



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio fitoquímico de dos especies del género *Piper* (*Piper subtomentosum*, *Piper septuplinervium*) (Piperaceae) y determinación de actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera)

Mónica Constanza Ávila Murillo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2014

Estudio fitoquímico de dos especies del género *Piper* (*Piper subtomentosum*, *Piper septuplinervium*) (Piperaceae) y determinación de actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera)

Mónica Constanza Ávila Murillo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Químicas

Director (a):

Doctor, MSc, Químico. Luis Enrique Cuca Suarez

Línea de Investigación:

Química de Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Estudio Químico y de Actividad biológica de Rutáceas y Miristicáceas Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2014

Resumen

El presente trabajo combina estudios fitoquímicos y de actividad insecticida sobre una plaga polífaga, con el fin de contribuir a la búsqueda de productos naturales potencialmente útiles en el sector agrícola. El trabajo comprende aislamiento bioguiado y caracterización de metabolitos secundarios presentes en las inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium*, caracterización química de 3 aceites esenciales de las mismas especies, modificaciones estructurales de algunos de los flavonoides naturales obtenidos, síntesis de chalconas y evaluación de la actividad insecticida sobre *S. frugiperda* de los extractos, aceites esenciales, compuestos aislados, y los compuestos obtenidos por síntesis y semisíntesis.

El estudio fitoquímico bioguiado desarrollado en las dos especies vegetales condujo al aislamiento y caracterización de 9 metabolitos secundarios, de los cuales el ácido protocatéquico **C8** (17,16 ppm) y el flavonol galangina **C2** (13,63 ppm) fueron los metabolitos más activos contra la larvas de *S. frugiperda*. Debido al reconocido papel de los flavonoides en la relaciones planta-insecto, y a que fueron los metabolitos aislados en mayor cantidad en este trabajo, se evaluó la actividad antialimentaria de una serie de compuestos de tipo flavonoide: flavonoides aislados de diferentes especies vegetales, flavonoides modificados estructuralmente (dos de ellos sin previos reportes en la literatura), y flavonoides obtenidos por síntesis (dos de ellos sin previos reportes en la literatura) estableciendo relaciones estructura-actividad.

El estudio de los aceites esenciales de las especies vegetales estudiadas, mostró que el contenido de monoterpenos de los aceites de inflorescencias de *P. subtomentosum* (44%) y parte aérea de *P. septuplinervium* (77%) es el responsable de la toxicidad fumigante que presentan dichos aceites esenciales (13,2 µL/L de aire y 9,41 µL/L de aire respectivamente). Se determinó que los monoterpenos canfeno, α y β-pineno, y limoneno, son algunos de los metabolitos responsables de la actividad fumigante, siendo el canfeno el que posee la mayor actividad con $CL_{50} < 0,57$ µg/L de aire.

Palabras Clave: *Piper septuplinervium*, *Piper subtomentosum*, Piperaceae, *Spodoptera frugiperda*, flavonoides, terpenos.

Abstract

The present research combines phytochemical studies and insecticidal activity on polyphagous pest, with the aim of contributing to the search of potentially useful natural products in the agricultural sector. The work consists of isolation and characterization of the secondary metabolites present in the inflorescences of *Piper subtomentosum* and the aerial part of *Piper septuplinervium*, chemical characterization of three essential oils of the same species, structural modifications of some natural flavonoids, chalcone synthesis and insecticidal activity evaluation on *S. frugiperda* of the extracts, essential oils, isolated compounds, and the compounds obtained by synthesis and semisynthesis.

The bioassay-guided phytochemical study of the two species leads to the isolation and characterization of 9 secondary metabolites, of which protocatechuic acid **C8** (17.16 ppm) and flavonol galangina **C2** (13.63 ppm) were the most active metabolites against *S. frugiperda*. Due to the recognized role of flavonoids in plant-insect relationships and for being the metabolites isolated in greater amounts in this work, the antifeedant activity of flavonoids type compounds was evaluated establishing structure-activity relationships. The compounds evaluated were: flavonoids isolated from different plant species, structurally modified flavonoids (two of them with no previous reports in the literature), and flavonoids obtained by synthesis (two of them with no previous reports in the literature).

The study of essential oils showed that the content of monoterpenes in inflorescences of *P. subtomentosum* (44%) and aerial part of *P. septuplinervium* (77%) oils is responsible for the fumigant toxicity of essential oils (13,2 $\mu\text{L/L}$ of air and 9,41 $\mu\text{L/L}$ of air respectively). the monoterpenes camphene, α and β -pinene and limonene, are some of the metabolites responsible for the fumigant activity. Camphene was the more active metabolite with $\text{LC}_{50} < 0.57 \mu\text{g/L}$ of air.

Keywords: *Piper septuplinervium*, *Piper subtomentosum*, Piperaceae, *Spodoptera frugiperda*, flavonoids, terpenes.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Piper subtomentosum</i> Y <i>Piper septuplinervium</i> (PIPERACEAE).	9
1.1. Generalidades.....	9
1.1.1 Insecticidas a partir de aceites esenciales de plantas	10
1.1.2 Aceites esenciales obtenidos de especies de la familia Piperaceae.	11
1.1.3 Insecticidas comerciales a base de aceites esenciales.	15
1.2 Materiales y Métodos	16
1.2.1. Análisis Químico de los aceites esenciales	16
1.2.2 Determinación de actividad insecticida de aceites esenciales.	17
1.3 Resultados y discusión	20
1.3.1. Composición química de los aceites esenciales	20
1.3.2. Determinación de actividad insecticida de los aceites esenciales	24
1.4 Conclusiones.....	40
1.5 Bibliografía.....	41
2. ESTUDIO FITOQUÍMICO BIoguiado DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE INFLORESCENCIAS DE <i>Piper subtomentosum</i> Y PARTE AÉREA DE <i>Piper septuplinervium</i>.	57
2.1 Generalidades.....	57
2.1.1 Sustancias aisladas de plantas como insecticidas	58
2.1.2 Metabolitos fijos aislados de la familia Piperaceae.....	63
2.2 Materiales y Métodos	79
2.2.1 General.....	79
2.2.2 Material Vegetal.....	80

2.2.3	Material Biológico	80
2.2.4	Determinación de actividad insecticida.....	80
2.2.5	Estudio fitoquímico bioguiado de la parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	81
2.2.6	Estudio fitoquímico bioguiado de las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	82
2.2.7	Determinación del efecto de los extractos etanólicos de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> e inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> sobre el ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	83
2.3	Resultados y discusión	85
2.3.1	Estudio fitoquímico bioguiado de la parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> y las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	85
2.3.2	Efecto de los extractos etanólicos de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> y las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> sobre el ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	108
2.4	Conclusiones.....	114
2.5.	Bibliografía.....	115
3.	DERIVADOS DE FLAVONOIDES NATURALES Y SINTÉTICOS Y SU EFECTO SOBRE EL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	125
3.1	Generalidades.....	125
3.2	Materiales y Métodos	128
3.2.1	Material Biológico	128
3.2.2	Determinación de actividad antialimentaria (Inapetencia)	129
3.2.3	Síntesis y semisíntesis de los compuestos ensayados contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	130
3.3	Resultados y discusión	135
3.3.1	Análisis espectroscópico	135
3.3.2	Análisis de resultados actividad insecticida y antialimentaria:	163
3.4	Conclusiones.....	174
3.5	Bibliografía.....	175
4.	RESUMEN FINAL	179
5.	RECOMENDACIONES GENERALES Y PROYECCIONES DE INVESTIGACIÓN.....	183

Lista de figuras

Figura 1 Ciclo de vida del gusano cogollero.....	3
Figura 1-1 Tipo de compuestos presentes en los aceites esenciales de algunas especies de Piperaceas estudiadas en los últimos catorce años.....	13
Figura 1-2 Metabolitos volátiles presentes en aceites esenciales de especies de Piperaceas.....	14
Figura 1-3 Mortalidades causadas por los aceites esenciales de inflorescencias, hojas de <i>P. subtomentosum</i> y parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> sobre larvas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i>	26
Figura 1-4 Mortalidades causadas por los monoterpenos puros ensayados (canfeno, α y β -pineno) sobre larvas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i>	29
Figura 1-5 Comparación de rectas de regresión para análisis de toxicidad conjunta del α y β -pineno.....	31
Figura 2-1 Estructura de la Piretrina I.....	59
Figura 2-2 Estructuras de triterpenos activos aislados del extracto de semillas del árbol del Neem.....	59
Figura 2-3 Estructura química de la rotenona.....	60
Figura 2-4 Estructura de Meliartenina.....	62
Figura 2-5 Ejemplos de C ₆ -C ₃ aislados de Piperaceas.....	65
Figura 2-6 Estructura de lignanos y neolignanos aislados de especies de <i>Piper</i>	70
Figura 2-7 Estructuras de flavonoides aislados de especies de <i>Piper</i>	71
Figura 2-8 Estructuras de α -pironas aisladas de <i>Piper metisticum</i>	73

Figura 2-9 Estructura de derivados de ácido benzoico aislados de Piperaceae.....	74
Figura 2-10 Estructuras de triterpenos y esteroides aislados de especies de <i>Piper</i>	75
Figura 2-11 Cromenos aislados de especies de Piperaceae.....	76
Figura 2-12 Metabolitos de estructura miscelánea aislados recientemente de especies del género <i>Piper</i>	78
Figura 2-13 Esquema general de extracción, fraccionamiento bioguiado del extracto de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	82
Figura 2-14 Esquema general de extracción, fraccionamiento bioguiado y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas de las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	84
Figura 2-15 Metabolitos aislados de la parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	86
Figura 2-16 Metabolitos aislados de las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	86
Figura 2-17 Espectros del compuesto C1.....	90
Figura 2-18 Espectros del compuesto C2.....	92
Figura 2-19 Espectro de masas por IE del derivado sililado de C3.....	93
Figura 2-20 Espectros del compuesto C4.....	94
Figura 2-21 Espectros del compuesto C5.....	96
Figura 2-22 Espectros del compuesto C6.....	97
Figura 2-23 Espectros del compuesto C7.....	99
Figura 2-24 Espectros del compuesto C8.....	100
Figura 2-25 Espectros del compuesto C9.....	102
Figura 2-26 Retraso en el crecimiento de <i>Spodoptera frugiperda</i> , generado por el extracto de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> al ser administrado en la dieta.....	109
Figura 2-27 Retraso en el crecimiento de <i>Spodoptera frugiperda</i> , generado por el extracto de inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> al ser administrado en la dieta.....	109

Figura 2-28 Mal formaciones causadas a las pupas y los adultos de <i>S. frugiperda</i> después de incluir los extractos de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> e inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> en la dieta.....	113
Figura 3-1 Perfiles de CCD revelados con vainillina/H ₃ PO ₄ y eluidas con EdP-AcOEt-HCOOH 70:30:2 de la mezcla antes y después de la acetilación.....	131
Figura 3-2 Procedimiento de obtención y purificación de la mezcla acetilada.....	132
Figura 3-3 Esquema general de reacción para obtención de S1-S6.....	133
Figura 3-4 Reacción general de obtención de análogos de carbamatos.....	134
Figura 3-5 Comparación de los espectros de RMN ¹ H de los compuestos C1, D1 y D2.....	136
Figura 3-6 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto D1, 100 MHz, CDCl ₃	138
Figura 3-7 Espectros de RMN ¹³ C del compuesto D2, 100 MHz, CDCl ₃	139
Figura 3-8 Comparación espectros de RMN ¹ H de los compuestos C2, D3, D4, D5.....	142
Figura 3-9 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto D3, 75 MHz, CDCl ₃	143
Figura 3-10 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto D4, 100 MHz, CDCl ₃	144
Figura 3-11 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto D5, 125 MHz, Acetona <i>d</i> ₆	145
Figura 3-12 Espectros del compuesto S1.....	148
Figura 3-13 Espectros del compuesto S2.....	149
Figura 3-14 Espectros del compuesto S3.....	151
Figura 3-15 Espectros del compuesto S4.....	152
Figura 3-16 Espectro del compuesto S5.....	154
Figura 3-17 Espectros del compuesto S6.....	155
Figura 3-18 Comparación de los espectros de RMN ¹ H de los compuestos S3 y S7.....	158
Figura 3-19 Comparación de espectros de RMN ¹ H de los compuestos S5 y S8.....	159
Figura 3-20 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto S7, 125 MHz, Acetona <i>d</i> ₆	160
Figura 3-21 Espectro de RMN ¹³ C del compuesto S8, 125 MHz, Piridina <i>d</i> ₅	160

Lista de tablas

Tabla 1-1 Rendimiento y constantes físicas de los aceites esenciales objeto de estudio.....	20
Tabla 1-2 Composición relativa de los aceites esenciales objeto de estudio.....	21
Tabla 1-3 CL ₅₀ obtenidas para los tres aceites esenciales ensayados.....	27
Tabla 1-4 CL ₅₀ calculadas para los monoterpenos puros.....	29
Tabla 1-5 Concentraciones de mezcla y mortalidades esperadas y obtenidas para la determinación de la toxicidad conjunta de α y β - pineno.....	31
Tabla 1-6 Resultados de la determinación de toxicidad por contacto de aceites esenciales y monoterpenos puros.....	33
Tabla 1-7 Resultados de actividad repelente sobre <i>S. frugiperda</i> de los aceites esenciales de <i>P. septuplinervium</i> y <i>P. subtomentosum</i>	34
Tabla 1-8 Efecto de los aceites esenciales sobre el tamaño de las larvas de <i>S. frugiperda</i> durante los primeros 21 días de incubación, posteriores al ensayo de toxicidad fumigante.....	37
Tabla 1-9 Efecto sobre la pupación, patrones de emergencia y mortalidad de larvas producida por los aceites esenciales después de 21 días de incubación.....	38
Tabla 1-10 Efecto de los aceites esenciales sobre la reproducción de <i>S. frugiperda</i>	39
Tabla 2-1 Ejemplos de amidas aisladas de especies de Piperaceae y su actividad biológica.....	66
Tabla 2-2 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C1.....	90
Tabla 2-3 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C2.....	91
Tabla 2-4 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C3.....	93
Tabla 2-5 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C4.....	94

Tabla 2-6 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C5.....	95
Tabla 2-7 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C6.....	97
Tabla 2-8 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C7.....	98
Tabla 2-9 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C8.....	100
Tabla 2-10 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto C9.....	101
Tabla 2-11 CL ₅₀ de los compuestos aislados de la parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> y las inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> sobre <i>S. frugiperda</i>	104
Tabla 2-12 Comparación del efecto del extracto de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> sobre el tamaño de las larvas de <i>S. frugiperda</i> durante los primeros 19 días de incubación.....	110
Tabla 2-13 Comparación del efecto del extracto de parte aérea de <i>P. subtomentosum</i> sobre el tamaño de las larvas de <i>S. frugiperda</i> durante los primeros 19 días de incubación.....	110
Tabla 2-14 Efecto de la pupación y la mortalidad de <i>S. frugiperda</i> producida por los extractos de inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> y la parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> después de 19 días de incubación.....	112
Tabla 2-15 Efecto de los extractos de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> e inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> sobre los patrones de emergencia y paso de estadio a estadio de <i>S. frugiperda</i> después del día 19 de incubación.....	112
Tabla 3-1 Condiciones de reacción para la obtención de S1-S6.....	133
Tabla 3-2 Condiciones de reacción para la obtención de los análogos S7 y S8.....	134
Tabla 3-3 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto D1.....	138
Tabla 3-4 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto D2.....	139
Tabla 3-5 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto D3.....	143
Tabla 3-6 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto D4.....	144
Tabla 3-7 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto D5.....	145
Tabla 3-8 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S1.....	147
Tabla 3-9 Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S2.....	149

Tabla 3-10	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S3.....	150
Tabla 3-11	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S4.....	152
Tabla 3-12	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S5.....	153
Tabla 3-13	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S6.....	155
Tabla 3-14	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S7.....	162
Tabla 3-15	Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto S8.....	162
Tabla 3-16	Indices antialimentarios (%IA) para los compuestos de núcleo 2-fenil-benzo-y-pirona.....	164
Tabla 3-17	Indices antialimentarios (%IA) para los compuestos de tipo flavanona.....	166
Tabla 3-18	Indices antialimentarios (%IA) de las dihidrochalconas ensayadas.....	168
Tabla 3-19	Indices antialimentarios (%IA) de las chalconas ensayadas.....	170
Tabla 3-20	Indices antialimentarios (%IA) de las catequinas ensayadas.....	172
Tabla 3-21	Indices antialimentarios (%IA) de los arilpropanos ensayados.....	173

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
A(%)	Porcentaje de adultos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial
AcOEt	Acetato de etilo
AcOiPr	Acetato de isopropilo
°C	Grado Celcius
c	Cuarteto
c	Concentración
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CF	Cromatografía flash
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CL ₂₅	Concentración letal para el 25% de la población
CL ₅₀	Concentración letal para el 50% de la población
CLV	Cromatografía líquida al vacío
d	Doblete
dd	Doble doblete
DMSO <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
DS	Desviación estándar
EdP	Éter de petróleo
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
eV	Electrón voltios
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GSH	Glutación
HRMS	High resolution mass spectroscopy
Hz	Hertz
IBUN	Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia
%IA	Índice antialimentario
IE	Impacto electrónico
IR3535	3-N-acetil-N-butilamino-propionato de etilo 15%
I _R	Índice de retención
J	Constante de acoplamiento
L(%)	Porcentaje de larvas
M (%)	Porcentaje de individuos muertos
m	Multiplete

Abreviatura	Término
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
ND	No determinado
P (%)	Porcentaje de pupas
PIB	Producto interno bruto
ppm	Partes por millón
R.A.	Reactivo analítico
RC	Recristalización
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
S	Singlete
T	Triplete
UV	Ultravioleta
[α]	Rotación óptica
Δ	Desplazamiento químico
φ-CH ₃	Tolueno

Introducción

La historia del uso de las plantas es milenaria y desde tiempos remotos estas han proporcionado múltiples beneficios a los seres vivos con los cuales comparten su habitat, en especial al hombre. Las especies vegetales han sido fuente de alimento, materias primas de textiles, insumos para construcción, en tratamientos para curar dolencias, y como insecticidas o repelentes para el mantenimiento de cultivos y cosechas almacenadas. La anterior diversidad de aplicaciones evidencia que las plantas representan un potencial inestimable para el descubrimiento de productos naturales con múltiples usos (Hostettman y Marston, 2002). Teniendo en cuenta las premisas anteriores en países megadiversos como Colombia, en el que con apenas el 0,7% de la superficie continental existe cerca del 10% de la diversidad biológica mundial (Andrade, 2011), es pertinente el desarrollo de investigaciones que incluyan el estudio de la diversidad química y biológica de su flora.

Colombia es un país eminentemente agrícola, esta actividad económica se desarrolla en los 32 departamentos que componen el territorio, en los que existen alrededor de 13 cultivos transitorios y 17 cultivos permanentes (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, 2010). De acuerdo a las últimas estadísticas del Ministerio de Comercio Exterior, después del sector minero (aporte 70% PIB), el sector agrícola es la segunda actividad económica aportante por exportaciones totales al PIB (7%) gracias a los ingresos obtenidos por comercio de café, flores y banano (Ministerio de Comercio exterior 2013). Además de los cultivos mencionados anteriormente existen otros que a pesar de que no generan grandes divisas por exportaciones son importantes por la extensión de tierra que se dedica a su cultivo, y por ser base de la alimentación y la cultura del país; este es el caso del cultivo del maíz, el cual está presente en 31 departamentos del territorio nacional y alcanza un área de 542.131 hectáreas sembradas y una producción de 1'869.970 toneladas anuales (FENALCE, 2012). A pesar de la extensión de tierra cultivada, la producción de maíz obtenida es insuficiente para cubrir la demanda, por ejemplo en el año 2012 se importaron 3'188.048 toneladas de maíz blanco y amarillo

(FENALCE, 2012). Entonces surge una pregunta: ¿Por qué si hay tanta extensión cultivada de maíz, la producción es insuficiente para cubrir las necesidades de los sectores consumidores?; factores como el daño en los suelos, el cambio climático, la presencia de plagas, muchas de ellas resistentes como resultado del uso y sobretodo el abuso de insecticidas son algunas de las posibles respuestas a la pregunta anterior.

Debe ser reconocido que los insecticidas son una herramienta muy poderosa para el control de los insectos plaga, pero al mismo tiempo se debe convenir que su aplicación indiscriminada e imprudente puede dar lugar a serios problemas de contaminación y de deterioro del ambiente. A largo plazo, los insecticidas pueden llegar a ser inefectivos debido al desarrollo de una población de insectos resistentes; sin embargo si los productos destinados para el control de plagas son usados correctamente pueden marcar la diferencia entre un buen cultivo o el fracaso total del mismo. En este sentido en nuestro país no se ha realizado un control exitoso de algunos insectos plaga, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), es la plaga que causa los mayores daños y pérdidas de cultivos de maíz en Colombia, hasta ahora su control es insuficiente y se realiza por lo general con insecticidas químicos que son peligrosos para los ecosistemas (CORPOICA, 2003). Este insecto es conocido comúnmente como “gusano cogollero” del maíz, actúa como gusano tierrero, trozador o gusano ejército y como cogollero que es su hábito más característico en el maíz, está distribuido por todo el continente americano y puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 2600 m.s.n.m. (García *et al.*, 2002). Durante su ciclo de vida el “gusano cogollero” pasa por cuatro etapas: huevo o postura, larva ó gusano, pupa, y polilla ó adulto. Las posturas 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 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 que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos. Las larvas al nacer 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 cabeza se distingue una "Y" blanca invertida. Las larvas pasan por 6 estadíos o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros;

en el primero estas miden hasta 2-3 milímetros y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-7 milímetros y la cabeza es café clara; las larvas pueden medir aproximadamente 35 milímetros de longitud en su último estadio, a partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se abre o desenvuelve (CORPOICA, 2003). Las pupas son de color caoba y miden 14 a 17 milímetros 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 posteriores, después de los cuales emerge el adulto. La polilla vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura. En la Figura 1 se presentan los diferentes estados del ciclo de vida del gusano cogollero.

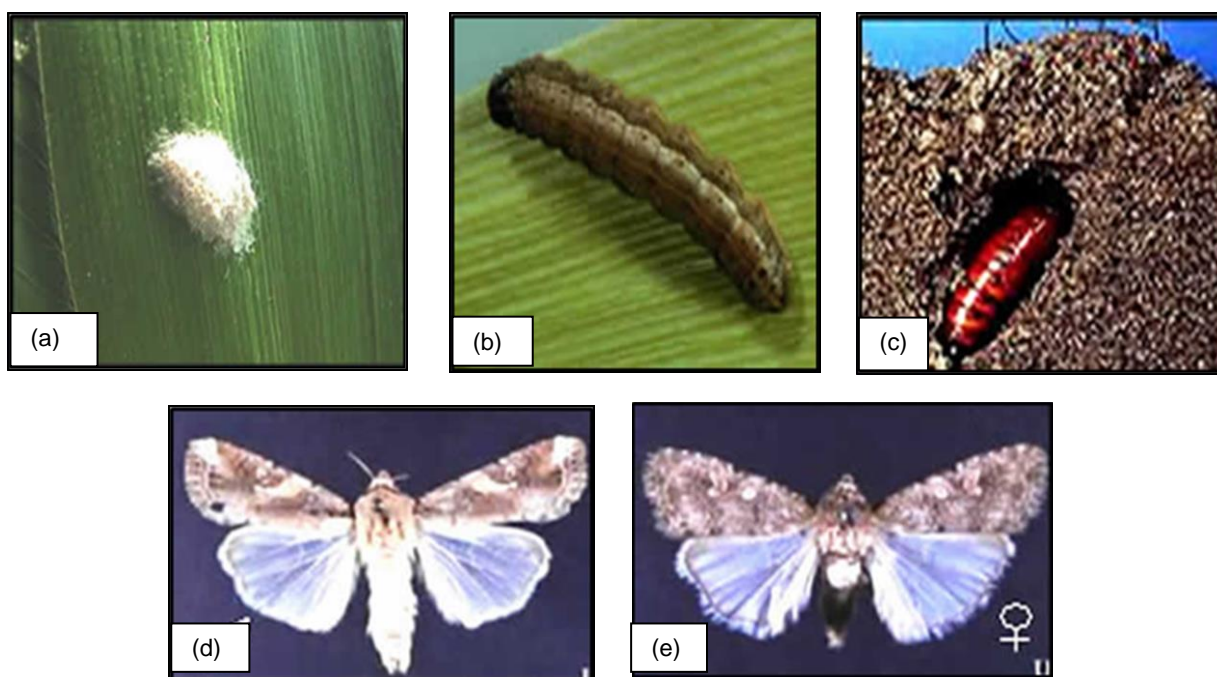


Figura 1. Ciclo de vida del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*). (a). postura, (b) larva, (c) pupa, (d) adulto macho, (e) adulto hembra

El uso indiscriminado de insecticidas químicos de amplio espectro para el control de esta plaga, tales como endosulfan, carbofuran, metamidifos, y clorpirifos (organoclorados, carbamato, y organofosforado respectivamente), ha favorecido el desarrollo de especies resistentes, además de ocasionar efectos negativos sobre la fauna benéfica e interferir con el equilibrio biológico (Pérez *et al.*, 2004). De acuerdo a CORPOICA quien es la dependencia estatal encargada de direccionar las estrategias de control a los agricultores, hasta ahora las alternativas existentes para remediar en alguna medida la infestación de *Spodoptera* después de haber detectado daño son las siguientes: trampas de monitoreo con melaza para capturar los adultos, liberación de la avispa *Telenomus remus* que parasita los huevos de *Spodoptera spp*, uso de insecticidas biológicos como las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, aspersion de extracto del árbol del Neem, aspersion del cultivo con extracto de hojas de tabaco, y finalmente en caso de que el daño del cultivo sea mayor al 35% debe usarse un insecticida químico y se recomienda sea de baja toxicidad lo cual es difícil de conseguir en el mercado

Por todo lo expuesto anteriormente es una prioridad realizar una continua búsqueda de sustancias insecticidas que además de ser efectivas, no generen perjuicios al medio ambiente. Con este fin, la investigación en plantas representa una fuente vastísima de sustancias o de nuevos "*lead compounds*", si se considera que existen indicios milenarios de la utilización de especies vegetales como insecticidas y/o deterrentes (Murray, 2006). En el caso específico de Colombia teniendo en cuenta que nuestro país es eminentemente agrícola, un campo de investigación prioritario es la búsqueda de sustancias con poder deterrente, antialimentario y/o insecticida que permita el mantenimiento de los cultivos y el éxito de la producción. De acuerdo con lo anterior existen entidades principalmente del estado como CORPOICA y el Ministerio de Agricultura que tienen como uno de sus objetivos la continua búsqueda de soluciones al problema de las plagas en los cultivos, y al mantenimiento de estos sin afectar el medio ambiente; por lo que varios grupos de investigación enfocan la investigación fitoquímica en la búsqueda de sustancias que puedan llegar a ser empleadas con este fin o como base de síntesis para el desarrollo de nuevos insecticidas químicos específicos en el tratamiento de plagas.

El grupo de investigación Estudio Químico y de Actividad biológica de Rutáceas y Miristicáceas Colombianas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá en conjunto con el grupo de investigación BIOGUAVIO de la

Universidad de Cundinamarca–Sede Fusagasugá en el marco del proyecto “Bioprospección participativa de comunidades vegetales asociadas a la familia Piperaceae en la región del sumapaz medio y bajo occidental” financiado por COLCIENCIAS dedicaron esfuerzos a seleccionar especies vegetales que puedan llegar a ser fuente de agentes fitosanitarios para el control de *Spodoptera frugiperda*, la familia botánica escogida para realizar el estudio fue la familia Piperaceae, ya que desde hace miles de años es usada como repelente de insectos y es conocida por sus múltiples propiedades como deterrente e insecticida (Scott *et al.*, 2008) y es ampliamente encontrada en nuestro territorio. Se recolectaron 41 especies de Piperaceas (25 del género *Piper* y 16 del género *Peperomia*), de las cuales 22 se determinaron plenamente y se sometieron a extracción con etanol al 96%, a los extractos etanólicos obtenidos se les realizó un ensayo de actividad insecticida preliminar; a partir del que se seleccionó a los extractos de parte aérea de la especie *Piper septuplinervium* y las inflorescencias de la especie *Piper subtomentosum* como objeto de la presente investigación.

Considerando la alta mortalidad causada por los extractos de *P. subtomentosum* y *P. septuplinervium* y la ausencia de reportes químicos y de actividad biológica previos de las especies seleccionadas, se decidió abordar el estudio de la siguiente forma: primero se realizó el estudio de los componentes volátiles de las especies seleccionadas, en busca de determinar la actividad insecticida *in vitro* de estos sobre *S. frugiperda* (descrito en el capítulo 1); segundo se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de las inflorescencias de la especie *P. subtomentosum* y la parte aérea de la especie *P. septuplinervium*, con el fin de determinar los metabolitos fijos responsables de la actividad insecticida *in vitro* contra *S. frugiperda* (descrito en el capítulo 2); por último y de acuerdo a los resultados presentados en el capítulo 2, se determinó el efecto de diferentes sustancias de tipo flavonoides o análogas de origen natural, semisintético y sintético, en el comportamiento alimentario de larvas de gusano cogollero, en busca de una forma adicional de control (descrito en el capítulo 3)

Bibliografía

Andrade, G. Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista Academia Colombiana de Ciencias*. **2011**, 35, 491-503.

CORPOICA. 2003. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. El Gusano cogollero del maíz. [Consultado Agosto 2013]. http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127153058_El%20gusano%20cogollero%20del%20maiz.pdf.

FENALCE 2012. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas. Indicadores cerealistas 2012. [Consultado Agosto 2013]. http://www.fenalce.org/nueva/plantillas/arch_down_load/Indice_Cerealista_2012.pdf.

García, F., Mosquera, M., Vargas, C., Rojas, L. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), plaga del maíz y otros cultivos de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. **2002**, 28, 1, 53-60.

Hostettman, K., Marston, A. Twenty years of research in to medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Review*. **2002**, 1, 275-285.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2010. Anuario Estadístico del sector agropecuario y pesquero. [Consultado Septiembre de 2013]. <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/Anuario/anuarioEstadistico2010.pdf>.

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, Exportaciones Colombianas Julio de 2013. [Consultado septiembre 2013]. <http://www.mincit.gov.co/publicaciones.php?id=15815>.

Murray, I. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and Increasingly Regulated World. *Annual Review Entomology*. **2006**, 51, 45-66.

Pérez, R., Rodríguez, C., Lara, J., Montes, R., Ramírez, G. Toxicidad de aceites esenciales y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Acta Zoológica Mexicana*. **2004**, 20, 141-152.

Scott, I., Jensen, H., Philogene, B., Arnason, J. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) Phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Review*. **2008**, 7, 65-75.

1. Composición química y determinación de actividad insecticida de los aceites esenciales de *Piper subtomentosum* y *Piper septuplinervium* (Piperaceae).

1.1. Generalidades

Las investigaciones en productos naturales derivados de plantas en lo referente a las interacciones planta-insecto han demostrado que uno de los tipos de insecticidas botánicos más efectivos son los basados en aceites esenciales (AE) (Isman *et al.*, 2011). Como AE se define la mezcla de compuestos orgánicos resultante de una parte del metabolismo de una especie vegetal que generalmente son de origen terpénico, que están asociados o no a otros componentes, que tienen como característica ser volátiles y que generan el aroma de dicho vegetal (Bandoni, 2000). Existe un amplio número de especies de plantas con propiedades aromáticas; sin embargo algunas familias botánicas son ampliamente reconocidas como fuente de AE, entre ellas se cuentan las Piperaceas (Enan, 2001).

Los aceites esenciales se encuentran almacenados en la mayoría de los órganos vegetativos de las especies de “aromáticas tradicionales”, y aunque no es clara la razón por la que son biosintetizados, muchos autores coinciden en señalar que cumplen un papel ecológico, ya que diversos estudios han evidenciado la capacidad de los AE de ejercer efectos alelopáticos, sobre diferentes tipos de organismos, incluyendo muchos órdenes de insectos (Enan, 2001). Dichos efectos dependen del perfil de composición de cada aceite esencial, el tipo de compuestos de la mezcla y la proporción en la que se encuentran. A continuación se presentará una revisión de las propiedades insecticidas encontradas en los AE de diferentes plantas, considerando las especies de la familia Piperaceae y los productos comerciales elaborados a base de AE.

1.1.1 Insecticidas a partir de aceites esenciales de plantas

A lo largo de la historia los aceites esenciales han sido importantes en diversas actividades económicas ya que estos se han usado como agentes saborizantes de alimentos y bebidas, bases para la industria de la perfumería y más recientemente se han empleado como agentes para aromaterapia. Estas aplicaciones han generado una cadena productiva que mueve millones de dólares al año en todo el mundo (Isman *et al.*, 2011). Además de los beneficios mencionados anteriormente, ciertas especies aromáticas y sus AE han sido usadas desde tiempos antiquísimos en la protección de cultivos; los primeros reportes se remontan a la antigua china, en donde los cultivos y cosechas de arroz se protegían usando los aceites esenciales de los cítricos para evitar la infestación de plagas (Drijfhout y Morgan, 2010), por lo que no es sorprendente que se haya retomado el uso de AE de plantas como una opción para el control de insectos plaga, en busca de reemplazar los insecticidas de síntesis química que en la mayoría de los países son los más utilizados y cuyo uso indiscriminado produce daño en los suelos, alteraciones de cadenas tróficas y subsecuentes problemas de resistencia (CORPOICA., 2003).

