L. (Tribu Mentheae) que es el más grande de la familia Lamiaceae con casi 1000 especies distribuidas en el mundo. Las principales áreas de diversidad de estas plantas se localizan en México, Centroamérica y América del Sur (c.a. 500 especies), Asia Occidental (c.a. 200 especies) y Asia Oriental (c.a. 100 especies).¹⁸

El estudio fitoquímico de varias especies de *Salvia* ha permitido el aislamiento de un gran número de metabolitos secundarios, como: esteroides, flavonoides, iridoides, sesquiterpenos,

¹⁷Biket M, Pickett J. 2003. Aphid sex pheromones from discovery to comercial production. *Phytochemistry*. 62:651-656.

¹⁸Walker JB, Sytsma KJ. 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae) molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*.100:375-391.

diterpenos, triterpenos y sesterterpenos.¹⁹El gran interés en algunos de los metabolitos secundarios aislados de este género es debido a su relevante actividad biológica, antiespasmódica, antiviral, antibacterial, etc. Por ejemplo, se han aislado un buen número de diterpenoides con estructura básica del tipo neo-clerodano, que presentan actividad como agentes antialimentarios en insectos, siendo esta una propiedad interesante ya que tiene poca probabilidad de adquirir resistencia hereditaria,²⁰ ofreciendo con esto una alternativa deseable para el medio ambiente, como agentes de protección de cultivos, ya que estos pueden ser dirigidos específicamente hacia un grupo reducido de plagas de insectos, dejando así insectos beneficiosos y otras especies ilesas,^{21, 22} lo que resulta de sumo interés para el control de plagas, dentro de los cuales se encuentra *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) o “gusano cogollero del maíz” que ataca principalmente cultivos de maíz, sorgo y arroz, y aunque en menor grado, hortalizas y algodón, entre otros cultivos. Esta plaga, es considerada una de las más importantes en los cultivos de maíz en México.

Bajo este contexto, el presente proyecto de tesis se desarrolló con la finalidad de aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en una especie del género *Salvia* que hasta antes de este trabajo no había sido estudiada (*Salvia clinopodioides*), comparándolos con los encontrados en otras especies del mismo género, evaluando a su vez su actividad biológica principalmente como antialimentarios contra *Spodoptera frugiperda*, y de esta manera ampliar el conocimiento sobre la familia Lamiaceae y el Género *Salvia*, aportando de igual forma nuevas estructuras de compuestos con actividad biológica que pueden tener importancia relevante en el área agrícola.

¹⁹Esquivel B, Calderón JS, Sánchez AA, Ramamoorthy TP, Flores EA and Dominguez RM. 1996. Recent Advances in Phytochemistry and Biological Activity of Mexican Labiatae. *Rev Latinoam Quim* 24:44-64.

²⁰Schoonhoven LM. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 31:57-69.

²¹van Beek TA, de Groot AC. 1986. Terpenoid antifeedants part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 105:513-527.

²²de Groot AC, van Beek TA. 1987. Terpenoid antifeedants part II. The synthesis of drimane and clerodane insect antifeedants. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 106:1-18.

2.- ANTECEDENTES

2.1 *Familia Lamiaceae*

2.2 *Género Salvia*

2.3 *Salvia clinopodioides*

2.3.1 *Características botánicas*

2.4 *Spodoptera frugiperda*

2.- ANTECEDENTES

2.1 Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae anteriormente llamada Labiatae, es un grupo muy amplio y diversificado de plantas que agrupa de 224 a 259 géneros y de 4000 a 6500 especies. Podemos encontrar tanto especies adaptadas a clima semiárido como en hábitats húmedos. Debido a esto, las áreas de mayor diversidad de esta familia son el Mediterráneo, Asia Central, el continente Americano, las islas del pacífico y las zonas tropicales de África y China.^{23,24} Aun que se encuentran en casi todo el mundo, con la excepción de las regiones polares, están particularmente bien representadas en las zonas tropicales y templadas, especialmente aquellas con un clima estacional, tales como la región mediterránea y en las sabanas de tierras altas tropicales. Mientras que algunas especies son características de las regiones semiáridas, muchos otros se adaptan a hábitats húmedos, en zonas inundables o riberas de ríos y bosques.^{26,27}

Desde el punto de vista taxonómico, la diversidad de familia en el Mediterráneo y Asia Central sugiere la posibilidad de que los ancestros de las Labiadas actuales tuvieran su origen en esta parte del mundo durante el periodo Cretácico (hace más de 100 millones de años).²⁵ Una de las características más distintivas de un gran número de especies de Labiadas es la presencia de glándulas, que almacenan aceites esenciales, en la superficie de las hojas, por lo que son conocidas como plantas aromáticas y en consecuencia muchas especies son utilizadas en diferentes sistemas de medicina popular, en la preparación de alimentos, o como plantas ornamentales, como por ejemplo los géneros *Agastache*, *Mentha*, *Lavandula*, *Marrubium* y *Thymus*, entre otros.²⁶ Es importante mencionar que las raíces de muchas de estas especies son también utilizadas en la medicina tradicional en diversas

²³Coll J, Jesús Esquivel B. Terpenos. En González CA, Burillo AJ, editores. *Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural*. 1 ed Gobierno de Aragón, CYTED AREA -3. p 77.

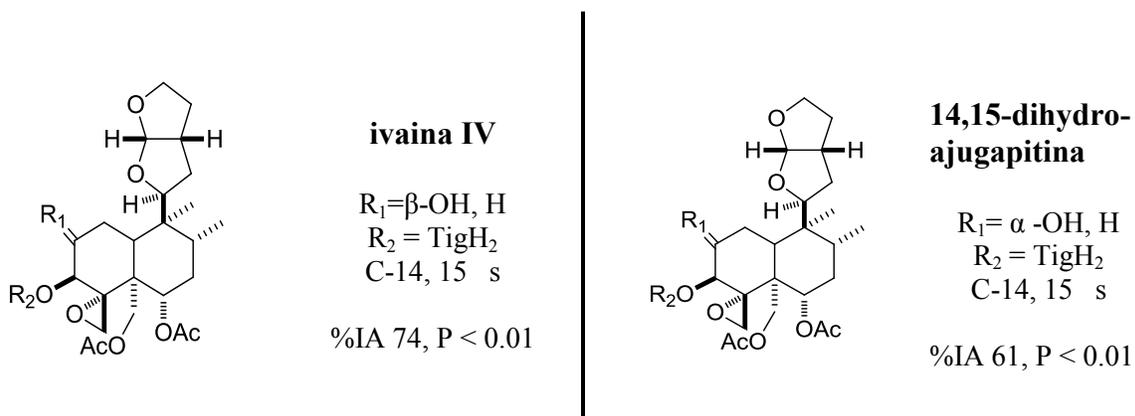
²⁴Plants & fungi from Kew- The mint Family (Lamiaceae). Disponible en: <http://www.kew.org/plants-fungi-groups/mint-family>. Acceso el 20 de Diciembre 2010.

²⁵Hedge IC. 1992. A Global Survey of the Biogeography of the Labiatae in *Advances in Labiatae Science*. Harley RM and Reynolds T. Eds. Royal Botanical Gardens Kew UK. p 7-17.

²⁶Ramamoorthy TP, Elliot M. 1993. *Mexican Lamiaceae: Evolution Distribution and Endemism*. In: Ramamoorthy TP, Bye R., Lot A, Fa J. Eds. *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press. New York.

partes del mundo.²⁷ Desde el punto de vista químico, la familia ha sido objeto de intensos estudios orientados al aislamiento de diferentes tipos de metabolitos secundarios. Los géneros más estudiados hasta ahora son *Isodon (Rabdosia)*, *Teucrium*, *Ajuga*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonorus*, *Ballota*, *Sideritis* y *Coleus*. Como resultado de todo ello, se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, tales como esteroides, flavonoides, iridoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y sesterterpenos entre otros.³⁰ Algunos de los metabolitos secundarios aislados de las Labiadas presentan una amplia gama de actividades biológicas tales como antiespasmódica, antiviral, antibacteriana, antitumoral y antialimentaria (Tabla 2) contra insectos entre otras. Esta última, ha sido descrita para algunos diterpenos de tipo neoclerodano aislados de los géneros *Ajuga*, *Scutellaria*, *Teucrium* y *Salvia* principalmente. La denominada actividad antialimentaria corresponde a un efecto insecticida directo ya que el insecto no muere al contacto con la sustancia, pero su conducta de alimentación se modifica y puede morir de inanición. Por lo que estas plantas son de gran interés medicinal y agroquímico.²⁸

Tabla 2. Ejemplos de diterpenos con actividad antialimentaria significativa contra *Spodoptera frugiperda* aislados de especies de la familia Lamiaceae²⁹

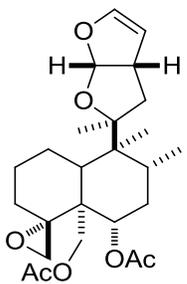
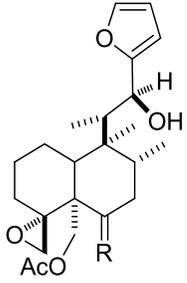
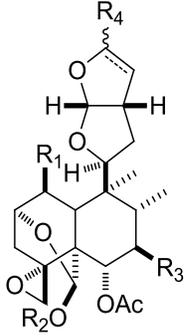
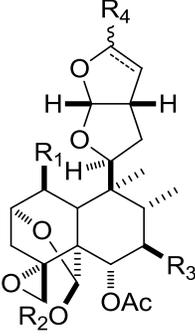


²⁷Esquivel, B., Sánchez A.A., Aranda, E., 2000. En: Shahidi, G., Ho, Ch. T. (Eds.), *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*. AOCS Press: Champaign Illinois, Chap.34, pp.371-385).

²⁸vanBeek, T. A., and A.E.de Groot, *Terpenoid Antifeedants, Part 1 : An Overview of Terpenoid Antifeedants of Natural Origin*, Recl.Trav. Chim. Pays-Bas 105: 513-527 (1986).

²⁹Edwin A, Klein G, Ben JM y de Groot A. 2002. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry*. 61:737-770.

Continuacion de la Tabla 2

<i>Clerodendron infortunatum</i>		<i>Teucrium massiliens</i>	
	<p>clerodina</p> <p>% IA 78.4, P < 0.05</p>		<p>6,19-diacetyl – teumassilina</p> <p>R = α - OAc, H</p> <p>%IA 94.2, P < 0.05</p>
<i>Scutellaria woronowii</i>			
	<p>jodrellina B</p> <p>R₁ = H R₂ = i-PrC(O) R₃ = H R₄ = H</p> <p>C-14,15 d</p> <p>%IA 98, P < 0.05</p>	<p>jodrellina A</p> <p>R₁ = H R₂ = Ac R₃ = H R₄ = H</p> <p>C-14,15 d</p> <p>%IA 85, P < 0.05</p>	
<i>Scutellaria woronowii</i>			
	<p>scutalbina A</p> <p>R₁ = H R₂ = H R₃ = H R₄ = H</p> <p>C-14,15 s</p> <p>%IA 53, P < 0.05</p>	<p>scutecyprol B</p> <p>R₁ = H R₂ = Tig R₃ = H R₄ = OH</p> <p>C-14, 15 s</p> <p>%IA 85, P < 0.05</p>	

2.3 Género *Salvia*

El género *Salvia* (Tribu Mentheae) es el más grande de la familia Lamiaceae con casi 1000 especies distribuidas en el mundo. Las principales áreas de diversidad se localizan en México, Centroamérica y América del Sur (con c.a. 500 spp), Asia Occidental (c.a. 200 spp) y Asia Oriental (c.a. 100 spp).³⁰ El género fue subdividido en cuatro subgéneros por Bentham *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*,³¹ sin embargo datos taxonómicos sugieren una reconsideración en esta clasificación la cual debe incluir el subgénero *Audibertia*³² el cual comprende las salvias de California y Baja California. Por razones históricas el nombre del subgénero *Calosphace* debe cambiarse a *Jungia*.³³ El estudio fitoquímico de varias especies del género *Salvia* ha permitido establecer un interesante perfil químico para el género. Esteroles tales como el β -sitosterol y estigmaesterol así como flavonoides se encuentran frecuentemente en las partes aéreas de estas plantas, triterpenos derivados del lupano, oleanano, dammarano y ursano y algunos compuestos fenólicos,^{34,35} lactonas sesquiterpénicas³⁶ y alcaloides diterpénicos,³⁷ sin embargo, los metabolitos secundarios más diversos y característicos del género son los diterpenoides, más de 200 del tipo del abietano con esqueletos transpuestos se han descrito para especies pertenecientes a todos los

³⁰Walker JB, Sytsma KJ. 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*. 100:375-391.

³¹Bentham G. 1876. Labiatae. In *Genera plantarum*. Vol. 2. Bentham G, Hooker JD. Eds. Reeve and Co. London UK. p 1160-1223.

³²Harley RM, Heywood CA. 1992. Chromosome numbers i tropical American Labiatae. In *Advances in Labiatae Science*. Harley RM, Reynolds T. Eds. Royal Botanic Gardens Kew London UK. p 211-246.

³³Wood JR, Harley RM. 1989 The genus *Salvia* (Labiatae) in Colombia. *Kew Bulletin*. 44:211-278.

³⁴Topcu G. 2006. Bioactive triterpenoids from *Savia* species. *Journal of Natural Products*. 69:482-487.

³⁵Rustaiyan A, Masoudi S, Tabatabaei-Anaraki. 2007. Terpenoids from Iranian *Salvia* species. *Journal Products Communications*. 2:1031-1042.

³⁶Ali MS, Ibrahim SA, Ahmed S, Lobkovsky E. 2007. Guaianesesquiterpene lactones from *Salvia nubicola* (Lamiaceae). *Chemistry and Biodiversity*. 4:98-104.

³⁷Lin FW, Damu AG, Wu TS. 2006. Abietanediterpene alkaloids from *Salvia yunnanensis*. *Journal of Natural Products*. 69:93-96.