Aparte de las ventajas comerciales que muchos AE tienen por ser materias primas en industrias mundialmente importantes (precios bajos y abundantes suministros), estas sustancias tienen propiedades que los hacen ser adecuados para el manejo de insectos plaga en cultivos y en productos almacenados:

- La mayoría de los aceites esenciales no son tóxicos para mamíferos (Isman *et al.*, 2011).
- Debido a la volatilidad de sus componentes, los AE no persisten en el medio ambiente teniendo vidas medias inferiores a 24 horas en suelo y agua, de tal forma que se reduce en gran medida la posibilidad de producir efectos negativos sobre fauna benéfica, como los organismos encargados de la polinización (Regnault-Roger *et al.*, 2003).
- Diversos estudios han demostrado que los AE parecen tener múltiples mecanismos y sitios de acción principalmente comprometiendo el sistema nervioso de los insectos, afectando los sistemas colinérgico, octopaminérgico y GABAérgico, lo que disminuye la posibilidad de que se generen variedades de

insectos resistentes (Rattan, 2010; López y Pascual-Villalobos, 2010; Ah Seo *et al.*, 2008; Enan, 2001; Coats, 1994; Isman, 2006).

- Dependiendo de la composición química, los aceites esenciales pueden actuar como repelentes, sustancias tóxicas, anti alimentarios, inhibidores de oviposición, inhibidores de crecimiento y atrayentes, entre otros (Regnault-Roger C, 1997). Existen múltiples estudios que evidencian la relevancia de las investigaciones de las propiedades insecticidas de los aceites esenciales ya que estos han demostrado que en muchos casos los AE presentan efectos importantes contra diferentes órdenes de insectos plaga, lo que hace a dichas sustancias candidatas a ser futuros insecticidas botánicos de amplio espectro. (Lamiri *et al.*, 2001; Zapata y Smagghe, 2010; Kéïta *et al.*, 2000; Aslan *et al.*, 2004; Pavela, 2005; Kim *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2013; Bakkali *et al.*, 2008; Zoubiri y Baaliouamer, 2011; Koschier, 2006; Isman y Machial, 2006; Enan, 2001; Nerio *et al.*, 2009)

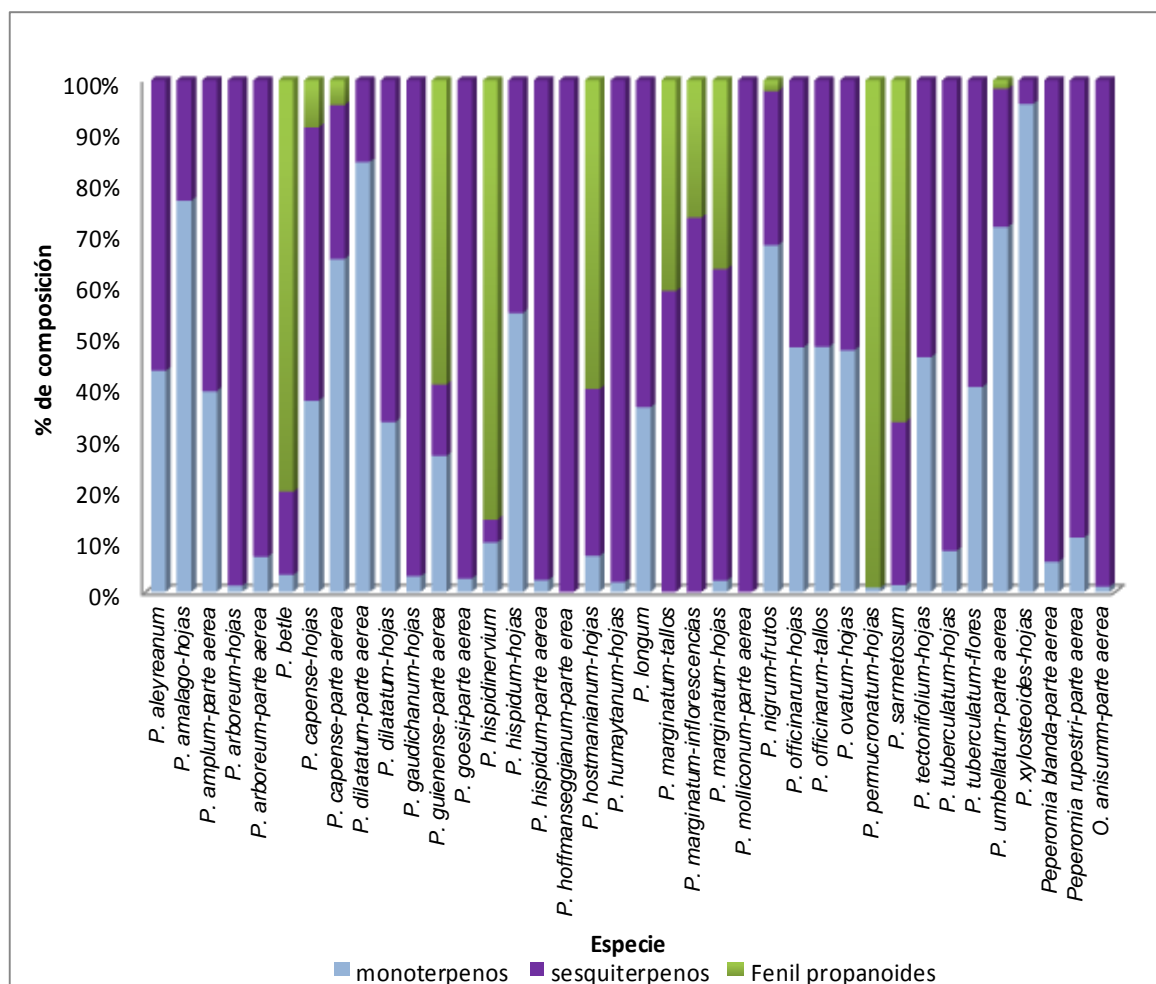
1.1.2 Aceites esenciales obtenidos de especies de la familia Piperaceae.

Su antiguo origen, amplia distribución y adaptabilidad han hecho que las especies de la familia Piperaceae sean reconocidas como uno de los grupos de plantas tropicales más utilizado tradicionalmente por diversas comunidades como insecticidas, fitomedicamentos y fuente de especias (Regnault-Roger *et al.*, 2003). Sus importantes y recurrentes usos motivaron el interés de los investigadores en productos naturales, por lo que han sido objeto de múltiples investigaciones fitoquímicas para determinar los principios responsables de las acciones observadas por años. La mayoría de los reportes de usos tradicionales que se tienen corresponden a especies vegetales del género *Piper*, el cual es el que cuenta con un número considerable de especies y posee amplia distribución (Parmar *et al.*, 1997); de las aproximadamente 2000 especies de Piperaceas que se conocen, alrededor de 700 pertenecen al género *Piper*, y como es de esperarse la mayoría de las investigaciones que involucran a la familia Piperaceae se centran en dicho género.

Parmar y colaboradores realizaron una completa revisión de la fitoquímica de las especies del género *Piper* (Parmar *et al.*, 1997), en la que se contemplan los estudios

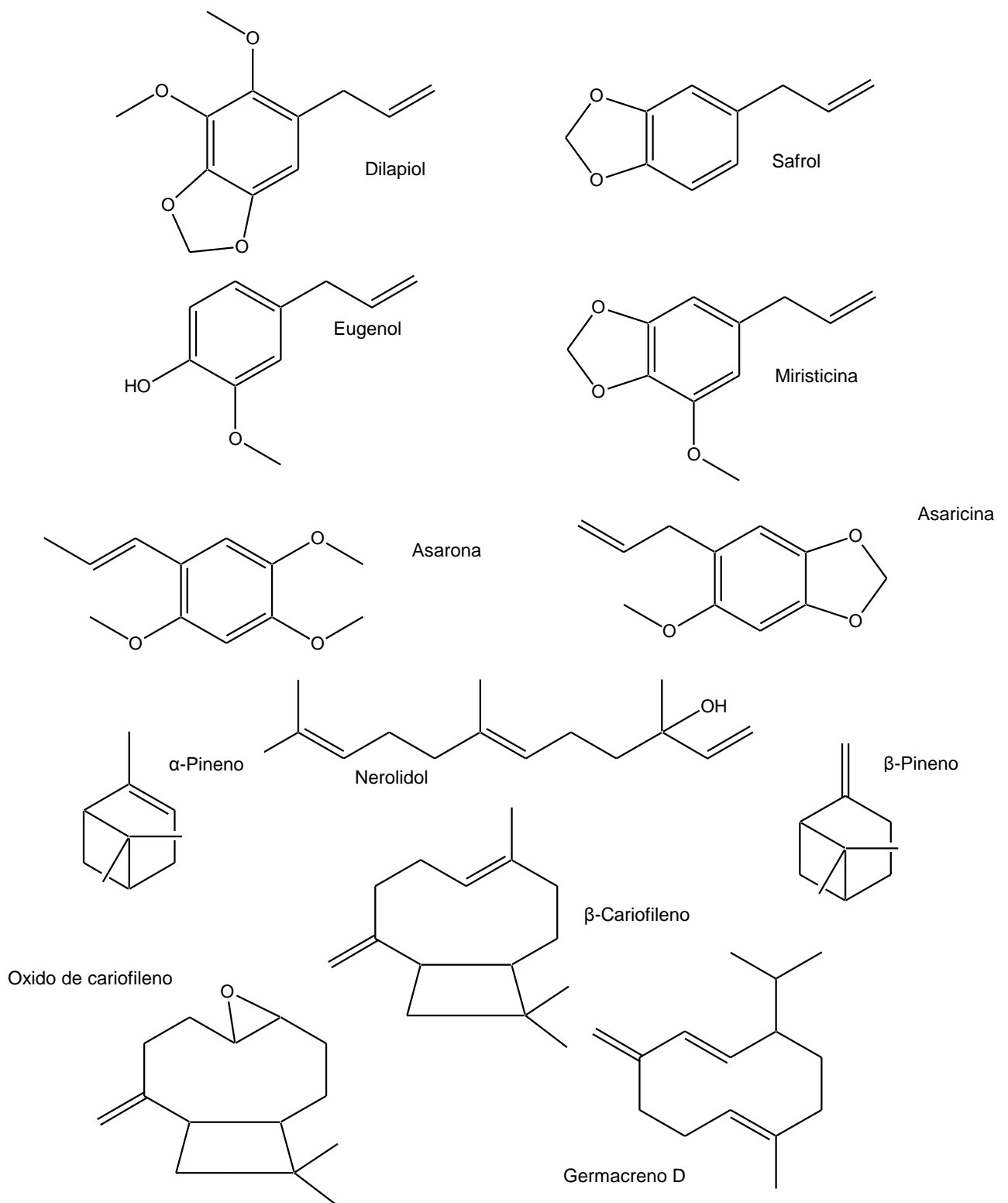
llevados a cabo desde 1901 hasta 1996, los metabolitos volátiles hacen parte de esta revisión, debido a su presencia, diversidad estructural y actividad biológica. En los últimos años se siguen estudiando con bastante frecuencia los aceites esenciales de la familia Piperaceae; la mayoría de los reportes se encuentran en países tropicales como Brasil e India (Martins *et al.*, 1998; Keita *et al.*, 2000; Dias dos Santos *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Potzernheim *et al.*, 2006; De Morais *et al.*, 2007; Autran *et al.*, 2009; Péres, *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2010; Matasyoh *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012; Sauter *et al.*, 2012; Chaubey, 2013). En la Figura 1-1 se presenta el perfil de composición de los aceites esenciales por tipo de sustancias de diferentes especies de Piperaceas estudiadas durante los últimos 14 años, las cuales poseen aceites esenciales formados en su mayoría por mezclas de compuestos de tipo terpénico que son muy complejas (mezclas de más de 30 sustancias), en algunos casos se observa la presencia de fenil propanoides; es importante anotar que cuando los fenil propanoides son los componentes mayoritarios del aceite, la complejidad de la mezcla se reduce y el porcentaje de composición relativa del componente mayoritario es cercano o superior al 50 %; ejemplo de esto son los aceites de las especies *Piper guinense* (Martins *et al.*, 1998), *Piper permucronatum*, *Piper hostmanianum* (De Morais *et al.*, 2007), *Piper hispidinervum* (Sauter *et al.*, 2012), *Piper betle* (Prakash *et al.*, 2010), *Piper sarmentosum* (Qin *et al.*, 2010), y *Piper marginatum* (Autran *et al.*, 2009); cuyos componentes mayoritarios son dilapiol (44,8%) (54,7%), asaricina (27,4), safrol (85%), eugenol (63,4%), miristicina (65,2%), y asarona (33%) respectivamente. En cuanto a los metabolitos de tipo terpénico se destaca la repetitiva presencia de monoterpenos como α y β pineno, y sesquiterpenos como nerolidol, germacreno D, óxido de cariofileno y β -cariofileno.

Figura 1-1 Tipo de compuestos presentes en los aceites esenciales de algunas especies de Piperaceas, realizados en los últimos 14 años (Martins *et al.*, 1998; Keïta *et al.*, 2000; Dias dos Santos *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Potzernheim *et al.*, 2006; De Morais *et al.*, 2007; Autran *et al.*, 2009; Péres, *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2010; Matasyoh *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012; Sauter *et al.*, 2012; Chaubey, 2013).



La mayoría de los estudios consultados al igual que los referenciados en la revisión de Parmar y colaboradores muestran el potencial de los aceites esenciales de la familia Piperaceae para el control de problemas fitosanitarios causados por hongos, bacterias y plagas de insectos de diferentes órdenes. En la Figura 1-2 se presentan las estructuras químicas de los metabolitos volátiles mencionados anteriormente, importantes en Piperaceas por su presencia y abundancia.

Figura 1-2. Metabolitos volátiles presentes en aceites esenciales de especies de Piperaceas



1.1.3 Insecticidas comerciales a base de aceites esenciales.

Las consecuencias de utilizar los sistemas de producción tradicional, los cuales se han caracterizado por deteriorar el medio ambiente debido a la utilización indiscriminada de pesticidas de síntesis química, ha promovido el desarrollo de nuevas prácticas agrícolas que involucran la rotación de cultivos y el uso de insecticidas de origen vegetal (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, 2011). En ese sentido la compañía americana Eco SMART Technologies es pionera en la fabricación y comercialización de productos pesticidas a base de aceites esenciales; sus productos se distribuyen y comercializan en USA con bastante éxito. La serie de pesticidas que comercializa están hechos a base de aceites esenciales de especies de aromáticas tradicionales algunas veces solos o en mezclas (Dayan *et al.*, 2009; Isman *et al.*, 2011). Las materias primas más utilizadas son:

- Aceite esencial de hojas de clavo (*Syzygium aromaticum*) (componente mayoritario: eugenol).
- Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) (componente mayoritario: 1,8-cineol)
- Aceite esencial de menta (*Menta piperita*) (componente mayoritario: mentol)
- Aceite esencial de hojas de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) (componente mayoritario: cinamaldehído)
- Aceite esencial de limoncillo (*Cymbopogon nordis*) (componente mayoritario: D-limoneno)

A pesar de que los aceites esenciales de especies pertenecientes a la familia Piperaceae y en particular al género *Piper* han sido objeto de múltiples estudios químicos y biológicos, aún existen especies, como las seleccionadas para desarrollar esta investigación, que poseen escasos o carecen de estudios, y que teniendo en cuenta los resultados encontrados por diferentes grupos de investigación con especies del mismo género y familia, se convierten en un interesante blanco de estudio para emprender investigaciones encaminadas a la búsqueda de aceites esenciales con potencial como agentes fitosanitarios. En este capítulo se presentarán los resultados correspondientes a

la composición química de los aceites esenciales de las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum*, junto con la determinación de la actividad insecticida de estos *in vitro* contra *Spodoptera frugiperda*.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1. Análisis Químico de los aceites esenciales

- **Material Vegetal**

El material vegetal corresponde a las hojas e inflorescencias del árbol *Piper subtomentosum* Trel & Yunck y la parte aérea de la enredadera *Piper septuplinervium* (Miq) C.DC. Las especies fueron colectadas en la vereda San José bajo, del municipio de Granada en Cundinamarca (2410 msnm), por integrantes del grupo de investigación Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceas y Miristicáceas Colombianas, en agosto de 2010; las muestras fueron determinadas por el biólogo Adolfo Jara Muñoz del Herbario Nacional Colombiano, en donde reposa un espécimen de cada muestra con los números de colección COL-517695 (*Piper septuplinervium*) y COL-516758 (*Piper subtomentosum*).

- **Extracción de aceites esenciales**

Los aceites esenciales de la parte aérea de *P. septuplinervium* (tallos, hojas e inflorescencias) y las hojas de *P. subtomentosum* fueron obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor a partir de 980 g y 820 g de material vegetal respectivamente; mientras que el aceite de inflorescencias de *P. subtomentosum* se obtuvo por hidrodestilación a partir de 550 g de material vegetal. Los aceites fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y mantenidos en nevera a una temperatura aproximada de 4 °C. Las muestras de aceites esenciales para el análisis por CG-EM se prepararon disolviendo 20 µL de AE en *n*-hexano hasta a un volumen final de 1 mL. (Cuca *et al.*, 2010)

- **Análisis por CG-EM**

El análisis de los aceites esenciales se llevó a cabo por CG-EM empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 7890A GC System equipado con un detector selectivo de masas, el cual fue operado a 70 eV en modo full scan y los espectros de masas

fueron adquiridos entre 35 y 450 uma. Se emplearon dos columnas cromatográficas: una de baja polaridad (RTX-5MS 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) cuya fase estacionaria está compuesta por 5% de difenilo y 95% de polidimetilsiloxano, y una de alta polaridad (CARBOWAX 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) cuya fase estacionaria está compuesta por poli etilenglicol; empleando helio (99,99% de pureza) como gas de arrastre con un flujo constante de 1 mL/min. La inyección se hizo en modo split 20:1.

En el análisis por CG-EM con la columna RTX-5, la temperatura del horno se programó así: desde 50 °C (2 min) hasta 160 °C (5 min) a 4 °C/min, se aumenta hasta 220 °C (5 min) a 2,5 °C/min y finalmente se elevó a 280 °C (5 min) a 8 °C/min. En el análisis por CG-EM con la columna CARBOWAX la temperatura del horno se programó como sigue: desde 40 °C (5 min) a 4 °C/min hasta 250 °C (10 min). Para cada análisis se inyectó 1 µL de la disolución de AE.

- **Determinación de composición de aceites esenciales**

La determinación de los constituyentes químicos se realizó con base en la comparación de los índices de retención calculados y los espectros de masas obtenidos con los reportados por las bases de datos Pherobase, 2011; Nist 11, 2011; y los reportados por Adams, 2001; Joulain y Koning, 1998. Los índices de retención (I_R) se calcularon teniendo como referencia una serie homologa de patrones de hidrocarburos normales desde C10 hasta C24, eluidos en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones analíticas que los AE objeto de estudio.

1.2.2 Determinación de actividad insecticida de aceites esenciales.

- **Cría de insectos**

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron colectadas en el municipio del Espinal (Tolima-Colombia) (323 msnm), en cultivos de maíz y sorgo sin aplicación previa de insecticidas. El mismo día de la colecta, las larvas fueron llevadas al cuarto de cría del laboratorio de biopesticidas-entomología del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. Las larvas fueron puestas en cuarentena por ocho días en dieta artificial. El pie de cría es mantenido en dieta artificial, bajo condiciones controladas a 28 ± 2 °C y $65 \pm 5\%$ de humedad relativa y con un

fotoperiodo de 12 horas luz -12 horas oscuridad. (Ceron y Bravo, 2004). Para la realización de los ensayos se utilizaron larvas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae).

▪ **Ensayo de determinación de toxicidad fumigante**

Para determinar la toxicidad volátil se emplearon dosis de AE de 500 $\mu\text{L/L}$ de aire a 3,00 μL de aire y de monoterpenos (patrones certificados Alfa Aesar[®] y Sigma[®]) de 20,0 mg/L de aire - 0,500 mg/L de aire. Las cantidades de AE y de monoterpenos puros fueron aplicadas en discos de papel de filtro Wathman 1 de 2 cm de diámetro, los cuales fueron colocados en la boca de un vial de vidrio de 1,5 mL de capacidad; el cual a su vez fue colocado dentro de un vial de mayor tamaño (Pascual Villalobos M.J. *et al*, 2004). En el vial de mayor tamaño se colocaron 10 larvas de segundo instar de *S. frugiperda* con un cubo de dieta artificial para evitar el canibalismo. Como control negativo se realizó un blanco. El ensayo se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (28 ± 2 °C) y humedad relativa ($65 \pm 5\%$). Cada muestra se ensayó por triplicado, y la mortalidad de los insectos fue determinada después de 24 horas de exposición, los insectos se consideraron muertos después de no ver movimiento durante estímulo por 15 segundos con pincel en estereoscopio. Los valores de concentración letal 50 fueron calculados por medio del programa Probit (Finney, 1971).

▪ **Ensayo de determinación de toxicidad por contacto**

La toxicidad por contacto de los aceites esenciales y los monoterpenos (patrones certificados Alfa Aesar[®] y Sigma[®]) sobre larvas de segundo instar de *S. frugiperda* se determinó aplicando tópicamente sobre el dorso de la larva de 0,1, 0,15, y 0,2 μL de AE y de monoterpeno. Como control se emplearon insectos sin tratar, las larvas tratadas y las larvas control fueron colocadas en vasos plásticos de una onza con dieta artificial (10 larvas/ vaso); todos los tratamientos fueron realizados por triplicado en condiciones de temperatura (28 ± 2 °C) y humedad relativa controladas ($65 \pm 5\%$). La mortalidad de los insectos se determinó a las 24 horas (Pavela R, 2005). La mortalidad se calculó con la fórmula de corrección de Abbott (Pitasawat B *et al*, 2007).

- **Ensayo de determinación de efecto repelente**

Para evaluar el efecto repelente de los aceites esenciales sobre *S. frugiperda* se empleó un bioensayo de elección, de acuerdo al procedimiento reportado por Nerio y colaboradores en el 2009 (Nerio L.S *et al*, 2009), para insectos del género *Sitophilus*, ya que *S. frugiperda* en su etapa larval presenta comportamiento caníbal, se realizó una modificación al ensayo; se adicionó una porción de dieta artificial. A discos de papel filtro de 9 cm de diámetro partidos en mitades fueron aplicados 500 μL de soluciones en acetona de los AE en concentraciones equivalentes a $0.063 \mu\text{L}/\text{cm}^2 - 0,0252 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, el solvente se deja evaporar por tres minutos, la mitad de la parte inferior de una caja de petri se cubrió con el papel filtro tratado, mientras que la otra mitad se cubrió con medio papel de filtro impregnado con acetona que se dejó secar por 3 minutos. En cada una de las mitades se colocó un trozo de dieta artificial y posteriormente se colocaron 10 larvas de segundo instar de *S. frugiperda* en el centro de la caja de petri, la cual se cerró y selló con parafilm. El número de insectos presentes en las dos mitades de los discos de papel se registró después de 2 horas de exposición. Se realizaron cinco réplicas para cada concentración evaluada. El ensayo se realizó en condiciones controladas de temperatura ($28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($65 \pm 5\%$), el porcentaje de repelencia se calculó por medio de la siguiente relación matemática: $\%R = [(C-T)/(C+T)] \times 100$, donde C= número de insectos en el papel no tratado y T= número de insectos en el papel tratado. Como control positivo se empleó el repelente comercial Stay off ®, cuyo principio activo es 3-N-acetil-N-butilamino-propionato de etilo 15% (IR3535).

- **Ensayo de determinación de efecto de los aceites esenciales en el ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*.**

Larvas de segundo instar de *S. frugiperda* se sometieron al ensayo de determinación de toxicidad volátil, en el cual fueron expuestas a los aceites de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* en dosis correspondientes a CL_{50} y CL_{25} determinadas por el análisis Probit para cada aceite esencial. Después de 24 horas de iniciado el ensayo, las larvas sobrevivientes en cada tratamiento fueron colocadas en vasos plásticos de una onza provistos con dieta artificial. Posteriormente se dejó a las larvas alimentarse por 72 horas, y luego cada 48 horas se retiraron aleatoriamente tres vasos por tratamiento para medir el largo de las larvas. Una vez que el control alcanzó el 80% de pupación, se registraron cada 48 horas los vasos restantes en cada tratamiento

para determinar el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupa, el porcentaje de pupas que alcanzaron el estado de adulto y el lapso de tiempo entre los estadios de larva a pupa y de pupa a adulto (Silva G, 2010). Posteriormente en los tratamientos donde fue posible se realizaron parejas de individuos tratados con individuos control para evidenciar los efectos sobre la oviposición de las hembras.

- **Análisis estadístico**

La lectura del registro de la longitud de larva fue realizada por triplicado, los valores promedio fueron calculados y se presentan como la media \pm DS. El coeficiente de correlación de Pearson fue calculado por medio de Excel 2007.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1. Composición química de los aceites esenciales

En la Tabla 1-1 se relacionan los rendimientos y las constantes físicas de los aceites obtenidos. En los tres casos los rendimientos son similares y cercanos al 0,20%; el valor del rendimiento permite concluir que aunque algunos autores indican que la familia Piperaceae hace parte del grupo de familias de plantas llamadas tradicionalmente como aromáticas (Enan, 2001), las especies objeto de estudio no poseen un alto contenido de aceite esencial.

Tabla 1-1. Rendimiento y constantes físicas de los AE objeto de estudio

AE		%Rendimiento	Densidad (20 °C) g/ mL*	Índice de refracción (20 °C)
Especie	Órgano vegetativo			
<i>P. subtomentosum</i>	Hojas	0,19	0,867 \pm 0,0161	1,4370
	Inflorescencias	0,19	0,865 \pm 0,00289	1,4825
<i>P.septuplinervium</i>	parte aérea	0.21	0,843 \pm 0,00577	1,4564

*Media de tres réplicas \pm DS

El análisis químico de los tres AE, se realizó usando como técnica CG-EM con dos columnas de diferente polaridad (RTX-5MS y CARBOWAX). La determinación de la identidad de los componentes de los AE se realizó teniendo en cuenta criterios cromatográficos y espectrométricos (comparación de los índices de retención en las dos columnas, los espectros de masas, abundancias de pico con los reportados en la

literatura especializada y en diferentes bases de datos) (Adams R, 2001; Joulain, D y Koning, W, 1998; Nist 11, 2011; Pherobase, 2011). En las condiciones de análisis se determinó la presencia de 63 compuestos que representan el 92,8%, 88,0%, y 94,6% de la composición relativa de los aceites de hojas e inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium*, respectivamente. En la Tabla 1-2 se presenta la composición relativa de los AE según su orden de elusión en la columna RTX-5MS, los índices de retención y las cantidades con base en el porcentaje de las áreas de pico obtenidas en el análisis en la columna RTX-5 relativas de cada componente en la mezcla de volátiles.

Tabla 1-2. Composición relativa de los AE objeto de estudio

Nº	Compuesto	I _R		AE Cantidad relativa (%)		
		RTX-5	CARBOWAX	Inflorescencias <i>P. subtomentosum</i>	Hojas <i>P. subtomentosum</i>	Parte aérea <i>P. septuplinervium</i>
1	α-Tuyeno	931		-	-	1,03
2	α-Pineno	939		27,3	0,33	21,0
3	Canfeno	953		0,68	-	0,75
4	Sabineno	976		-	-	5,62
5	β-Pineno	980	1107	15,0	0,24	13,8
6	β-Mirceno	991	1163	0,16	-	1,57
7	α-Felandreno	1005	1190	-	0,33	13,0
8	α-Terpineno	1018		-	-	0,22
9	Ocimeno	1025		-	-	0,33
10	β-Felandreno	1031	1170	-	-	1,51
11	Limoneno	1033	1190	1,00	0,07	3,84
12	p-Cimeno	1050	1250	-	-	0,29
13	γ-Terpineno	1064		-	-	0,38
14	Oxido de <i>trans</i> -Linalool	1088	1460	2,48	-	-
15	α-Terpinoleno	1088	1290	-	-	1,03
16	Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	1097		-	-	0,51
17	2-metil-acetofenona	1139		0,24	-	-
18	Citronelal	1156	1439	-	-	10,3
19	α-Terpineol	1185		0,93	-	0,09
20	Mirtenal	1196		0,19	-	-

Continuación Tabla 1-2						
No	Compuesto	I _R		AE Cantidad relativa (%)		
		RTX-5	CARBOWA X	Inflorescencias <i>P.subtomentosum</i>	Hojas <i>P.</i> <i>subtomentosum</i>	Parte aérea <i>P.</i> <i>septuplinervium</i>
21	Verbenona-2-pinen-4-ona	1214		0,18	-	-
22	Citronelol	1233		-	-	0,11
23	Citral	1249		-	-	0,26
24	Citronelato de metilo	1263		-	-	0,20
25	Acetato de bornilo	1285		-	-	0,15
26	Geraniato de metilo	1328		-	-	0,20
27	δ-Elemento	1340	1443	-	-	0,71
28	Acetato de citronelilo	1354			-	0,33
29	Isoledeno	1365		-	0,22	-
30	Ciclosativeno	1378		0,72	-	-
31	10-Italiceno	1384		5,30	-	-
32	β-Cubebeno	1390		-	0,64	-
33	β-Elemento	1391	1578	0,53	2,87	-
34	Isodauca-6,9-dieno	1393	1491	-	-	1,51
35	α-Copaeno	1394	1480	-	2,00	-
36	α-Cubeben	1396	1462	0,60	-	-
37	β-Bourboneno	1406		0,27	1,20	-
38	Longifoleno	1411	1560	-	-	2,06
39	β-Gurjuneno	1432		-	-	0,07
49	β-Cariofileno	1444	1629	7,42	14,6	-
41	4-H-10-H-guaia-1(5),6-dieno	1445	1677	1,39	-	-
42	α-Himachaleno	1450		-	-	7,24
43	ε-Muroleno	1455		-	4,30	-
44	7-H-10-H-cadina1(6),4dieno	1460		-	0,21	-
45	γ-Gurjuneno	1472		-	0,36	-
46	β-Neocloveno	1475		-	0,30	-
47	α-Cariofileno	1477	1676	5,56	-	-
48	(Z,E)-α-Farneseno	1480	1720	-	7,46	-
49	Biciclosesquifelandreno	1487		0,59	-	-
50	γ-Amorfenoleno	1499		-	0,78	-

Otinuación Tabla 1-2						
No	Compuesto	I _R		AE Cantidad Relativa (%)		
		RTX-5	CARBOWAX	Inflorescencias <i>P. subtomentosum</i>	Hojas <i>P. subtomentosum</i>	Hojas <i>P. subtomentosum</i>
51	γ-Cadineno	1507	1777	-	2,11	2,69
52	β-Selineno	1509		0,20	-	-
53	β-Bisaboleno	1509	1749	1,39	-	-
54	Germacrenol	1511		0,17	-	-
55	α-Muuroleno	1517	1730	1,06	-	-
56	δ-Cadineno	1520	1794	0,72	45,2	-
57	<i>E</i> -γ-Bisaboleno	1521		-	0,59	-
58	β-Cadineno	1526	1806	-	6,53	1,13
59	Calameneno	1530		0,18	-	-
60	ω-Amorfeneno	1545		-	1,69	-
61	δ-Cupreneno	1546		-	-	0,65
62	Germacreno B	1550		-	-	0,64
63	Oxido de Cariofileno	1606	2040	12,5	-	-
Monoterpenos				47,9	0,97	76,9
Sesquiterpenos				38,6	91,1	17,0
Otros compuestos				0,24	-	-
Componentes Determinados				86,7	92,1	93,9.

Como se observa en la Tabla 1-2 los aceites esenciales de inflorescencias y hojas de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium*, son de carácter terpénico, en todos los casos existe una compleja mezcla de hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos, monoterpenoides y sesquiterpenoides. Por medio de los criterios cromatográficos y espectrométricos empleados fue posible determinar más del 85% de la composición relativa de los AE; los componentes volátiles de las inflorescencias del árbol *P. subtomentosum* y parte aérea de la enredadera *P. septuplinervium* poseen un perfil de composición similar ya que en ambos casos están conformados en su mayoría por monoterpenos, siendo el aceite de la enredadera el que posee el más alto contenido de dichos metabolitos (76,9%). Tanto en el AE de las inflorescencias como en el de la parte aérea, el α-pineno (27,3% y 21,0% respectivamente) y β-pineno (15,0% y 13,8%); son los componentes mayoritarios. Además de los pinenos, en los AE de las inflorescencias de *P. subtomentosum* y de parte aérea de *P. septuplinervium* están presentes las siguientes

sustancias en cantidades representativas: óxido de cariofileno, β -cariofileno, α -cariofileno, α -felandreno, y citronelal.

El aceite de hojas del árbol *P. subtomentosum*, tiene un perfil diferente a los demás AE objeto de estudio, teniendo en cuenta que está compuesto casi en su totalidad por sesquiterpenos y sesquiterpenoides (91,1%), el δ -cadineno es el componente mayoritario (45,3%), los sesquiterpenos β -cariofileno (14,6%), (*Z,E*)- α -farneseno (7,43%), β -cadineno (6,53%), están presentes también en este aceite en cantidades representativas.

Los compuestos volátiles determinados en los aceites esenciales analizados ya habían sido previamente reportados para otras especies del género *Piper* (Parmar *et al.*, 1997). Al igual que en los aceites de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* los monoterpenos α y β -pineno hacen parte de los AE de otras especies del género *Piper* como *P. capense*, *P. amplum*, *P. amálago*, *P. hispidum*, *P. tectonifolium* (Martins *et al.*, 1998; Días dos Santos *et al.*, 2001; Potzernherm *et al.*, 2006) lo que indica que los resultados del presente estudio están de acuerdo con la quimiotaxonomía del género. La presencia del sesquiterpeno δ -cadineno como componente mayoritario de AE se había reportado en la especie *Piper capense* (Matasyoh *et al.*, 2011). Este trabajo constituye el primer reporte de composición química de volátiles para las dos especies vegetales objeto de estudio. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo es determinar si los metabolitos volátiles de las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum* tienen alguna responsabilidad en la actividad insecticida mostrada por dichas especies contra el gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*), se realizaron diferentes bioensayos para poder determinar la existencia de la actividad junto al efecto generado en el insecto plaga. A continuación se presentarán los resultados obtenidos en los diferentes procedimientos realizados.