NOTA El término *Salvia* proviene de la palabra latina “salvare”, que significa “curar”. En la antigüedad se utilizaban las especies de *Salvia* puesto que servía para curar más de sesenta diversas dolencias que van de dolores a la epilepsia, y tratar principalmente resfríos, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, etc. También tiene uso ornamental y gastronómico empleándose como condimento. <http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia>.

subgéneros, tanto en la parte aérea como en las raíces. La mayor concentración y diversidad de este tipo de metabolitos están representadas en los subgéneros *Salvia*, *Sclarea* y *Audibertia*. Los diterpenoides aislados de especies de *Salvia*, que crecen en Turquía, los cuales pertenecen a los subgéneros *Salvia*, *Sclarea* y *Leonia*, representan muy bien esta diversidad estructural.³⁸ Hasta el momento más de 100 diterpenoides de tipo clerodano y compuestos relacionados se han aislados de especies pertenecientes al subgénero *Jungia* (*Calosphace*).³⁹ Como resultado de varios estudios fitoquímicos de especies de salvias mexicanas (subgénero *Jungia*), se había propuesto en las etapas iniciales de éstos, una relación cercana entre el contenido de diterpenos de una especie y la sección taxonómica a la cual pertenece. Sin embargo, con los datos actuales resulta claro que no existe dicha relación.^{40,41} Así mismo siguiendo la clasificación de Bentham se ha observado una relación interesante entre el contenido de diterpenos en estas plantas, su distribución geográfica y su clasificación botánica a nivel de subgéneros.^{42,42,43}

Los datos actuales indican que los diterpenoides derivados del clerodano son característicos de salvias del subgénero *Jungia* (*Calosphace*) y que compuestos derivados del esqueleto del abietano han sido aislados con mayor frecuencia de plantas pertenecientes a otros subgéneros. La distribución y el patrón de oxidación de varios diterpenoides derivados del abietano son de importancia fitogeográfica y han sugerido una conexión evolutiva entre las salvias que crecen en China y las del Nuevo Mundo.⁴⁴ Una de las características más

³⁸Topcu G, Gorden Ac. 2007. Biological activity of diterpenoid isolated from Anatolian Lamiaceae plants. *Records of Natural Products*. 1:1-16.

³⁹Hanson JR. 2007. Diterpenoids. *Natural Products Reports*. 24:1332-1341 and preceding reviews.

⁴⁰Rodríguez-Hahn L, Esquivel B, Cárdenas J. 1994. Clerodanoditerpenes in the Labiatae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 63:107-197.

⁴¹Esquivel B, Ramírez-Davalos N, Espinosa-Pérez G. 1999. A cis-languidulanediterpenoid from *Salvia mexicana* var. Major (Labiatae). *Heterocycles*. 51:1647-1651.

⁴²Esquivel B, Sánchez AA, Aranda E. 2000. Natural products of agrochemical interest from Mexican Labiatae. In: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*. Shanhi F, Ho CT, Eds. AOCS Press Champaign Illinois. USA. p 371-385.

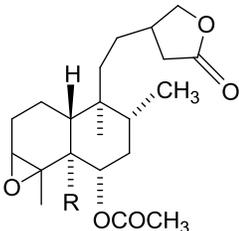
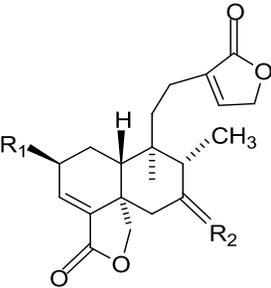
⁴³Esquivel B, Calderón JS, Arano MG, Hernández PM, Sánchez AA. 2005. Diterpenoids from the roots of Mexican *Salvia* species. Phytochemical and evolutionary significance. *Revista Latinoamericana de Química*. 33:82-89.

⁴⁴Esquivel B, Sánchez AA, Vergara F, Matus W, Hernández-Ortega S, Ramírez-Apam MT. 2005. Abietanoditerpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae): Chemical diversity phytochemical significance and cytotoxic activity. *Chemistry and Biodiversity*. 2:738-747.

distintivas del género *Salvia* desde el punto de vista químico es la biosíntesis de diterpenoides que presentan arreglos hidrocarbonados (esqueletos) transpuestos los cuales pueden derivarse conceptualmente de esqueletos conocidos tales como abietano, clerodano y pimarano. Aproximadamente 30 nuevos esqueletos transpuestos de diterpenoides se han aislado tanto de las partes aéreas como de las raíces de estas plantas.

La base química de los mecanismos de defensa de estas plantas son los metabolitos secundarios que biosintetizan. El género *Salvia* es por lo tanto un material excelente para el aislamiento de compuestos con propiedades alelopáticas, insecticidas, antifúngicas y antialimentaria (Tabla 3) entre otras, las cuales pueden ser útiles en agricultura.

Tabla 3. Ejemplos de diterpenos con actividad antialimentaria significativa ($P < 0.05$) contra *Spodoptera frugiperda* aislados de especies del género *Salvia*.⁴⁵

	<p style="text-align: center;"><i>S. melissodora</i></p> <p style="text-align: center;">Ester metílico del acetato del ácido 13,14-dihidro-3,4-epoxi-melisdórico</p> <p style="text-align: center;">R = CO₂CH₃</p> <p style="text-align: center;">% IA 73</p>
	<p style="text-align: center;"><i>S. melissodora</i></p> <p style="text-align: center;">7α-acetoxi-2β-hidroxi-neo-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diólida</p> <p style="text-align: center;">R₁ = OH R₂ = α OCOCH₃, βH</p> <p style="text-align: center;">% IA 54</p>

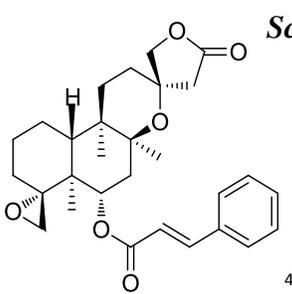
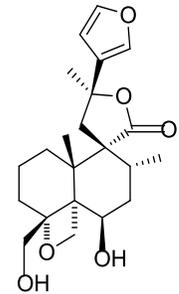
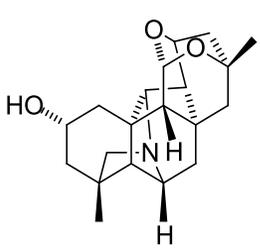
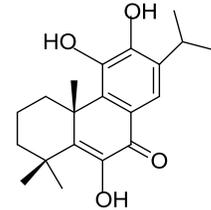
⁴⁵Simmonds JM, Blaney WM, Esquivel B y Rodriguez – Hahn L. 1996. Effect of Clerodane- Type Diterpenoids Isolated from *Salvia* spp. On the Feeding Behaviour of *Spodoptera littoralis*. Pestic, Sci.47: 17-23.

Continuación de la Tabla 3

	<p style="text-align: center;"><i>S. melissodora</i></p> <p style="text-align: center;">2β-acetoxi-7α-hidroxi-neo-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diólida</p> <p style="text-align: center;">R₁ = OCOCH₃ R₂ = α OH, βH</p> <p style="text-align: center;">% IA 54, P < 0.05</p>	
	<p style="text-align: center;"><i>S. semiatrata</i></p> <p style="text-align: center;">Semiatrina</p> <p style="text-align: center;">R₁ = OH R₂ = H, H R₃ = OH 12 (S)</p> <p style="text-align: center;">% IA 57</p>	<p style="text-align: center;"><i>S. keerlii</i></p> <p style="text-align: center;">Kerlinólida</p> <p style="text-align: center;">R₁ = H R₂ = α OCOCH₃ R₃ = OH 12 (R)</p> <p style="text-align: center;">% IA 70</p>
	<p style="text-align: center;"><i>S. rhyacophilla</i></p> <p style="text-align: center;">6β-hydroxysalviarina</p> <p style="text-align: center;">R = OH</p> <p style="text-align: center;">% IA 59</p> <p style="text-align: center;">Salvirina</p> <p style="text-align: center;">R = H</p> <p style="text-align: center;">% IA 66</p>	
	<p style="text-align: center;"><i>S. tiliaefolia</i></p> <p style="text-align: center;">Tilifodioido</p> <p style="text-align: center;">% IA 51</p> <p style="text-align: center;"><i>S. lineata</i></p> <p style="text-align: center;">% IA 66</p> <p style="text-align: center;">1(10)-dihidrosalviarina</p>	

En la naturaleza podemos encontrar una gran diversidad de compuestos con estructuras variadas, aislados de diferentes familias, géneros y especies de plantas, que presentan cierta actividad antialimentaria (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de compuestos de origen natural con actividad antialimentaria significativa

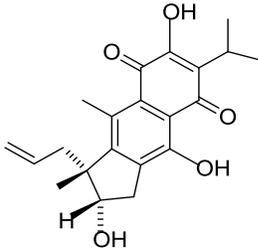
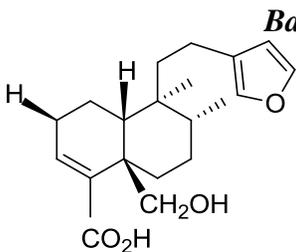
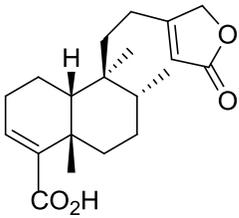
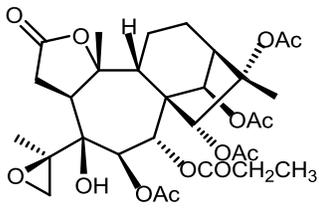
 <p><i>Scutellaria hastifolia</i></p> <p>hastifolina B</p> <p>46</p>	 <p><i>Teucrium arduini</i></p> <p>montanina D</p> <p>47</p>
 <p><i>Consolida glandulosa</i></p> <p>hetisina</p> <p>48</p>	 <p><i>Salvia broussonetii</i></p> <p>14-deoxicoleon U</p>

⁴⁶Raccuglia RA, Bellone G, Loziene K, Piozzi F, Rosselli S, Maggio A, Bruno M and Simmonds MS. 2010. Hastifolins A–G, antifeedant neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria hastifolia*. *Phytochemistry* 71: 2087-2091.

⁴⁷Bruno M, Piozzi F, Maggio AM, Rosselli S, Simmonds MSJ, Servettaz O. 2002. Antifeedant activity of neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium arduini*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30:595-599.

⁴⁸González – Coloma A, Matías R, Guadaño A, Martínez-Díaz R, Díaz GJ, García- Rodríguez J, Alva A and Grandez M. 2004. Antifeedant C20 Diterpene Alkaloids. *Chemistry & Biodiversity*.1: 1327-1335.

Continuación de la Tabla 4

	<i>Plectranthus saccatus</i>		<i>Baccharis flabellata</i> Hook
coleon A		CO ₂ H	49
	<i>Baccharis sagittalis</i>		<i>Pierisformosa</i>
butanolido		perisoides A	
50			

2.3 *Salvia clinopodioides*

Es una especie que pertenece al subgénero *Jungia* (*Calosphace*), sect. *Cucullatae*.⁵¹ Planta perenne (Figura 1) que crece en bosques de pino y encino, a orillas de caminos, resistentes a la sequía⁵², y que puede ser arvense. En México se ha registrado en los estados de Chihuahua, Durango, Estado de México y Michoacán.^{53, 54}

⁴⁹Hikawczuk VE, Lopez VM, Borkowski EJ, Sosa ME, Giordano OS, Saad JR and Tonn CE. 2006. from *Baccharis flabellata* Hook & Arn var. *Flabellata* toward *Tribolium castaneum* Herbst: structure–activity relationships. *Natural Product Research* 20: 813-819.

⁵⁰Cifuentes DA, Borkowski EJ, Sosa ME, Gianello JC, Giordano OS and Tonn CE. 2002. Clrodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. *Phytochemistry*. 16: 899-905.

⁵¹Epling C. 1939. A revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*. In *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* Vol.110 Fedde F (Ed) Verlag des Repertorium, Berlin, Germany. p 31.

⁵²*Salvia clinopodioides*. Disponible en : zipcodezoo.com/Plants/S/Salvia_clinopodioides. Acceso 11 de Enero 2011.

⁵³Martínez M, Matuda E. 1979. Flora del Estado de México. Tomo II. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. Estado de México.

⁵⁴Villaseñor R, Espinosa G. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México DF.

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Salvia Clinopodioides*.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas);
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>Salvia clinopodioides</i>



Figura 1. *Salvia clinopodioides*.

2.3.1 Características botánicas

Salvia clinopodioides (Figura 1) es una hierba perenne, robusta, de hasta 1 m de alto con tallos cubierto de pelillos erguidos, sus hojas opuestas, ovadas, de hasta 12 cm de largo y hasta 7 cm de ancho, margen aserrado, base redondeada o aguda y luego haciéndose angosta sobre el pecíolo de hasta 6 cm de largo, con pelillos sedosos. Inflorescencia racimos de hasta 30 cm de largo, formados por verticilos (de numerosas flores) globosos, distantes entre sí hasta por 3cm, sus brácteas persistentes, ovadas, redondeadas, de hasta 2.5 cm de largo, cubiertas de pelillos. El cáliz de 10 mm hasta 20 mm de largo (cuando oculta el fruto que consiste de cuatro nuececillas de color claro con manchitas oscuras que generalmente no todos maduran), es un tubo con pelillos acampanado, que hacia el ápice se divide en 2 labios, el labio superior como un capuchón y con una punta diminuta en el ápice, con 7 venas evidentes, el labio inferior más corto que el superior y dividido en 2 lóbulos puntiagudos, la corola de color azul oscuro, es un tubo de 13 a 14 mm de largo que

hacia el ápice se divide en 2 labios, el superior de 6 mm de largo y en forma de capuchón, el labio inferior de 10 a 12 mm de largo y dividido en lóbulos desiguales, 2 estambres, ocultos en el labio superior.⁵⁵(Figura 2)

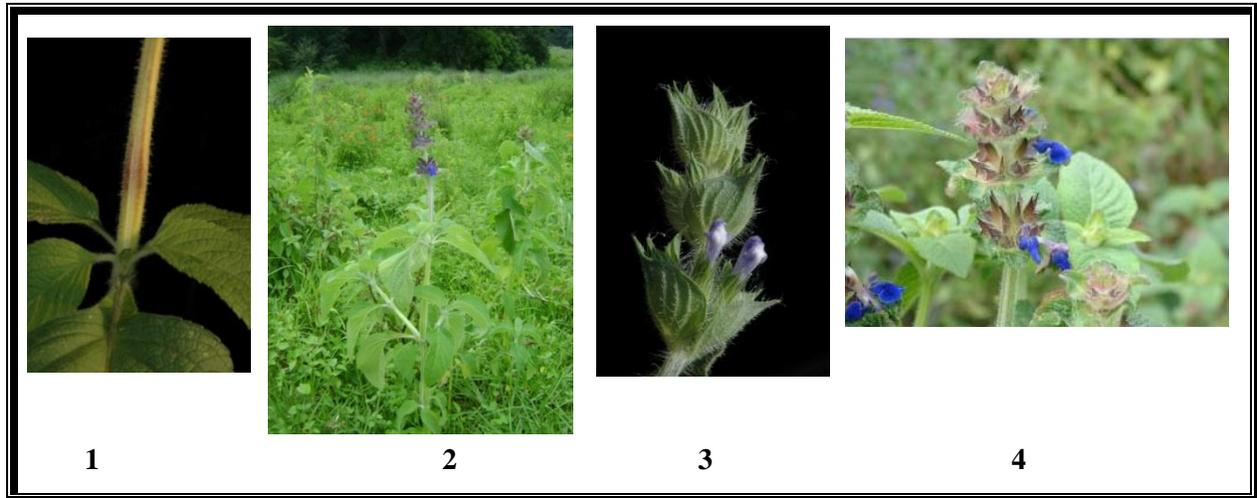


Figura 2. *Salvia clinopodioides*: 1.- Tallo, 2.- Planta colectada, 3, 4.- Inflorescencia.⁴⁶

2.4 *Spodoptera frugiperda*

⁵⁵*Salvia clinopodioides*. Disponible en: bibdigital.rjb.csic.es/ing/Carga.php?Pagina=O_HUM_Nov...2.. . Acceso el 11 de enero 2011.