1.3.2. Determinación de actividad insecticida de los aceites esenciales

▪ Determinación de toxicidad fumigante de los aceites esenciales

Dependiendo de su estructura y de sus propiedades químicas y físicas, una sustancia puede producir diferentes efectos en los organismos que estén en contacto con ella. Debido a la volatilidad característica de los AE muchos autores han demostrado la

toxicidad fumigante de dichas sustancias en insectos de diferentes órdenes siendo más estudiados los efectos en Coleópteros, Dípteros, Hemípteros, y Lepidópteros. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se decidió evaluar la toxicidad fumigante de los aceites esenciales de inflorescencias y hojas de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* por el método de vial en vial reportado por Pascual-Villalobos en 2004, haciendo una adaptación al procedimiento debido a que el ensayo se diseñó para insectos del orden Coleoptera; el insecto plaga objeto de estudio en nuestro caso es un Lepidóptero, el cual se utilizó en estado de larva, estado en el que posee hábito caníbal, para evitar este comportamiento en el ensayo se adiciona dieta artificial. *S. frugiperda* causa daños a los cultivos que ataca en estado de larva, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros instar de dicha etapa (CORPOICA, 2003).

La concentración más alta evaluada en todos los casos fue 500 $\mu\text{L/L}$ de aire, en la cual los tres aceites produjeron la mortalidad del total de las larvas (100%), de acuerdo a este comportamiento se fueron disminuyendo las concentraciones de AE para poder determinar la concentración a la cual los aceites esenciales producen la mortalidad del 50% de la población de larvas utilizadas, el control utilizado fue un tratamiento blanco en el cual no se observó mortalidad. En la Figura 1-3 se muestran las mortalidades producidas por los aceites a las diferentes concentraciones ensayadas, cada punto corresponde a la media de los triplicados realizados en cada caso. La Figura 1-3 muestra las Figuras 1-3a, 1-3b, y 1-3c, las cuales relacionan el porcentaje de mortalidad de las larvas de segundo instar de *S. frugiperda* en función de las concentraciones de aceite ensayadas, los resultados obtenidos permiten observar que en todos los casos a la concentración máxima ensayada (500 $\mu\text{L/L}$ de aire) se obtienen mortalidades del 100%, sin embargo a medida que disminuye la concentración, se observan efectos diferentes. En el caso del aceite de hojas de *P. subtomentosum* (Figura. 1-3b), a medida que las concentraciones disminuyen la mortalidad también disminuye; comportamiento totalmente contrario al observado con los aceites de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* (Figura. 1-3a y 1-3c) con los cuales se mantienen las altas mortalidades (100%) en el rango de 50 $\mu\text{L/L}$ de aceite- 500 $\mu\text{L/L}$ de aceite. Observando los efectos producidos por los aceites y comparándolos con la composición de los mismos, se puede concluir que el alto contenido de monoterpenos es el responsable de la actividad fumigante observada en los AE, ya que los aceites que

poseen esta característica son los que producen las más altas mortalidades a menores concentraciones, mientras que el AE que está compuesto casi en su totalidad por sesquiterpenos no produce una mortalidad apreciable. Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura (Zapata y Smaghe, 2010; Kim *et al.*, 2003; Isman, 2006; Regnault-Roger *et al.*, 2003) ya que muchos autores atribuyen la actividad insecticida de aceites esenciales a los monoterpenos lo cual está ampliamente documentado principalmente para plagas de cereales almacenados

Figura 1-3. Mortalidades causadas por los aceites esenciales de inflorescencias y hojas de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* sobre larvas de segundo instar de *S. frugiperda*

Figura 1-3a

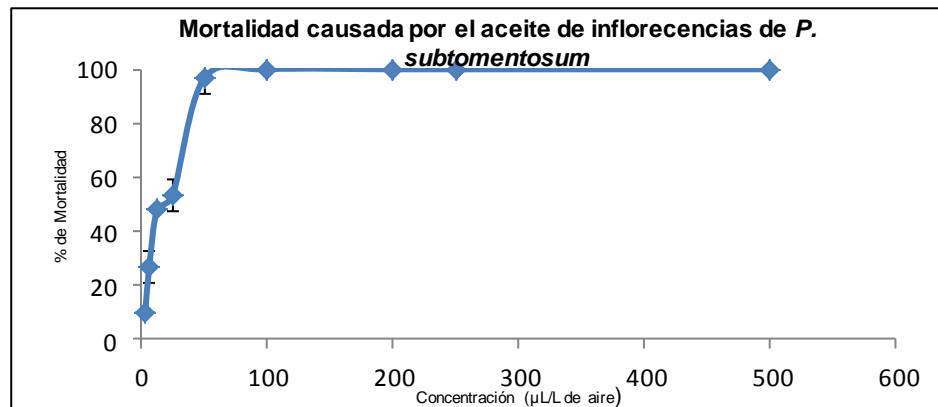


Figura 1-3b.

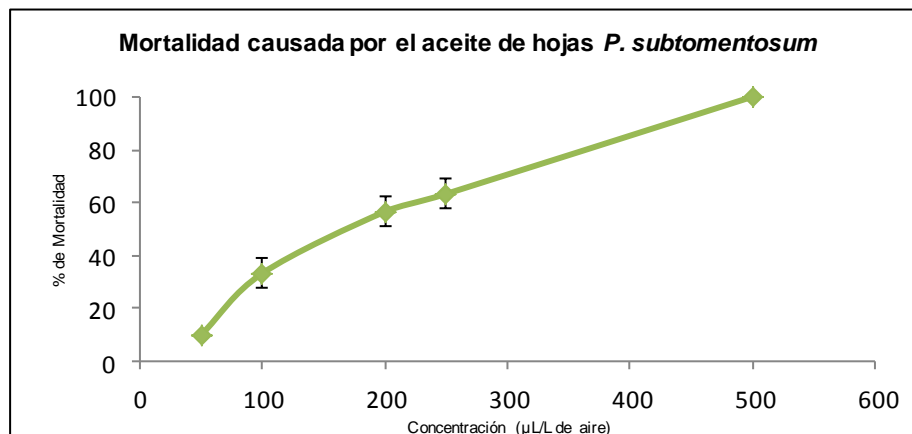
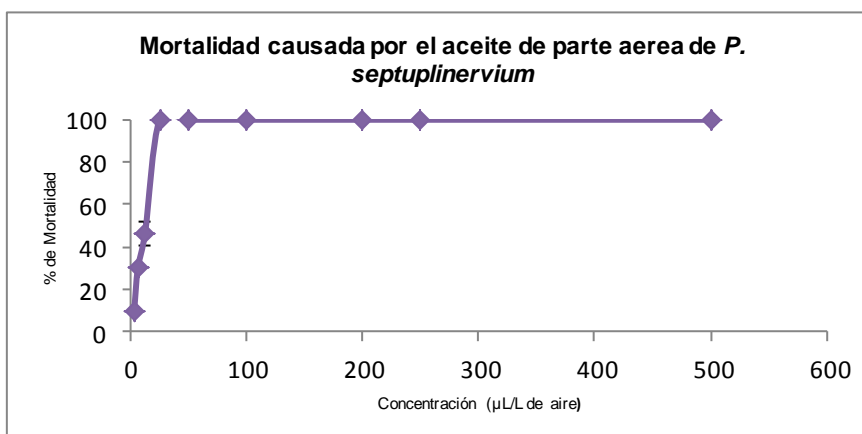


Figura 1-3c



En el Anexo 1-1 se presentan las mortalidades producidas por los aceites esenciales estudiados, y en la Tabla 1-3 se muestran los valores de CL_{50} para cada AE calculados con el programa Probit.

Tabla 1-3 CL_{50} obtenidas para los tres aceites esenciales ensayados.

Aceite esencial	CL_{50} (μL/L de aire)	CL_{50} (mg/L de aire) ^{*b}
Inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	13,2 ^{*a} (10,3-16,6)	11,4
Hojas de <i>P. subtomentosum</i>	146 ^{*a} (116,4-180,3)	127
Parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	9,41 ^{*a} (7,72-11,4)	7,93

^{*a} intervalo de confianza del 95%

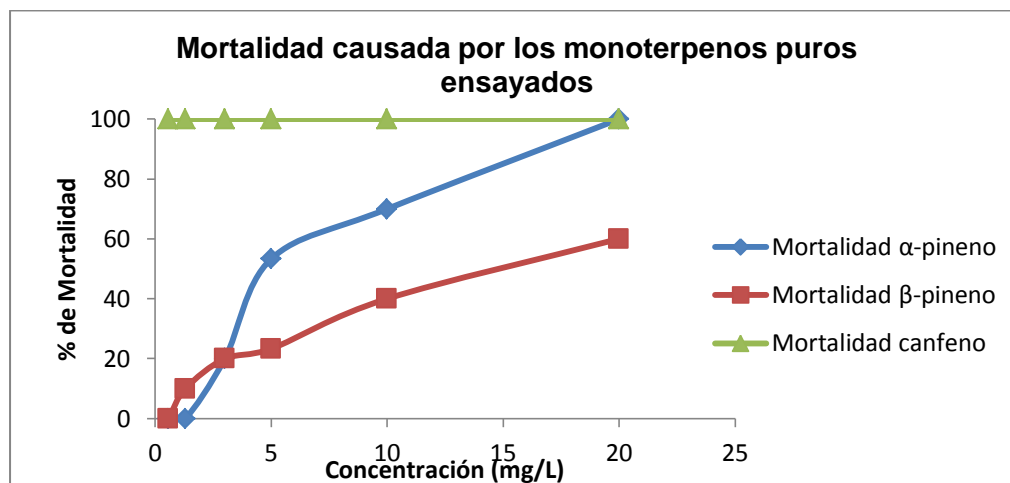
^{*b} valores calculados a partir de la densidad de cada aceite presentada en la Tabla 1-1

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de determinación de toxicidad fumigante, se decidió hacer una aproximación estadística para encontrar los posibles monoterpenos responsables de la actividad insecticida mostrada por los aceites esenciales, para tal fin se relaciona el contenido relativo de cada monoterpeno y monoterpenoide presente en los dos AE que presentaron mejor respuesta con la CL_{50} , mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson; esta herramienta estadística permite determinar qué tan relacionadas están dos variables observando el valor numérico del coeficiente de correlación (Miller and Miller, 2000). Entre más cercano a la unidad sea el valor del coeficiente de correlación, más relacionadas están las

variables. En el Anexo 1-2 se presentan los resultados de los coeficientes de correlación calculados con el valor de la media de la cantidad relativa de cada monoterpeno obtenida a partir de tres réplicas analíticas y relacionándolos con el valor de las CL_{50} calculada para cada AE. La significancia estadística de los coeficientes de correlación se determinó con la prueba t para un intervalo de confianza del 95% (Azzimonti R, 2003).

Los valores de los coeficientes calculados muestran que los monoterpenos más relacionados con los valores de la CL_{50} son en su orden: canfeno ($r = -0.999$), β -pineno ($r = -0.987$), α -pineno ($r = -0.947$) y limoneno ($r = -0.751$); el monoterpeno limoneno ya es reconocido como uno de los componentes activos de aceites esenciales para combatir insectos plaga de cuerpo blando como las larvas de Lepidópteros, orden de insectos al que pertenece *S. frugiperda* (Isman, 2006). Para el α -pineno y β -pineno se reporta la acción larvicida de la mezcla de los dos monoterpenos contra *Aedes aegypti*; y la acción antialimentaria causada por el β -pineno sobre los áfidos *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* (Yamane H et al, 2010) plagas de cultivos de frutas y cereales respectivamente. Teniendo en cuenta los valores de los coeficientes de correlación obtenidos se decidió evaluar la toxicidad de los monoterpenos canfeno, α -pineno, y β -pineno (patrones certificados Alfa Aesar® y Sigma®) por el método de vial en vial, disminuyendo la magnitud de las concentraciones probadas por tratarse de sustancias puras. La Figura 1-4 muestra las gráficas que relacionan el porcentaje de mortalidad (media de tres repeticiones) de las larvas de segundo instar de *S. frugiperda* en función de las concentraciones de monoterpenos ensayadas, los resultados muestran que la mortalidad total producida por las sustancias ensayadas (100%) a la concentración máxima empleada (20 mg/L de aire), siendo el α -pineno y el canfeno las sustancias que producen las mayores mortalidades de larvas a menores concentraciones. El canfeno es la sustancia más activa ya que produjo el 100% de mortalidad de las larvas de *S. frugiperda* en todo el rango de concentraciones ensayadas. En el anexo 1-3 se presentan los valores de las mortalidades causadas por los monoterpenos ensayados, en la Tabla 1-4 se presentan los valores de CL_{50} calculados en el programa Probit para los monoterpenos puros a partir de las mortalidades obtenidas.

Figura 1-4. Mortalidades causadas por los monoterpenos puros (canfeno, α y β -pineno) sobre larvas de segundo instar de *S. frugiperda*.



Los resultados muestran que la mortalidad producida por las sustancias ensayadas es alta a bajas concentraciones, siendo el α -pineno y el canfeno los que causan la más alta toxicidad fumigante ya que muestran una CL_{50} de 5.73 y < 0.57 mg/L de aire respectivamente (Figura 1-4). En ambos casos las concentraciones letales cincuenta son menores que las mostradas por los aceites esenciales lo que indica que la acción de los dos monoterpenos mencionados es sustancialmente menor sobre las larvas de *S. frugiperda* en mezcla que como compuestos puros, ó que en el aceite esencial pueden existir sustancias antagonistas que disminuyan el efecto de los compuestos activos. Es importante anotar que de acuerdo a los ensayos realizados se puede concluir que pequeñas cantidades de canfeno en los AE evidencian efectos insecticidas importantes sobre las larvas de *S. frugiperda* en las condiciones del ensayo, todo lo anterior teniendo en cuenta el efecto causado por el monoterpeno puro. Para el caso del β -pineno se observó una CL_{50} superior correspondiente a 14.0 mg/L de aire.

Tabla 1-4 CL_{50} calculadas para los monoterpenos puros

Monoterpeno	CL_{50} (mg/L de aire)
α -Pineno	5,73 *(4,80-6,85)
β -Pineno	14,0 *(9,29-27,5)
Canfeno	$<0,57$

*Intervalo de confianza del 95%

Si comparamos los valores de las CL_{50} calculadas con el programa Probit para los monoterpenos puros con los valores de las CL_{50} calculadas para los AE podemos concluir lo siguiente:

- En el caso del AE de hojas de la especie *P. subtomentosum* ($CL_{50}=126,8$ mg/L de aire), la actividad fumigante evidenciada en el valor de la concentración letal cincuenta, se debe a la baja cantidad de monoterpenos en la mezcla de volátiles los cuales poseen un importante efecto tóxico sobre las larvas de *S. frugiperda*.
- Los AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* ($CL_{50}= 11,4$ mg/L de aire) y parte aérea de *P.septuplinervium* ($CL_{50}= 7,93$ mg/L de aire), deben el efecto tóxico fumigante observado a la alta cantidad relativa de monoterpenos en el AE, específicamente a la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno y limoneno. Teniendo en cuenta los valores de las concentraciones letales cincuenta calculadas podemos concluir que es posible que las sustancias que hacen parte de la mezcla de volátiles en conjunto estén ejerciendo efectos antagonistas, toda vez que en el caso del canfeno y el α -pineno la CL_{50} de los monoterpenos puros son menores que las CL_{50} calculadas para los AE; en caso contrario el efecto del β -pineno es potenciado por los componentes de la mezcla de volátiles ya que la CL_{50} de este monoterpeno es mayor comparada con la CL_{50} de los AE.

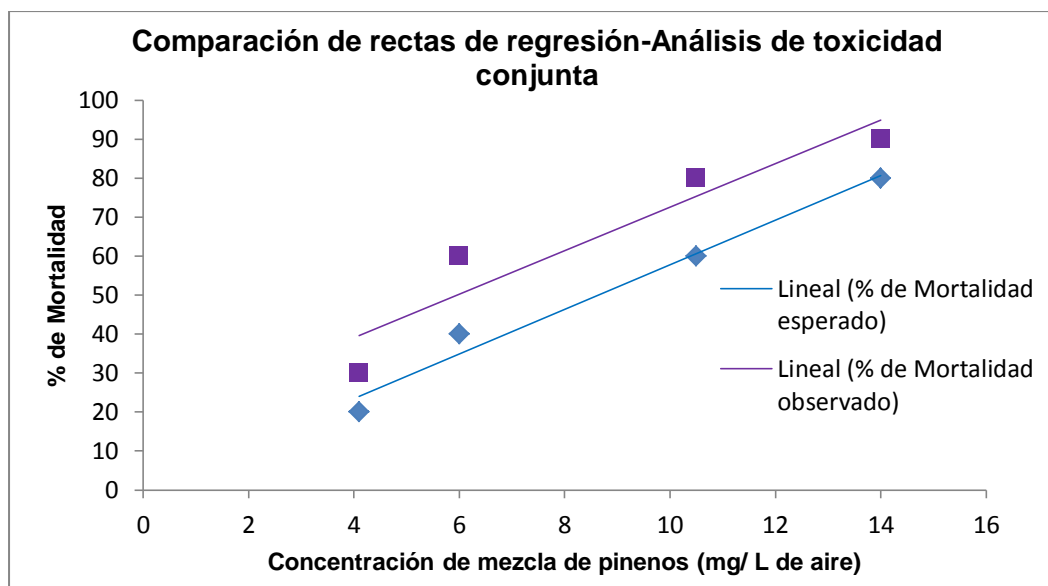
Para confirmar el efecto que genera la actividad conjunta del α - pineno y el β -pineno, se realizó un ensayo en el cual se evaluó el efecto tóxico fumigante por el método de vial en vial de diferentes mezclas de concentración conocida de α -pineno y β -pineno, y se comparó el efecto de las mezclas ensayadas, con el efecto que éstas deberían mostrar teniendo la mortalidad producida por cada componente puro por separado; este método se denomina “Comparación de rectas de regresión” y es uno de las formas más usadas para determinar el efecto tóxico conjunto de diferentes toxinas, entre ellas las endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. (Ibarra y Del Rincón, 2001). En la Tabla 1-5 se presentan las concentraciones de la mezcla de monoterpenos utilizadas, la mortalidad esperada y la mortalidad obtenida en el ensayo de determinación de efecto tóxico conjunta.

Tabla 1-5. Concentraciones de mezcla y mortalidades esperadas y obtenidas para determinación de toxicidad conjunta de α y β -pineno.

Cantidad de monoterpeno (mg)		Concentración de la mezcla (mg/L de aire)	Mortalidad esperada (%)	Mortalidad obtenida (%) $\pm 1DS$
α -pineno	β -pineno			
2,5	1,6	4,1	20	30 \pm 0
3,0	3,0	6,0	40	60 \pm 5,8
3,5	7,0	10,5	60	80 \pm 5,8
4,0	10	14	80	90 \pm 5,8

Al observar los datos de la mortalidad obtenida en el ensayo de vial en vial con la mortalidad esperada de acuerdo al efecto causado por cada monoterpeno puro, es claro que el efecto conjunto del α y del β -pineno no es aditivo. La Figura 1-5 muestra la comparación de las rectas de regresión para el análisis de la toxicidad conjunta del α y β -pineno, el corrimiento de la recta producto de la concentración de mezcla en función de la mortalidad esperada indica el efecto sinérgico de los dos monoterpenos sobre las larvas de *S. frugiperda* (Ibarra y Del Rincón, 2001).

Figura 1-5. Comparación de rectas de regresión para análisis de toxicidad conjunta de del α y β -pineno.



Este trabajo se constituye en el primer estudio en el cual se reporta la toxicidad fumigante del canfeno sobre larvas de Lepidópteros, específicamente *S. frugiperda*. Singh realizó una completa revisión publicada en el 2010, en la que se recopilan los mecanismos de acción de algunos metabolitos aislados de plantas. En dicha revisión se reporta que los AE y sus componentes monoterpénicos afectan procesos bioquímicos que específicamente interrumpen el normal desarrollo morfológico y fisiológico de los insectos, actuando como neurotóxicos perturbando principalmente los sistemas: colinérgico, GABA-érgico, y octopaminérgico (Singh, 2010). El estudio de determinación de toxicidad fumigante sobre larvas de *S. frugiperda* desarrollado en este trabajo, corresponde al primer reporte de actividad insecticida de los aceites esenciales evaluados.

▪ **Determinación de toxicidad por contacto**

Independiente de la estructura química, el efecto tóxico de las sustancias depende también de la forma en la que estas ingresan al insecto, los AE pueden actuar al administrarse por vía respiratoria (toxicidad fumigante), al ser absorbidos a través de la epidermis (toxicidad por contacto), o al ser ingeridos con la dieta (actividad antialimentaria). El objetivo de la determinación de la toxicidad por contacto radica en establecer si existe alguna incidencia de esta, en el efecto observado en las larvas de *S. frugiperda* en el ensayo de actividad fumigante, ya que durante dicho ensayo las larvas pueden ascender libremente por el vial y en algún momento puede haber existido contacto entre el AE o los monoterpenos puros y la epidermis de la larvas. En la Tabla 1-6 se presentan los resultados del ensayo de toxicidad por contacto obtenidos con los dos aceites más activos (AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* y AE de parte aérea de *P. septuplinervium*) y los monoterpenos puros (α -pineno, β -pineno, canfeno) sobre larvas de segundo instar de *S. frugiperda* expresados en % de mortalidad.

Los resultados presentados en la Tabla 1-6 muestran que las mortalidades producidas por los aceites esenciales al ser colocados en el dorso de la larva después de 24 horas de la aplicación poseen un valor inferior al obtenido en el ensayo de actividad fumigante en el mismo tiempo de exposición, lo que indica que el efecto del contacto de los AE con los insectos tiene una incidencia mínima en su mortalidad, confirmando que el importante efecto observado en el ensayo de actividad fumigante es debido a la inhalación de las sustancias ensayadas. El AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* es la sustancia

que produce las mayores mortalidades por contacto (26,7 % en la cantidad más alta aplicada), sin embargo no son comparables con las mortalidades producidas por inhalación. Los monoterpenos que fueron determinados como activos en el ensayo de actividad fumigante no producen mortalidades altas por contacto, por lo que es posible que la mortalidad causada por el aceite de inflorescencias se deba a un efecto sinérgico ó a otros componentes del aceite que no tienen una incidencia importante en el ensayo de actividad fumigante. Los resultados de toxicidad por contacto realizados en este estudio sobre larvas de *S. frugiperda* con los AE de inflorescencias de *P. subtomentosum*, parte aérea de *P. septuplinervium* y los monoterpenos canfeno, α -pineno, β -pineno; se constituyen en el primer reporte de este tipo de actividad para las sustancias anteriormente mencionadas.

Tabla 1-6. Resultados de la determinación de toxicidad por contacto de AE y monoterpenos puros.

Sustancia Ensayada	Cantidad Aplicada (μ L)	% Mortalidad obtenida después de 24 h*(%)
Aceite de inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	0,20	27 \pm 5,8
	0,15	17 \pm 5,8
	0,10	10 \pm 0
Aceite de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	0,20	6,7 \pm 5,8
	0,15	0 \pm 0
	0,10	0 \pm 0
α -Pineno	0,20	13 \pm 5,8
	0,15	6,8 \pm 5,78
	0,10	0 \pm 0
β -Pineno	0,20	10, \pm 0
	0,15	0 \pm 0
	0,20	0 \pm 0
Canfeno	0,20	20, \pm 0
	0,15	13 \pm 5,8
	0,10	10 \pm 0
Control	NA	0 \pm 0

*Media \pm DS de las tres réplicas

▪ Determinación de efecto repelente de los aceites esenciales

Es bien conocido que las relaciones entre plantas e insectos están mediadas en la mayoría de los casos por señales químicas, y esto es aprovechado en el manejo integrado de plagas, ya que los compuestos producidos por las especies vegetales pueden atraer o repeler a diversas especies de insectos de tal forma que este reconocimiento provoca efectos en el comportamiento que pueden ser aprovechados para hacer protección de cultivos (Harborne, 2001). El efecto repelente de los compuestos volátiles producidos por las plantas ha sido investigado en diversos insectos, los mayores estudios se centran en organismos como: dípteros del género *Anopheles* importantes por ser vectores de enfermedades tropicales como la malaria, coleópteros de los géneros *Sitophyllus* y *Tribolium* que se constituyen en plagas de infestación primarias y secundarias de almacén que producen millonarias pérdidas en todo el mundo, trips y áfidos que en su mayoría son plagas de leguminosas, hortalizas y cereales en campo. (Zapata y Smaghe, 2010; Albuquerque *et al.*, 2013, Koschier, 2006; Nerio *et al.*, 2009; Nerio *et al.*, 2010). En el presente estudio se decidió determinar si los aceites esenciales de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium* pueden actuar como repelentes o atrayentes sobre las larvas de *S. frugiperda* y si la magnitud de este efecto puede motivar estudios posteriores para aprovechar dicha característica en pro de una forma de control. En la Tabla 1-7 se presentan los resultados de actividad repelente obtenidos con los AE expresados como % de repelencia (%R)

Tabla 1-7. Resultados de actividad repelente sobre *S. frugiperda* de los AE de *P.septuplinervium* y *P. subtomentosum*

Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	%R*
Parte aérea de <i>P. septuplinervium</i>	0,063	-20±0
	0,126	44± 6
	0,252	56± 8
	0,503	76± 7
Inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i>	0,063	20± 0
	0,126	36± 8
	0,252	40± 0
	0,503	44± 8
IR3535	0,063	50± 7
	0,126	68± 5
	0,252	76± 5
	0,503	100 ± 0

Los resultados presentados en la Tabla 1-7 muestran que los dos AE ensayados presentan algún efecto repelente sobre las larvas de *S. frugiperda* en todas las concentraciones ensayadas a excepción del aceite de parte aérea de *P. septuplinervium* a la concentración más baja ensayada, en la cual se observa un leve efecto atrayente. De forma contraria los mayores porcentajes de repelencia se obtienen para este mismo aceite en el rango de 0.126-0,503 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$; los valores de los porcentajes obtenidos permiten concluir que para el caso del aceite en mención existe una relación directa dosis-respuesta. Al comparar los porcentajes de repelencia obtenidos para el AE de la parte aérea de *P. septuplinervium* con los obtenidos con el repelente comercial usado como control en el ensayo se puede observar que en todos los casos son sustancialmente menores.

En el caso del aceite de las inflorescencias de *P. subtomentosum* no se observa efecto atrayente en ninguna de las concentraciones ensayadas, se observa una relación directa entre el aumento de la dosis y la respuesta del insecto a la deterrencia generada por la sustancia ensayada, sin embargo los aumentos del porcentaje de repelencia no son sustanciales. El efecto repelente generado por el AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* es en orden de magnitud aproximadamente la mitad en cada una de las concentraciones ensayadas con respecto al control empleado en el ensayo. Los resultados de actividad repelente obtenidos en este estudio se constituyen en el primer reporte de actividad repelente de los aceites esenciales ensayados e indican que el aceite de parte aérea de la especie *P. septuplinervium* que posee una alta cantidad de monoterpenos y monoterpenoides (77%) es el que produce los mejores efectos generando % R cercanos al 80%.

- **Determinación del efecto de los aceites esenciales sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda*.**

El Lepidóptero *S. frugiperda* es una importante plaga cuyo hábito alimenticio es polífago e incluye maíz, sorgo, algodón, y pastos (Monnerat *et al.*, 2006). El insecto produce daños al follaje cuando es larva siendo más voraz en los primeros instar de dicha etapa del ciclo de vida; es por esta razón que los ensayos de determinación de actividad insecticida cuando se usa el gusano cogollero como insecto blanco se hacen cuando este se encuentra en larva; sin embargo si dentro de las investigaciones se incluye la búsqueda de sustancias que afecten los demás estadios del ciclo de vida del insecto se

está ejerciendo una forma de control de la plaga. Después de realizar los ensayos de actividad fumigante, toxicidad por contacto y actividad repelente los cuales mostraron que los AE con mayor contenido de monoterpenos y monoterpenoides (inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium*) poseen un efecto fumigante importante, ya que a bajas concentraciones producen altas mortalidades a las larvas de segundo instar de *S. frugiperda* posiblemente por su acción neurotóxica; se decidió evaluar la acción de dichos aceites esenciales en el desarrollo del insecto. Para ello se sometieron larvas de segundo instar al ensayo de actividad fumigante usando dos concentraciones correspondientes a CL₅₀ y CL₂₅ calculadas con el programa Probit a partir del ensayo de actividad fumigante para cada AE. Después de 24 horas de exposición a los AE, las larvas sobrevivientes en cada tratamiento se colocaron en dieta artificial permitiéndoles que se desarrollaran hasta alcanzar su etapa adulta, tiempo en el cual se registraron retrasos en el desarrollo en los diferentes estadíos usando los siguientes parámetros.

- Retraso en estado de larva: se registró la longitud cada 48 horas y se comparó contra un tratamiento control.
- Una vez el tratamiento control alcanzó el 80% de pupación se registró el tiempo de paso de estadío a estadío.
- Efecto en la reproducción: en los tratamientos donde fue posible obtener pupas hembras y machos se realizaron cruces en los que se determinó el efecto sobre la oviposición de la hembra, por triplicado.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados para determinar la incidencia de los AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium* en el desarrollo del insecto.

- **Retraso en estado de larva:**

En la Tabla 1-8 se observa el efecto en el desarrollo de las larvas, comparando la longitud de las mismas en cada tratamiento con el control durante los primeros 21 días de incubación, día en el cual este último (larvas sin previa exposición a los AE) alcanzó el 80% de pupación. La lectura del tamaño de las larvas evidenció el retraso del crecimiento con los dos AE en las concentraciones ensayadas, siendo mayores los retrasos en los tratamientos correspondientes a las CL₅₀ de los dos aceites (13,2 µL/L de aire en AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* y 9,47 µL/L de aire en AE de parte

aérea de *P. septuplinervium*), en los primeros 10 días de incubación, ya que se registran disminuciones de tamaño cercanas al 75% con respecto al control, el cual alcanzó una longitud máxima de 35.0 mm. Silva y colaboradores en el 2010, realizaron un estudio en el cual evaluaron el efecto del aceite esencial de boldo (*Peumus boldus*) sobre el tamaño de la larva de *S. frugiperda*, encontrando al igual que en esta investigación el retraso en el crecimiento de las larvas (retraso cercano al 70%), siguiendo una relación directa concentración-respuesta. El AE de boldo y los aceites esenciales objeto de este estudio comparten como característica el alto contenido de monoterpenos y monoterpenoides, el cual en todos los casos es superior al 50%, la conocida acción neurotóxica que provocan los monoterpenos en los insectos debe producir el retraso en la cascada de señalización necesaria para la expresión de las enzimas encargadas de la mediación de la morfogénesis de las larvas de *S. frugiperda* produciendo las disminuciones de tamaño observadas las cuales deben ser mayores a medida que la cantidad de monoterpenos aplicada aumenta.

Tabla 1-8 Efecto de los aceites esenciales sobre el tamaño de las larvas sobreviviente de *S. frugiperda* durante los primeros 21 días de incubación, posteriores al ensayo de toxicidad fumigante

Aceite esencial – Dosis	Tamaño de Larva (mm)*									
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día13	Día 15	Día 17	Día 19	Día 21
Inflorescencias <i>P. subtomentosum</i> - CL ₅₀	3.46±0 .401	6.25±0 .424	7.70±0 .424	10.3±0 .424	8.61± 0.940	9.60± 0.626	11.0± 1.02	12.2± 0.325	12.2± 0.353	ND
Inflorescencias <i>P. subtomentosum</i> - CL ₂₅	5.16±0 .325	7.40±0 .427	10.2±0 .490	14.5±0 .820	18.7± 1.25	22.6± 0.541	23.5± 1.30	21.8± 1.52	21.3± 0.770	23.5± 0.557
Parte aérea <i>P. septuplinervium</i> - CL ₅₀	2.67±0 .460	4.07±0 .884	5.47±0 .389	ND	11.1± 0.577	ND	17.0± 1.10	22.0±0	23.8± 1.76	ND
Parte aérea <i>P. septuplinervium</i> – CL ₂₅	3.92±0 .382	7.55±0 .530	9.75±0 .250	11.1±0 .340	13.6± 0.626	13.6± 0.626	24.5± 0.707	29.9± 0.389	26.3± 1.24	26.8±0
Control (sin exposición a AE)	7.67±1 .15	14.5±0 .86	18.3±0 .57	26,0±1 .00	29.3± 2.30	32.0± 1.00	28.3± 3.51	33.5± 2.12	34.0± 2.82	35.0±0

*Media ± 1DS de las tres repeticiones

ND corresponde a larvas muertas o insectos en estadio diferente a larva

▪ **Retraso en el paso de estadio a estadio**

Una vez el control alcanzó el 80% de la pupación se registraron en los demás tratamientos el número de individuos en cada estado del ciclo de vida y el tiempo que demora el paso de larva a pupa y de pupa a adulto, con respecto al control. En la Tabla 1-9 se presenta el efecto sobre la pupación, los patrones de emergencia y la mortalidad producida por los AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium* después de 21 días de incubación.

Tabla 1-9. Efecto sobre la pupación, patrones de emergencia y mortalidad de larvas producida por los AE después de 21 días de incubación.

Tratamiento	L (%) ^a	P (%) ^b	A (%) ^c	M (%) ^d	Día de emergencia de adultos
<i>P. subtomentosum</i> - CL ₅₀ (13.2 µL/L de aire)	50	8.3	0	42	26 a 30
<i>P. subtomentosum</i> - CL ₂₅ (6.6 µL/L de aire)	50	14	0	36	26
<i>P. septuplinervium</i> - CL ₅₀ (9.4 µL/L de aire)	5.7	0	1.4	93	Las larvas restantes no logran pasar a pupa
<i>P. septuplinervium</i> - CL ₂₅ (4.7 µL/L de aire)	25.	2.8	8.3	64	26 a 30
Control	20.	80	0	0	24

^a L (%): larvas sobrevivientes x 100/total de individuos restantes a día 21

^b P (%): pupas x 100/ total de individuos restantes a día 21

^c A (%): adultos emergentes x 100/ total de individuos restantes a día 21

^d M (%): larvas muertas x 100/total de individuos restantes a día 21

Los resultados de la Tabla 1-9 evidencian la influencia de los aceites esenciales en la pupación, ya que mientras que en el tratamiento control el 80% de los organismos llega a estado de pupa, los individuos expuestos a los AE no alcanzan el 10% de pupación, siendo mayor el efecto cuando la concentración de aceite es mayor. Es importante anotar que se observa una alta cantidad de organismos muertos en estado de larva en todos los tratamientos, siendo el aceite de parte aérea de *P. septuplinervium* el que produce las mayores mortalidades (93%), lo cual es consistente con el resultado del ensayo de actividad fumigante, ya que es el aceite más activo de acuerdo al valor de la CL₅₀ (9,41 µL/L de aire) Junto a la alta mortalidad observada se encuentra el hecho de que en la más alta concentración ensayada del aceite de *P. septuplinervium* no se observaron pupas lo que indica que dicho AE posiblemente está inhibiendo la síntesis de

la cutícula necesaria para la formación de la capsida que forma la pupa, y por ende evitando la formación del adulto y ejerciendo otra forma de control.

▪ **Efecto en la reproducción**

Las pupas obtenidas fueron sexadas por observación en estereoscopio, en los tratamientos donde fue posible tener hembra y machos suficientes para hacer triplicados se hicieron parejas para evaluar el efecto de los aceites esenciales sobre la oviposición de las hembras. Los resultados del conteo de huevos obtenidos de las posturas se resumen en la Tabla 1-10.

Tabla 1-10 efecto de los AE sobre la reproducción de *S.frugiperda*

Pareja-Tratamiento	Número de huevos*	% de reducción de la oviposición
Hembra control-macho control	854 ± 26	
Macho control- hembra tratada con AE de parte aérea de <i>P. septuplinervium</i> CL ₂₅	No se obtuvieron posturas	100
Hembra control – macho tratado con AE inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> CL ₂₅	540 ± 37	33
Macho control –hembra tratada con AE inflorescencias de <i>P. subtomentosum</i> CL ₂₅	158 ± 18	83

*Media±1DS de tres repeticiones

Los resultados obtenidos (Tabla 1-10) muestran que cuando los adultos son sometidos al AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* a CL₂₅ se evidencian efectos sobre la hembra y sobre el macho, ya que al cruzar macho tratado con hembra control se observa una disminución del 33% de la oviposición con relación a la pareja control; al cruzar hembra tratada con macho control el efecto es mayor con una disminución del 83% de la oviposición con relación al control. Para el caso del aceite de parte aérea de *P. septuplinervium* se logró cruzar la pareja macho control con hembra tratada a la CL₂₅, observando que el aceite ejerce un importante efecto sobre la hembra causando la inhibición total de la oviposición de ésta. Existen reportes de otros aceites de la familia Piperaceae que producen inhibición de la oviposición de insectos plaga, como es el caso del aceite esencial de frutos de *P.guinense* el cual inhibe el 75% de la oviposición de *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera) plaga de almacén de granos de leguminosas

(Kélta *et al.*, 2000), y los aceites esenciales de hojas y tallos de *P. marginatum* los cuales causan disminución de la oviposición en *Aedes aegypti* con porcentajes cercanos al 50% (Autran *et al.*, 2009).

1.4 Conclusiones

- El potencial insecticida de los AE, evidenció que el alto contenido de monoterpenos (48% y 77%) incide en la importante toxicidad fumigante observada contra la plaga (CL_{50} =13,2 μ L/L de aire y 9,41 μ L/L de aire), actividad que se debe al efecto nocivo que tienen sus vapores, pues no se evidenció una mortalidad importante al ser evaluados como repelentes y como agentes tóxicos por contacto.
- Se pudo determinar que los compuestos α -pineno, β -pineno, limoneno, y canfeno son algunos de los compuestos responsables de la actividad insecticida que presentan los AE de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *P. septuplinervium*.
- Se estableció la importante toxicidad fumigante del canfeno sobre larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, ya que causó el total de la mortalidad de los organismos en todo el rango de concentraciones ensayadas (0,57 μ g/L de aire-20 μ g/L de aire).
- Los AE afectan todo el ciclo de vida, disminuyen el tamaño de las larvas especialmente en los primeros días de incubación (disminuciones cercanas al 75%).
- El AE de *P. septuplinervium* produce altas mortalidades de las larvas de *S. frugiperda* provocando mortalidades superiores al 60% y afectando el paso de las larvas sobrevivientes a estadio de pupa.
- Los AE provocan disminuciones en la oviposición siendo mayores los efectos sobre las hembras.

- Los resultados obtenidos en este estudio permiten postular a los AE de *P. subtomentosum* y *P. septuplinervium* como candidatos a estudios en condiciones controladas en invernadero y en campo.

1.5 Bibliografía

Adams, R. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography-quadrupole mass spectroscopy. 3th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Steam, Illinois, USA

Ah Seo, K., Kim, H., Ku, H., Ahn, H., Park, S., Bae, S., Shin, J., Liu, K. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chemico-Biological Interactions*. **2008**, 174, 141-146.

Albuquerque, E., Lima, J., Souza, F., Silva, I., Santos, A., Araújo, A., Blank, A., Lima, R., Alves, P., Bacci, L. Insecticidal and repellence activity of essential oils of *Posgostemon cablin* against urban ants species. *Acta Trópica*. **2013**, 127, 181-186.

Aslan, I., Özbek, H., Çalmasur, O., Fikretin, S. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pest, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaco* Genn. *Industrial Crops and Products*. **2004**, 19, 167-173.

Autran, E.S., Neves, I.A. Da Silva, C, Santos, G., Da Câmara, C., Navarro, D. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*. **2009**, 100, 2284-2288.

Azzimonoti, R. (2003). Bioestadística aplicada a Bioquímica y Farmacia. 2 ed. Editorial Universitaria, Posadas, Argentina, pp. 464.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 446-475.

Bandoni, A. (2000) Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Primera Edición. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. La Plata-Argentina, pp.29.

Cerón, J., Bravo, A. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico, 1st ed., Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, pp 207-228

Coats, J. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Reviews of Entomology*. 1994, 39, 489-515.

CORPOICA. Corporación Colombiana de investigación agropecuaria, 2003, [Consultado Diciembre 2011]. Disponible en http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061127153058_EI%20gusano%20cogollero%20del%20maiz.pdf

Chaubey, M.K. Biological Activities of *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) and *Piper cubeba* (Piperaceae) essential oils against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2013, 16, 517-523.

Cuca, L.E., Coy, C., Coy, E. La investigación en productos naturales vegetales. *Innovación y Ciencia*. 2010, 17, 58-71.

Dayan, F., Cantrell, C., Duke, S. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2009, 17, 4022-4034.

De Moraes, S., Facundo, V., Medeiros, L., Barreira, E., Dos Anjos, J., Ferreira, S., Sousa de Brito, E., Alves de Sousa, M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007, 35, 670-675.

Días dos Santos, P., Moreira, D., Guimarães, E., Coelho, M. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*. 2001, 58, 547-551.

Drijfhout, F.P.; Morgan, D.E. (2010). Terrestrial natural products as antifeedants. En *Comprehensive Natural Products: Chemistry and Biology*. Elsevier. Volumen. 4, cap. 11, pp 458-459.

Enan, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2001, 130, 325-337.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge UK.

Harborne, J. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Products Report*. **2001**, 18, 361-379

Ibarra, J., Del Rincón, M.C. Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis*. En: Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Editorial Phytoma, Primera Edición. **2001**, pp146.

Isman, M. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Reviews of Entomology*. **2006**, 51, 45-66.

Isman, M., Machial, C. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. En Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier. **2006**, cap. 2, 29-44.

Isman, M. B.; Miresmailli, S.; Machial, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*. **2011**, 10, 197-204.

Joulain, D., Koning, W. **(1998)**. The atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, 1st ed.; E.B. Verlag Hamburg: Hamburg.

Kéïta, S., Vincent, C., Schmith, J., Ramaswamy, S., Bélanger, A. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*. **2000**, 36, 355-364.

Kim, S., R, J., Kim, D., Lee, H., Ahn, Y. Insecticidal of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*. **2003**, 39, 293-303.

Koschier, E. Plant allelochemicals in thrips control strategies. En Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier. **2006**, cap. 10, 221-249.

Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B., Berrada, M. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Research*. **2001**, 71, 9-15.

Lima, D., Ballico, L., Rocha, F., Gonçalves, H., Mera de Souza, L., Lacomini, M., Werner, M.F., Hatsuko, C., Tiemy, I., Mota da Silva, L., Facundo, V., Soares, A. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**, 142, 274-282.

López, M.D., Pascual-Villalobos, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*. **2010**, 31, 284-288.

Martins, A.P., Salguiero, L., Vila R., Cañigüeral, S., Casanova, J., Proença Da Cunha, A., Adzett, T. Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 7, 2019-2023.

Matasyoh, J., Wathuta, E., Kariuki, S., Chepkorir, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Journal of Asia Pacific Entomology*. **2011**, 14, 26-18

Miller, J., Miller, J. **(2000)**. Estadística y Quimiometría para Química analítica, Cuarta Edición., Pearson Prentice Hall, España, pp 115-118.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011. http://www.minagricultura.gov.co/archivo/guía_de_agricultura_ecológica.pdf. [Consultado Julio 2013].

Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Orduz, S., Jaramillo, G., Benintende, G., Cozzi J., Real, D., Martínez-Ramírez, A., Rausell, C., Cerón, J., Ibarra, J., Del Rincón, C., Espinoza, A., Meza, L., Cabrera, L., Sanchez J., Soberon, M., Bravo, A. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from latin américa is associated with variations in suceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **2006**, 72, 11, 7026-7035.

Nerio L.E., Olivero-Verbel J., Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*. **2010**, 101, 372-378.

Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*. **2009**, 45, 212-214.

Nist 11: Mass Spectral Library, 2011. [Consultado, junio 2011]. Disponible en <http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>

-
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C., Boll, P. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 4, 597-673.
- Pascual-Villalobos, M.J., Ballesta-Acosta, M.C., Soler, A. Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*. **2004**, 30, 279-286.
- Pavela, R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*. **2005**, 76, 691-696.
- Perés, V.F., Moura, D., Sperotto, A.R., Damasceno, F.C., Caramão, E.B., Zini, C., Saffi, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*. **2009**, 47, 2389-2395.
- Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals, 2011. [Consultado, Junio 2011]. Disponible en <http://www.pherobase.com>.
- Pitasawat, B., Champakaew, D., Choochote, W., Jitpakdi, A., Chaithong, U., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Tippawangkosol, P., Riyong, D., Tuetum, B., Chaiyasit, D. Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*, **2007**, 78, 205-210
- Potzernhein, M., Bizzo, H.R., Agostini-Costa, T.S., Vieira, R., Carvalho-Cilva, M., Gracindo, L. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, bases on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de plantas Mediciniais*. **2006**, 8, 10-12.
- Prakash, B., Shunkla, R., Singh, P., Kumar, A., Kumar, P., Kishore, N. Efficacy of chemical characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. **2010**, 142, 114-119.
- Qin, W., Huang, S., Li, C., Chen, S., Peng, Z. Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Coleoptera: Hispididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **2010**, 96, 132-139.

Rattan, R. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. **2010**, 29, 913-920.

Regnault-Roger, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*. **1997**, 2, 25-34.

Regnault-Roger, C., Philogene, B., Vincent, C. (2003) "Biopesticides D' Origine Végétale". Tec&Doc-Lavoisier. Paris. Francia.pp. 33.

Sauter, I., Evalt, G., Machado, A., Cibulski, S., Roehe, P., Alves da Silva, L., Brittes, M., Figueiró, R., Cassel, E., Lino von Poser, G. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervium* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*. **2012**, 40, 292-295.

Silva, G. (2010). "Actividad de polvo, extractos y aceite esencial de *Pumus boldus* Molina solos y en mezcla con *Bacillus thuringiensis* Berliner contra *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie)". Tesis Doctoral, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, México. pp 18.

Singh Rattan R. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. **2010**, 29, 913-920.

Singh, T., Kumar, D., Kumar, S., Kumar, S. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*. **2009**, 123, 302-308.

Yamane, H., Konno, K., Sabelis, M., Takabayashi, J., Sassa, T., Oikawa, H. (2010). *Comprehensive Natural Products*, Vol 4, Chap. 8, 1st ed., El Sevier, Academic Press, New York, pp 3

Zapata, N., Smaghe, G. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*. **2010**, 32, 405-410.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A. Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry*. **2011**, 129, 179-182.

Anexo 1-1.

Datos de Mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* causada por los aceites esenciales de hojas e inflorescencias de *Piper subtomentosum* y parte aérea de *Piper septuplinervium*

Mortalidades causadas por los aceites esenciales de inflorescencias y hojas de *P. submentosum*, y parte aérea de *P. septuplinervium*

Muestra Ensayada	Concentración ($\mu\text{L/L}$ de aire)	% M \pmDS
Aceite esencial de Inflorescencias de <i>Piper submentosum</i>	3,10	10,0 \pm 0
	6,30	26,6 \pm 5,77
	12,5	48,0 \pm 0
	25,0	53,3 \pm 5,77
	50,0	96,6 \pm 5,77
	100	100 \pm 0
	200	100 \pm 0
	250	100 \pm 0
Aceite esencial de hojas de <i>Piper submentosum</i>	50,0	10,0 \pm 0
	100	33,3 \pm 5,77
	200	56,6 \pm 5,77
	250	63,3 \pm 5,77
	500	100 \pm 0
Aceite esencial de parte aérea de <i>Piper septuplinervium</i>	3,10	10 \pm 0
	6,30	30 \pm 0
	12,5	46,6 \pm 5,77
	25,0	100 \pm 0
	50,0	100 \pm 0
	100	100 \pm 0
	200	100 \pm 0
	250	100 \pm 0
500	100 \pm 0	

Anexo 1-2.

Resultados del cálculo del coeficiente de correlación de
Pearson

**Coeficientes de Correlación de Pearson para los monotepenos en función
de la CL₅₀**

**Coeficientes de Correlación de Pearson para los monotepenos en función
de la CL₅₀**

Coeficientes de Correlación de Pearson para los monotepenos en función de la CL50

Coeficientes de Correlación de Pearson para los monotepenos en función de la CL50

Anexo 1-3

Datos de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* causada por los monoterpenos Canfeno, α -Pineno, y β -Pineno

Mortalidades causadas por los monoterpenos canfeno, α y β -pineno

Muestra Ensayada	Concentración (mg/L de aire)	% M \pm DS
α -Pineno	0,57	0 \pm 0
	1,30	0 \pm 0
	3,00	20,0 \pm
	5,00	53,3 \pm 5,77
	10,0	70,0 \pm 0
	20,0	100 \pm 0
β -Pineno	0,57	0 \pm 0
	1,30	10,0 \pm 0
	3,00	20,0 \pm 0
	5,00	23,3 \pm 5,77
	10,0	40,0 \pm 0
	20,0	60,0 \pm 0
Canfeno	0,57	100 \pm 0
	1,30	100 \pm 0
	3,00	100 \pm 0
	5,00	100 \pm 0
	10,0	100 \pm 0
	20,0	100 \pm 0

2. Estudio fitoquímico bio guiado de los extractos etanólicos de inflorescencias de *Piper subtomentosum* y parte aérea de *Piper septuplinervium*.

2.1 Generalidades

Las plantas históricamente han sido la más importante fuente de productos naturales bioactivos y han sido empleadas principalmente por el hombre para tratar sus dolencias, y para mejorar su calidad de vida (Cragg *et al.*, 2010). Los responsables de los efectos causados por las especies vegetales y que han propiciado el uso de estas de generación en generación, son una amplia variedad de compuestos orgánicos, la gran mayoría de los cuales no parecen estar involucrados en procesos de crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, sin embargo si están involucrados en roles ecológicos o de defensa formando lo que se conoce como defensa química (Cseke *et al.*, 2006). Esta variedad de compuestos orgánicos comúnmente se denominan metabolitos secundarios o productos naturales y en la actualidad son importantes debido a que su investigación ha proporcionado una fuente de compuestos que son en muchos casos nuevas formulaciones inaccesibles por otras vías y plantillas necesarias para el diseño de nuevos productos aplicados a las industrias farmacéutica, cosmética y de agroquímicos. (Colegate y Molineux, 2008; Kauffman *et al.*, 2006; Cragg *et al.*, 2005).

En este sentido y en forma particular las industrias de agroquímicos han encontrado en los productos naturales opciones para la obtención de productos o plantillas de síntesis que puedan ser aplicados y comercializados para la efectiva protección de cultivos,

teniendo en cuenta que con el transcurrir de los años y la evolución, la presión medioambiental ha provocado que las especies vegetales solucionen el problema de la supervivencia y se mantengan ante el ataque de depredadores y patógenos, distribuyendo sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse; de tal forma que poseen una diversidad química que en muchos casos les asegura la conservación (Williams *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta que en el capítulo 1 se hizo referencia al papel de los metabolitos volátiles como insecticidas, a continuación se hace una revisión de los productos naturales no volátiles aislados de plantas que han sido usados efectivamente como insecticidas.

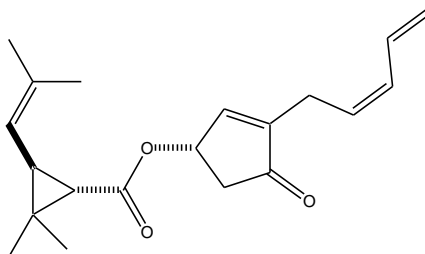
2.1.1 Sustancias aisladas de plantas usadas como insecticidas

Los insecticidas botánicos son los más antiguos que se conocen, el uso de extractos de plantas y sus mezclas se remonta a las antiguas civilizaciones (Pascual-Villalobos, 1996). En la era moderna, gracias al perfeccionamiento de los métodos de análisis, se avanzó en la determinación de los componentes puros que ejercen la acción que muestran los extractos; por lo que actualmente no solo mezclas de compuestos sino además los metabolitos puros, aislados de especies vegetales se siguen usando en el mantenimiento y la protección de cultivos dentro del sistema denominado manejo integrado de plagas. A continuación se realizará una breve revisión de los extractos y/o metabolitos puros aislados de plantas utilizados como insecticidas botánicos.

- **Piretrinas**

Las piretrinas son terpenos modificados, obtenidos como oleorresinas extraídas de las flores de *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae) comúnmente conocidas como crisantemo (Dewick, 2002). La acción insecticida de las piretrinas es “*knock down*” es decir inmediata, particularmente en insectos voladores; en otros tipos de insectos producen convulsiones ya que bloquean los canales de sodio en axones, mecanismo muy similar a los organoclorados (González-Coloma *et al.*, 2010). Las piretrinas son moderadamente tóxicas para los mamíferos y su tiempo de vida media es aproximadamente 2 horas debido a que se descomponen en presencia de radiación UV lo que limita su uso a campo abierto (Isman, 2006). Un ejemplo estructural de este tipo de insecticidas se presenta en la Figura 2-1.

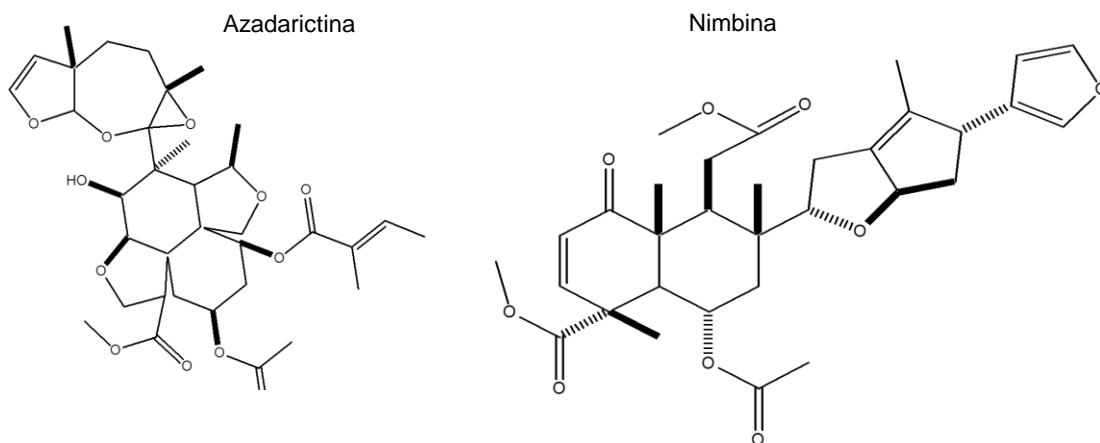
Figura 2-1. Estructura de la Piretrina I



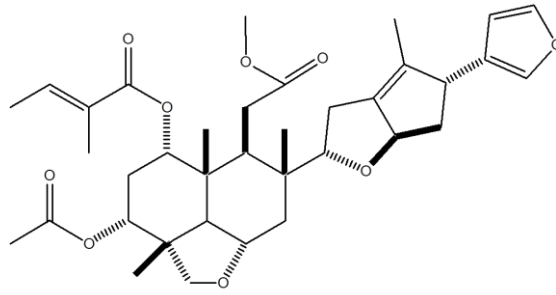
- **Neem**

La especie *Azadirachta indica* (Meliaceae) conocida comúnmente como árbol del Neem, es muy apreciada por la cantidad de usos dados en medicina tradicional. Del Neem se pueden obtener dos tipos de insecticidas, el aceite esencial de las semillas que es efectivo sobre insectos de cuerpo blando y el extracto de las semillas obtenido después de remover el aceite, este extracto es rico en triterpenos tipo limonoide, los cuales son los principios insecticidas activos (Isman, 2006). Los compuestos más importantes extraídos del Neem son: azadiractina, nimbina y salanina (Figura 2-2); los productos comerciales que contienen azadiractina se pueden utilizar en una amplia gama de cultivos, incluyendo: algodón, té, tabaco, café, plantas ornamentales y en el sector forestal. Los triterpenos tipo azadiractina bloquean la síntesis de hormonas desde la glándula protorácica en larvas de muchos órdenes de insectos lo que impide el desarrollo normal de estos, provocándoles la muerte. En hembras adultas produce esterilidad además tiene efecto antialimentario sobre muchos tipos de plagas produciendo finalmente la muerte por inanición. La azadiractina es considerada como no tóxica para mamíferos y no se espera que tenga efectos adversos en organismos no vegetales o el medio ambiente (González-Coloma *et al.*, 2010).

Figura 2-2. Estructuras de triterpenos activos aislados del extracto de semillas del árbol del Neem



Continuación Figura 2-2

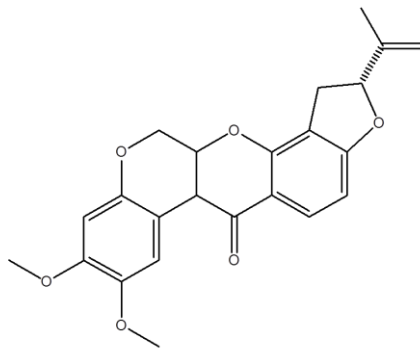


Salanina

- **Rotenona**

La rotenona (Figura 2-3) es un flavonoide extraído de las raíces de las especies *Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*, (Leguminosae). Son metabolitos mayoritarios en las especies mencionadas, ya que a partir del material seco de la primera se puede obtener cerca del 13% de rotenona, mientras que de la segunda un 5%. Las especies de *Derris* son nativas de los trópicos orientales, mientras que *Lonchocarpus spp* son nativas del hemisferio occidental. La rotenona es un insecticida de contacto e ingestión, y posee efecto repelente. Su modo de acción implica una inhibición del transporte de electrones a nivel de mitocondrias bloqueando la fosforilación y el paso de ADP a ATP. Los síntomas que presentan los insectos intoxicados con rotenona son: disminución del consumo de oxígeno, depresión en la respiración y ataxia que provocan convulsiones y conducen finalmente a la parálisis y muerte (Isman, 2006).

Figura 2-3. Estructura química de la rotenona



Rotenona

- **Nicotina**

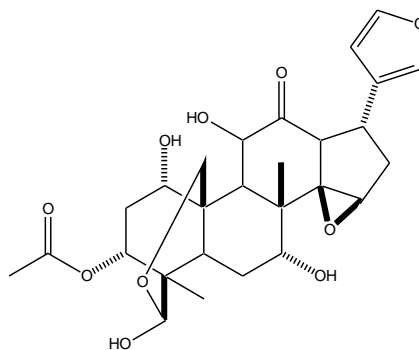
La nicotina es un alcaloide extraído de una especie de la familia Solanacea conocida comúnmente como tabaco (*Nicotiana tabacum*). Sus propiedades insecticidas fueron reconocidas en la primera mitad del siglo XVI. Este compuesto no se encuentra en la planta en forma libre sino que está formando maleatos y citratos. La nicotina es básicamente un insecticida de contacto no persistente. Su modo de acción consiste en mimetizar la acetilcolina al combinarse con su receptor en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. El receptor acetilcolínico, es un sitio de acción de la membrana postsináptica que reacciona con la acetilcolina y altera la permeabilidad de la membrana; la actividad de la nicotina ocasiona la generación de nuevos impulsos que provocan contracciones espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte. Hoy en día se encuentran en el mercado un grupo de insecticidas conocidos como neonicotinoides que son copias sintéticas o derivadas de la estructura de la nicotina (Isman, 2006).

- **Extractos de *Melia***

Como extractos de *Melia* se conocen a los extractos obtenidos de la especie *Melia azedarach* (Meliaceae), también llamada "Paraíso" la cual crece abundantemente en América del sur, sus frutos maduros y sus hojas amarillas son usados como insecticida y antialimentario sobre diferentes tipos de plagas. El potente efecto insecticida del extracto de "Paraíso" podría ser equivalente al del extracto del árbol del Neem. Estudios realizados a partir de distintas concentraciones de extracto de "Paraíso" demuestran que este inhibe la alimentación y afecta negativamente el desarrollo y supervivencia de distintas especies de insectos plaga que atacan diversos cultivos (Valladares *et al.*, 1997). Ejemplo de esto es el efecto antialimentario que provoca sobre *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera) llamada también "vaquita del Olmo", distintas concentraciones de extracto de "Paraíso" (2, 5 y 10 %p/p), logran inhibiciones de la alimentación cercanas al 87 % en larvas y un 75 % en los adultos llegando a un 100 % de inhibición bajo la concentración más alta. El compuesto activo aislado del extracto de "Paraíso" es un limonoide llamado meliartenina, la actividad antialimentaria de este compuesto muestra que a dosis que van desde 5.5 a 27.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se provocan inhibiciones de más del 75% y la moderada desde un 50 a un 75% para la mayoría de las especies tratadas, estos resultados son comparables al efecto causado por la Azadiractina el cual es el compuesto natural más efectivo como antialimentario en la actualidad (Carpinella *et al.*,

2003). El modo de acción de los limonoides extraídos de distintas especies de Meliaceas puede darse a partir de una combinación entre un efecto antialimentario y una toxicidad post-digestiva (Céspedes *et al.*, 2000). En la Figura 2-4 se presenta la estructura de la Meliartenina, limonoide activo aislado de especies de la familia Meliáceae.

Figura 2-4. Estructura de Meliartenina



▪ Especies de *Piper*

Desde la antigüedad las especies de la familia Piperaceae se han utilizado tradicionalmente como fuente de insecticidas, y condimentos, ejemplo de esto es el uso de los frutos secos y molidos de la especie *Piper nigrum* (“pimienta negra”) en los cultivos de cereales en el antiguo Egipto, para evitar la infestación de plagas (Gonzales-Coloma, 2010). Estudios fitoquímicos realizados en la pimienta y en otras especies de Piperáceas han mostrado que las amidas llamadas comunmente “piperamidas” son los compuestos responsables de la actividad insecticida evidenciada en la mayoría de las especies de donde se extraen, por lo que la química y la acción insecticida ha sido objeto de importantes revisiones (Parmar *et al.*, 1997; Nascimento do *et al.*, 2012; Boonen *et al.*, 2012). A diferencia de los limonoides procedentes de las Meliáceas, las amidas extraídas de especies de *Piper*, presentan toxicidad aguda y propiedades “*knock down*” similares a los piretroides, pero parecen actuar sobre un receptor distinto; además de las piperamidas, las Piperáceas contienen compuestos con sustituyente metilendioxi y otros metabolitos secundarios como los derivados de los ácidos benzoico y cinámico que han mostrado interesantes propiedades insecticidas (Regnault-Roger *et al.*, 2003).

Se ha estudiado con detalle la utilización como insecticida de la “pimienta negra”, en Asia, y de la “pimienta de Guinea” en África (Koma y Omoregie, 2013). La especie americana *Piper tuberculatum* se ha convertido en una alternativa neotropical que posee una actividad insecticida similar a la encontrada en la pimienta negra y la pimienta de

guinea, ya que al igual que estas contiene piperamidas, con la ventaja de que estas se producen abundantemente en las hojas lo que no pasa con las especies africana y asiática. Además de la actividad observada para las amidas puras se ha observado que, cuando se mezclan (3 ó 4 piperamidas), se obtiene un producto mucho más tóxico que cuando se ensayan por separado. Este fenómeno de sinergismo análogo (o más exactamente de potenciación), se ha comprobado también en la pimienta negra. Una de las grandes ventajas de estas mezclas fitoquímicas es que retrasan la evolución de las resistencias de los fitófagos a los insecticidas (Regnault-Roger *et al.*, 2003). Las evidencias del potencial de las especies de Piperaceas como fuente de insecticidas, aunado a las demás actividades biológicas comprobadas que estas presentan han motivado diversos estudios fitoquímicos que muestran la variedad química estructural de la familia lo cual las hace un interesante objeto de investigación. A continuación se presenta una revisión de los principales tipos de compuestos aislados en especies de Piperaceas, haciendo énfasis en el género *Piper*, el más estudiado, abundante y al cual pertenecen las dos especies objeto de este estudio.

2.1.2 Metabolitos fijos aislados de la familia Piperaceae.

Las Piperaceas, hacen parte de uno de los grupos más fascinantes de plantas con semillas cubiertas, perteneciente al primer linaje que evolucionaron después del origen de las Angiospermas y a los cuales se les denomina a menudo “Angiospermas basales”. Además de la importancia que poseen por sobrevivir al proceso de “prueba y error” de la selección natural, son relevantes por su amplia distribución, importancia económica, utilidad etnobotánica, acciones biológicas comprobadas y diversidad química (Dyer y Palmer, 2004). En este sentido, impulsados por la reconocida diversidad etnobotánica de muchas especies de la familia Piperaceae, múltiples grupos de investigadores han desarrollado estudios fitoquímicos que arrojaron como resultado una amplia variedad química; los reportes de literatura principalmente documentan la presencia de amidas, lignanos, terpenos, flavonoides, cromenos, derivados de ácido benzoico y pironas. (Ayyanar y Ignacimuthu, 2011; Ghorbani *et al.*, 2011; Krief *et al.*, 2005; Nunkoo y Mahomoodally, 2012; Picking *et al.*, 2011; Sandberg *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2013) A continuación se presentará una breve descripción de las características más relevantes de los compuestos comúnmente aislados del género *Piper* al cual pertenecen las especies objeto de estudio.

▪ **Amidas**

Llamadas en un principio alcaloides ya que en muchos casos el nitrógeno amídico forma parte de un ciclo, sin embargo a pesar de que poseen esta característica estructural que las hace similar a los alcaloides, difieren de ellos en otras características químicas propias de estos y posteriormente se convino en llamarlas alcanidas como también muy comúnmente se conocen (Molina, 2001). Las amidas son compuestos comunes en los seres vivos ya que están presentes en los enlaces de todas las proteínas de los organismos, sin embargo las amidas como producto natural vegetal están presentes en 26 familias de plantas siendo representativa su presencia en las familias Asteraceae, Solanaceae, Piperaceae y Rutaceae (Boonen *et al.*, 2012). Desde el punto de vista biosintético las alcanidas representan una clase de productos naturales que se forman de un ácido graso y una amina proveniente de un aminoácido por descarboxilación al momento de la condensación (Molina, 2001).

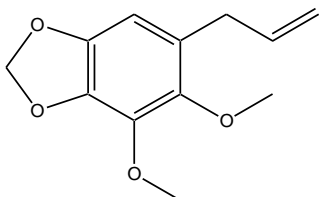
Las amidas aisladas del género *Piper* son de varios tipos dependiendo los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno, se encuentran principalmente isobutílicas, piperínicas, piperidínicas, pirrolidínicas, alquil amidas y lactamas, en las cuales existen características estructurales a saber: la cadena derivada de la fracción de ácido graso es normalmente de 6 a 26 carbonos que algunas veces se encuentra unido a un anillo aromático, el cual a menudo es un fenil etilo sustituido en la posición 3,4 del anillo por un grupo metilendioxi; cuando no existe sustituyente aromático, la cadena de ácido graso posee un número par de átomos de carbono; al igual que en la familia Rutáceae se encuentran un gran número de amidas derivadas del ácido cinámico (Boonen *et al.*, 2012). Existen revisiones que recopilan los trabajos de diversas investigaciones que reportan la presencia de amidas principalmente en el género *Piper* de las cuales las más completas son las realizadas por Parmar y colaboradores en 1997 (Parmar *et al.*, 1997) y Nascimento y colaboradores en el 2012 (Nascimento *et al.*, 2012). En la primera se reúnen los trabajos publicados desde 1907 hasta 1996, reportando 144 estructuras diferentes de amidas presentes en 67 especies diferentes de *Piper*; en la segunda se describen los resultados del estudio de 158 especies vegetales del mismo género de las cuales se obtuvieron 277 amidas diferentes. Las revisiones mencionadas anteriormente evidencian que las amidas además de ser metabolitos diversos desde el punto de vista estructural, presentan una amplia gama de actividades biológicas, de las cuales la actividad insecticida es relevante y está ampliamente documentada (Ahmad *et al.*, 2012; Boonen *et al.*, 2012; Gulzar *et al.*,

2013; Kitayama *et al*, 2013; Scott *et al*, 2002; Scott *et al*, 2008), hecho que ha permitido catalogar a las especies de la familia Piperaceae como fuente potencial de insecticidas que poseen dos características importantes: la variedad de efectos que causan entre los que se cuentan toxicidad por ingestión y por contacto, sinergia, repelencia, efecto antialimentario; y la diversidad de órdenes de insectos a los cuales afectan convirtiéndolos en probables insecticidas de amplio espectro (Scott *et al*, 2008). En la Tabla 2-1 se presentan algunos ejemplos estructurales de amidas aisladas del género *Piper* con la actividad biológica determinada para cada una.