⁵⁶*Salvia clinopodioides*. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/salvia-clinopodioides/imagenes/tallo-insercion-hoja.jpg>. y <http://www.robinssalvias.com/blue/c.shtm> . Acceso 15 de noviembre 2010.

Spodoptera frugiperda J.E. Smith (Lepidoptera Noctuidea) o “gusano cogollero del maíz”, que en su fase larvaria causa un daño físico a las plantas. Es conocida principalmente como plaga del maíz, aunque también se alimenta de algodón, alfalfa, trébol, cacahuate, pastos, tabaco y muchas hortalizas devorando las partes aéreas de las plantas.

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Spodoptera frugiperda*.

Orden	Lepidoptera
Subdivision	Ditrysia
Seccion	Neuroptera
Subseccion	Amphiesmenoptera
Superfamilia	Noctuidea
Familia	Noctuidae
Subfamilia	Amphipyriinae
Tribu	Amphipyriini (Walker)
Especie	<i>Spodoptera S.</i> <i>S.frigiperda</i> (Smith)



Figura 3. *Spodoptera frugiperda*.⁴⁷

Esta plaga, es considerada una de las más importantes del maíz en México, es de origen tropical y ataca con más rigor las siembras tardías en las costas y las regiones cálidas de riego. Menos infestados son los maizales de los altiplanos, donde el ataque del cogollero

⁵⁷*Spodopterafrugiperda*. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Spodoptera_frugiperda y <http://elmundoysusplantas.blogspot.com/2010/04/insectos-plaga-y-enfermedades-en-pastos.html>.

disminuye al entrar las lluvias. En el caso del maíz más crecido, se refugia en el cogollo, en cuyo interior se alimenta haciendo grandes perjuicios (Figura 9), hasta que la planta alcanza un metro de altura, en ocasiones ataca también las espigas y las partes tiernas del elote. El daño más grave por esta plaga, lo resienten las plantas pequeñas que a veces son afectadas en su totalidad. Muchas de ellas mueren o retrasan su crecimiento. La producción de grano disminuye entre 10 y 100%, ya que en ocasiones se pierde todo el cultivo cuando las plantitas mueren.⁵⁸

Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*

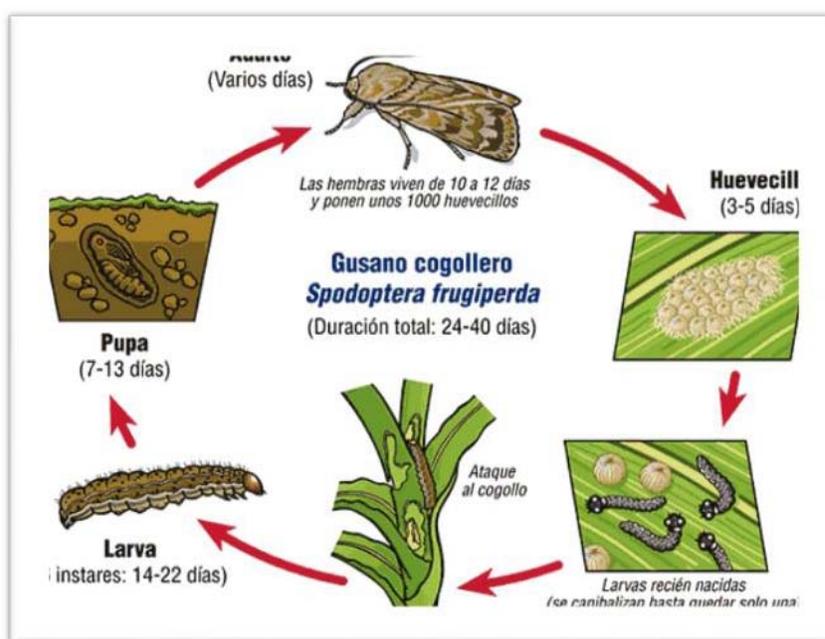


Figura 4. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*.⁴⁹

La fase larvaria pasa normalmente por seis estadíos, independientemente de la temperatura, pudiéndose observar con frecuencia individuos que completan dicha fase en 5 o 6 estadíos, y en menor proporción, con números más extremos (4 u 8 estadíos), en la medida en que la temperatura se hace menos adecuada, hacia arriba o hacia abajo, respectivamente. La

⁵⁸Bayer CropScienceMexico - Pests/Gusano cogollero. Disponible en:<http://avepagro.org.ve/entomol/v05/0503b001.html>. Acceso el 26 de diciembre 2010.

⁵⁹Ciclo de vida de *Spodopterafrugiperda* Bayer Disponible en:http://agronomia1ersemestreunach.blogspot.com/2010_09_05_archive.html . Acceso el 23 de noviembre 2010.

duración de estas y del resto de los estadios depende directamente de la temperatura, desarrollándose sin problema en un rango comprendido entre 20 y 30 °C, aunque pueden soportar temperaturas entre 15 y 35 °C, según el estadio de desarrollo en consideración⁶⁰ y se puede esperar que en la mayoría de las condiciones en las que se siembra maíz el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* complete su ciclo de vida (Figura 4) en unos 24-40 días, dividido en cuatro etapas, huevecillos (Figura 5), larvas (Figura 6), pupas (Figura 7) y adultos (Figura 8), que se describen más adelante.

a) Huevos

Individualmente son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión.

Las hembras depositan los huevos corrientemente durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos.^{51,52}



Figura 5. Huevecillos de *Spodopterafrugiperda*⁵³

⁶⁰Fontana H, González C.2000. El cultivo de maíz en Venezuela. 1 ed. Fundación Polar. Caracas Venezuela. 530 p.

⁶¹Negrete BF, Morales ÁJ. (*Spodopterafrugiperda*. Smith).Cooperación Técnica CORPOICA Universidad del Sinú. Centro de Investigación Turipaná Montería Colombia.

⁶²Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas. Disponible en: www.agronet.gov.co/.../20061127153058_El%20gusano%20cogollero%20del%20maiz.pdf. Acceso 11 de diciembre 2010.

⁶³*Spodopterafrugiperda*. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/reconquista/info/documentos/agricultura/gusano_cogollero/art_gusano_cogollero.htm Acceso 11 de diciembre 2010.

b) Larvas

Las larvas al nacer se alimentan del corion, más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida.

Las larvas pasan por 6 ó 7 estadios o mudas, en el primero estas miden hasta 2-3 mm y la cabeza es negra completamente, en el segundo miden de 4-10 mm y la cabeza es de un tono más claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 mm en su último estadio.^{51,52}

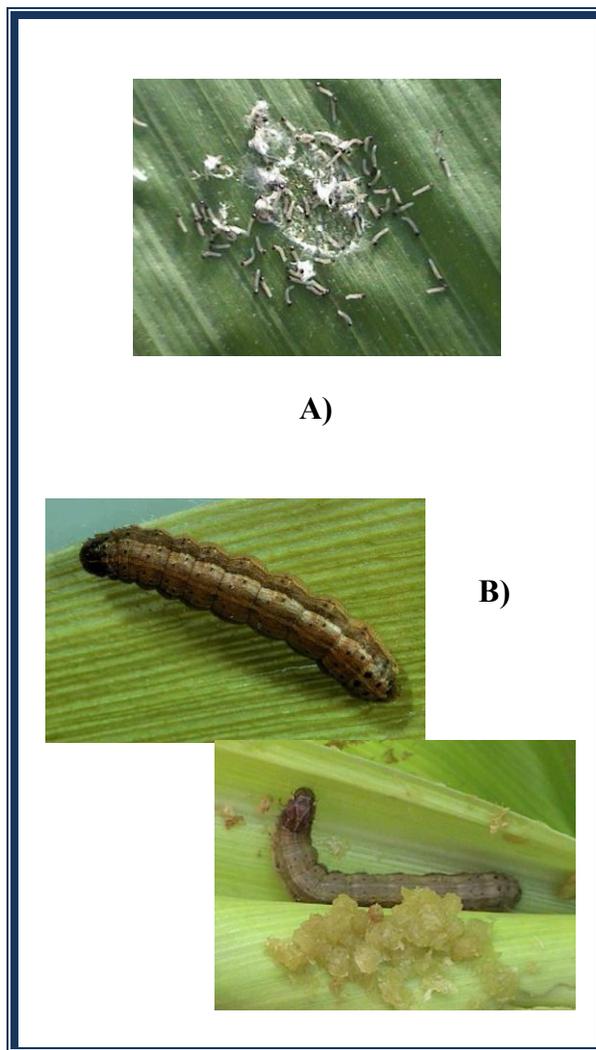


Figura 6. *Spodoptera frugiperda* A) Larvas recién nacidas. B) Larva en 5 instar.⁵³

d) Pupa

Son de color caoba y miden de 14 a 17 mm de longitud, con su extremo abdominal, terminando en 2 espinas o ganchos en forma de “U” invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta los 8 a 10 días en que emerge el adulto o mariposa.^{51,52}



Figura 7. Pupa de *Spodoptera frugiperda*.⁵³

c) Adultos

La mariposa vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen arabescos o figuras irregulares llamativas en las alas delanteras, y las traseras son blancas. En reposo doblan sus alas sobre el cuerpo, formando un ángulo agudo que permite la observación de una prominencia ubicada en el tórax. Permanecen escondidas dentro de las hojarascas, entre las malezas, o en otros sitios sombreados durante el día y son activas al atardecer o durante la noche cuando son capaces de desplazarse a varios kilómetros de distancia, especialmente cuando soplan vientos fuertes.^{51, 52}

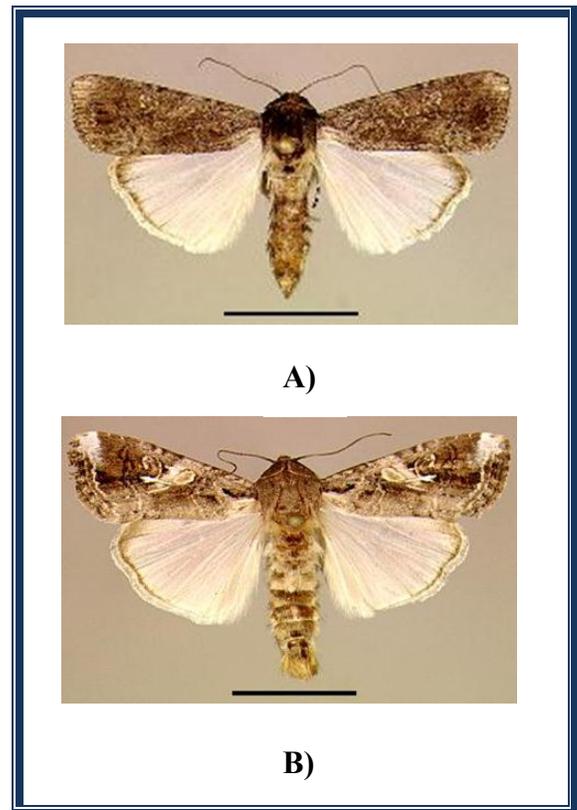


Figura 8. Adulto de *Spodoptera frugiperda*.⁵³
A) Hembra B) Macho

El daño que ocasiona la larva de esta especie es como masticador del tejido vegetal ya que hace raspaduras sobre las partes tiernas de las hojas, que posteriormente aparecen como pequeñas áreas translúcidas (Figura 9). En esta fase es característico observar los excrementos de la larva en forma de aserrín.^{64,65}



Figura 9. Daño causado por el gusano cogollero o *Spodoptera frugiperda* en las hojas de maíz.^{48, 52, 66}

⁶⁴Bayer CropScience Disponible en:www.bayercropscience.es/BCSWeb/www/BCS_ES_Internet.nsf/id/ES_Spodoptera_frugiperda?open&ccm=1020. Acceso el 22 de diciembre 2010.

⁶⁵FitoChapingo-[Agropecuario].Disponible en :
<http://fitochapingo.blogspot.com/2009/08/gusano-cogollero-spodoptera-frugiperda.html>. Acceso el 15 de diciembre 2010.

⁶⁶*Spodopterafrugiperda*. Disponible en:
<http://www.fitochapingo.com/2009/08/gusano-cogollero-spodoptera-frugiperda.html>. Acceso 20 de octubre 2010.

3.- HIPÓTESIS

Considerando que el estudio fotoquímico de varias especies de *Salvia* a permitido aislar un gran número de diterpenoides, los cuales presentan actividad como agentes antialimentarios en insectos, y tomando en cuenta que la planta a estudiar *Salvia clinopodioides* Kunt (Lamiaceae) no presenta daños de herbivoría en su zona de colectada nos permite plantear que en este trabajo se aislara compuestos con actividad biológica como agentes antialimentarios en insectos.

4.- JUSTIFICACIÓN

El estudio biodirigido de *Salvia clinopodioides* Kunt (Labiatae) contribuirá al conocimiento de los metabolitos secundarios producidos por dicha planta, que hasta antes de este trabajo no había sido estudiada, así como comprobar su posible actividad como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith y comparar la composición química de esta planta con la encontrada en otras pertenecientes al mismo género *Salvia*, permitiéndonos de esta manera ampliar el conocimiento sobre este género y la familia Lamiaceae aportando de igual forma nuevas estructuras de compuestos con actividad biológica que pueden tener importancia relevante en el área agrícola.

5.- OBJETIVO

Contribuir al conocimiento químico y biológico del genero *Salvia* mediante el aislamiento de metabolitos secundarios de la especie *S.clinopodioides* y la evaluación de los extractos y los metabolitos aislados como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.

4.1 Objetivos específicos.

- 1.- Realizar la colecta de la planta *Salvia clinopodioides* Kunt.
- 2.- Obtención de los extractos orgánicos (acetónicos) de los diferentes órganos (tallos, hojas y flores) de la planta.
- 3.- Evaluación de actividad biológica, como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith por medio de pruebas de elección.
- 4.- Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios con posible actividad como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith presentes en la planta, empleando técnicas de cromatografía en columna y en placa delgada.
- 5.- Determinar las estructuras de los metabolitos secundarios aislados mediante técnicas espectroscópicas de Infrarrojo, RMN ^1H y ^{13}C .

6.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

PARTE 1

6.1.1 Colecta del material vegetal

*6.1.2 Extracción y fraccionamiento primario de las diferentes partes, tallos, hojas y flores de la planta *Salvia clinopodioides**

PARTE 2

*6.2 Evaluación de la actividad antialimentaria de *Salvia clinopodioides**

.

*6.2.1 Cría de la especie *Spodoptera frugiperda**

*6.2.2 Prueba de actividad biológica. Como disuasorios de la alimentación en un bioensayo de elección con *Spodoptera frugiperda**

6.3 Aparatos, materiales y disolventes

6.4 Esquema del procedimiento experimental

6.- METODO EXPERIMENTAL

Se obtuvieron los extractos orgánicos de los diferentes órganos (tallos, hojas y flores) de la planta *Salvia clinopodioides* Kunt (Lamiaceae), por maceración con acetona.

6.1.1 Colecta del material vegetal

Salvia clinopodioides Kunt (Labiatae) fue colectada en el Estado de México en el Km 4 de la carretera Valle de Bravo-Temascaltepec, el 5 de Agosto del 2009.

La planta fue secada a temperatura ambiente por un lapso de 9 días, separando y pesando posteriormente las flores, hojas y tallos (Tabla 7).

Tabla 7. Pesos de las partes secas de *Salvia clinopodioides*

MUESTRAS	PESO (g)
Flores	200
Hojas	800
Tallos	750

6.1.2 Extracción y fraccionamiento primario de los (tallos, hojas y flores) de la planta *Salvia clinopodioides*.

Obtención del extracto acetónico de las flores de *Salvia clinopodioides*

Las flores después de secar a temperatura ambiente en la sombra, se extrajeron vía maceración dos veces consecutivas con acetona (2 L) durante 72 hrs. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, obteniéndose 11 g de extracto seco.

Obtención del extracto acetónico de las hojas de *Salvia clinopodioides*

Las hojas después de secar a temperatura ambiente en la sombra, se extrajeron vía maceración dos veces consecutivas con acetona (12 L) durante 72 hrs. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, obteniéndose 69 g de extracto seco.

Obtención del extracto acetónico de los tallos de *Salvia clinopodioides*

Los tallos después de secar a temperatura ambiente en la sombra., se extrajeron vía maceración dos veces consecutivas con acetona (2 L) durante 72 hrs. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, obteniéndose 6 g de extracto seco.

Fraccionamiento primario de los extractos de *Salvia clinopodioides*

Extracto de flores

Se tomaron 9 g de extracto, se adsorbieron en sílica gel 230/400 y se aplicaron en una columna flash de 5 cm de diámetro empacada con sílica gel del mismo tipo, llenándola hasta una altura de 10 pulgadas. La columna se eluyó con una mezcla hexano: acetato de etilo (9:1), obteniéndose 230 eluatos de 125 ml, los cuales se reunieron de acuerdo con sus perfiles cromatográficos en CCD, obteniéndose 16 fracciones (Tabla 8).

La fracción 8 (346.9mg) presentó un IA de 52.4 %, considerándose activa,⁶⁷ por lo que se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando cromatografía en columna rápida (flash)⁵⁰ obteniéndose 6 fracciones secundarias (Tabla 9).

Extracto de hojas

Se tomaron 25 g de extracto, los cuales se preadsorbieron en 50 g de sílica gel para cromatografía en capa delgada y se cromatografiaron en una columna empacada con 500 g de sílica gel del mismo tipo en relación 1:20 con respecto al extracto. La columna se eluyó al vacío utilizando mezclas hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, obteniéndose 205 eluatos de 250 mL (Tabla 10).

⁶⁷Bentley M, Stoddard W, Zalkow L.1984. *Annals of Entomological Society of America*.77:393.

Tabla 8. Fracciones obtenidas por cromatografía flash (fraccionamiento primario) del extracto acetónico de las flores de *Salvia clinopodioides* .Sistema de elución Hex-AcOEt (9:1)

FRACCION	ELUATOS REUNIDOS	PESO (mg)
1	1-11	52.1
2	12-20	304.3
3	21-26	47.2
4	27-32	2.8
5	33-38	8.6
6	39-47	703.1
7	48-67	788.4
8	68-89	346.9
9	90-107	552.3
10	108-113	21
11	114-127	161.4
12	128-138	86.3
13	139-150	365.6
14	151-189	533.8
15	190-200	599.3
16	201-230	299

Tabla 9. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía flash (fraccionamiento secundario), de la fracción activa 8 del extracto acetónico de las flores *Salvia clinopodioides*. Sistema de elución Hex-AcOEt (9:1)

FRACCION	ELUATOS REUNIDOS	PESO (mg)
1	4-29	4.0
2	30-49	4.4
3	50-80	4.0
4	81-104	8.5
5	105-116	13.6
6	117-129	6.0

Extracto de tallos

Se tomaron 4 g de extracto, los cuales se preadsorbieron en sílica gel para 230/400 y se cromatografiaron en una columna flash de 5 cm de diámetro, empacada con sílica gel del mismo tipo hasta una altura de 10 pulgadas. La columna se eluyó con mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1) y (8:2), obteniéndose 227 eluatos de 125 mL, los cuales se reunieron obteniéndose 14 fracciones (Tabla 11).

Tabla 10. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna (fraccionamiento primario) del extracto acetónico de las hojas de *Salvia clinopodioides*.

FRACCIONES	ELUATOS REUNIDOS	PESO (mg)	SISTEMA DE ELUCION (Hex-AcOEt)
1	1-24	2000	100
2	25-28	100	95:5
3	29-32	1400	
4	33-36	915	
5	37-39	780	90:10
6	40-46	245	
7	47-57	100	
8	58-65	100	
9	66-73	147	80:20
10	74-80	5000	
11	81-84	100	
12	85-100	1000	
13	101-114	3430	60:40
14	115-122	660	
15	123-140	2000	
16	141-152	300	
17	153-163	250	
18	164-171	100	40:60
19	172-181	930	
20	182-205	1000	

Tabla 11. Fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna(fraccionamiento primario) del extracto acetónico de los tallos de *Salvia clinopodioides*.

FRACCIONES	ELUATOS REUNIDOS	PESO (mg)	SISTEMA DE ELUCION (Hex-AcOEt)
1	5-9	335	90:10
2	10-12	51.4	
3	13-16	19.8	
4	17-26	196.9	
5	27-37	184.1	
6	38-42	150	
7	43-57	153.2	
8	58-63	444	
9	4-86	322	
10	87-178	560	
11	179-200	70	
12	201-210	220	80:20
13	211-227	217	
14	228-242	200	

6.2 Evaluación de la actividad antialimentaria

6.2.1 Cría de la especie *Spodoptera frugiperda*

La cría y reproducción artificial se llevó a cabo en el “Laboratorio de cultivo de insectos” del Instituto de Química de la UNAM en una cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: temperatura de 25 a 27 ° C, 70% de humedad relativa, fotoperiodo de 16:8 h de luz/obscuridad y dieta artificial. ^{Anexo}

6.2.2 Prueba de actividad biológica

Bioensayo de elección

El bioensayo de elección evalúan los efectos antialimentarios del tratamiento administrado a los insectos, junto con un blanco que se utilizará como control negativo de la prueba. Esta técnica se utiliza para la evaluación de la actividad tanto en extractos como en compuestos puros.⁶⁸

Desarrollo de la técnica

En cajas petri de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de alto, se coloca de manera uniforme agar al 3% en la base de la caja, hasta cubrir una altura de 9 mm aproximadamente. Una vez que el agar se ha solidificado, con la ayuda de un sacabocados se realizan 4 perforaciones en forma de cruz. Por otro lado, utilizando el mismo sacabocados, se cortan discos de hoja de espinaca (*Spinacia oleraceae*) y se colocan en las perforaciones del agar con el envés hacia arriba.

Los discos de las hojas que se encuentran de forma vertical en la caja se denominan hojas control y las hojas en posición horizontal son las hojas tratamiento. De esta manera se colocan en los discos tratamiento 10 µL de la solución acetónica del extracto o muestras a probar en una concentración de 1000 ppm, y en los discos control se adiciona solo 10 µL de acetona. Esto se realiza en 5 cajas para cada extracto considerando esto una de las 3 pruebas o bioensayos a realizar por cada extracto o fracción a probar, realizando cada

⁶⁸González- Coloma A, Valencia E, Valenzuela E, Barros M, Hernández M, Lazo C. 2000. Boletín de la Sociedad Chilena de Química.45:2.

bioensayo en días diferentes.

Pasados 20 min, para permitir la evaporación del disolvente, se colocan en el centro de cada caja dos larvas en el quinto estadio y ayuno previo de 5 a 7 hrs y se comienza el bioensayo (Figura 10). El bioensayo finaliza cuando las larvas consumen al menos una parte de ambos discos de un mismo tipo, ya sea de control o de tratamiento, con la condición de que uno de estos discos haya sido consumido aproximadamente en un 75%.

En una hoja de papel se montan los remanentes de todos los discos de cada caja, Ya con todos los remanentes pegados se procede a escanear dicha hoja blanca con la finalidad de poder medir el área consumida de cada disco,⁶⁹ utilizando el programa computacional *Scion Image*. Una vez obtenidos las medidas de las áreas, se calcula el porcentaje de índice antialimentario (IA) para cada extracto o muestra probada, para así seleccionar al extracto o extractos con actividad, mediante la siguiente ecuación.⁷⁰

$$IA = (1-T/C) \times 100$$



Dónde:

Figura 10. Bioensayo de elección (*Spodoptera frugiperda*)

T = Área total de hoja Tratamiento (contiene la muestra)

C = Área total de hoja Control (sin muestra)

IA = Índice antialimentario

⁶⁹Escoubas P, Lajide L, Mizutani J. 1993. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 66:99.

⁷⁰Bentley M, Stoddard W, Zalkow L. 1984. *Annals of Entomological Society of America* 77:393.

>50 % = Activo (Anti alimentario)

< 50 % = Negativos (Fago estimulante)

Método estadístico

Por medio de una prueba de *t*-student pareada se realizaron los análisis para evaluar diferencias estadísticas significativas entre los controles con respecto a los tratamientos.

Aparatos, materiales y disolventes

Las cromatografías rápidas (“flash”)⁷¹ en columna se realizaron con sílica gel 60 Å 230/400. Las cromatografías en columna (CC)^{72,73} se realizaron utilizando sílica gel para cromatografía en capa fina, aplicando vacío.^{63,74} La aplicación de la muestra se realizó adsorbiendo previamente el extracto vegetal en sílica gel del mismo tipo, en una proporción 1:20.

Las cromatografías en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando cromatofolios de sílica gel G UV₂₅₄, de 0.25mm de espesor, de la marca Macherey-Nagel; para realizar el seguimiento de las CC y para comprobar la pureza de los metabolitos aislados. Las cromatografías en capa delgada preparativa (CCDP) se realizaron en placas de vidrio de 20x20cm, de sílica G-100 UV₂₅₄, de 1.0mm de espesor, de la marca Macherey-Nagel, y cromatoplasmas de 5x10cm de sílica gel 60 F₂₅₄, de 0.25mm de la marca Merck para la purificación de los metabolitos. El revelado se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil modelo ENF-260C (254-365 nm) y/o utilizando como reactivo cromogénico una solución de 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22 mL de ácido sulfúrico concentrado en 350 g de hielo.

⁷¹Still WC, Kahn M and Mitra A. 1978. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* 43:2923-2925.

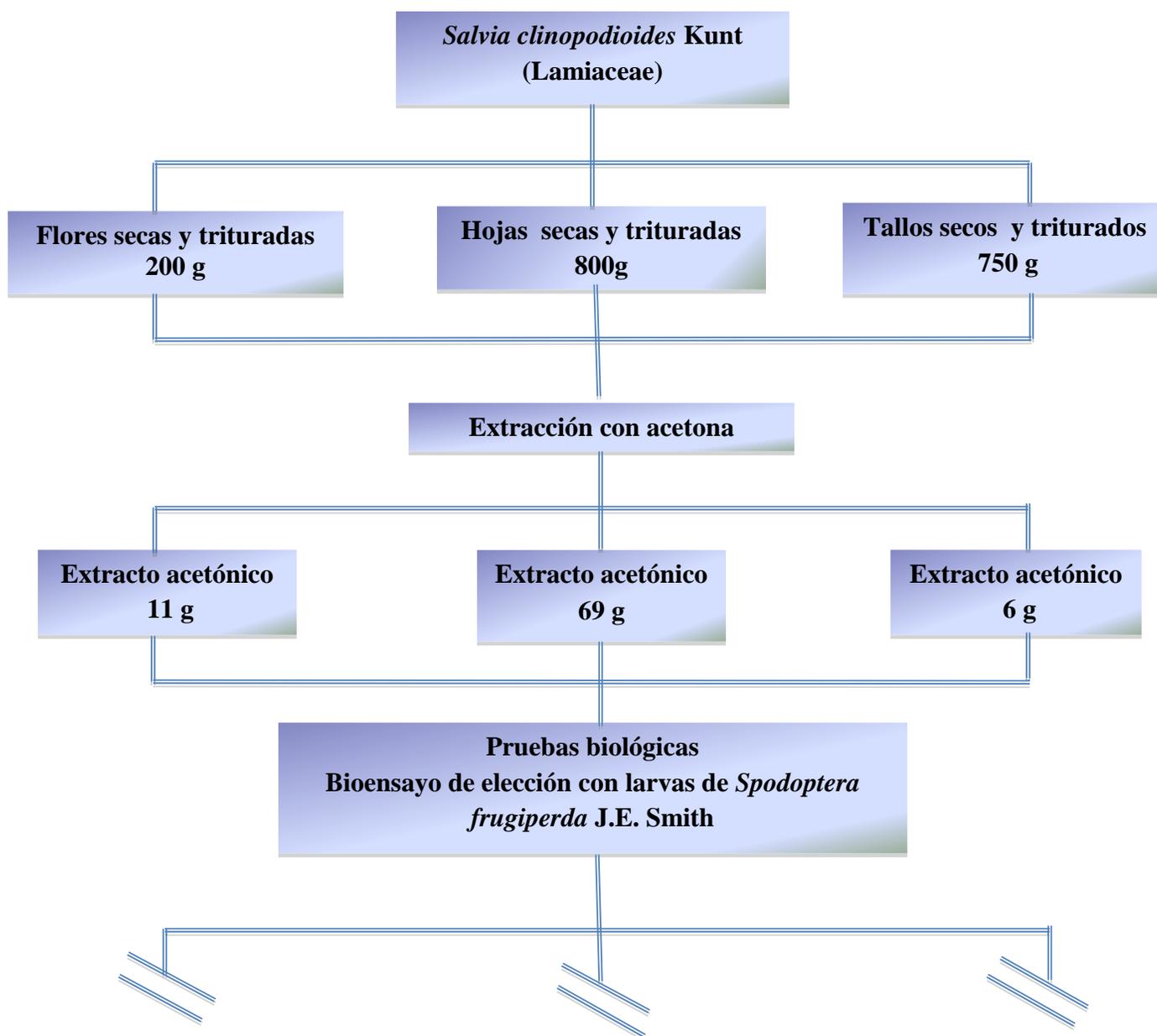
⁷²Cromatografía en columna. Disponible en: depa.pquim.unam.mx/~fercor/dqo/manuales/1311/p8.pdf. Acceso el 24 de noviembre 2010.