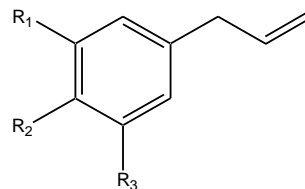
▪ Fenil Propanoides

Los fenil propanoides son metabolitos secundarios provenientes de la ruta biosintética del ácido shiquímico y su precursor es el ácido cinámico, el cual es obtenido por aminación reductiva desde fenil alanina (Dewick P, 2002); están formados por un anillo aromático unido a una cadena de tres carbonos comúnmente nombrados como C₆-C₃. Los fenil propanoides son comúnmente encontrados en los aceites esenciales de las especies de *Piper*, sin embargo en algunas especies se reporta su presencia dentro de las fracciones no volátiles. En la Figura 2-5 se presentan algunos ejemplos de metabolitos C₆-C₃ aislados de especies de *Piper* con la actividad biológica determinada.

Figura 2-5. Ejemplos de C₆-C₃ aislados de Piperaceae.

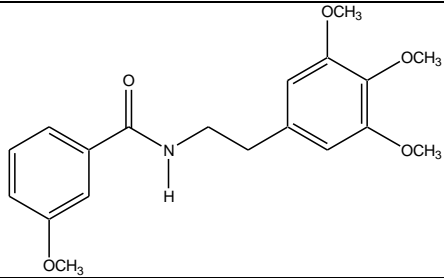
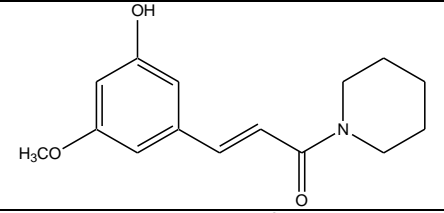
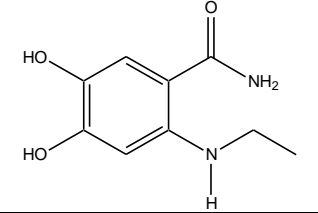
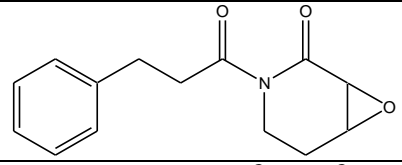
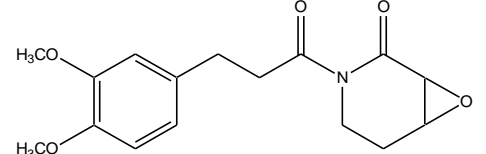


Dilapiol. Aislado de hojas de *Piper aduncum*, actividad insecticida contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera) (Bernard C *et al*, 1995)

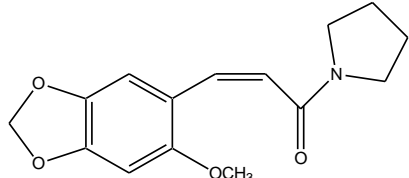
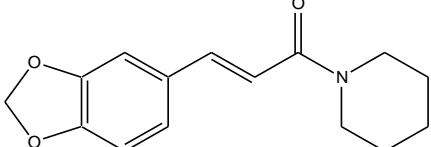
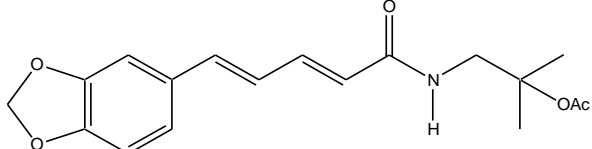
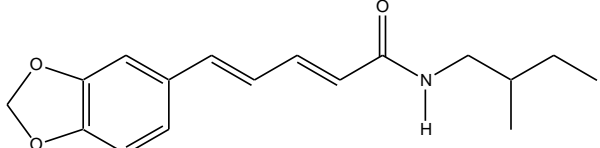
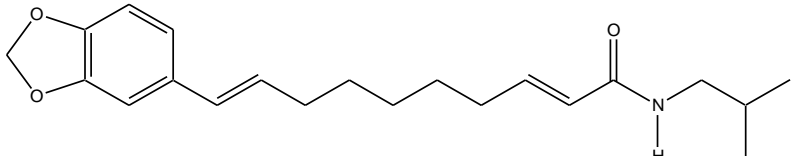
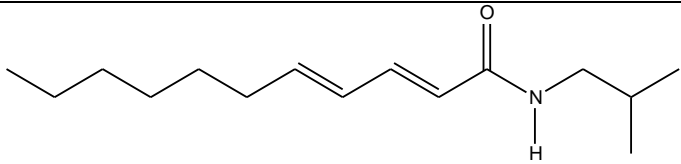


R₁=OAc, R₂=OAc, R₃=OCH₃, 2,3-Diacetoxi-1-metoxi-5-aililbenceno. R₁=OH, R₂= OH, R₃= H, 4-ailil-catecol Aislados de *Piper taiwaense*. Inhibidores de agregación plaquetaria. (Chen S *et al*, 2013)

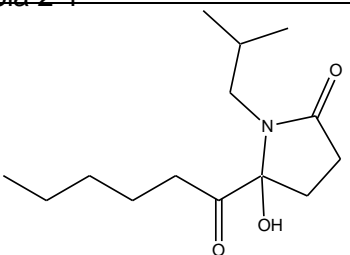
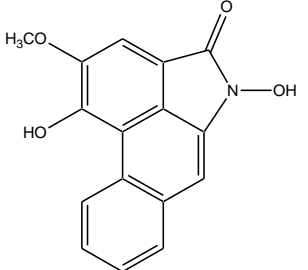
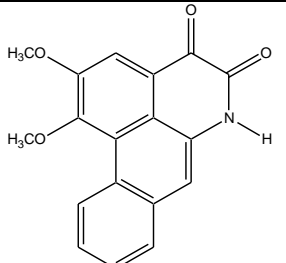
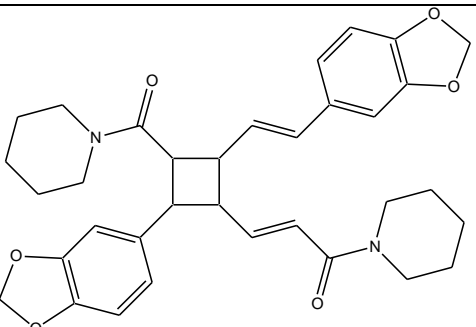
Tabla 2-1. Ejemplos de amidas aisladas de especies de Piperaceae y su actividad biológica (Nascimento do J, 2012)

Estructura	Nombre	Actividad Biológica	Especie vegetal
	Tawainamida B	Anti agregación plaquetaria	<i>Piper taiwaense</i>
	1-(3'-hidroxi-5'.metoxicinamoil)-piperidina	Antiinflamatorio	<i>Piper galeatum</i>
	3',4'-dihidroxi-6'-(N-etilamina)-benzamida	Antioxidante	<i>Piper nigrum</i>
	Kausina	Antiplasmodial	<i>Piper capense</i>
	Piplaroxido	Insecticida	<i>Piper tuberculatum</i>

Continuación Tabla 2-1

	<p><i>N</i>-(2<i>Z</i>)-[3-(2'-etoxi-4',5'-metilendioxiifenil)prop-2-enoyl]pirrolidina</p>	<p>Antifúngica</p>	<p><i>Piper tuberculatum</i></p>
	<p><i>N</i>-<i>trans</i>-(3', 4'-metilendioxi-cinamoil)-piperidina</p>	<p>Enzimática</p>	<p><i>Piper nigrum</i> – <i>Piper novae</i></p>
	<p>(2<i>E</i>,4<i>Z</i>)-scutifoliamida B</p>	<p>Antifúngica</p>	<p><i>Piper scutifolium</i></p>
	<p>Piperchabamida E</p>	<p>Hepatoprotectora</p>	<p><i>Piper chava</i></p>
	<p>Retrofractamida C</p>	<p>Enzimática</p>	<p><i>Piper nigrum</i></p>
	<p>Pellitorina</p>	<p>Antifúngica, antituberculosa, inhibición de adhesión celular, insecticida, enzimática, antiagregación plaquetaria</p>	<p><i>Piper tuberculatum</i>, <i>Piper arboreum</i>, <i>Piper sarmentosum</i>, <i>Piper longum</i>, <i>Piper attenuatum</i>,</p>

Continuación Tabla 2-1

 <p>Chemical structure of N-isobutyl-4-hexanoil-4-hydroxypiperidin-1-one, showing a piperidine ring with a carbonyl group at position 1, a hydroxyl group at position 4, and an isobutyl group at position 3. A hexanoyl chain is attached to the carbon at position 4.</p>	N-isobutil-4-hexanoil-4-hidroxi-pirrolidin-1-ona	-	<i>Piper nigrum</i>
 <p>Chemical structure of Piperumbellactama A, a complex polycyclic molecule featuring a benzene ring fused to a piperidine ring, with a hydroxyl group and a methoxy group on the benzene ring, and a hydroxyl group on the piperidine ring.</p>	Piperumbellactama A	Antioxidante	<i>Piper umbellatum</i>
 <p>Chemical structure of Norcefardiona B, a complex polycyclic molecule featuring a benzene ring fused to a piperidine ring, with two methoxy groups on the benzene ring and a carbonyl group on the piperidine ring.</p>	Norcefaradiona B	Antiagregación plaquetaria	<i>Piper attenuatum</i> , <i>Piper boehimerifolium</i> , <i>Piper hamiltonii</i> , <i>Piper longum</i>
 <p>Chemical structure of Dipiperamida E, a complex polycyclic molecule featuring a central piperidine ring fused to a benzene ring, with two piperidine rings attached to the benzene ring via amide linkages.</p>	Dipiperamida E	Enzimática	<i>P. nigrum</i>

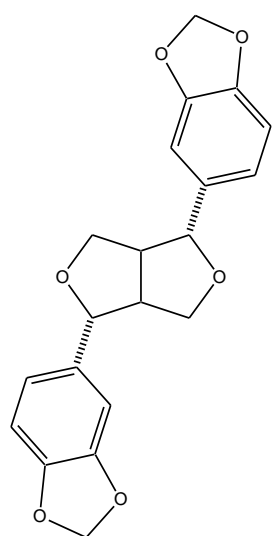
- **Lignanos y Neolignanos**

En las especies de la familia Piperaceae se encuentran lignanos de diferentes tipos dependiendo el núcleo que se origine en el acoplamiento, los más comúnmente encontrados son: lignanos furofuránicos también conocidos como 1,3-benzodioxanos, lignanos diarilbutánicos, y lignanos tetrahidrofuránicos también conocidos como epoxilignanos; estos metabolitos son muy apreciados por la variedad de actividades biológicas que poseen (Ayres y Loike, 1990).

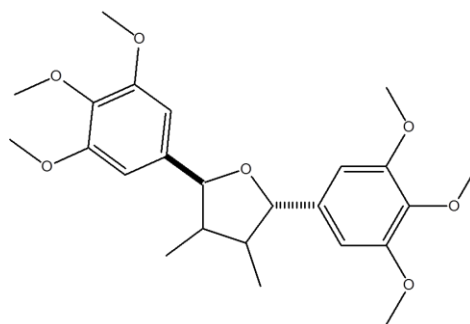
El primer lignano aislado de una especie de Piperaceae fue la Sesamina, lignano furofuránico presente en *P. austrosinense*, *P. brachystachyum*, *P. clusii*, *P. cubeba*, *P. guineense*, *P. longum*, y *P. peepuloides* (Parmar *et al.*, 1997). De la especie *P. solisianum* se aisló el lignano tetrahidrofuránico: (-)-Grandisina, el cual presenta actividad tripanocida (Maetins *et al.*, 2000), y causa cambios morfológicos y toxicidad en *Aedes aegypti* (Leite *et al.*, 2012).

En las especies del género *Piper* se han reportado diferentes tipos de neolignanos los cuales se originan cuando el dímero que se genera en el acoplamiento oxidativo se da por una unión de dos posiciones diferentes a las posiciones 8-8', como sucede en los lignanos. De la especie *Piper decurrens* se aisló el neolignano 2,3-dihidrobenzofuránico Conocarpano, el cual tiene actividad insecticida contra la larva *Ostrinia nubilalis*, responsable de las pérdidas de cultivos de maíz en Europa y América del Norte (Chauret *et al.*, 1996), además tiene una potente actividad antifúngica contra hongos patógenos de los géneros *Microsporium* y *Trichophyton* como sucede con otro neolignano del mismo tipo denominado Eupamatenoide aislado de *Piper solisianum* (De Campos *et al.*, 2005). De la especie *P. taiwaense* se aisló el neolignano Neotaiwanosol A el cual ejerce un efecto importante de anti agregación plaquetaria comparado con la aspirina (Chen *et al.*, 2013). En la Figura 2-6 se presentan las estructuras de algunos lignanos y neolignanos aislados de especies de *Piper*

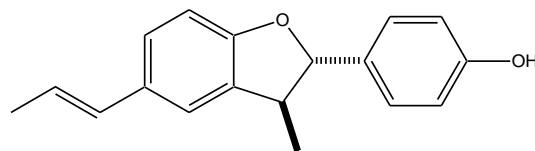
Figura 2-6 Estructuras de lignanos y neolignanos aislados de especies de *Piper*



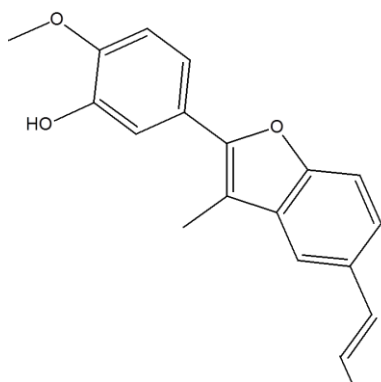
Sesamina



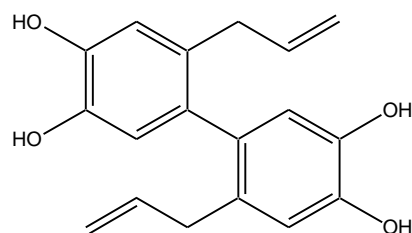
Grandisina



Conocarpano



Eupamatenoida



Neotaiwanensol A

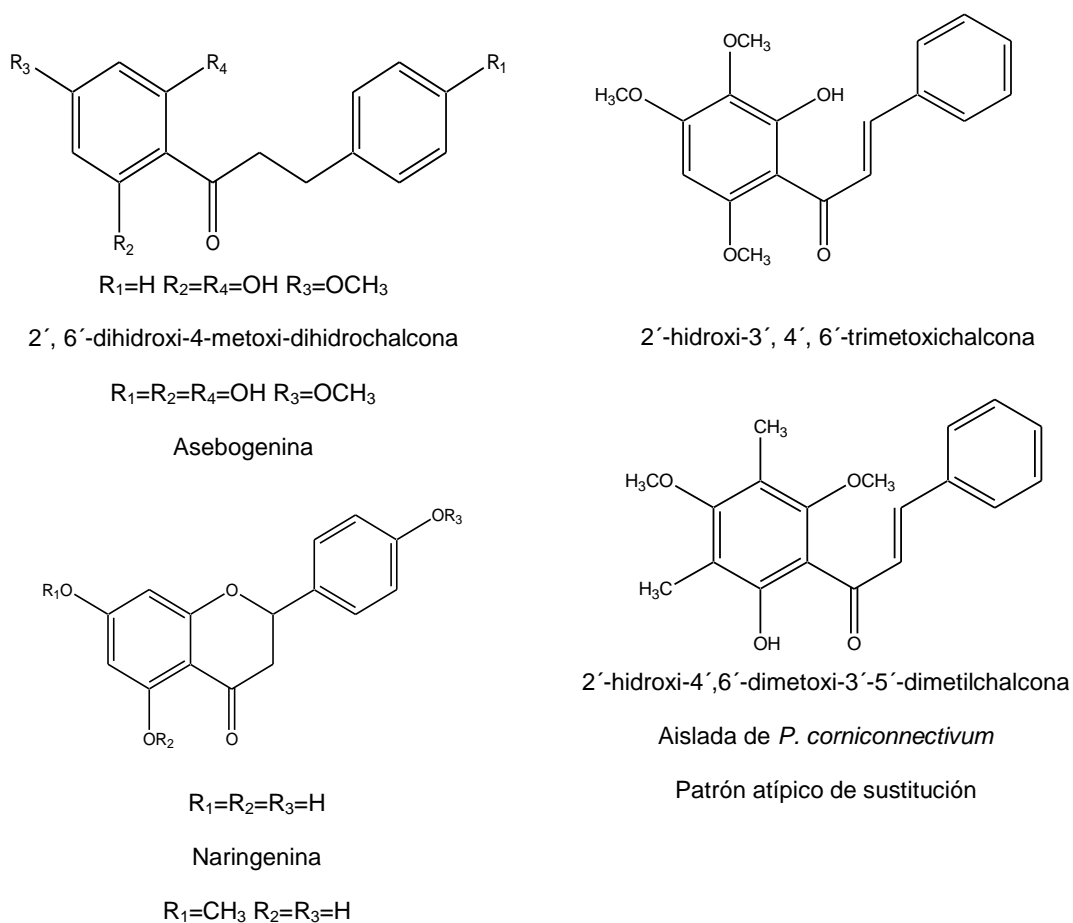
▪ Flavonoides

En las especies del género *Piper*, se reporta la presencia de flavonoides de núcleo chalcona, dihidrochalcona, flavanona y flavona principalmente, los cuales se encuentran en alta cantidad y tienen como característica estructural común, la baja oxigenación en el anillo B (Parmar *et al.*, 1997; Facundo *et al.*, 2012).

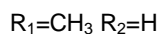
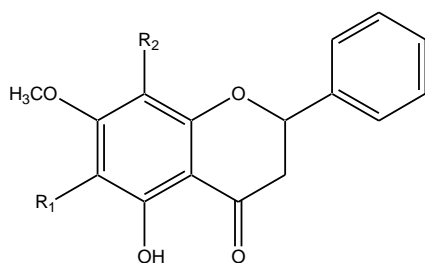
De la especie *P. elongatum* se aislaron dos dihidrochalconas con actividad leishmanicida 2',6'-dihidroxi-4-metoxi-dihidrochalcona y Asebogenina (Hermoso *et al.*, 2003); estudios realizados sobre la especie *P. hispidum* en 2011 evidenciaron la presencia de chalconas como la 2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxichalcona, la cual mostró un importante inhibición de los amastigotes de *Leishmania amazonensis*, además posee un patrón de oxigenación que no es común de encontrar en la familia Piperaceae (Ruiz *et al.*, 2011).

Flavonoides con núcleo flavanonona naringenina y sakuretina fueron aislados de la especie *P. crassinervium*, estas sustancias presentan actividad contra cepas de hongos fitopatógenos del género *Cladosporium* (Danelutte *et al.*, 2003). De la especie *P. corniconnectivum* (Facundo *et al.*, 2004) y *P. alatabaccum* (Trindade *et al.*, 2012) se aislaron metabolitos secundarios con diferentes núcleos flavonoides con patrones de sustitución totalmente atípicos (sustituyente en las posiciones 6,8 y 5' en flavanonas y flavonas; y 3', 5 en las chalconas), es importante destacar que las flavonas con esta característica estructural presentan actividades larvicidas interesantes sobre *Anopheles darlingi* vector de la malaria en algunas regiones de la Amazonía (Trindade *et al.*, 2012). En la Figura 2-7 se presentan las estructuras de algunos flavonoides aislados de especies del género *Piper*.

Figura 2-7. Estructuras de flavonoides aislados de especies de *Piper*.



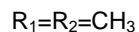
Continuación Figura 2-7



5-hidroxi-7-metoxi-6-metil-flavanona



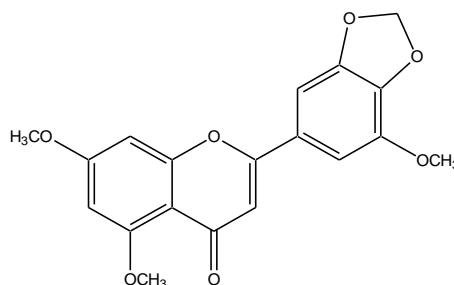
5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona



5-hidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavanona

Aislados de *P. corniconnectivum*

Patrón atípico de sustitución



5,5',7-trimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavona

Aislada de *P. alatabaccum*

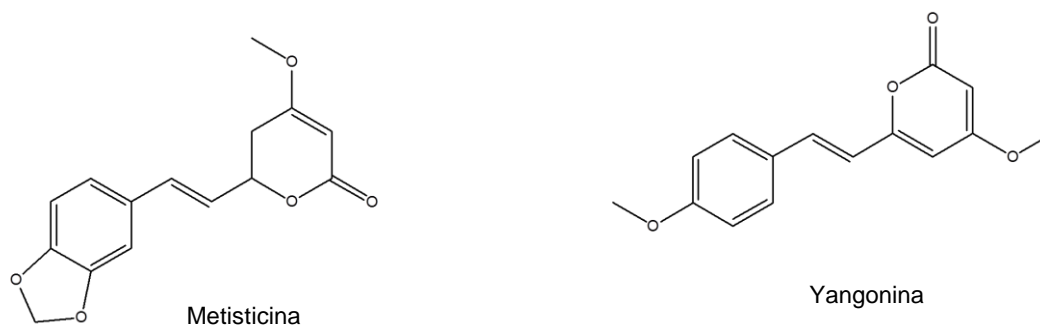
Patrón atípico de sustitución

▪ α -Pironas

Las α -pironas son metabolitos secundarios derivados de ácido acético formados a través de un tricétido. En la familia Piperaceae están restringidos a la especie *Piper metisticum* por lo que se consideran marcadores quimiotaxonómicos de dicha especie, sin embargo a pesar de su escasa distribución son muy relevantes, por ser los compuestos responsables del efecto relajante atribuido a la bebida elaborada a partir de las raíces de la especie en mención, desde la antigüedad en Oceanía y Tailandia, y que actualmente es comercializada en todo el mundo como kava-kava, por tal razón las α -pironas aisladas de esta especie se denominan comúnmente kavapironas (Gurib-Fakim, 2006).

Estructuralmente las kavapironas se caracterizan por la sustitución del anillo de la α -pirona, en el cual está presente un grupo estiril o dihidroestiril. En general las kavapironas actúan como agentes antagonistas de la estricnina, un poderoso agente que induce convulsiones y posee una acción letal; la metisticina es la kavapirona que posee el efecto antagonista más marcado según un experimento realizado en ratones, la Yangonina además de su efecto relajante, inhibe el crecimiento de la Ameba *Entamoeba histolítica* (Parmar *et al.*, 1997). En la Figura 2-8 se presentan las estructuras de las α -pironas aisladas de la especie *Piper metisticum*.

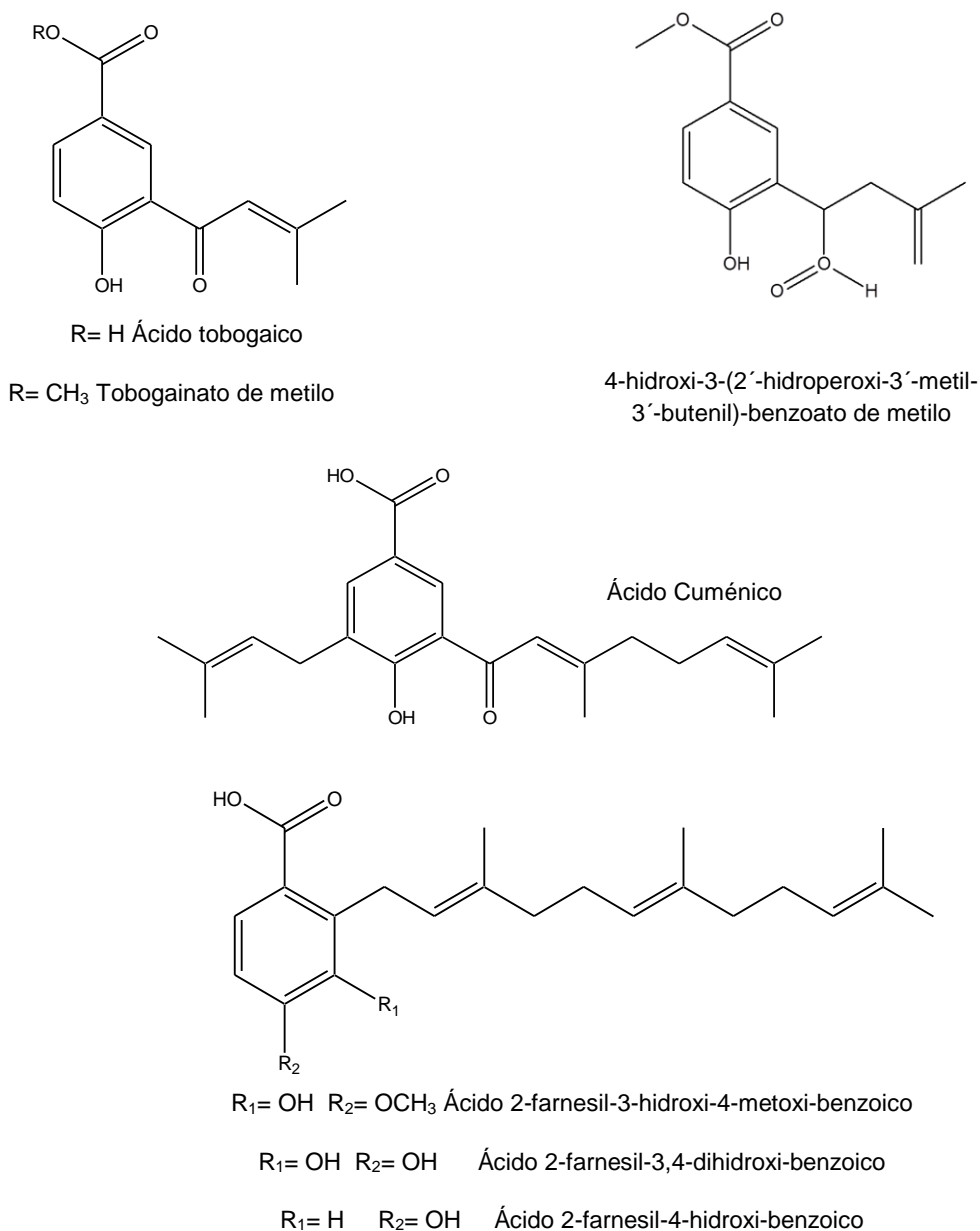
Figura 2-8. Estructuras de α -pironas aisladas de *Piper metisticum*



▪ Derivados de ácido benzoico

Comparados con las amidas, los flavonoides y los fenil propanoides, los derivados del ácido benzoico son metabolitos aislados en menor cantidad en especies de Piperaceas, sin embargo revisten importancia por la actividad fungicida e insecticida que la mayoría de estos compuestos posee. Estructuralmente se caracterizan porque sobre el anillo aromático existe al menos un sustituyente prenilado cuyo número de carbonos oscila entre 5 y 20, que puede ser hidrocarbonado o presentar grupos carbonilo. Los metabolitos ácido tobogaico, toboganato de metilo aislados de la especie *P. dilatatum* (Terreaux *et al.*, 1998) y el 4-hidroxi-3-(2'-hidroperoxi-3'-metil-3'-butenil)-benzoato de metilo (Lago *et al.*, 2009) aislado de la especie *P. aduncum*, poseen actividad fungicida contra hongos del género *Cladosporium*; el compuesto cuyo sustituyente prenilo tiene el grupo hidroperóxido, posee una actividad *in vitro* similar a los antifúngicos comerciales usados como controles positivos empleados en el ensayo (Nistatina y Miconazol) (Lago *et al.*, 2009). De la especie *P. cumanense* Kunth se aisló el ácido cuménico el cual mostró actividad contra dos hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi* que causa marchitamiento vascular en clavel y *Botritis cinerea* causante de antracnosis en diversas frutas y hortalizas (Parra *et al.*, 2013).

De la especie *P. arieianum* se aislaron tres derivados de ácido benzoico hidroxiprenil sustituidos: ácido 2-farnesil-3-hidroxi-4-metoxi-benzoico, ácido 2-farnesil-3,4-dihidroxi-benzoico, y ácido 2-farnesil-4-hidroxi-benzoico; los cuales poseen actividad pungente, la cual es característica para isobutil amidas o sustancias con grupos piperidínicos (Correa *et al.*, 2011). En la Figura 2-9 se presentan algunos ejemplos de estructuras de derivados de ácido benzoico aislados de especies de Piperaceas.

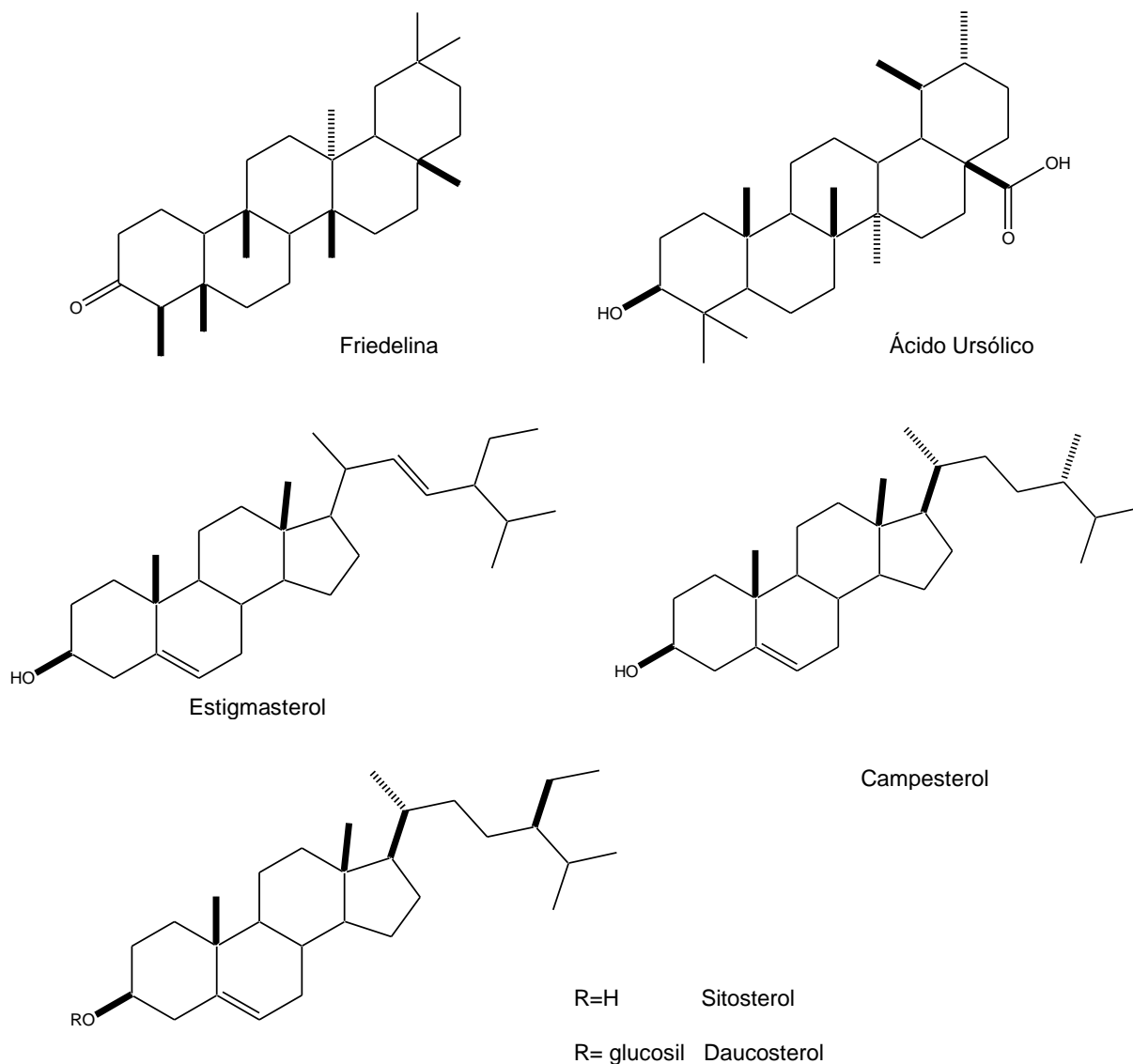
Figura 2-9. Estructuras de derivados de ácido benzoico aislados de Piperaceae.

▪ Triterpenos y Esteroles

Al igual que en muchas especies vegetales, en el género *Piper* se reporta la presencia de metabolitos tipo triterpeno y esterol. Los triterpenos aislados son principalmente de núcleo ursano y friedelano, dichos compuestos son apreciados por la variedad de actividades biológicas que presentan, principalmente antiinflamatoria; los esteroles comunes en plantas como el sitosterol, campesterol, estigmasterol y daucosterol han sido aislados en diferentes especies del género *Piper* (Parmar *et al.*, 1997). En la Figura 2-10

se presentan las estructuras de algunos triterpenos y esteroides aislados de especies de *Piper*.