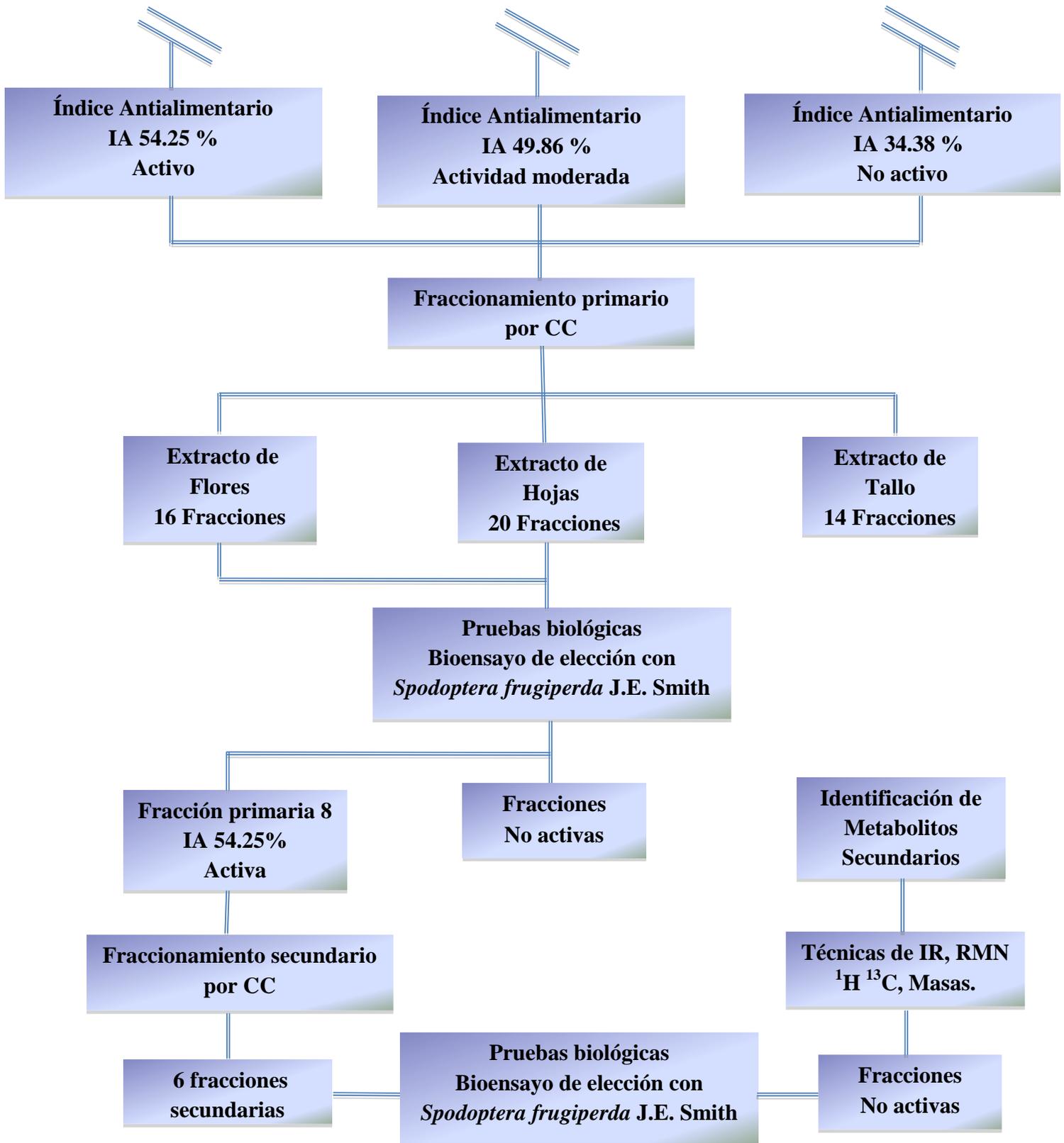
⁷³Complemento teórico. Cromatografías especiales-cromatografía. Disponible en: www.fcn.unp.edu.ar/.../COMPL-TEOR-CROMATOG-ESPECIALES-2010.pdf. Acceso el 25 de noviembre 2010.

⁷⁴Cromatografía en columna. Disponible en: depa.pquim.unam.mx/~fercor/dqo/manuales/1311/p8.pdf. Acceso el 24 de noviembre 2010.

Los espectros en el IR fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , fueron determinados en un espectrómetro Bruker Avance 300 y Varian Unity 300 operados a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C , y utilizando como disolventes cloroformo deuterado (CDCl_3).

3.1.1 Esquema del procedimiento experimental





Esquema 1. Procedimiento experimental seguido en el estudio biodirigido de *Salvia clinopodioides* Kunt (Lamiaceae).

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de los extractos crudos de flores, hojas y tallos de Salvia clinopodioides en la alimentación de Spodoptera frugiperda

7.2 Efecto de las fracciones primarias del extracto de las flores de Salvia clinopodioides en la alimentación de Spodoptera frugiperda

7.3 Efecto de las fracciones secundarias del extracto de las flores de Salvia clinopodioides en la alimentación de Spodoptera frugiperda

7.3.1 Discusión de espectros

7.3 Efecto de las fracciones primario del extracto de las hojas de Salvia clinopodioides en la alimentación de Spodoptera frugiperda

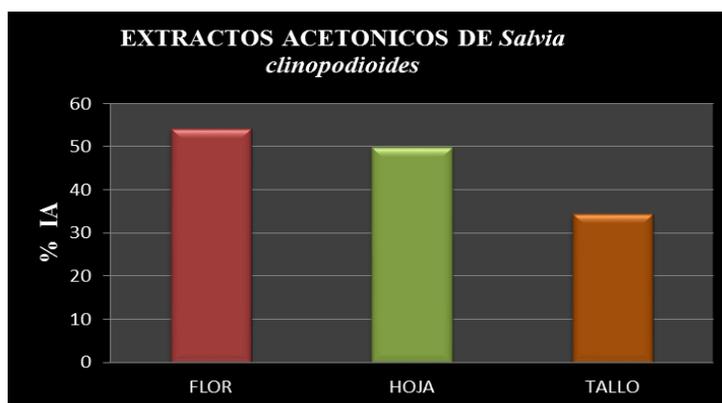
7.- RESULTADOS

7.1 Efecto de los extractos crudos de flores, hojas y tallos de *Salvia clinopodioides* en la alimentación de *Spodoptera frugiperda*

Las pruebas de actividad antialimentaria de los extractos acetónicos de hojas, flores y tallos de *Salvia clinopodioides*, se evaluaron a una concentración de 1000 ppm⁷⁵ mediante una prueba de elección sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* de sexto estadio, se utilizaron discos de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*), a los cuales al finalizar del bioensayo se les midieron las áreas de los discos no consumidos.⁶⁵

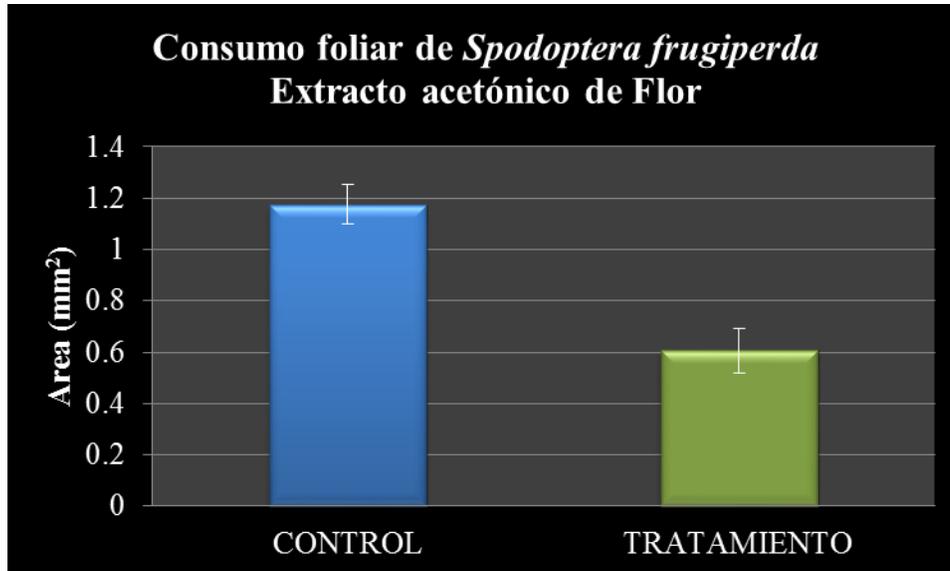
Con la finalidad de tener el número de individuos confiables y poder llevar a cabo un estudio estadístico apropiado, cada experimento se realizó con tres replicas, siendo un total de 30 larvas por extracto o muestra a evaluar, 30 discos de hojas control y 30 discos de hojas tratamiento, por experimento. Los valores obtenidos a partir de las áreas de las hojas consumidas, se analizaron estadísticamente con base en una prueba de *t*-student pareada por medio del programa estadístico SPSS.

Los resultados obtenidos señalaron que el extracto acetónico de las flores fue el de mayor actividad con un IA de 54.25 % mientras que el extracto acetónico de las hojas mostró una actividad moderada con un IA de 49.86 % y el extracto acetónico de los tallos no fue activo con un IA de 34.38 % (Gráfica 1).

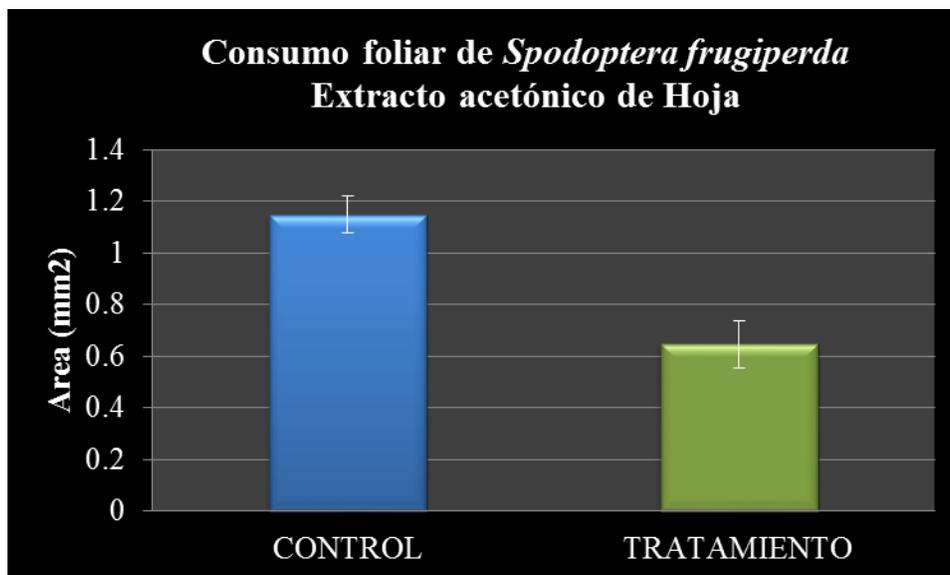


Gráfica 1. Índice antialimentario (IA) de extractos crudos de *Salvia clinopodioides* Kunt. A una concentración de 1000 ppm.

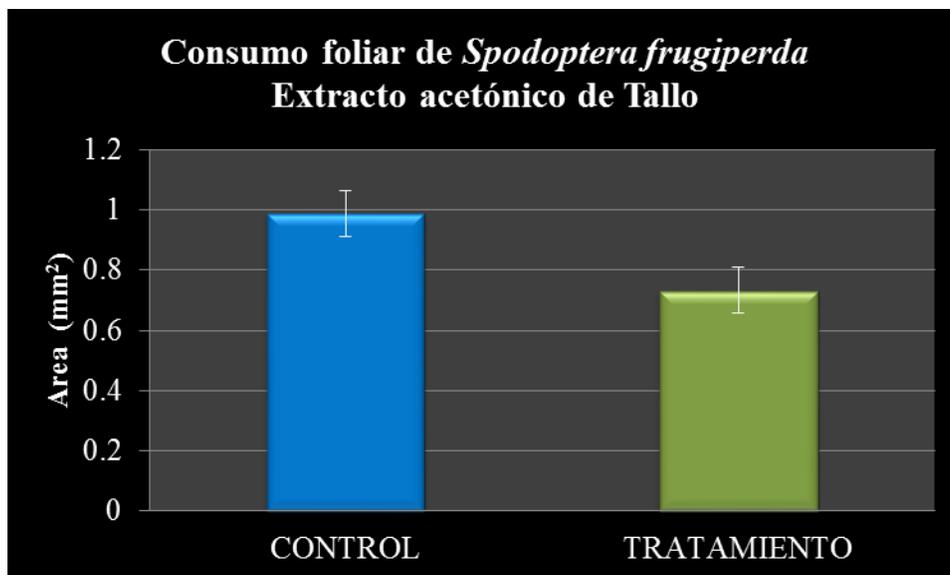
⁷⁵Moreno-Osorio L, Cortés M, Armstrong V, Bailén M, González-Coloma A. 2008. Zeitschrift für Natur for schung C. Journal of Biosciences. 63:215-220.



Gráfica 2. Área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda*, en el bioensayo con el extracto acetónico de flores. Concentración 1000 ppm ($t = 5.183$, $p < 0.01$).



Gráfica 3. Área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda*, en el bioensayo con el extracto acetónico de hojas. Concentración 1000 ppm ($t = 4.87$, $p < 0.01$).



Gráfica 4. Área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda*, en el bioensayo con el extracto acetónico de tallos. Concentración 1000 ppm ($t = 2.74$, $p < 0.05$).