Figura 2-10. Estructuras de triterpenos y esteroides aislados de especies de *Piper*



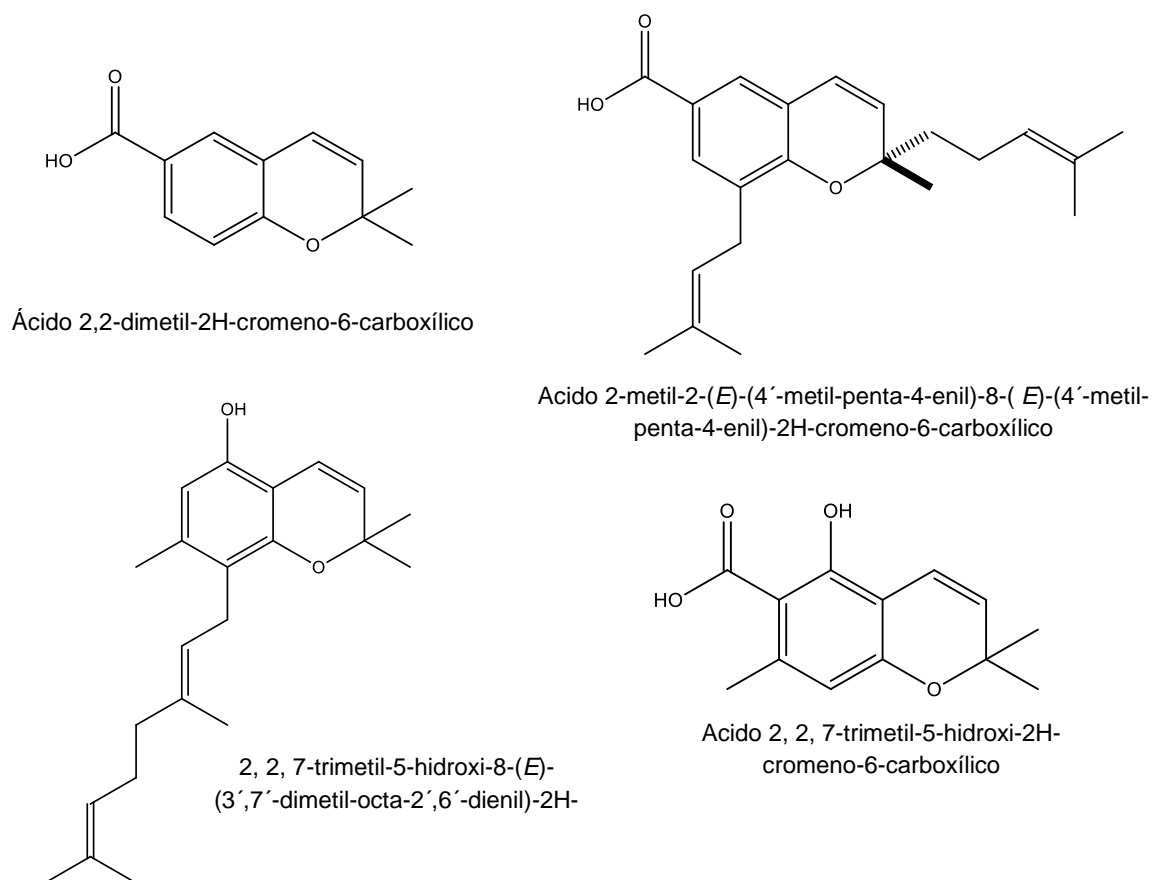
▪ Cromenos

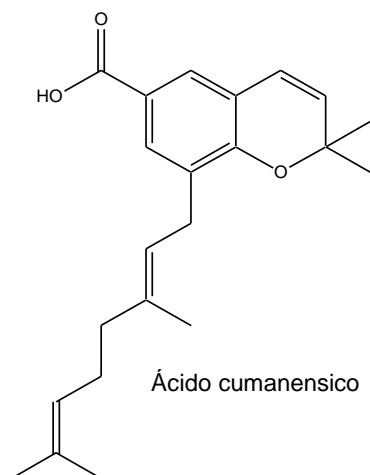
Los cromenos son metabolitos secundarios derivados biosintéticamente de ácido acético, obtenidos por C-isoprenilación de una acetofenona polihidroxilada. Se ha reportado su presencia en especies de los géneros *Peperomia* y *Piper*, muchas de estas sustancias han sido objeto de investigación por las importantes actividades antifúngicas *in vitro* que poseen, la mayoría tiene al menos un sustituyente isoprenilo o geranilo. De la especie

Piper aduncum se aisló el cromeno: ácido 2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxílico, el cual posee actividad anticancer (Baldoqui *et al.*, 1999). De las especies *Piper gaudichaudianum* (Lago *et al.*, 2004), *Peperomia sarpens* (Saga *et al.*, 2006) y *Peperomia villipetiola* (Malquichagua *et al.*, 2007), se aislaron los cromenos: Acido 2-metil-2-(*E*)-(4'-metil-penta-4-enil)-8-(*E*)-(4'-metil-penta-4-enil)-2H-cromeno-6-carboxílico y 2, 2, 7-trimetil-5-hidroxi-8-(*E*)-(3',7'-dimetil-octa-2',6'-dienil)-2H-cromeno respectivamente; los cuales poseen actividad antifúngica contra hongos del género *Cladosporium*.

De la especie *Piper cumanense* Kunth, se aisló el cromeno ácido cumanensico, el cual posee una importante actividad *in vitro*, contra el hongo causante del marchitamiento vascular en clavel *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* comparable al control positivo usado en el ensayo el cual corresponde a un fungicida comercial cuyo principio activo es Benomyl (Parra *et al.*, 2011). En la Figura 2-11 se presentan algunos ejemplos de estructuras de cromenos aislados de especies de Piperaceas.

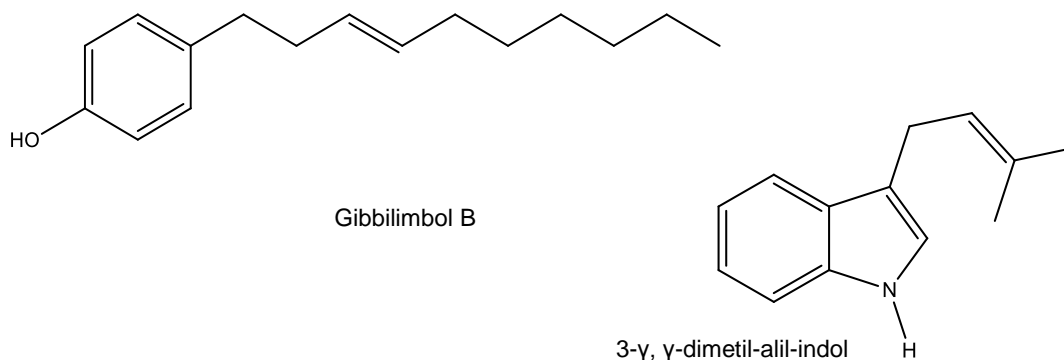
Figura 2-11. Cromenos aislados de especies de Piperaceae



Continuación figura 2-11**▪ Compuestos de estructura miscelánea**

En menor cantidad con relación a los compuestos descritos anteriormente, en especies del género *Piper* se han aislado metabolitos con estructuras variadas como aminoácidos, ácidos grasos, hidrocarburos; alcoholes, carbohidratos, entre otros. Una completa revisión de estos se encuentra en la publicación de Parmar y colaboradores de 1997 (Parmar *et al.*, 1997). En los últimos años se han aislado sustancias que vale la pena mencionar ya sea por la actividad biológica que poseen o por la importancia química que revisten para la familia; tal es el caso de alquenil fenoles aislados de las especies *P. obliquum* (Valdivia *et al.*, 2008), *P. gibbilimum* (Orjala *et al.*, 1998), *P. villiramulum* (Galinis *et al.*, 1993) y *P. malacophyllum* (De Oliveira *et al.*, 2012), ejemplo de este tipo de metabolitos es el Gibbilimbol B, el cual posee actividad leishmanicida y tripanocida. De la especie *P. aleyreanum* se aisló el primer alcaloide indólico reportado en especies de la familia Piperaceae el cual se denominó 3-(γ , γ -dimetil-alil)-indol (Facundo *et al.*, 2012). En la Figura 2-12 se presentan las estructuras de los metabolitos de estructura miscelánea aislados recientemente de especies del género *Piper*.

Figura 2-12. Metabolitos de estructura miscelánea aislados recientemente de especies del género *Piper*



La revisión anteriormente presentada evidencia el gran número de estudios fitoquímicos realizados sobre especies del género *Piper* y la variedad estructural y de actividades biológicas que presentan los compuestos aislados. Sin embargo todavía existen especies vegetales de la familia Piperaceae y en particular del género *Piper* con escasos o nulos estudios fitoquímicos y de actividad biológica. A continuación se presentará la metodología y los resultados obtenidos del estudio fitoquímico bioguiado y de actividad insecticida de las inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium*; especies sin estudios químicos y de actividad previos en lo que respecta a los metabolitos fijos.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 General

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron por efecto de la gravedad (CC), por aplicación de presión mediante cromatografía flash (CF) y por aplicación de vacío mediante cromatografía líquida al vacío (CLV). La fase estacionaria utilizada para la purificación por CC fue sílica gel 60 Merck® (70-230 Mesh), para la CF fue sílica gel 60 (230-400 Mesh) Macherey–Nagel® y para CLV sílica gel 60HF₂₅₄ Merck. Las separaciones cromatográficas en capa delgada preparativa (CCDP) se realizaron en placas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck de 1 mm de espesor. Los estudios cromatográficos, el monitoreo de las cromatografías en columna y preparativa y el control de pureza se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck, utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 y 365 nm) y vainillina/H₃PO₄. Los solventes empleados para las separaciones cromatográficas fueron grado técnico (destilados y secados antes de su uso) y grado analítico.

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados en un espectrómetro Bruker Avance operando a 400 MHz (¹H), 100 MHz (¹³C); empleando como solventes: cloroformo deuterado (CDCl₃), acetona deuterada (CD₃)₂CO, metanol deuterado (CD₃OD), y dimetil sulfóxido deuterado (DMSO *d*₆). Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en hercios (Hz). Las multiplicidades están asignadas como sigue: s = simplete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, dd = doble doblete.

Los análisis de masas se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosistem GCMS usando como método de ionización impacto electrónico (IE) y en el espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 Plus Bruker, acoplado a un cromatógrafo líquido Agilent 1100, usando como método de ionización electrospray en modo negativo (ESI). Los fragmentos significativos se indican como *m/z* (intensidad relativa al pico base=100), con masa exacta determinada para el ión molecular (M) o fragmento iónico adecuado. La rotación óptica se determinó en un equipo Atago-Polarimeter Polax-L.

2.2.2 Material Vegetal

El material vegetal corresponde a las inflorescencias del árbol *Piper submentosum* Trel & Yunck y la parte aérea de la enredadera *Piper septuplinervium* (Miq) C.D.. Las especies fueron colectadas en la vereda San José bajo del municipio de Granada, Cundinamarca, Colombia, en agosto de 2010 por miembros del grupo de investigación en Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceas y Miristicáceas colombianas. Las muestras fueron determinadas por el Biólogo Adolfo Jara Muñoz del Herbario Nacional Colombiano, en donde reposan los especímenes de herbario con los números de colección COL-517695 (*P. septuplinervium*) y COL-516758 (*P. submentosum*).

2.2.3. Material Biológico

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) fueron colectadas en el municipio del Espinal, Tolima, Colombia; en cultivos de sorgo y maíz sin aplicación previa de insecticidas. El mismo día de la recolección fueron llevadas a un cuarto de cría ubicado en el Laboratorio de Biopesticidas-entomología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Las larvas se mantuvieron en dieta artificial (Lopez S *et al*, 2010), en condiciones controladas correspondientes a 28 ± 2 °C y $65 \pm 5\%$ de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz-oscuridad). El pie de cría fue renovado anualmente evitando superar la novena generación (Ceron J y Bravo A, 2004).

2.2.4. Determinación de actividad insecticida

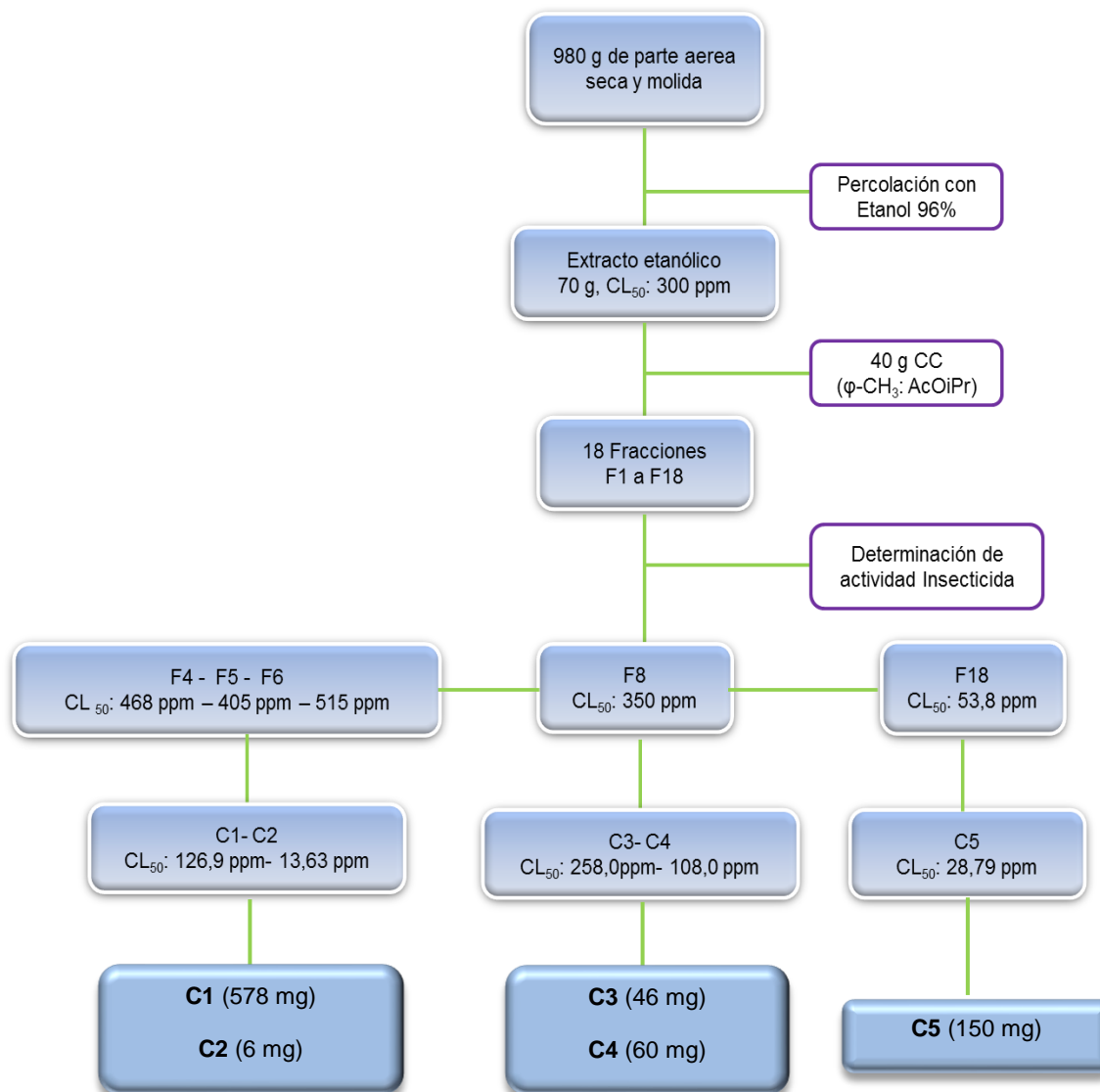
Los extractos, fracciones, y compuestos puros fueron evaluados frente a larvas de primer instar de *S. frugiperda* en diferentes rangos de concentraciones dependientes de la muestra evaluada. En cajas de 24 pozos de poliestireno se colocó dieta artificial, y sobre cada pozo se aplicó un volumen constante de la disolución a ensayar a la concentración deseada. Dieciséis larvas neonatas fueron analizadas por concentración de muestra por triplicado. Una larva de primer instar se añadió por pozo y la lectura de la mortalidad se registró después de siete días de incubación a 28 ± 2 °C y $65 \pm 5\%$ de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz-oscuridad). La concentración a la que el 50% de las larvas sobrevivieron fue estimada por el análisis Probit. Como controles positivos del ensayo se usaron dos insecticidas comerciales Lorsban® y Xen Tari®; como controles relativos se usaron DMSO R.A., acetona R.A: y como control absoluto se usó dieta artificial.

2.2.5. Estudio fitoquímico bioguiado de la parte aérea de *Piper septuplinervium*

La parte aérea seca y molida de *P. septuplinervium* (980 g) se sometió a extracción por percolación con etanol 96% a temperatura ambiente, el solvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida obteniéndose 70 g de extracto crudo. De este extracto, 40 g se fraccionaron por CC sobre sílica gel con la mezcla tolueno (ϕ -CH₃): acetato de isopropilo (AcOiPr) en polaridad creciente (90:10 \rightarrow 0:100) obteniéndose 18 fracciones; las cuales fueron sometidas al ensayo de determinación de actividad insecticida, en el que las fracciones F4 (CL₅₀= 468 ppm), F5 (CL₅₀= 405 ppm), F6 (CL₅₀= 515 ppm), F8 (CL₅₀=350 ppm), y F18 (CL₅₀=53.8 ppm), fueron seleccionadas para continuar con el estudio fitoquímico.

Teniendo en cuenta el comportamiento en CCD con varios sistemas de eluyentes se reunieron las fracciones F4 (1,2691g), F5 (6,3573 g) y F6 (3,8683g) para su posterior purificación; la fracción resultante denominada F4-6(11,4947 g), fue sometida a CC con la mezcla éter de petróleo (EdP): acetato de etilo (AcOEt) en polaridad creciente (70:30 \rightarrow 0:100) , y CF repetitivas con hexano-AcOEt-ácido fórmico (80:20:2) y hexano-acetona-ácido fórmico (85:15:2) obteniendo la dihidrochalcona conocida como uvangoletina **C1** (578 mg) y el flavonol conocido como galangina **C2** (6 mg). La fracción F8 (1.555 g) fue purificada mediante CC con el sistema de elución diclorometano (CH₂Cl₂) - metanol (MeOH) en polaridad creciente (95:5 \rightarrow 30:70), y CF sucesivas con las mezclas cloroformo (CHCl₃) - MeOH (95:5), CHCl₃-MeOH-ácido fórmico (95:5:2), hexano-acetona (70:30) (75:25); para obtener monopalmitato de glicerilo **C3** (46 mg) y *N-p*-cumaroil-tiramina **C4** (60 mg). De la fracción F18 por CC y CF eluyendo con los sistemas EdP-AcOiPr-ácido fórmico (50:50:1), y CH₂Cl₂-acetona-ácido acético (90:10:2) con posteriores lavados sucesivos con metanol se obtuvo el flavonoide crisina **C5** (150 mg). En la Figura 2-13 se resume el procedimiento llevado a cabo para el aislamiento bioguiado de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de parte aérea de *P. septuplinervium*.

Figura 2-13. Esquema general de extracción, fraccionamiento bioguiado del extracto de parte aérea de *P. septuplinervium*



2.2.6. Estudio fitoquímico bioguiado de las inflorescencias de *P. subtomentosum*

Las inflorescencias secas y molidas de *P. subtomentosum* (530 g) fueron extraídas por maceración con etanol 96% obteniendo 25 gramos de extracto etanólico. De este extracto 20 g fueron fraccionados por CLV usando solventes de polaridad creciente (EdP, CH₂Cl₂, AcOIPr, y MeOH). Las fracciones obtenidas fueron sometidas al ensayo de actividad insecticida en el que se seleccionó a las fracciones F CH₂Cl₂ (CL₅₀= 650 ppm) y

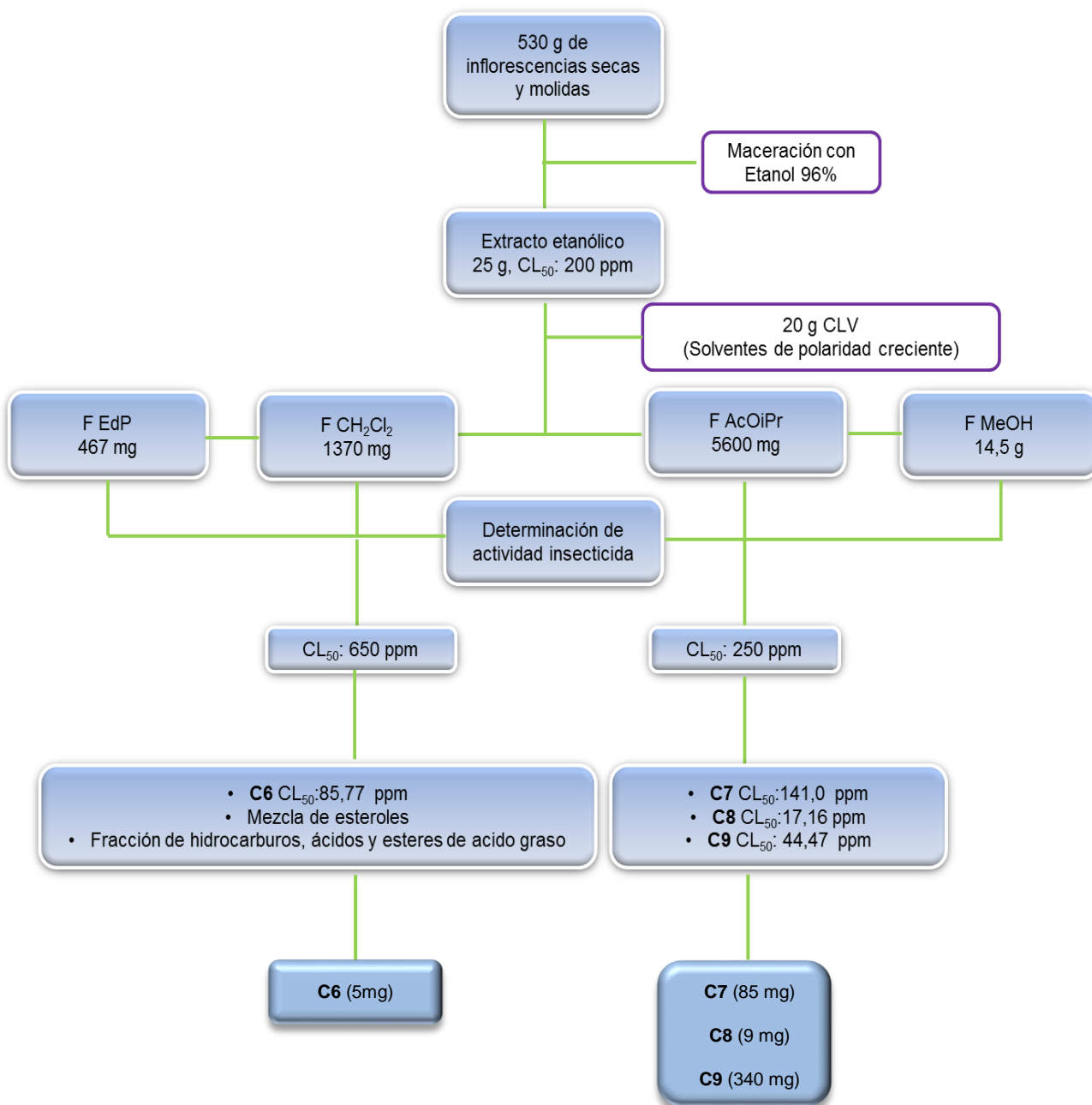
F. AcOiPr ($CL_{50}=250$ ppm) para continuar el estudio. De la fracción F. CH_2Cl_2 (1,370 g), por re-fraccionamiento mediante CLV con la mezcla tolueno-AcOiPr en gradiente de polaridad (90:10 \rightarrow 0:100) y posterior purificación por CF con los sistemas de elución hexano-acetona (85:15), heptano-AcOEt-ácido fórmico (90:10:2), hexano-AcOEt (85:15), CH_2Cl_2 -AcOEt (98:2) se obtuvo el flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona **C6** (5 mg), la mezcla de esteroides: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (150 mg); y una mezcla compleja de ácidos grasos, ésteres e hidrocarburos (1250 mg). De la fracción F. AcOiPr (5,6000 g), la cual fue sometida a CLV con la mezcla hexano-acetona en polaridad creciente (80:20 \rightarrow 0:100) y CF sucesivas con las mezclas de elución: hexano-AcOEt (75:25), CH_2Cl_2 -acetona-ácido fórmico (90:10:2), CH_2Cl_2 -MeOH (90:10), EdP-AcOEt-ácido fórmico (55:45:2), AcOiPr-ácido fórmico (100:2), $CHCl_3$ -MeOH-ácido fórmico (90:10:2), $CHCl_3$ -MeOH (70:30); se obtuvieron el flavonoide pinostrobin **C7** (85 mg), el ácido protocatéquico **C8** (9 mg), y el esteroide glicosidado daucosterol **C9** (340 mg). En la Figura 2-14 se resume el procedimiento llevado a cabo para el aislamiento bioquímico de los metabolitos secundarios de las fracciones activas del extracto etanólico de inflorescencias de *P. subtomentosum*.

2.2.7. Determinación del efecto de los extractos etanólicos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda*

Para determinar el efecto de los extractos de las especies objeto de estudio sobre el desarrollo del insecto *Spodoptera frugiperda*, se utilizó un ensayo biológico en el cual en vasos plásticos de una onza de capacidad se colocó dieta artificial hasta la mitad del volumen, en la superficie de la dieta se aplicaron soluciones de los extractos etanólicos a concentraciones inferiores a CL_{50} en cada caso calculadas con el programa Probit. Para cada tratamiento se prepararon 100 vasos y en cada uno de ellos se introdujo una larva neonata de *S. frugiperda*. Se dejó a las larvas alimentarse libremente por un lapso de 72 horas y luego cada 48 horas se retiraron aleatoriamente cinco vasos por tratamiento para registrar la longitud de cada larva y utilizarlo como indicador de retraso en función de los controles empleados. Una vez que el control alcanza el 80% de pupación, las unidades experimentales en todos los tratamientos se dividieron en 10 repeticiones de 5 vasos cada una. En cada repetición se evaluó el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de

pupa, el peso de estas, el número de pupas que alcanzaron el estado de adulto y el tiempo transcurrido entre los estadios de larva-pupa y pupa-adulto. Como control relativo se uso etanol y como control absoluto dieta artificial (Silva, 2010).

Figura 2-14. Esquema general de extracción, fraccionamiento bioquímico y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas de las inflorescencias de *P. subtomentosum*.



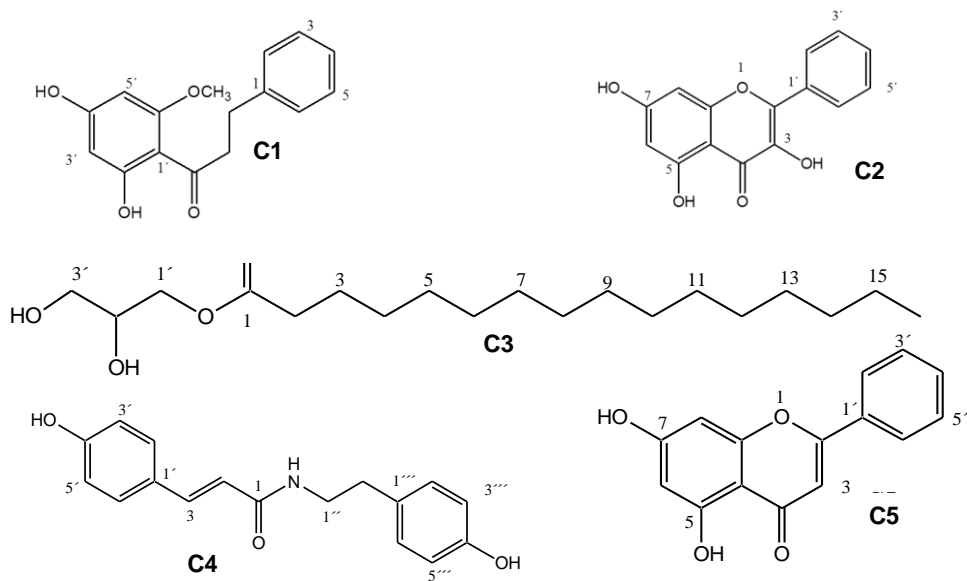
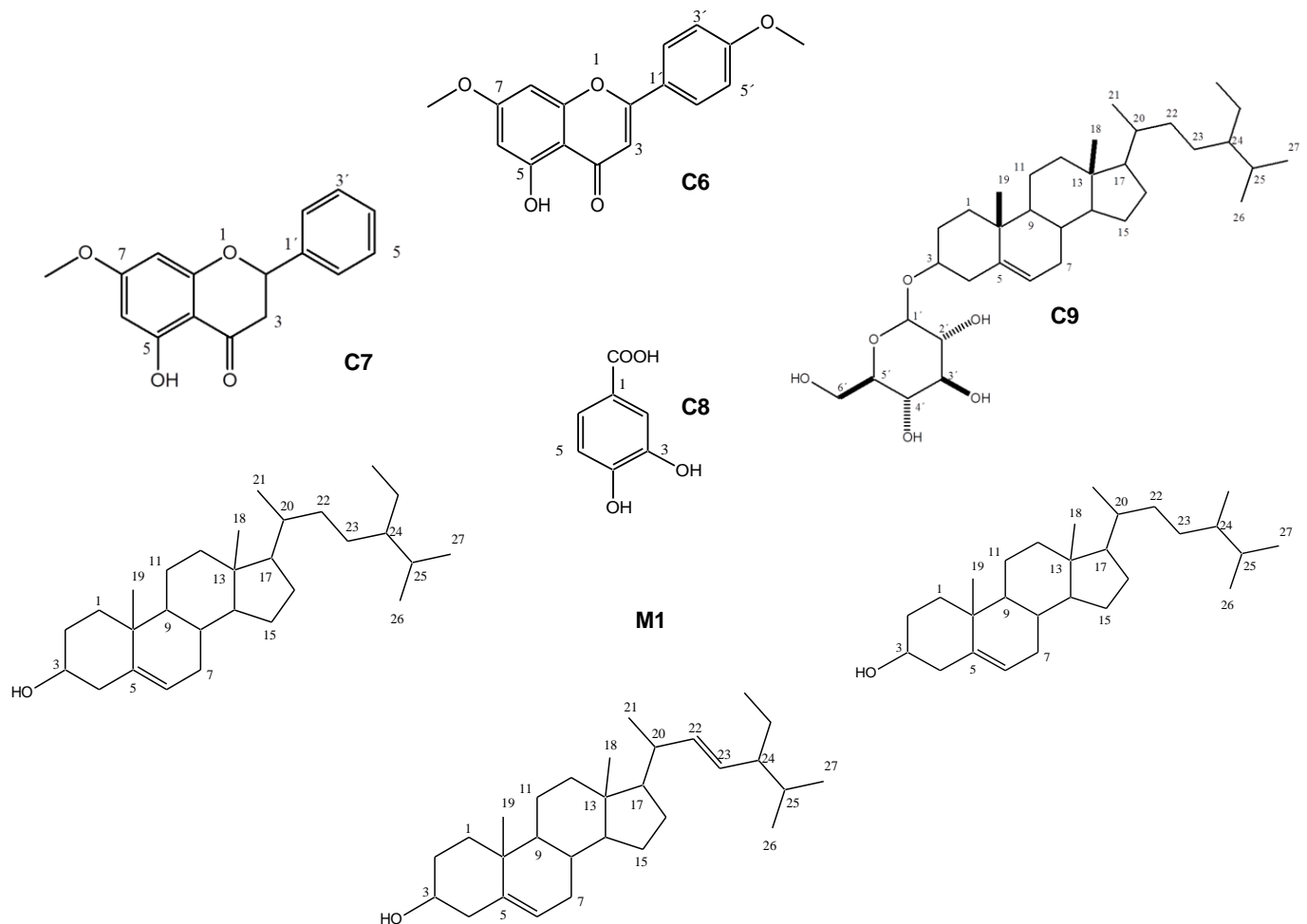
2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Estudio fitoquímico bioguiado de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum*.

2.3.1.1 Análisis espectroscópico

Después de la determinación de la mortalidad causada por los extractos etanólicos de diferentes órganos de veintidos especies de Piperaceae recolectadas en la región del Sumapaz medio y bajo occidental, se seleccionaron los extractos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* para realizar el estudio fitoquímico bioguiado, teniendo en cuenta que produjeron mortalidades apreciables de larvas de *S. frugiperda* en los ensayos preliminares realizados y además son especies vegetales que no tienen estudios de actividad biológica y composición química en lo referente a los metabolitos fijos. El fraccionamiento y posterior purificación de los extractos etanólicos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* permitió el aislamiento de cinco flavonoides: **C1**, **C2**, **C5**, **C6**, y **C7**; una amida **C4**, un acil glicerol **C3**, un derivado de ácido benzoico **C8**; un esteroil glicosidado **C9**, una mezcla de esteroides **M1** que de acuerdo al análisis por CG-EM se determinó que correspondía a los esteroides ampliamente distribuidos en plantas sitosterol, estigmasterol, y campesterol; y una mezcla **M2** que fue analizada por CG-EM determinando que correspondía a una compleja combinación de ésteres, hidrocarburos, y ácidos grasos. En las Figuras 2-15 y 2-16 se presentan las estructuras químicas de los metabolitos puros aislados de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum*, respectivamente.

Los compuestos obtenidos en este estudio son el primer reporte de composición química de las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum*; los metabolitos **C3**, **C4**, **C6**, **C7**, **C8** y **C9** han sido previamente aislados de especies vegetales del género *Piper*, (Parmar *et al.*, 1997; Plazas *et al.*; 2008) mientras que este es el primer reporte para el género de la presencia de los compuestos **C1**, **C2**, y **C5**. La determinación estructural de los compuestos **C1**, **C2**, **C4-C9**, se realizó por comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C con los reportados en la literatura.

Figura 2-15. Metabolitos aislados de la parte aerea de *P. septuplinervium*Figura 2-16. Metabolitos aislados de las inflorescencias de *P. subtomentosum*.

La apariencia física del compuesto **C3** hace presumir que corresponde a un metabolito de carácter lipídico, probablemente acil glicerol, para corroborar lo anterior se realizó el análisis por CG-EM. Para la asignación correcta del número de carbonos del fragmento de acilo se preparó el derivado sililado (Herebain *et al.*, 2005), el análisis del espectro de masas por impacto electrónico del derivado preparado, el cual se presenta en la Figura 2-19 permitió ver el fragmento $m/z=459$, correspondiente a $[M-15]^+$ ión formado por la pérdida de un grupo metilo, común en derivados sililado, (Bathia *et al.*, 2013) por lo que con la diferencia de 15 una se determina que el compuesto **C3** corresponde a la Monopalmitina, adicionalmente se comparó el perfil de masas con el reportado en la literatura para el derivado sililado de la Monopalmitina preparado a partir del acil glicerol presente en el extracto hexánico de *Withania somnifera* (Bathia *et al.*, 2013).

El compuesto **C4** es un sólido amorfo de color blanco soluble en metanol, con punto de fusión 244-245 °C, el espectro de RMN ^1H (Figura 2-20a) muestra señales a campo alto y bajo, lo que hace presumir que el compuesto posee en su estructura una parte alifática y una aromática. Las señales en δ 6,38 (d, $J=15,7$ Hz, 1H) y δ 7,44 (d, $J=15,7$ Hz, 1H) por su desplazamiento químico corresponden a protones sobre un doble enlace en posición *trans* (Crews *et al.*, 2010). Las señales en δ 6,72 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), δ 6,79 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), δ 7,05 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), y δ 7,40 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), por los valores de las constantes de acoplamiento, los desplazamiento y multiplicidades corresponden a protones ubicados en posición orto sobre anillo aromático 1-4 sustituido formando un sistema simétrico, por el numero de señales se infiere que en la estructura existen dos anillos aromáticos para sustituidos y simétricos. Finalmente las señales en δ 2,75 (t, $J=7,4$ Hz, 2H) y δ 3,46 (t, $J=7,4$ Hz, 2H) corresponden a metilenos que acoplan entre si de acuerdo al valor de la constante de acoplamiento, se encuentran formando una cadena corta sin acoplar con otro protón diferente por la multiplicidad de la señal.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 2-20 b) muestra la presencia de 13 señales, de las cuales las señales en 116,2 ppm, 116,8 ppm, 130,5 ppm, 130,7 ppm poseen el doble de la intensidad con respecto a las demás, lo que hace pensar que cada una corresponde a dos carbonos que deben ser equivalentes, de esta manera se confirma el sistema simétrico y de protones equivalentes observado en el espectro de RMN ^1H y descrito anteriormente, por lo que la estructura debe contener entonces 17 carbonos. El espectro de RMN ^{13}C muestra también la presencia de tres carbonos cuaternarios desplazados a campo bajo, las señales en 156,9 ppm y 160,5 ppm corresponden a carbonos

cuaternarios aromáticos oxigenados, y la señal en $\delta 169,2$ es característica de carbono carbonílico. El espectro de masas tomado en ionización por electroespray en modo positivo muestra un pico m/z en 284,12 correspondiente al ión pseudomolecular $[M+H^+]$, por lo que el peso de la molécula debe ser 283,12 g/mol y por consiguiente debe tener en su estructura un átomo de nitrógeno. Al comparar los espectros de RMN 1H y ^{13}C del compuesto **C4** con los reportes en la literatura se concluye que este corresponde a la *N-p*-coumaroil-tiramina, previamente aislada de la especie *Piper argyrophyllum* (Singh *et al.*, 1996).

Los espectros de RMN 1H de los compuestos **C1** (Figura 2-17a), **C2** (Figura 2-18a), **C5** (Figura 2-21a), **C6** (Figura 2-22a) y **C7** (Figura 2-23a) muestran una señal sínglele en δ 13,9, 12,1, 12,8, 12,8 y 12,1 respectivamente, la cual es característica para un hidrógeno de hidroxilo fenólico que hace quelato intramolecular con un grupo carbonilo adyacente, comportamiento común en compuestos de tipo flavonoide (Crews *et al.*, 2010), el cambio observado en el desplazamiento de esta señal es dependiente de si el carbonilo está o no conjugado ya que la presencia de un carbonilo α - β insaturado produciría la protección del protón fenólico y por ende su desplazamiento hacia campo alto con respecto a la ubicación que se evidencia en ausencia del sistema insaturado en la estructura, por lo que la posición de la señal en el espectro da un indicio del tipo de núcleo flavonoide al que corresponde el compuesto. Lo anterior es confirmado con los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **C1** (Figura 2-17b), **C2** (Figura 2-18b), **C5** (Figura 2-21b), **C6** (Figura 2-22b), y **C7** (Figura 2-23b) en los que se observa una señal en 206 ppm, 174,6 ppm, 181,6 ppm, 182,4 ppm, y 195,8 ppm respectivamente, que por su desplazamiento corresponden a carbono carbonílicos (Crews *et al.*, 2010).

El valor del desplazamiento del carbono carbonílico en RMN ^{13}C da un indicio del tipo de núcleo flavonoide ya que la presencia de enlaces múltiples, junto a la existencia del anillo de γ pirona y la O- sustitución cercana al carbonilo, hace que los efectos generados por dobles enlaces y la presencia de grupos electrodonores protejan el carbono carbonílico y varíe así el desplazamiento de la señal de éste en el espectro. Teniendo en cuenta el valor del desplazamiento del carbonilo en los compuestos de núcleo flavonoide aislados en este trabajo se concluye que de mayor a menor desplazamiento se encuentran: dihidrochalconas (**C1**) > flavanonas (**C7**) > flavonas (**C5, C6**) > flavonoles (**C2**).

Además de determinar la presencia y el tipo de núcleo flavonoide, los espectros de RMN 1H y los espectros de masas permitieron establecer el tipo de sustitución de los anillos

aromáticos en la estructura de los flavonoides. El espectro de RMN ^1H de los compuestos **C1** (Figura 2-17a), **C2** (Figura 2-18a), **C5** (Figura 2-21a), **C6** (Figura 2-22a), y **C7** (Figura 2-23a) muestran en cada caso dos señales dobletes en: δ 5,97 (d, 2,2 Hz, 1H) / δ 6,00 (d, 2,2 Hz, 1H); δ 6,29 (d, 2,0 Hz, 1H) / δ 6,57 (d, 2,1 Hz, 1H); δ 6,21 (d, 1,6 Hz, 1H) / δ 6,50 (d, 1,6 Hz, 1H); δ 6,37 (d, 2,3 Hz, 1H) / δ 6,49 (d, 2,3 Hz, 1H); y δ 6,06 (d, 2,3 Hz, 1H) / δ 6,07 (d, 2,3, 1H) respectivamente, las cuales teniendo en cuenta el valor de los desplazamientos y de las constantes de acoplamiento indican que en todos los metabolitos en mención existen dos protones aromáticos ubicados en posición meta. El análisis de los espectros de masas por impacto electrónico de los compuestos **C1**, **C2**, **C5**, y **C7**, evidenció la presencia de un ión $m/z = 91$ correspondiente al ión tropilio, el cual se genera por la ruptura típica del enlace formado entre los carbonos α y β al carbono carbonílico del flavonoide (Harborne *et al.*, 1980), el valor de la masa de este ión indica que el anillo aromático proveniente biosintéticamente del fragmento de shiquimmato (anillo B) no está sustituido, por lo que los protones con acoplamiento meta que se evidencian en el espectro de RMN ^1H deben ubicarse sobre el anillo aromático proveniente biosintéticamente del tricétido para la formación de flavonoide (Anillo A).

El compuesto **C8** es un sólido amorfo con punto de fusión $221\text{ }^{\circ}\text{C}$, el espectro de RMN ^1H muestra señales a campo bajo del espectro. Las constantes de acoplamiento muestran el acoplamiento orto del proton en δ 7,34 (dd, $J=8,3$ Hz y 2,0 Hz, 1 H), con el proton en δ 7,00 (d, $J=8,3$ Hz, 1H) y en posición meta con el hidrógeno en δ 7,36 (d, $J=1,9$ Hz, 1 H); adicionalmente existe una señal en δ 9,77 (s, 1H) que por el desplazamiento corresponde a un proton de ácido carboxílico (Crews *et al.*, 2010). El espectro de RMN ^{13}C muestra siete señales de carbonos en 114,4ppm, 116,4 ppm, 121, 6 ppm, 122, 8 ppm, 145,4 ppm, 150,0 ppm, y 169 ppm; por el valor del desplazamiento seis carbonos corresponden a carbonos aromáticos, dos de los cuales son carbonos unidos a un sustituyente oxigenado. El carbono más desplazado hacia campo bajo el cual se presenta en 169 ppm, corresponde a un carbono carbonílico de ácido carboxílico. El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C junto a la comparación de los datos reportados en la literatura, se determinó que el compuesto **C8** corresponde a un derivado dihidroxilado del ácido benzoico denominado ácido protocatéquico (An *et al.*, 2006).

A continuación se presentan los datos espectroscópicos, las constantes físicas (Tablas 2-2 a 2-10) y los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y masas de los compuestos aislados de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum*.

Datos Espectroscópicos de los compuestos aislados de las fracciones activas de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum*

Tabla 2-2. Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **C1**

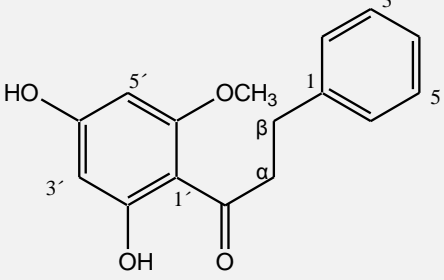
	Nombre:	Uvangoletina
	Estado físico	Sólido cristalino blanco
	Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
	Peso molecular	272,1 g/mol
	Punto de fusión	189 – 190 °C
EM (ESI) m/z = 294,99 [M + Na⁺]		
EM-IE: m/z (%) = 167 (100), 272 (22,2), 140 (19,5), 207 (13,2), 91 (9,1)		
RMN ¹H [400 MHz, (CD₃)₂CO] δ 2,95 (t, $J=7,7$ Hz, H-β), 3,25-3,32 (m, H-α), 5,97 (d, $J=2,2$ Hz, H-3'), 6,00 (d, $J=2,2$ Hz, H-5'), 7,14-7,21 (m, H-4), 7,27 (d, $J=7,3$ Hz, H-2/H-3/H-5/H-6), 3,86 (s, OCH₃), 13,9 (s, OH)		
RMN ¹³C [100 MHz, (CD₃)₂CO]: 32,4 ppm (C-β), 47,4 (C-α), 92,9 (C-5'), 97,9 (C-3'), 106,8 (C-1'), 127,6 (C-4), 130,1 (C-2/C-6), 130,2 (C-3/C-5), 143,8 (C-1), 165,5(C-6'), 166,6 (C-2'), 169,3 (C-4'), 206,0 (C=O), 57,2 (OCH₃).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Ávila <i>et al.</i> , 2011.		

Figura 2-17. Espectros del compuesto **C1**

Figura 2-17a. Espectro de RMN ¹H del compuesto **C1**, 400 MHz, Acetona *d*₆

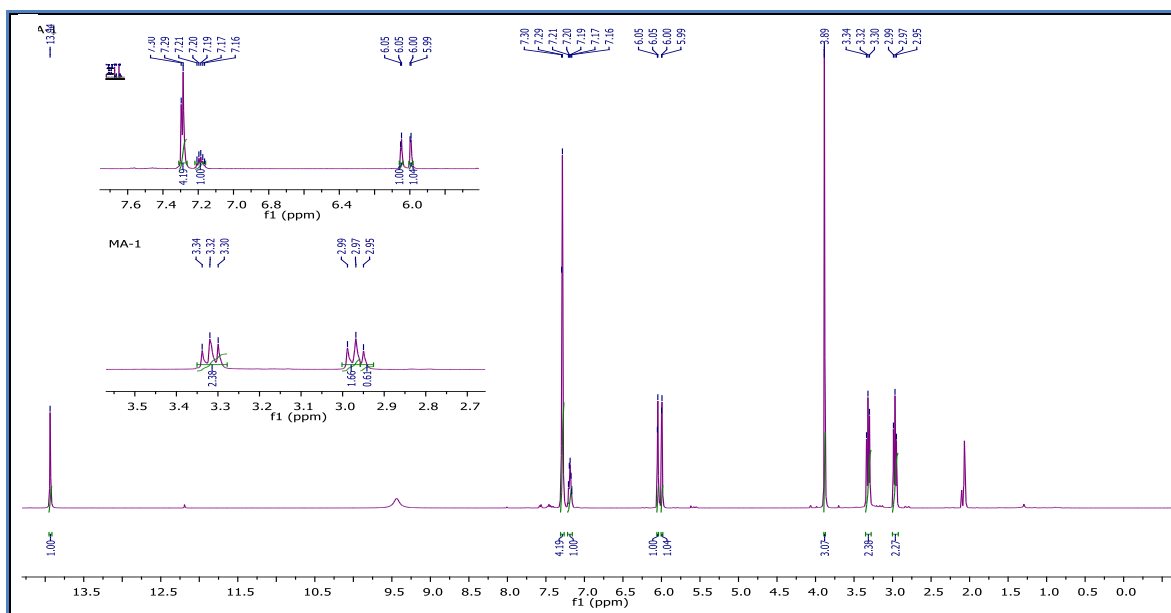


Figura 2-17b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C1**, 100 MHz, Acetona d_6

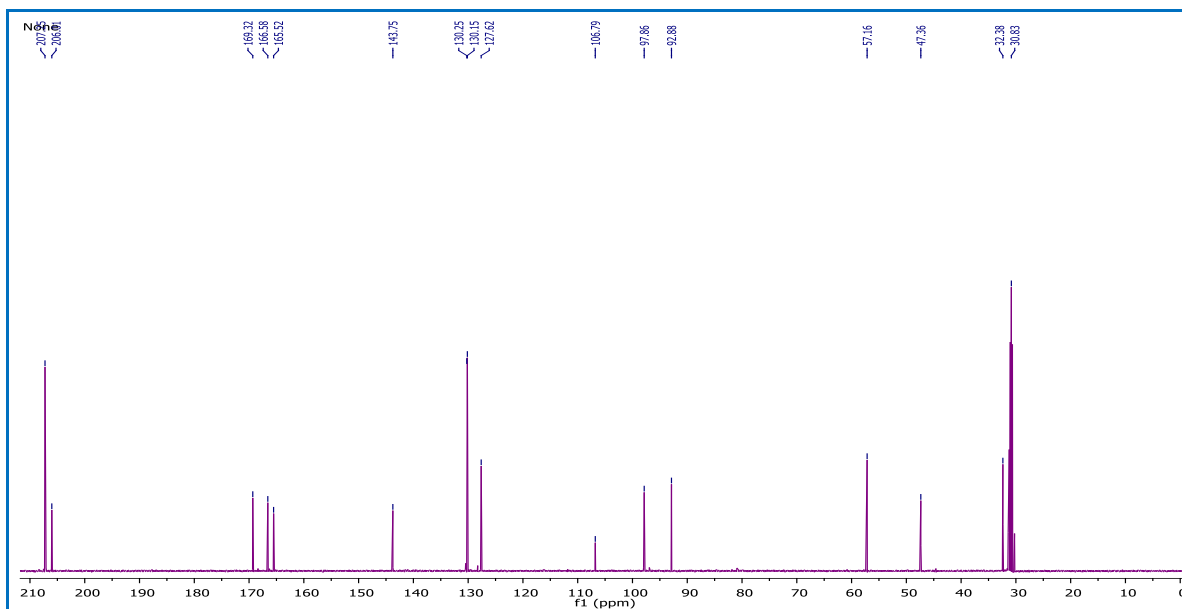


Tabla 2-3. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C2**

	Nombre:	Galangina
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$
	Peso molecular	270,0 g/mol
	Punto de fusión	214-215 °C
EM-IE: m/z (%) = 77(100), 69 (60,0), 51 (59), 270 (45), 269 (30), 91 (10).		
RMN ^1H [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]: δ 6,29 (d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,57 (d, $J=2,0$ Hz, H-8), 7,49-7,52 (m, H-3'/H-4'/H-5'), 8,26 (d, $J=8,3$ Hz, H-2'/H-6'), 12,1 (s, OH).		
RMN ^{13}C [100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]: 146,1 ppm (C-2), 138,0 (C-3), 177,0 (C-4), 162,4 (C-5), 99,3 (C-6), 165,2 (C-7), 94,6 (C-8), 158,0 (C-9), 104,3 (C-10), 132,1 (C-1'), 129,2 (C-2'/C-6'), 128,5 (C-3'/C-5')		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Facundo y Morais S, 2003.		

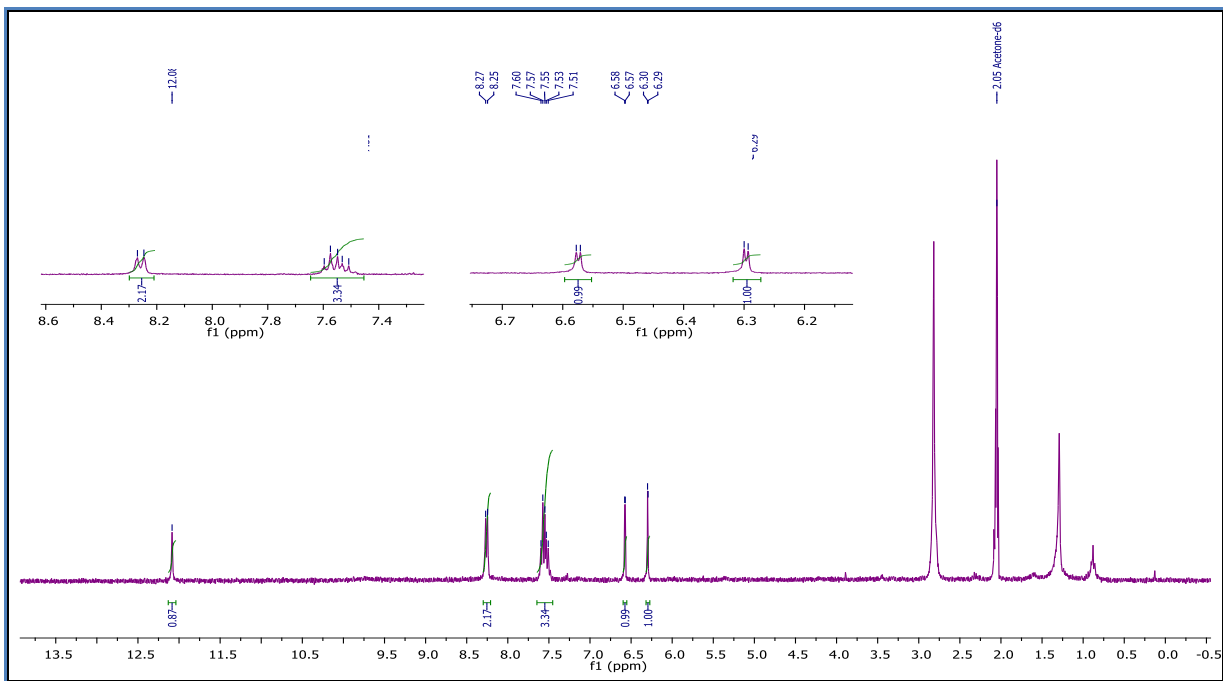
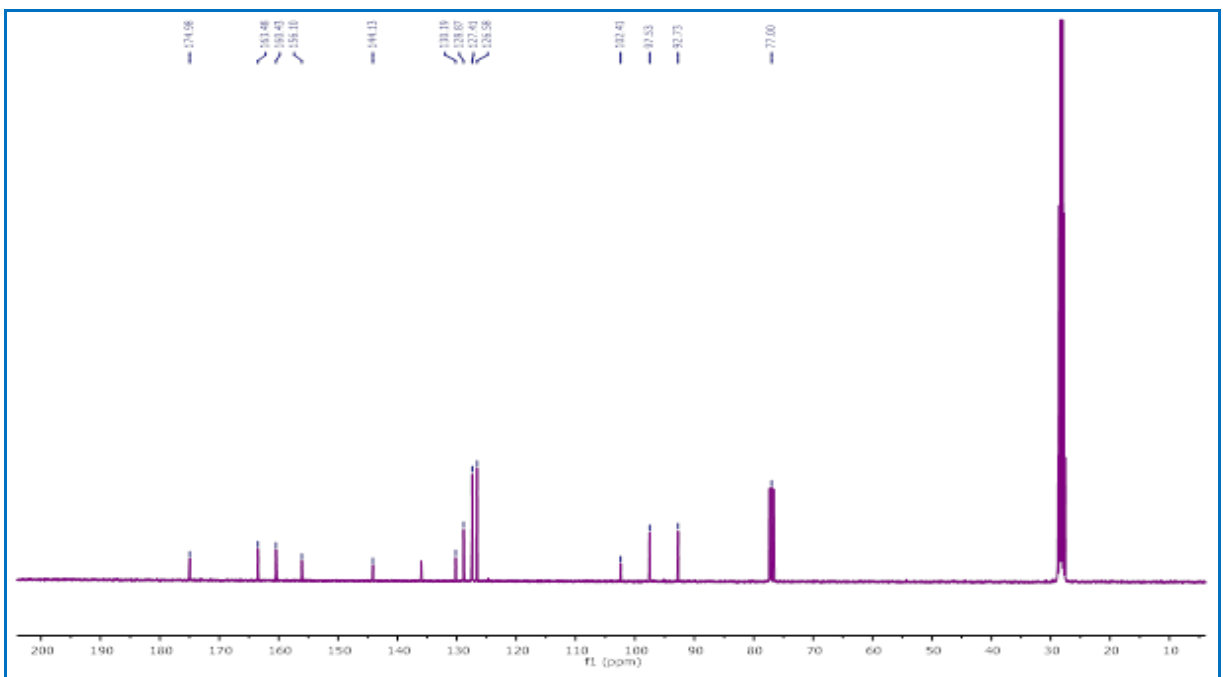
Figura 2-18. Espectros del compuesto **C2****Figura 2-18a.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **C2**, 400 MHz, Acetona d_6 **Figura 2-18b.** Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C2**, 100 MHz, Acetona d_6 

Tabla 2-4. Datos espectrométricos y constantes físicas de **C3**

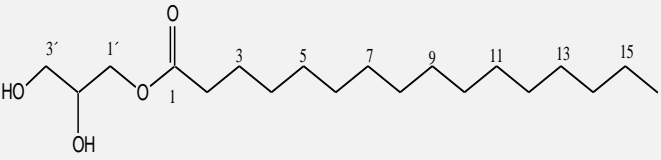
	Nombre:	Monopalmitato de glicerilo
	Estado físico	Aceite
	Fórmula molecular	C ₂₅ H ₂₅ O ₄
	Peso molecular	389,0 g/mol
Datos espectrométricos del Monopalmitato de glicerilo sililado EM-IE: m/z (%) = 73 (100), 43 (70), 371 (58), 57 (50), 147 (40), 239 (20), 459 (5)		
Datos espectrométricos descritos en la literatura: Bathia <i>et al</i> , 2013		

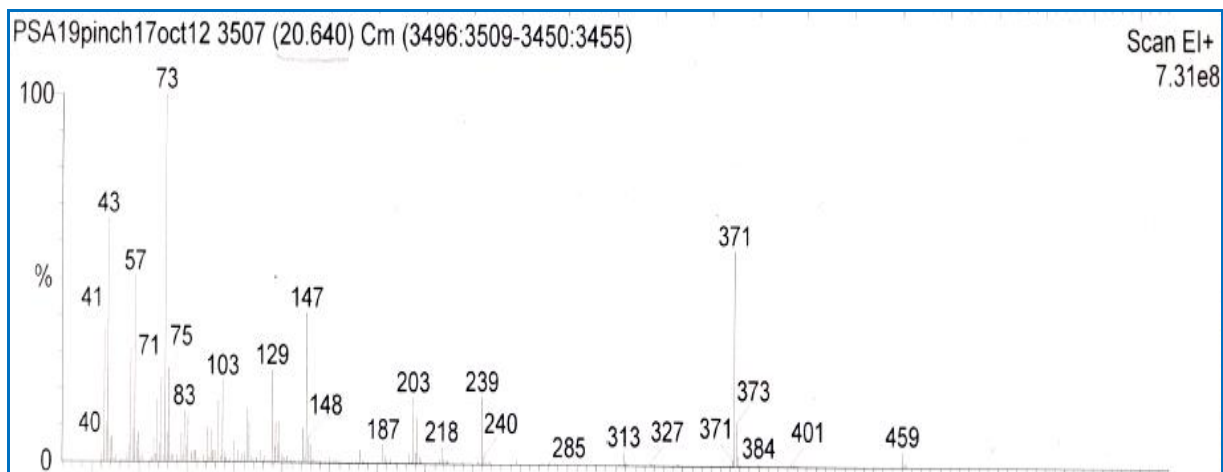
Figura 2-19. Espectro de masas por IE del derivado sililado de **C3**.

Tabla 2-5. Datos espectroscópicos y constantes físicas para en compuesto **C4**

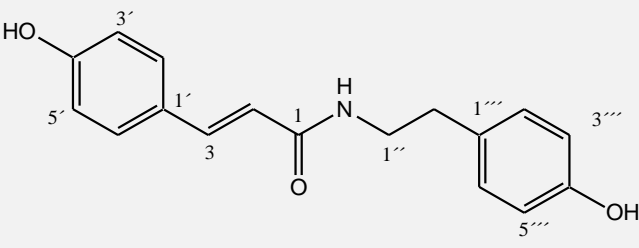
	Nombre:	N-p-cumaroil-tiramina
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃
	Peso molecular	283,12 g/mol
	Punto de fusión	244-245 °C
EM-ESI <i>m/z</i> 284,12 [M+H⁺]		
RMN ¹H [400 MHz, CD ₃ OD]: δ 2,75 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, H-2''), 3,46 (t, <i>J</i> =7, 4 Hz, H-1''), 6,38 (d, <i>J</i> =15,7 Hz, H-2), 7,44 (d, <i>J</i> =15,7 Hz, H-3), 6,72 (d, <i>J</i> =8,5, H-3'''/H-5'''), 6,79 (d, <i>J</i> =8,6, H-2'''/H-6'''), 7,05 (d, <i>J</i> =8,5 Hz, H-3'/H-5'), 7,40(d, <i>J</i> =8,4 Hz, H-2'/H-6')		
RMN ¹³C [100 MHz, CD ₃ OD]: 35,7 ppm (C-2''), 42,4 (C-1''), 116,2 (C-3'''/C-5'''), 116,8 (C-3'/C-5'), 118,4 (C-2), 127,7 (C-1'), 130,5 (C-2'/C-6'), 130,7 (C-2'''/C-6'''), 131,8 (C-1'''), 141,7 (C-3), 156,9 (C-4'''), 160,5 (C-5'''), 169,2 (C-1)		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Singh <i>et al.</i> , 1996		

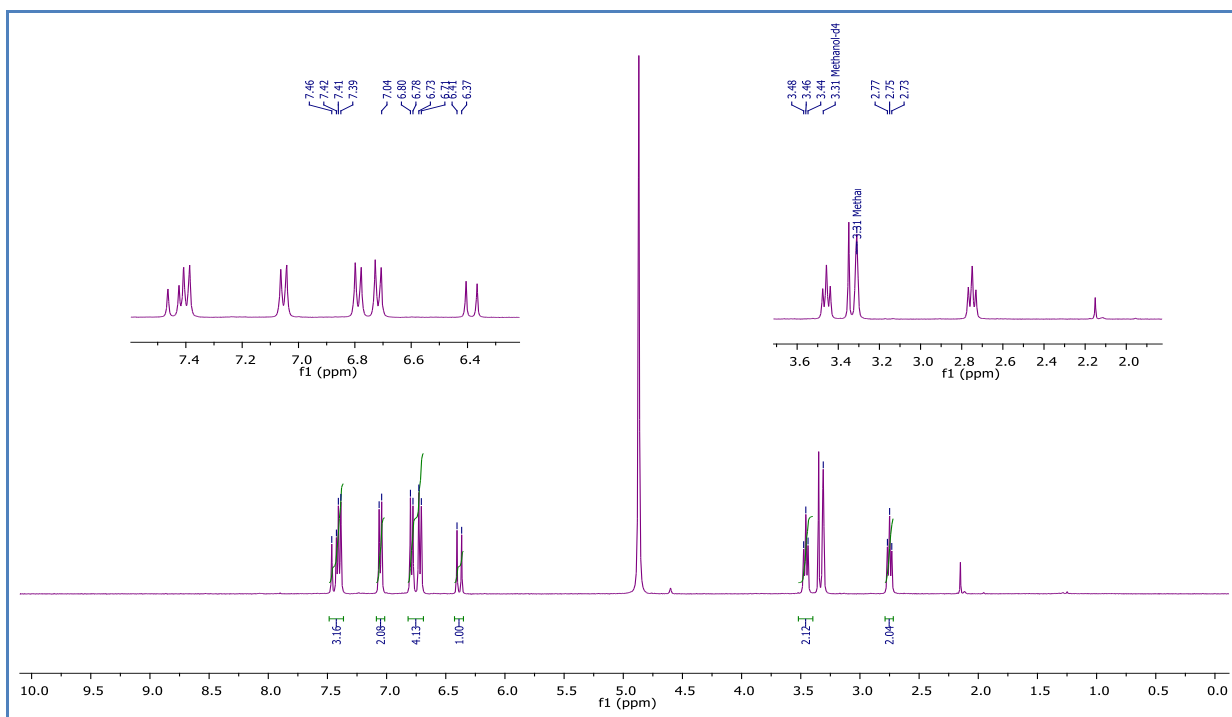
Figura 2-20. Espectros del Compuesto **C4****Figura 2-20a.** Espectro de RMN ¹H del compuesto **C4**, 400 MHz, CD₃OD

Figura 2-20b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C4**, 100 MHz, CD_3OD

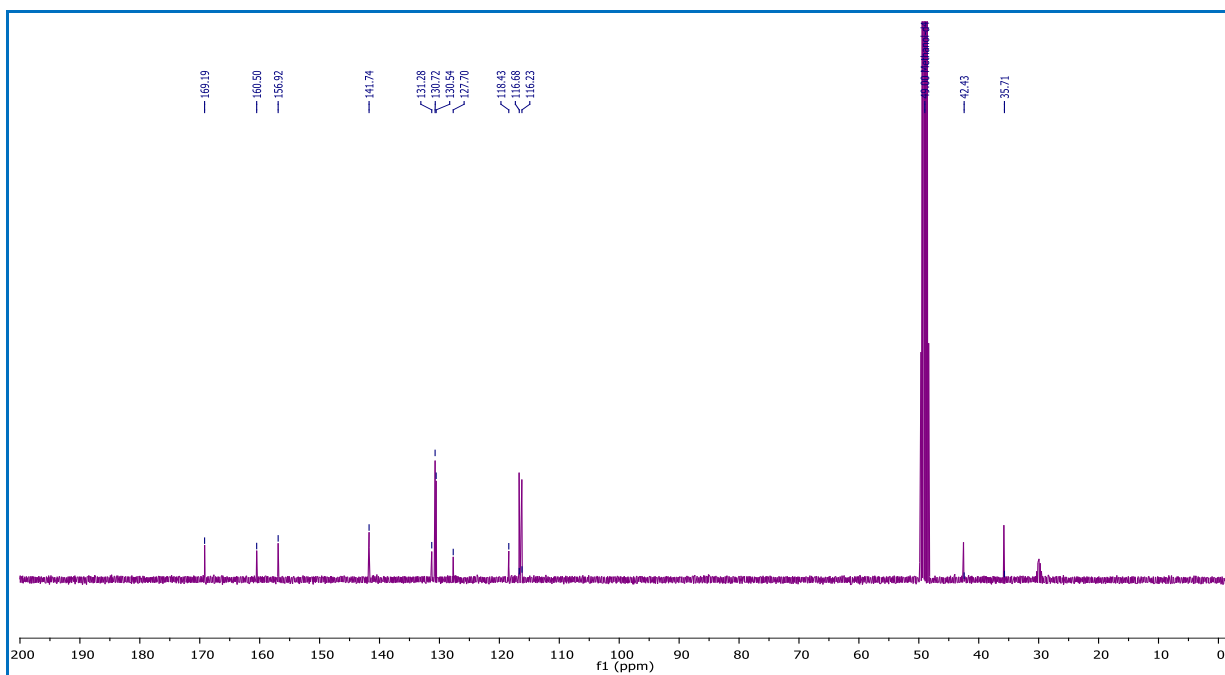


Tabla 2-6. Datos espectroscópicos y constantes físicas para la Crisina - **C5**

	Nombre:	Crisina
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$
	Peso molecular	254,12 g/mol
	Punto de fusión	261 °C
EM-ESI m/z 254,12 [$\text{M}+\text{H}^+$]		
RMN ^1H [400 MHz. $\text{DMSO } d_6$]: δ 6,21 (d, $J=1,6$ Hz, H-6), 6,5 (d, $J=1,6$ Hz, H-8), 6,94 (s, H-3), 7,57 (m, H3'/H4'/H5'), 8,04 (d, $J=7,2$ Hz, H-2'/H-6'), 12,8 (s, OH)		
RMN ^{13}C [100 MHz. $\text{DMSO } d_6$]: 163,1ppm (C-2), 105,2 (C-3), 181,6 (C-4), 161,5 (C-5), 99,0 (C-6), 164,4 (C-7), 94,1 (C-8), 157,4 (C-9), 104,0 (C-10), 130,7 (C-1'), 126,4 (C-2'/C-6'), 129,1 (C-3'/C-5')		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Shimura <i>et al.</i> , 2007		