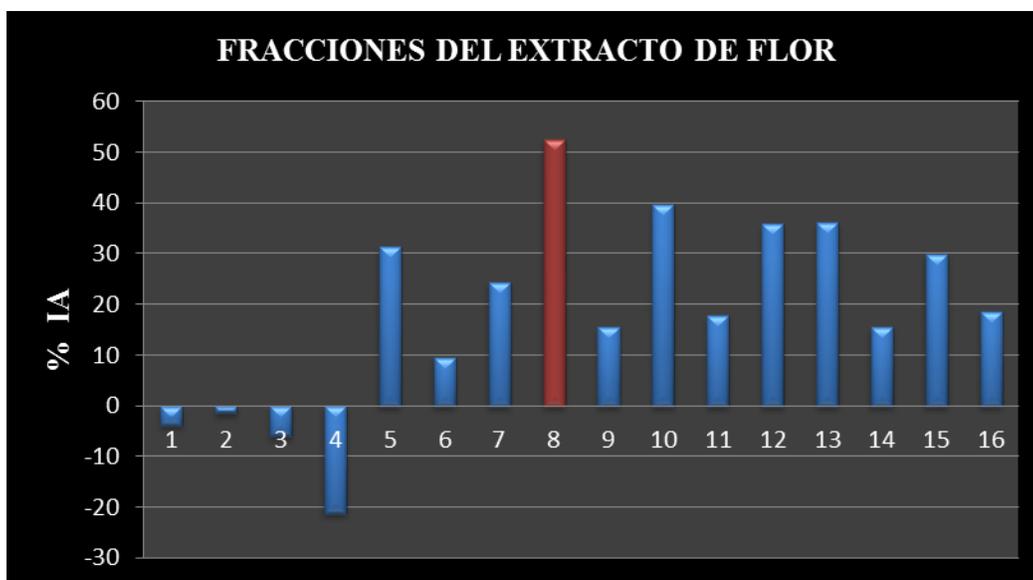
Se presentan los resultados del análisis estadístico del consumo foliar por *Spodoptera frugiperda* (Gráficas 2-4), en el bioensayo de elección en la evaluación de los extractos acetónicos de flores, hojas y tallos respectivamente, obteniéndose un valor de $p < 0.01$ en el caso de flores y hojas y un valor de $P < 0.05$ en el caso de los tallos que los hacen estadísticamente significativos. Solo los extractos de flores y hojas se incluyeron para el estudio biodirigido en busca de metabolitos secundarios con actividad antialimentaria, a pesar de que el extracto de las hojas se podría considerar no activo (IA 49.86 %), comparando el resultado con los descritos en la literatura⁶⁵, en donde se consideran activos a los valores a partir de un IA 50%, por lo cual es importante señalar que diversos factores, como son entre ellos la concentración de cada metabolito secundarios activo, así como, los fenómenos sinérgicos que se presentan entre la gran cantidad de compuestos contenidos en los extractos crudos, pueden causar variaciones en los valores; haciendo válido suponer que al realizar las diversas purificaciones, el comportamiento de las diversas fracciones será diferente al extracto crudo.

Ambos extractos se sometieron a un fraccionamiento primario utilizando cromatografía en columna, evaluando la actividad antialimentaria de cada una de las fracciones obtenidas.

7.2 Efecto de las fracciones primarias del extracto de las flores de *Salvia clinopodioides* en la alimentación de *Spodoptera frugiperda*

Tabla 12. Índice antialimentario (IA) (concentración de 1000 ppm) del extracto de las flores de *Salvia clinopodioides*.

FRACCION	IA (%)
1	-3.84
2	-1.46
3	-5.96
4	-21.21
5	31.30
6	9.50
7	24.32
8	52.40
9	15.52
10	39.68
11	17.71
12	35.78
13	36.05
14	15.40
15	29.93
16	18.60



Gráfica 5. Índice antialimentario (IA) de las fracciones primarias obtenidas del extracto acetónico de las flores de *Salvia clinopodioides*.

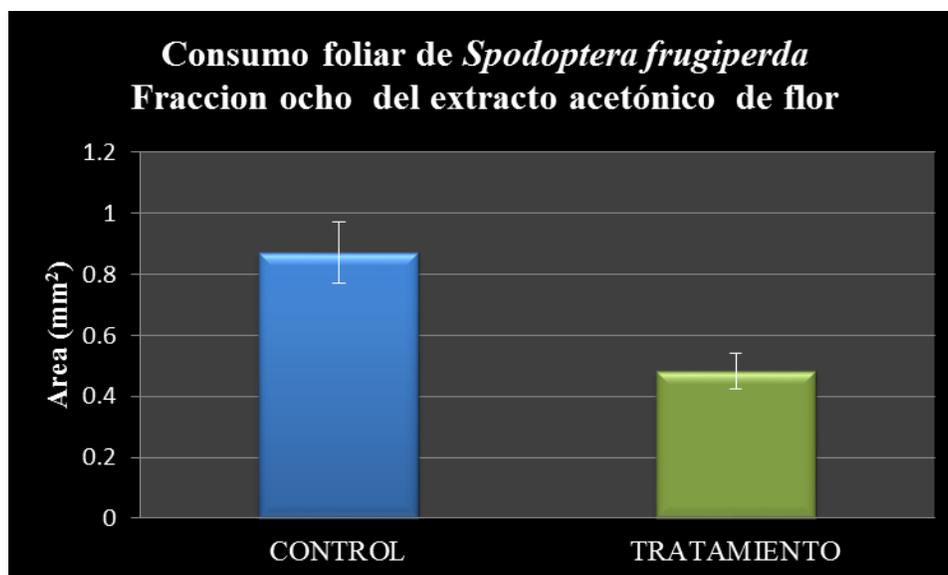
El fraccionamiento primario del extracto acetónico de flores de *Salvia clinopodioides*, nos permitió obtener 16 fracciones primarias las cuales fueron evaluados a una concentración de 1000 ppm con tres replicas cada una, en un bioensayo de no elección con *Spodoptera frugiperda*, obteniendo como resultado que solo la fracción 8 presenta actividad antialimentaria con un IA 52.4% (Tabla 12, Gráfica 5) y un valor de $p < 0.01$, puede considerarse activo y estadísticamente significativo^{76,77} (Gráfica 6).

Por lo cual se procedió a separarla nuevamente por medio de cromatografía en columna flash,⁷⁸(fraccionamiento secundario) obteniéndose 6 fracciones secundarias, las cuales fueron probadas nuevamente en el bioensayo de elección.

⁷⁶Bentley M, Stoddard W, Zalkow L. 1984. *Annals of Entomological. Society of America.*77:393.

⁷⁷González- Coloma A, Valencia E, Valenzuela E, Barros M, Hernández M, Lazo C. 2000. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.* 45:2.

⁷⁸Still W C, Kahn M and Mitra A. 1978. *Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. J.Org.Chem.*43:2923-2925.



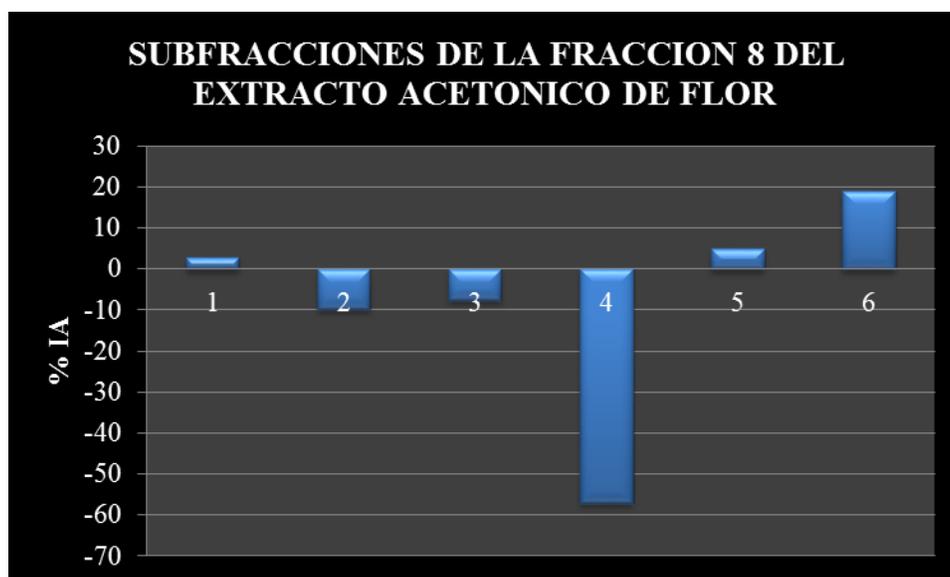
Gráfica 6. Área foliar consumida por *Spodoptera frugiperda* en el bioensayo con la fracción 8 del extracto acetónico de flores. Concentración 1000 ppm ($t = 3.12$, $p < 0.01$).

7.3 Efecto de las fracciones secundarias del extracto de las flores de *Salvia clinopodioides* en la alimentación de *Spodoptera frugiperda*

Las 6 fracciones secundarias que se obtuvieron de la cromatografía flash (fraccionamiento secundario) del extracto acetónico de las flores, no muestran actividad como disuasorios de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* por separado. Lo cual indica que la actividad antialimentaria de la fracción 8 primaria es causada por un efecto sinérgico de los compuestos presentes en las fracciones 1,5 y 6 (Tabla 13, Gráfica 7) que presentan actividad, que a pesar de no ser significativo de acuerdo a la literatura, podrían contemplarse como parte de la mezcla de compuestos que le dan actividad a la fracción 8, ya que en el caso de la fracciones 2, 3 y 4 que presentan valores negativos de hasta -57 % (Tabla 13, Gráfica 7). En el caso de la fracción 4 de acuerdo a lo establecido en la literatura y la fórmula utilizada, se considera altamente fagoestimulante.

Tabla 13. Índice antialimentario (IA) (concentración 1000ppm) de las fracciones secundarias obtenidas de la fracción 8 del extracto acetónico de Flor de *Salvia clinopodioides*.

FRACCION	IA (%)
1	2.71
2	-9.90
3	-7.67
4	-57.01
5	4.88
6	19.14



Gráfica 7. Índice antialimentario (IA) de las fracciones secundarias obtenidas de la fracción 8 del extracto acetónico de las Flores de *Salvia clinopodioides*.

Esterificación

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocaron 23 mg de la muestra 2 y se disolvió en éter etílico a una temperatura de 5°C; por otro lado, se añadieron 100 mL de una solución

etérea de diazometano previamente preparado. La reacción se monitoreo por medio de cromatografía en placa delgada, al terminar ésta se evaporó el disolvente y el producto fue purificado por cromatografía en capa delgada preparativa.

7.3.1 DISCUSION DE ESPECTROS

Como ya se ha discutido previamente el extracto acetónico de las flores de *Salvia clinopodioides* mostró un índice antialimentario de 54.25 % a 1000 ppm por lo que fue sometido a una separación cromatográfica primaria , obteniéndose 16 fracciones (Tabla 8), a las cuales se les realizo un bioensayos de elección con *Spodoptera frugiperda*, determinando así que la fracción 8 (346.9 mg) presentaba un efecto antialimentario de 52.4 % (Tabla 13), por lo cual fue sometida a una separación cromatográfica secundaria obteniéndose 6 fracciones (Tabla 9), las cuales no mostraron actividad antialimentaria en el bioensayos de elección con *Spodoptera frugiperda* (Tabla 14) y debido a la cantidad y pureza solo fue posible identificar los componentes de las fracciones 4 y 5.

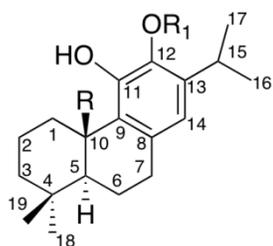
La fracción 4, la cual muestra un efecto fagoestimulante, se obtuvo como una mezcla aceitosa de dos componentes (CCD) en cuyo espectro de IR se observan bandas en 3606, 3514, 2949, 2867, 1696 y 1463 cm^{-1} . La banda en 3514 cm^{-1} es ancha y en combinación con la señal en 1696 cm^{-1} , permiten inferir la presencia de un grupo ácido carboxílico. El perfil del espectro de RMN de ^1H de esta mezcla sugiere que se trata de los ácidos oleanólico y ursólico. Estos triterpenos pentacíclicos son muy comunes en plantas del género *Salvia*. El tratamiento de esta mezcla con solución etérea de diazometano permitió obtener los correspondientes esteres metílicos los cuales fueron identificados por comparación de sus propiedades espectroscópicas de IR y RMN de ^1H con los descritos en la literatura.

La fracción 5, la cual muestra un índice antialimentario positivo, está constituida por un componente principal. Se obtuvieron 13.6 mg de un producto aceitoso, cuya fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas (Espectro 5) como $C_{21}H_{30}O_5$. En el espectro de IR (Espectro 1) se observan bandas en 3670.9, 3591.3, 3496.8, 3238.3 (ancha), 1682.2, 1608.98 y 1561.5 cm^{-1} . La banda ancha en 3238.3 y la de 1682.2 cm^{-1} indican la presencia de un ácido carboxílico en este producto. Asimismo del espectro en el IR se puede inferir la presencia de grupos $-OH$ y de dobles ligaduras aromáticas.

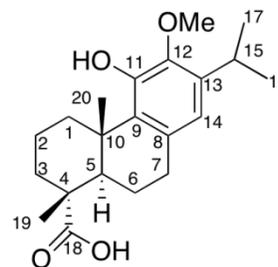
En el espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) (Espectros 2) de esta sustancia se pueden observar una señal simple aguda que integra para tres protones en 3.86 ppm. El desplazamiento químico de esta señal indica que se trata del metilo un grupo metoxilo el cual debe estar unido a un anillo aromático. En 3.28 ppm se observa un septuplete ($J = 6.9$ Hz) característico de un metino de un grupo isopropilo. El desplazamiento químico de esta señal indica que este grupo está unido asimismo a un anillo aromático. Dos señales dobles ($J = 6.9$ Hz) en 1.20 y 1.19 se asignan a los metilos del precitado grupo isopropilo. Una señal simple en 6.54 ppm se asigna a un protón aromático. La fórmula molecular ($C_{21}H_{30}O_5$) indica la presencia de 7 grados de insaturación. Tomando en cuenta la presencia de un anillo aromático y de un grupo ácido carboxílico se explican 5 de las 7 insaturaciones. Debido a que no hay evidencias en el espectro de RMN de 1H de la presencia de dobles ligaduras, se concluye que las dos insaturaciones restantes corresponden a dos ciclos más. La discusión anterior permite concluir que este compuesto es un diterpenoide tricíclico, con un esqueleto fundamental de abietano. Tomando en cuenta el desplazamiento químico del protón aromático y del metino del isopropilo se propone que el anillo C de este diterpenoide sea un anillo bencénico, el cual debe de estar pentasustituído, como en los ácidos carnósico, 12-O-metil-carnósico y en la pomiferina C, diterpenos abietánicos aislados de *Salvia lanígera*⁷⁹ y *S.pomífera*.⁸⁰

⁷⁹Hassan MG, Al-Hazimil, Ghulam A, Miana and Depp MS. 1987. Terpenoids from *salvia lanígera*. *Phytochemistry*.26 (4): 1091-1093.

⁸⁰Ulubelen A and Topcu G. 1992. Abietanediterpenoids from *salvia pomífera*. *Phytochemistry*.31 (11):3949-3951.



R= CO₂H, R₁ = H, Acido carnósico
 R= CO₂H, R₁= Me, Acido 12-O-metil-carnósico



pomiferina C

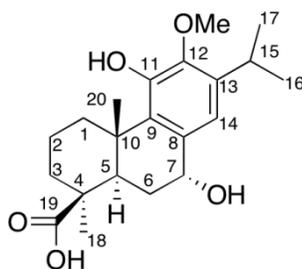
En el espectro de RMN de ¹H de este compuesto se observa además una señal doble de triples ancha y deformada que integra para un protón, centrada en 3.45 ppm ($J = 13.5$). Esta señal se asigna al protón de la posición 1 β -ecuatorial. El desplazamiento químico de esta señal se debe a la desprotección a través del espacio que sufre por el hidroxilo de la posición 11. Este fenómeno ha sido descrito para compuestos relacionados como los indicados previamente. De esta manera se estableció la posición relativa del metoxilo y el hidroxilo del sistema aromático.

En 5.6 ppm se observa una señal simple ancha que integra para un protón y que se asignó por su desplazamiento químico al protón geminal a un grupo hidroxilo secundario en posición bencílica, por lo cual se asigna a la posición 7. Por intercambio con agua deuterada, la señal para este protón se afina considerablemente. La posición de la señal es consistente con una orientación a axial para este grupo hidroxilo.

Finalmente en 1.16 y 1.25 ppm se observan las señales para dos grupos metilos adicionales. La comparación del desplazamiento químico con sistemas relacionados, permite establecer que el ácido carboxílico se localiza en la posición 4.⁸¹ La diferencia del desplazamiento químico de los metilos del producto aislado de *Salvia clinopodioides* con respecto a la pomiferina C, permiten postular que el ácido carboxílico tiene una orientación beta. De acuerdo con la discusión anterior se propone que la estructura del producto aislado, debe corresponder a la 4-*epi*-7 α -hidroxipomiferina C. Debido a la pequeña cantidad obtenida no

⁸¹Wenkert E, Afonso A, Beak P, Carney RW, Jeffs PW and McChesney JD. 1965. The Proton Magnetic Resonance Spectral Characteristics of Tricyclic Diterpenic Substance. 30: 713-722.

fue posible obtener un espectro de ^{13}C para sustentar esta estructura, por lo cual esta debe considerarse como tentativa. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada como apoyo a este trabajo, esta sustancia no se encuentra descrita previamente.



4-*epi*-7 α -hidroxipomiferina C

La fracción 6 de la separación cromatográfica secundaria del extracto acetónico de las flores, la cual presenta un efecto antialimentario positivo y ligeramente superior a la 5, está formada por una mezcla de dos productos de características semejantes. El análisis del espectro de RMN de ^1H de ésta indica que la 4-*epi*-7 α -hidroxipomiferina C se encuentra como componente principal junto con otro compuesto de naturaleza similar.

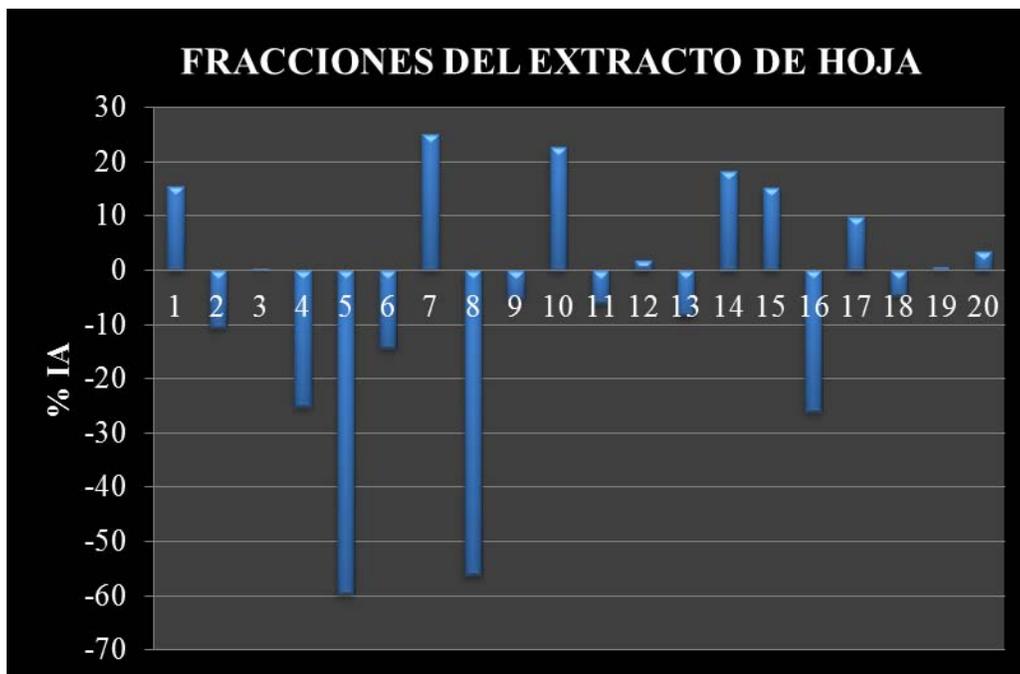
7.4 Efecto de las fracciones del extracto de hojas de *Salvia clinopodioides* en la alimentación de *Spodoptera frugiperda*.

De acuerdo con lo anterior veinte fracciones del extracto acetónico de las hojas, fueron evaluados a una concentración de 1000 ppm con tres replicas cada una, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14 y en la Grafica 8, Los resultados indican que ninguna de ellas presenta actividad antialimentaria mostrando valores de IA por debajo del 50%. Lo cual nos lleva a suponer que el efecto moderado mostrado en el extracto crudo es proporcionado por el efecto sinérgico de algunas de estas fracciones. De igual forma podemos apreciar que se tienen fracciones con un % IA de -59.68 para la fracción 5 y –

56.08 para la fracción 8 lo cual nos indica la presencia de compuestos con una fuerte actividad fagoestimilante.

Tabla 14. Índice antialimentario (IA) (concentración 1000 ppm) del extracto de las hojas de *Salvia clinopodioides*

FRACCIONES	% IA
1	15.36
2	-10.47
3	0.34
4	-25.02
5	-59.68
6	-14.24
7	24.99
8	-56.08
9	-5.11
10	22.63
11	-6.041
12	1.78
13	-8.25
14	18.29
15	15.14
16	-26
17	9.88
18	-4.66
19	0.57
20	3.52



Gráfica 8. Índice antialimentario (IA) de las fracciones primarias obtenidas del extracto acetónico de las hojas de *Salvia clinopodioides*.

8.- CONCLUSIONES

8.- CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo nos permiten confirmar la presencia de metabolitos secundarios con efecto disuasorio de la alimentación en *Spodoptera frugiperda* que está presente en *Salvia clinopodioides* principalmente en las flores, y en menor grado en las hojas, como en el caso de otras especies de salvias.

La actividad disuasoria parece ser debida a un efecto sinérgico de un grupo de compuestos presentes en el extracto dado que al ser separados pierden su actividad.

Esto nos ha permitido ampliar el conocimiento sobre la familia Lamiaceae, principalmente sobre *Salvia clinopodioides* Kunt que hasta antes de este trabajo no había sido estudiada.

9.- PERSPECTIVAS

9.- PERSPECTIVAS

Continuar con el estudio fitoquímico del resto de las fracciones no activas de los diferentes extractos acetónicos de las hojas, tallos y flores de *Salvia clinopodioides*.

Aislar he identificar las estructuras de los metabolitos secundarios presentes en las diferentes fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de los extractos acetónicos de las hojas, tallos y flores de *Salvia clinopodioides*.

Realizar pruebas biológicas como disuasorios de la alimentación sobre *Spodoptera fugiperda*, empleando las fracciones que presentan un índice antialimentario (IA) positivo para comprobar si la actividad es causada por el efecto sinérgico de las 6 fracciones del fraccionamiento secundario o solo son unas de ellas.

Realizar pruebas citotóxicas de los extractos crudos y compuestos puros, de las hojas, flores y tallos,

Realizar modificación en la estructura químicas de los metabolitos secundarios aisladas he identificadas que actividad biológica para identificar el sitio activo de dichas estructuras.

ANEXO

Preparación de la dieta artificial

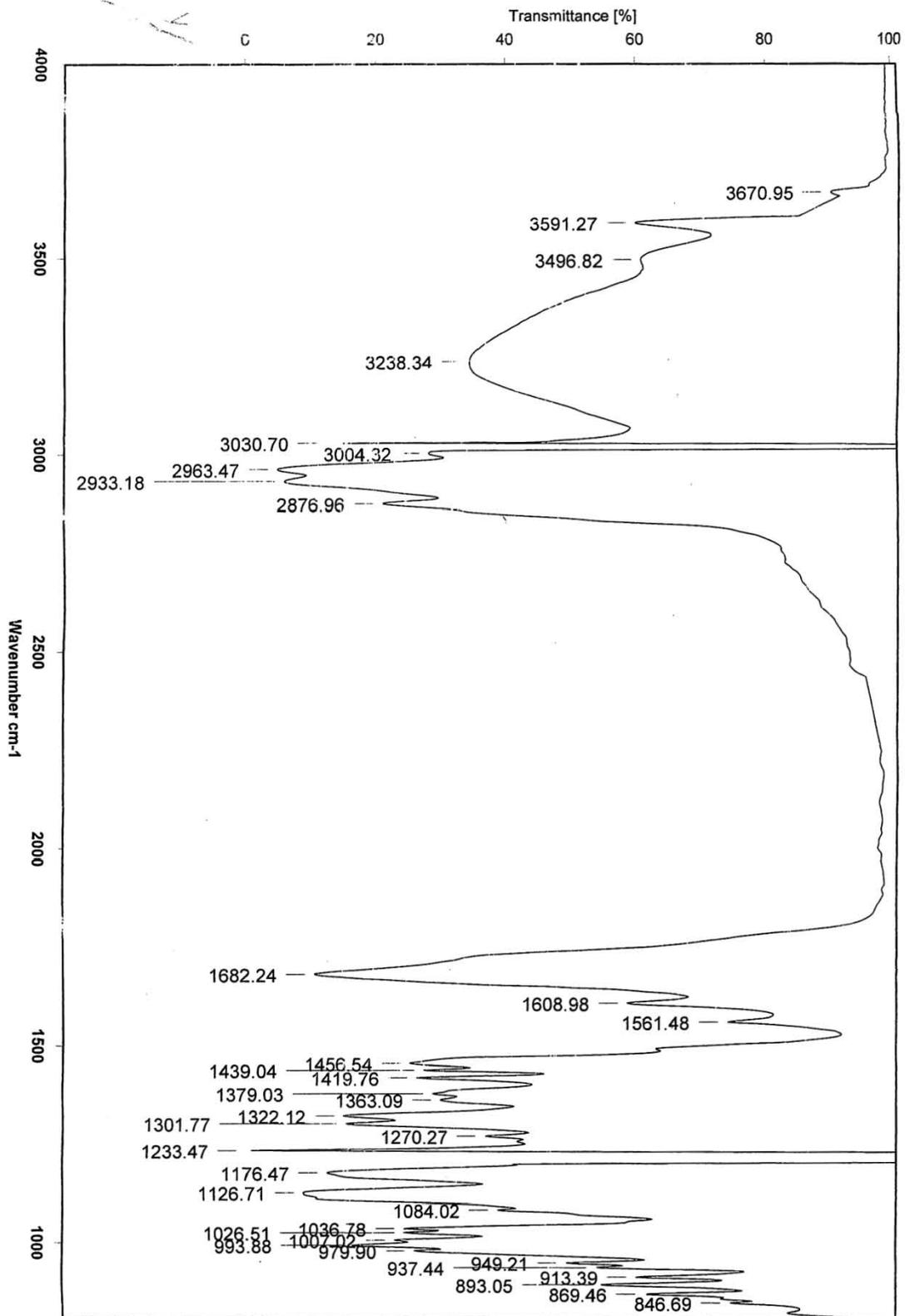
En un recipiente de 1L. Se disuelven los 14 g agar en 500 ml de agua destilada caliente y se agita para evitar que se formen grumos. Se hierve a fuego lento durante 10 min y se le adicionan los componentes descritos en la Tabla 15 (excepto la solución vitamínica) y se licúa.

Posteriormente se agregan 600 mL de agua destilada fría y se adiciona la solución vitamínica. Inmediatamente se distribuyó la dieta en recipientes plásticos donde se deja enfriar un poco y posteriormente se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

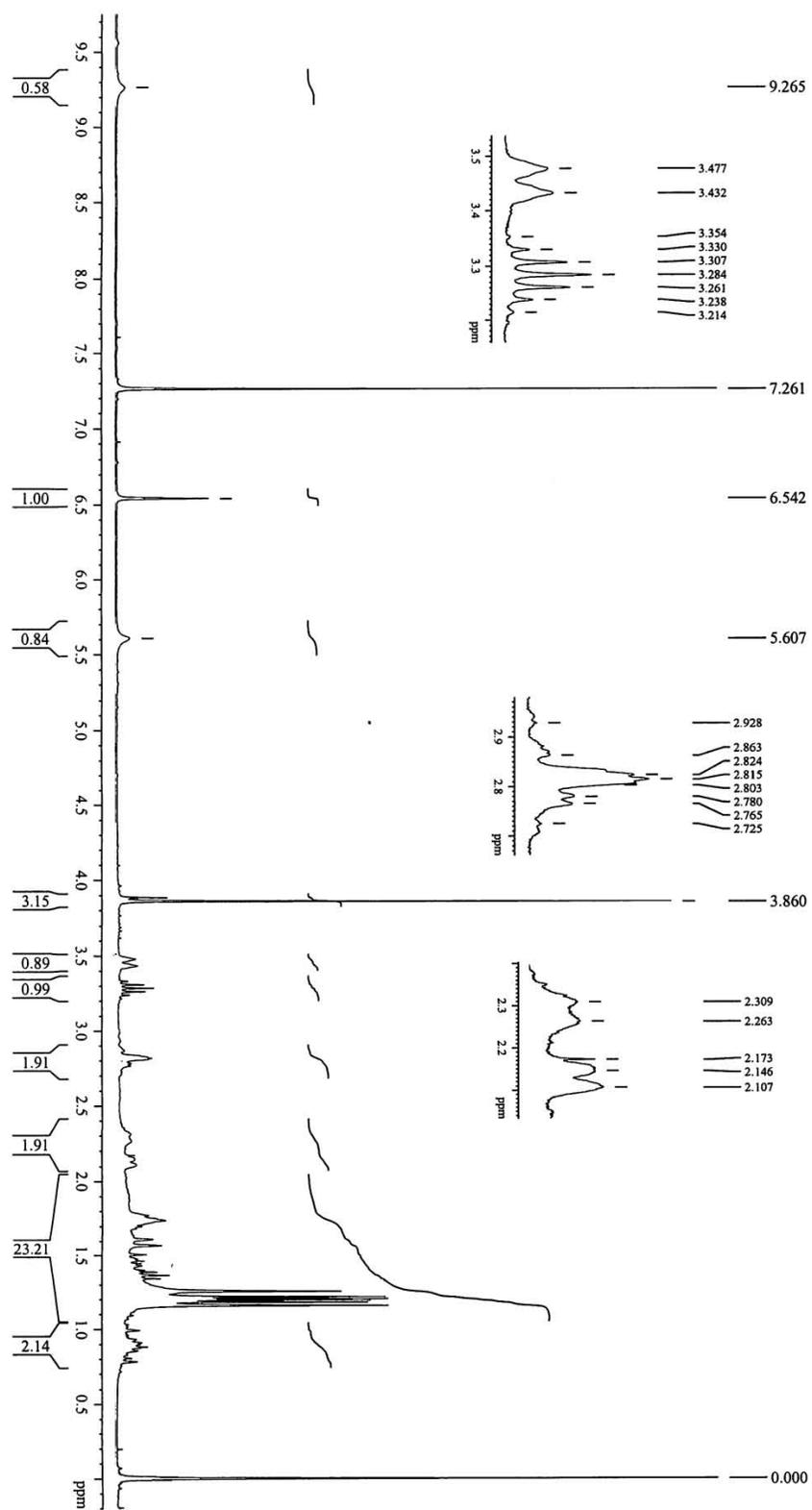
- Vitaminas: mezcla de vitaminas para la cría de lepidópteros (Vitamin mix-BioServ)

Tabla 15. Ingredientes de la dieta artificial para *Spodoptera frugiperda*.

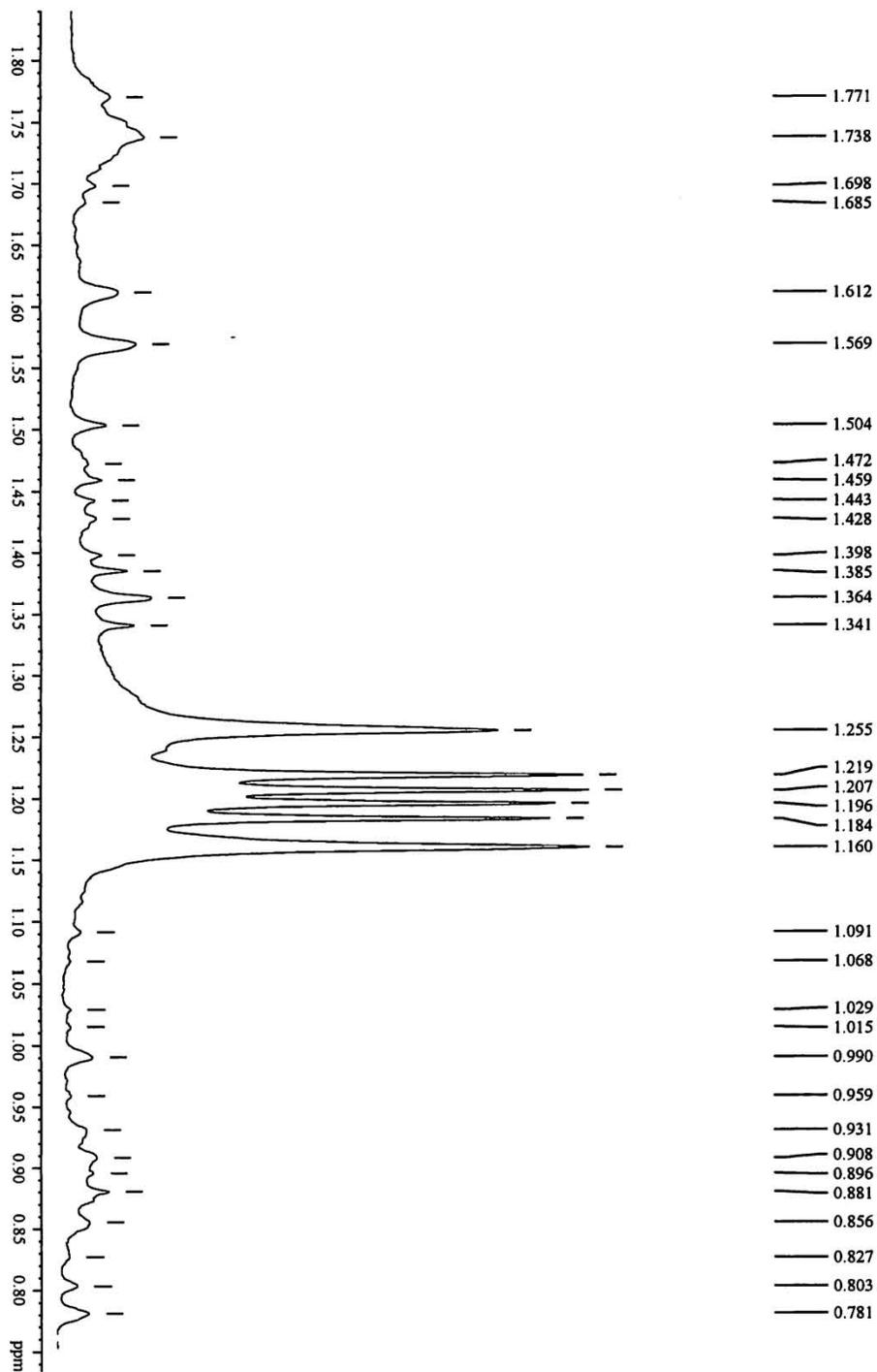
COMPONENTES	CANTIDAD
Ac. Acético (25%)	12.0 mL
Ac. Ascórbico	4.3 g
Ac. Sórbico	1.0 g
Aureomicina (14%)	1.2 mL
Agar	14.0 g
Cloruro de colina (15%)	7.3 mL
Formalina (10%)	4.4 mL
Germen de trigo	31.7 g
Harina de soya	71.1 g
Metilparabeno	1.6 g
Sacarosa	13.0 g
Sales Wesson	10.6 g
Solución vitamínica *	3.5 mL



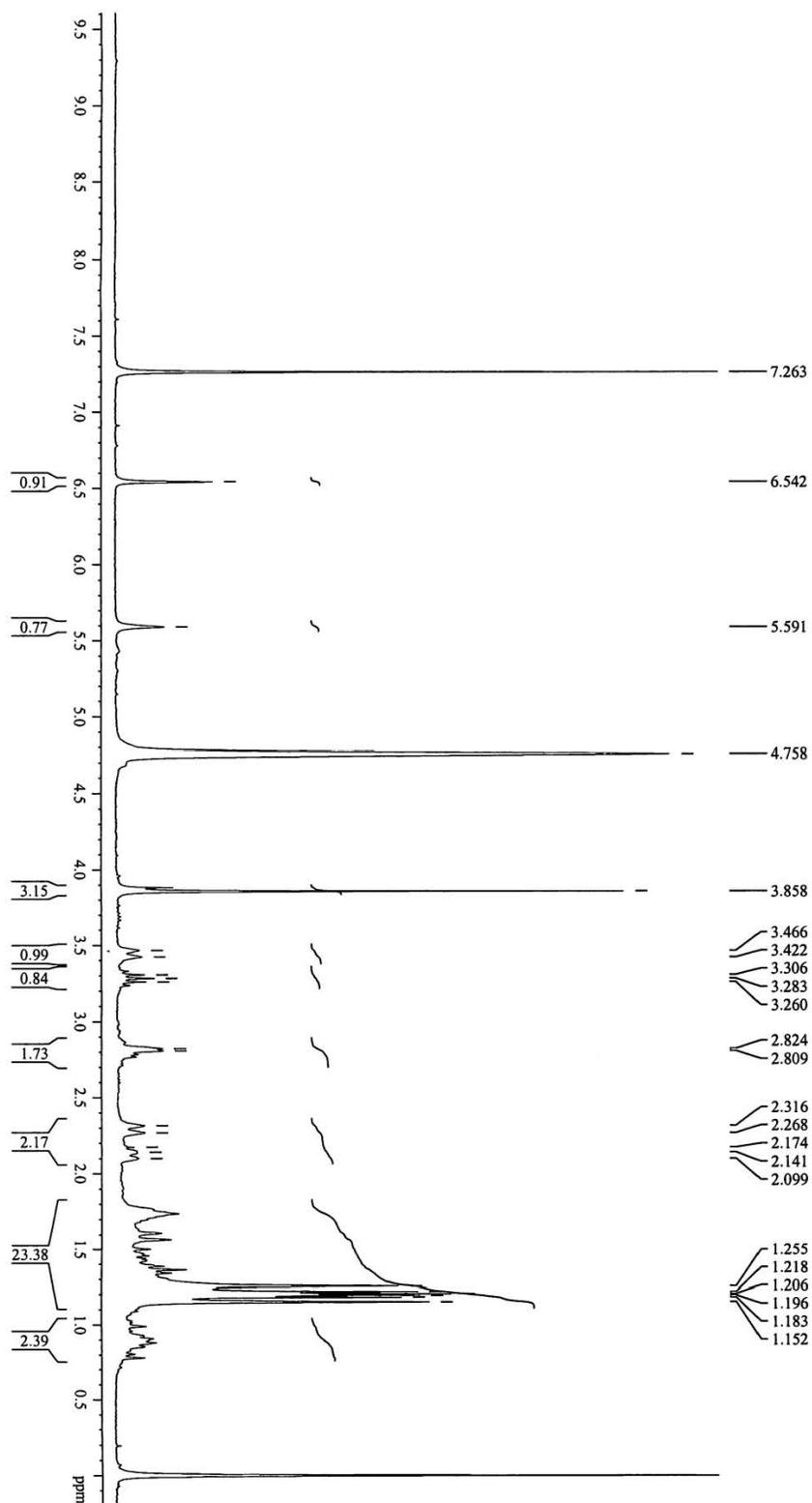
Espectro 1. IR 4-epi-7 α -hidroxipomiferina C



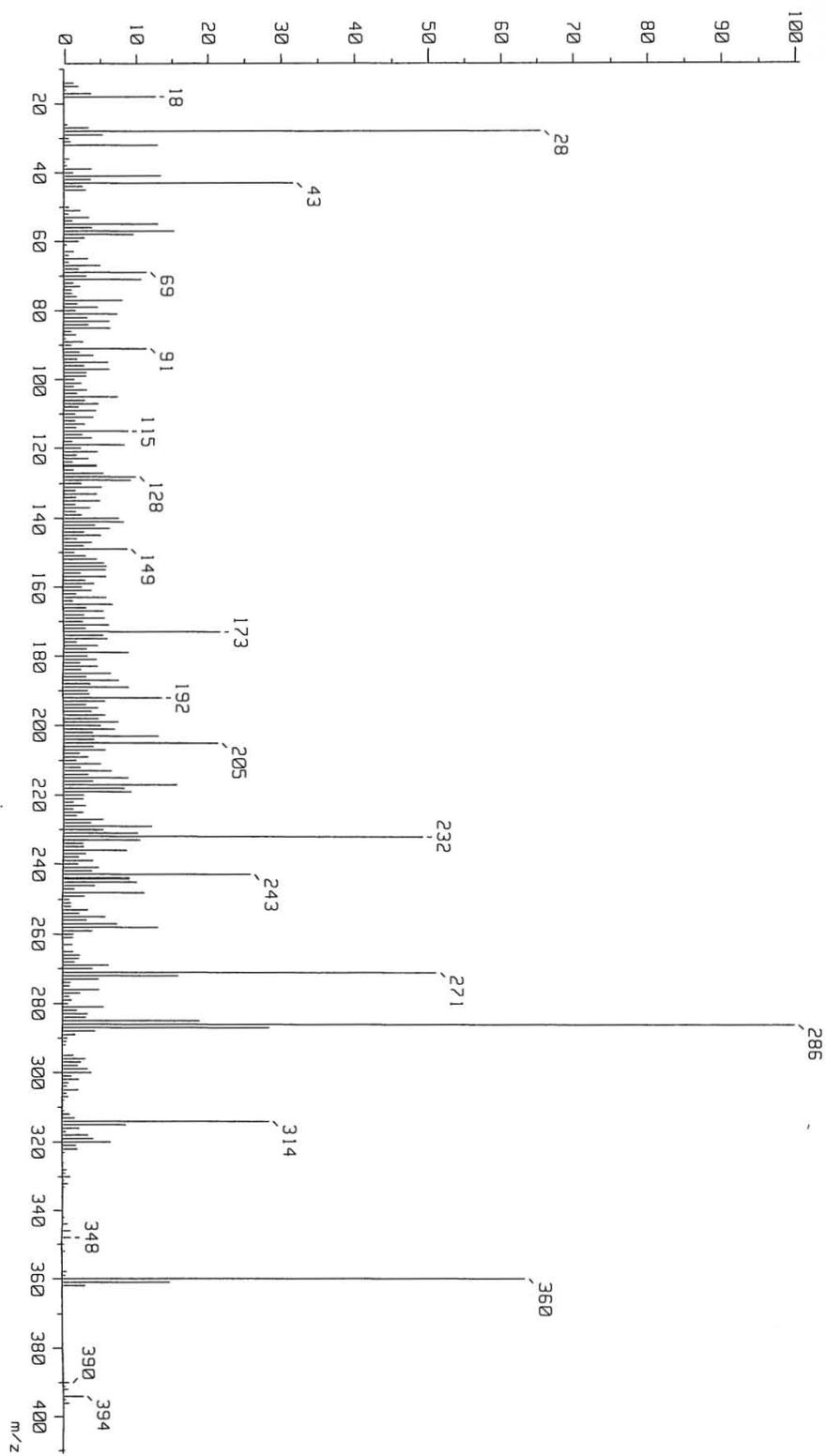
Espectro 2. RMN¹H 4-epi-7 α -hidroxipomiferina C



Espectro 3. RMN ^1H 4-epi-7 α -hidroxipomiferina C



Espectro 4. RMN ^1H (D_2O) 4-epi-7 α -hidroxipomiferina C



Espectro 5. Masas, 4-epi-7 α -hidroxipomiferina C