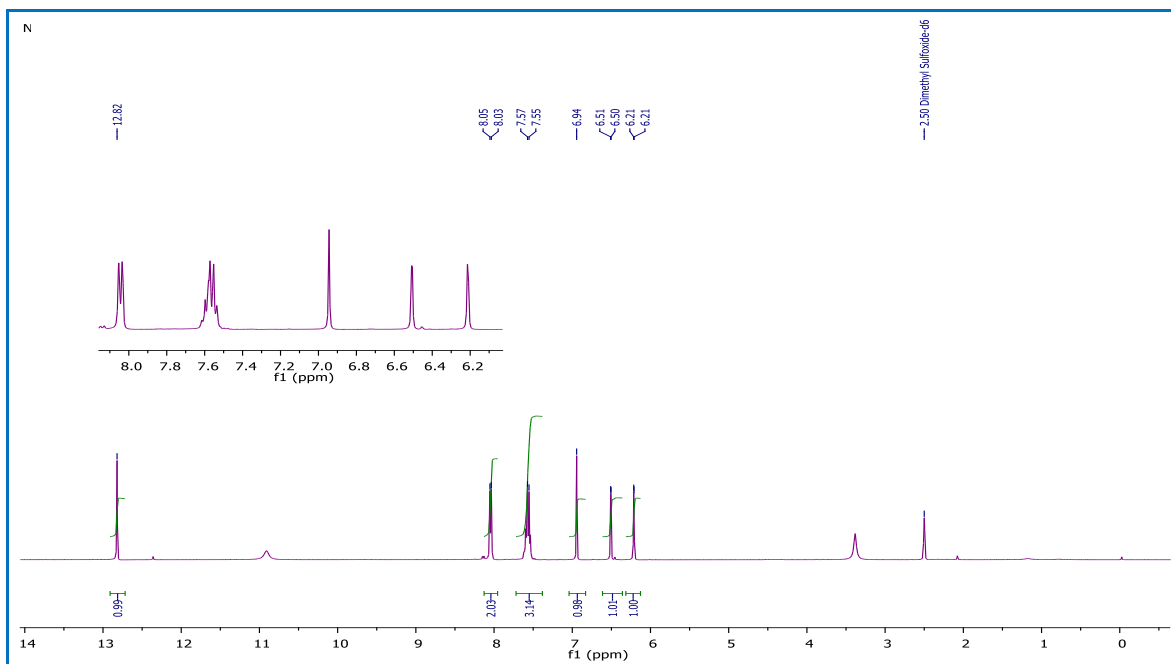
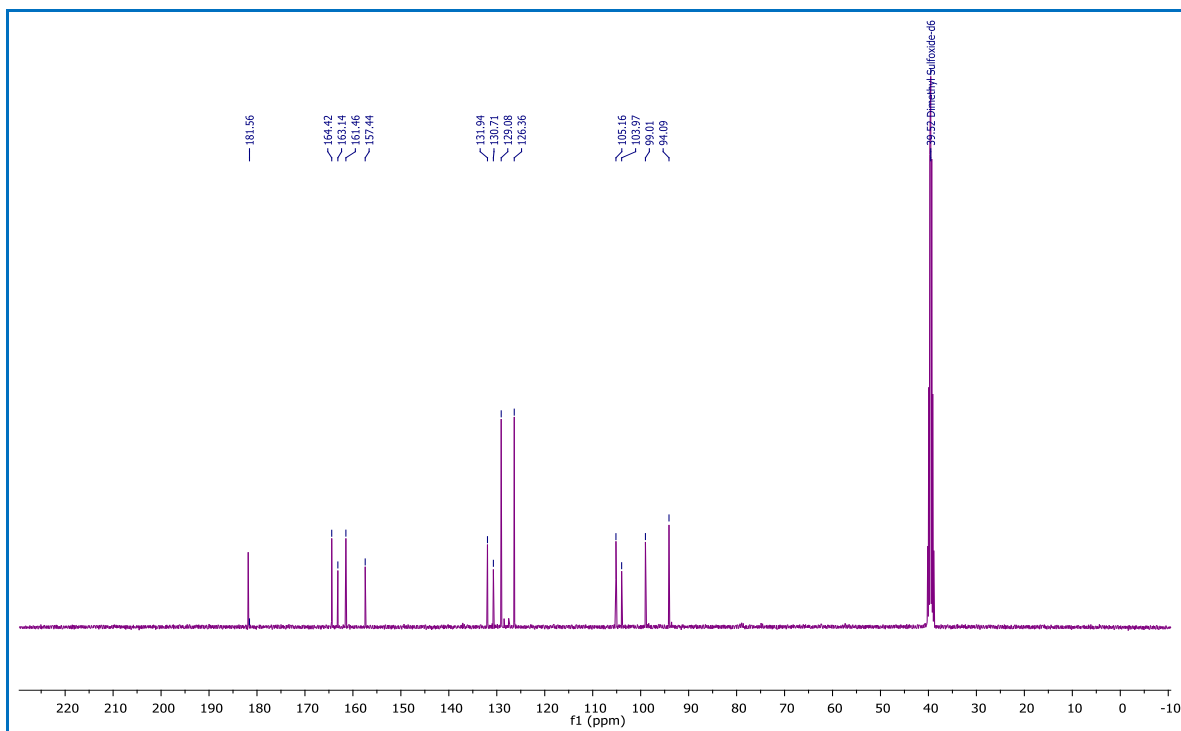
Figura 2-21. Espectros del compuesto **C5****Figura 2-21a.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **C5**, 400 MHz, DMSO d_6 .**Figura 2-21b.** Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C5**, 100 MHz, DMSO d_6 

Tabla 2-7. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C6**

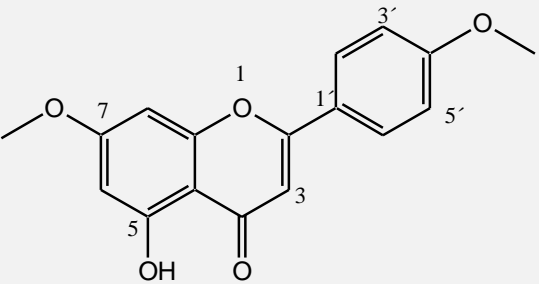
	Nombre:	5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona
	Estado físico	Sólido cristalino amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
	Peso molecular	298 g/mol
	Punto de fusión	111-112 °C
EM-IE: m/z (%) = 298 (100), 89(80), 95 (70), 69 (65), 135 (50), 269 (40)		
RMN ¹H [400 MHz (CD ₃) ₂ CO]: δ 6,37 (d, J=2,3 Hz, H-6), 6,49 (d, J=2,3 Hz, H-8), 6,58 (s, H-3), 7,02 (d, J=9,0 Hz, H-2'/H-6'), 7,84 (d, J=9,1 Hz, H3'/H5'), 3,88 y 3,89 (s, OCH ₃), 12,8(s, OH).		
RMN ¹³C [100 MHz. (CD ₃) ₂ CO]:164,0 ppm (C-2), 104,4 (C-3), 182,4 (C-4), 162,2 (C-5), 98,0 (C-6), 165,4 (C-7), 92,6 (C-8), 157,7 (C-9), 105,6 (C-10), 123,6 (C-1'), 128,0 (C-2'), 114,5 (C-3'), 162,6 (C-4'), 114 (C-5'), 128,0 (C-6'), 55,5 y 55, 8 (OCH ₃).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Plazas <i>et al.</i> , 2008		

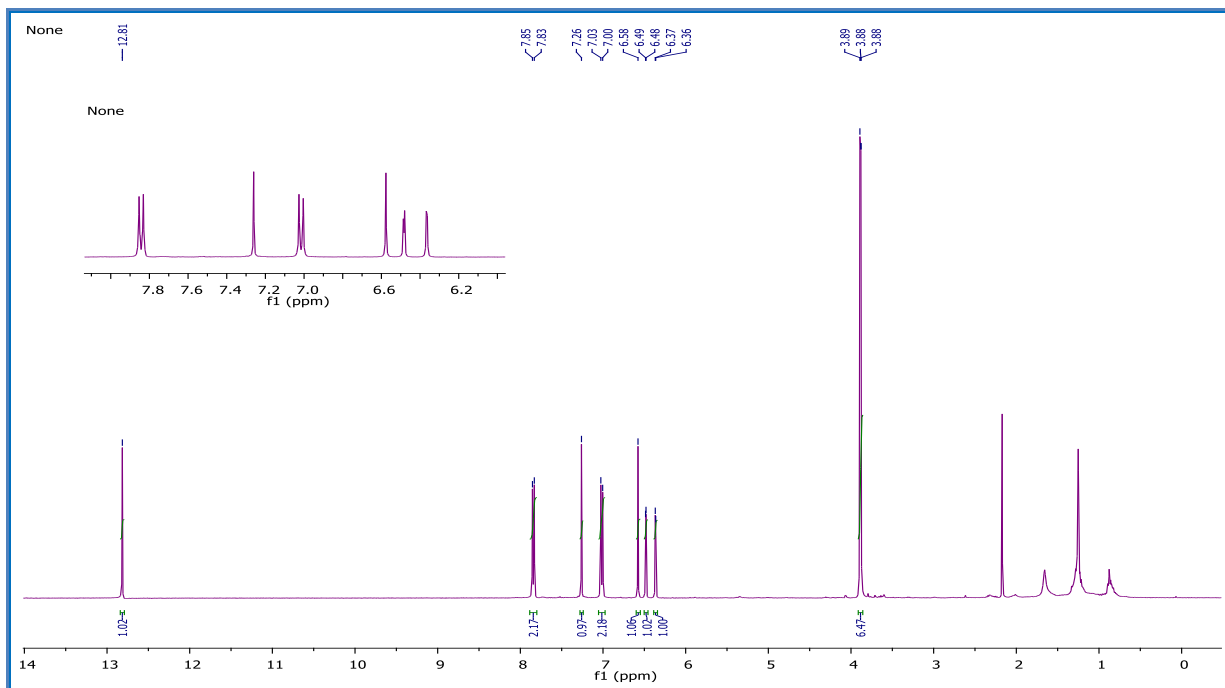
Figura 2-22. Espectros del compuesto **C6****Figura 2-22a.** Espectro de RMN ¹H del compuesto **C6**, 400 MHz, Acetona *d*₆.

Figura 2-22b- Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C6**, 100 MHz, Acetona d_6

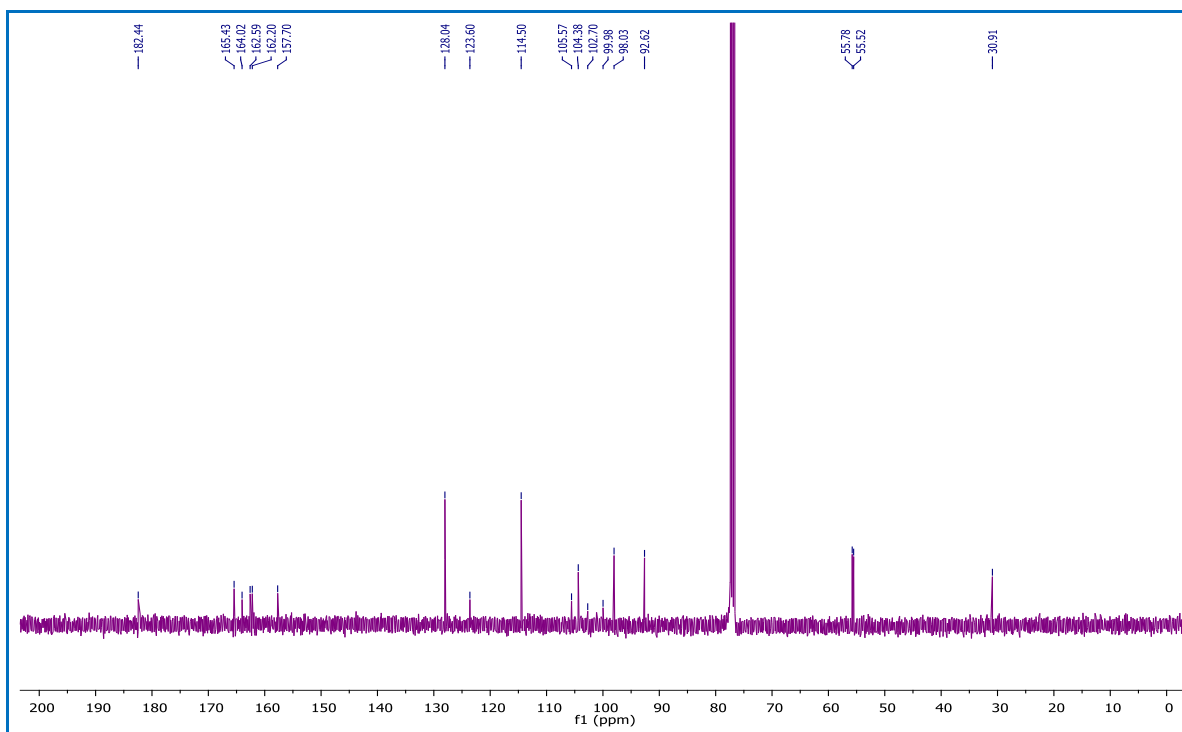


Tabla 2-8. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C7**

	Nombre:	Pinostrobin
	Estado físico	Sólido cristalino
	Fórmula molecular	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$
	Peso molecular	270 g/mol
	Punto de fusión	92 -93 °C
EM-IE: m/z (%)= 269 (100), 193 (85), 270(80).		
RMN ^1H [400 MHz. CDCl_3]: δ 2,80 (dd, $J=17,2-3,1$ Hz, H-3a), 3,06 (dd, $J=17,2$ y 13,0 Hz, H-3b), 5,39 (dd, $J=13,0$ y 3,0 Hz, H-2), 6,06 (d, $J=2,3$ Hz, H-6), 6,07 (d, $J=2,3$ Hz, H-8), 7,36-7,48 (m, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'), 3,79 (s, OCH_3), 12,1(s, OH)		
RMN ^{13}C [100 MHz. CDCl_3]: 79,2 ppm (C-2), 43,4 (C-3), 195,8 (C-4), 164,2 (C-5), 95,2 (C-6), 168,0 (C-7), 94,3 (C-8), 162,9 (C-9), 103,2 (C-10), 138,5 (C-1'), 126,2 (C-2'/C6'), 128,90 (C-3'/C-4'/C-5'), 55,7 (OCH_3)		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Abdelwahab <i>et al</i> , 2011.		

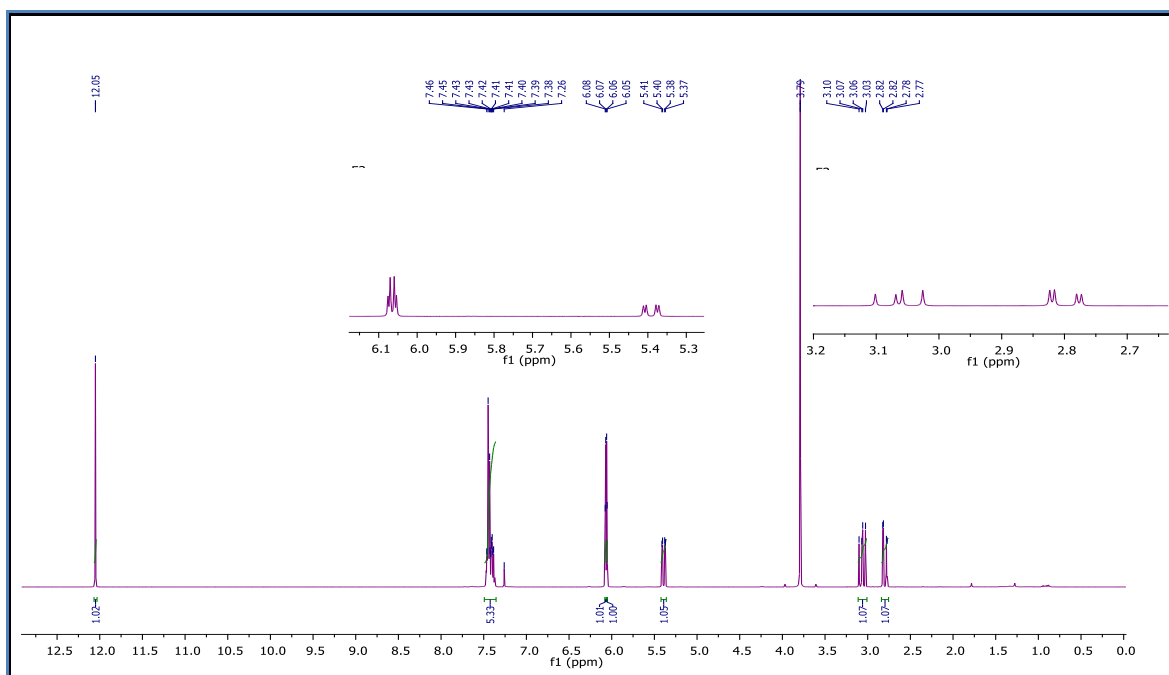
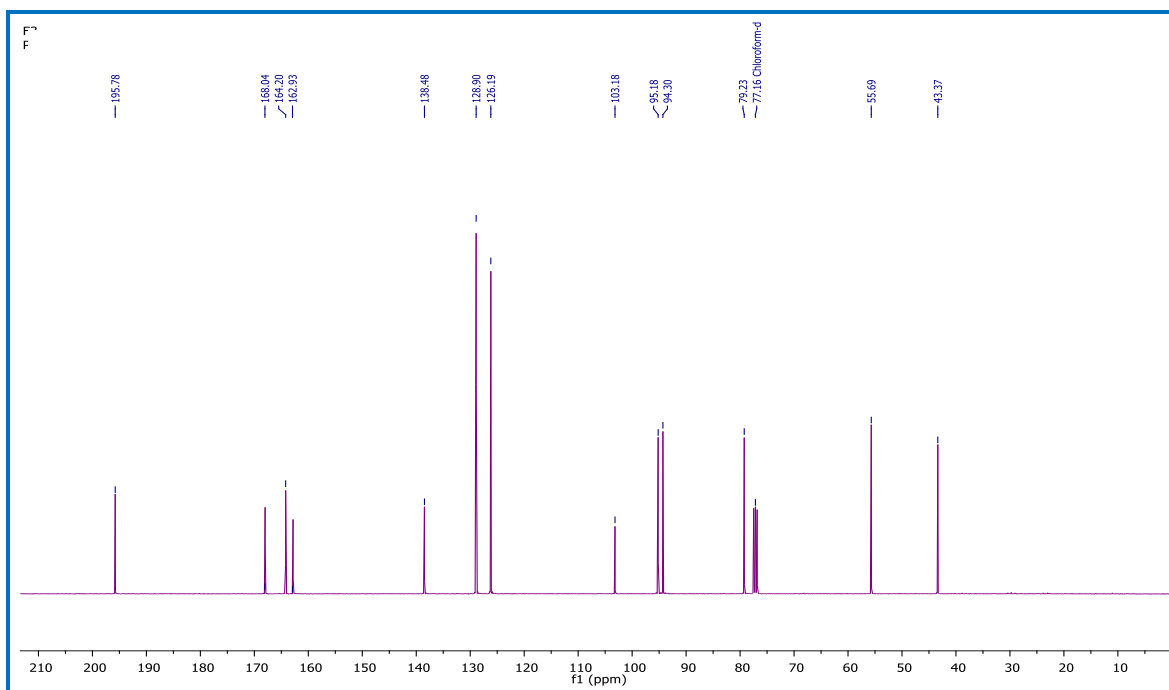
Figura 2-23 Espectros del compuesto **C7****Figura 2-23a.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **C7**, 400 MHz, CDCl_3 **Figura 2-23b.** Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C7**, 100 MHz, CDCl_3 

Tabla 2-9. Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **C8**.

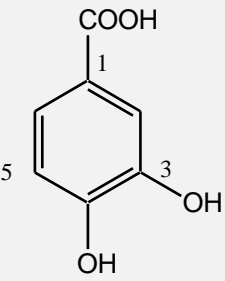
	Nombre:	Ácido Protocatequico
	Estado físico	Sólido amorfo
	Fórmula molecular	C ₇ H ₆ O ₄
	Peso molecular	154 g/mol
	Punto de fusión	221 °C
EM-IE: m/z (%)= 153 (100), 136 (98),92 (12)		
RMN ¹H [400 MHz. (CD₃)₂CO]: δ 7,00 (d, J=8,3 Hz, H-5), 7,34 (dd, J=8,3 Hz y 2,0 Hz, H-6), 7,36(d, J=1,9 Hz, H-2), 9,77 (s,COOH)		
RMN ¹³C [100 MHz. CDCl₃-CD₃OD]: 121,6 ppm (C-1), 116,4 (C-2), 145,4 (C-3), 150,0 (C-4), 114,4 (C-5), 122,8 (C-6), 169 (COOH)		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: An <i>et al.</i> , 2006		

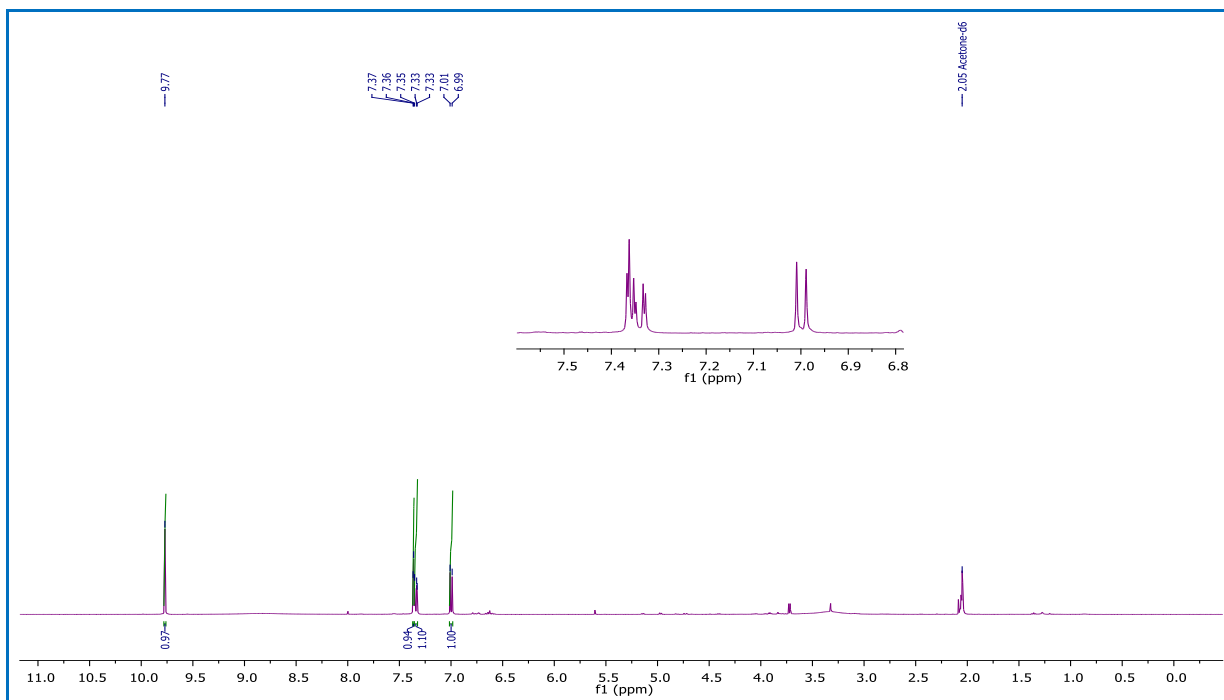
Figura 2-24. Espectros del compuesto **C8****Figura 2-24a.** Espectro RMN ¹H del compuesto **C8**, 400 MHz, Acetona d₆

Figura 2-24b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C8**, 100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$

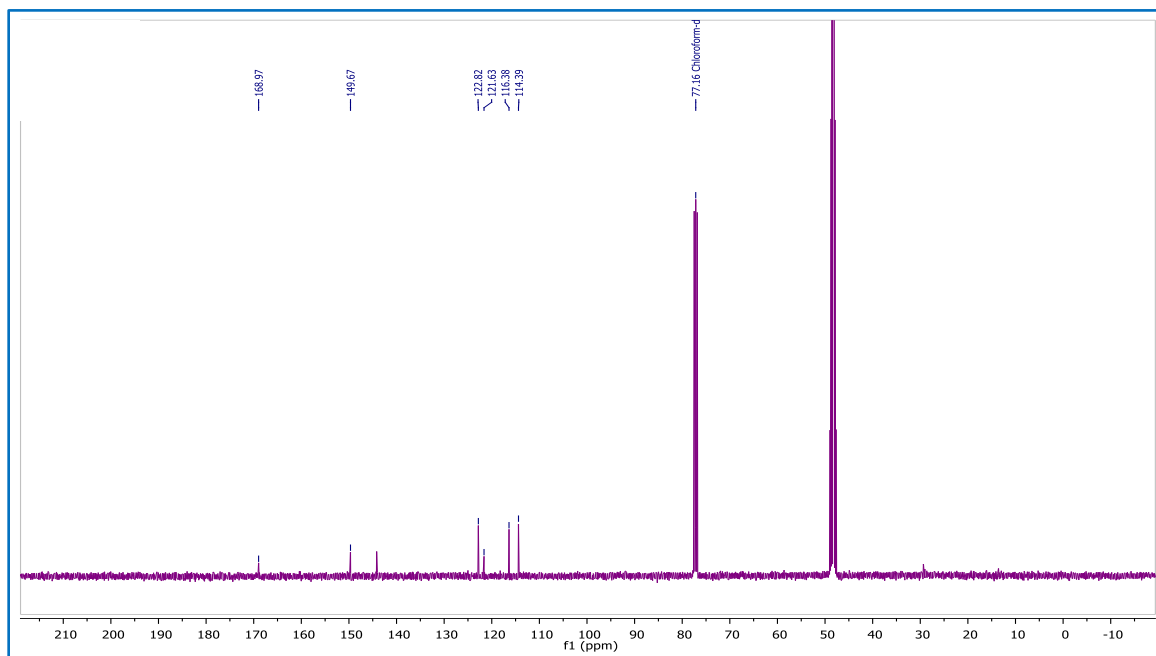


Tabla 2-10- Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C9**.

	Nombre:	Daucosterol
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	$\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$
	Peso molecular	576 g/mol
	Punto de fusión	$285\text{ }^{\circ}\text{C}$
ESI-MS $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 599.4$		
$[\alpha]_D (c=0,4, \text{MeOH}) = -35,5$		
RMN ^{13}C [100 MHz, DMSO d_6]: 11,7 ppm (C-18), 11,8 (C-29), 18,6 (C-21), 18,9 (C-27), 19,1 (C-19), 19,7 (C-26), 21,1 (C-11), 23,8 (C-28), 25,4 (C-15), 27,8 (C-23), 28,2 (C-16), 29,2 (C-25), 31,4 (C-2), 31,4 (C-7), 33,3 (C-8), 35,4 (C-22), 36,2 (C-20), 36,8 (C-10), 38,3 (C-1), 39,7 (C-4), 41,7 (C-12), 41,8 (C-13), 45,1 (C-24), 50,6 (C-9), 55,4 (C-17), 56,1 (C-14), 61,1 (C-6'), 70,1 (C-4'), 73,4 (C-2'), 76,7 (C-5'), 76,8 (C-3'), 76,9 (C-3), 100,8 (C-1'), 122,4 (C6), 140,7 (C-5).		
Datos espectroscópicos descritos en la literatura: Viqar y Anwer, 2007, Mouffok <i>et al.</i> , 2012		

Figura 2-25. Espectros del compuesto **C9**

Figura 2-25a. Espectro de RMN ^1H del compuesto **C9**, 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$

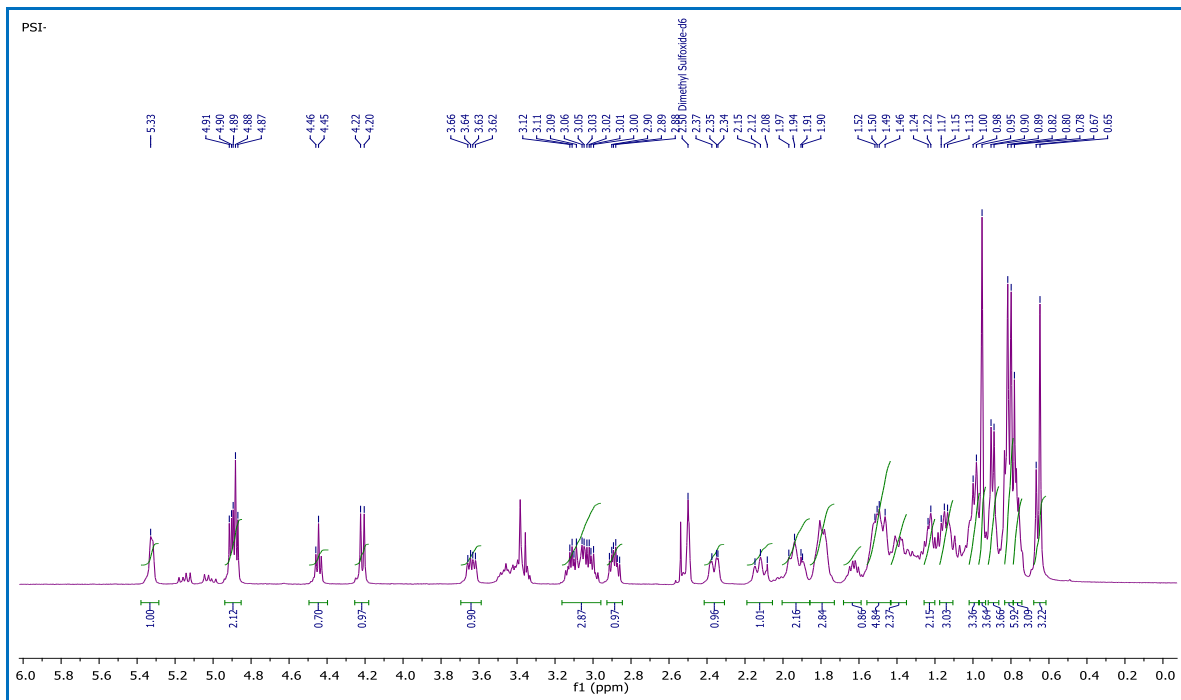
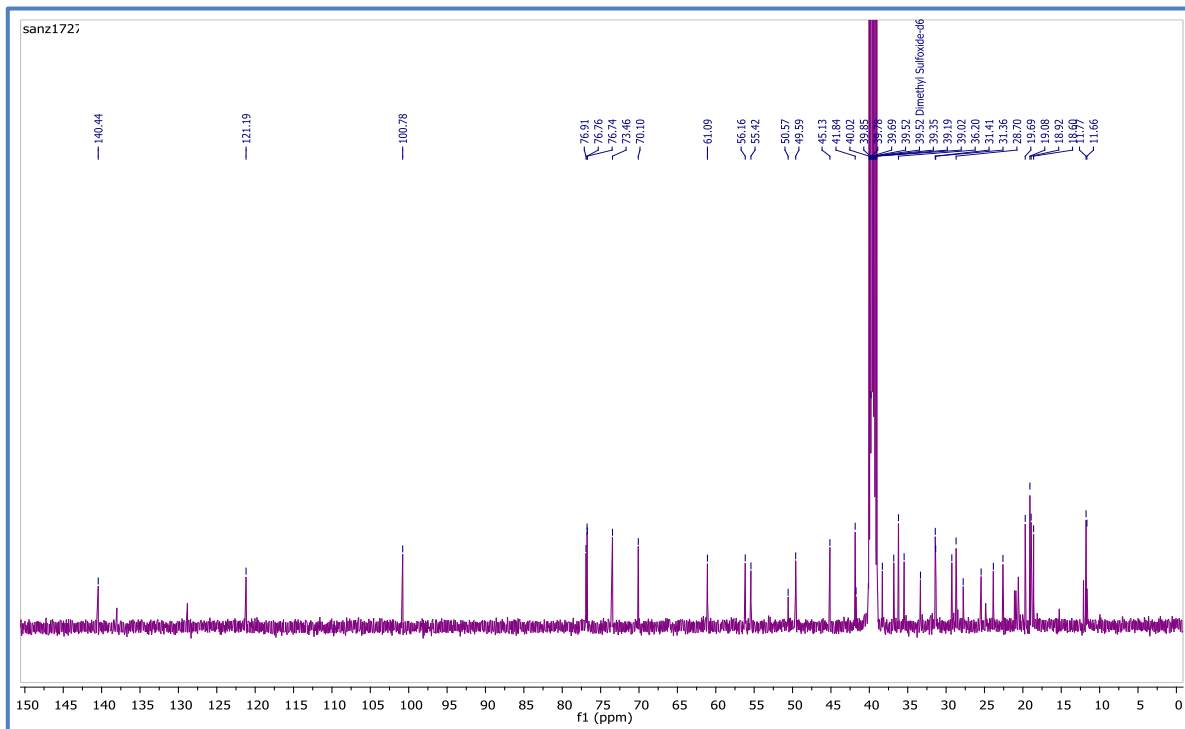


Figura 2-25b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **C9**, 100 MHz, $\text{DMSO } d_6$



2.3.1.2. Análisis de resultados de actividad insecticida

La actividad insecticida de los compuestos **C1-C9** fue evaluada usando larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda*, todos los compuestos fueron ensayados en el rango de 0,5 a 500 ppm; en el ensayo se usaron como controles negativos acetona R.A. y DMSO R.A., y dieta artificial, (López *et al.*, 2010) y como controles positivos dos insecticidas comerciales ampliamente usados para el control de gusano cogollero en diferentes cultivos en Colombia: Lorsban y XenTari; el primero es un insecticida químico fabricado por DOW Agrosience® y cuyo componente activo es Clorpirifos, un organofosforado neurotóxico que inhibe la acetil colinesterasa. Por su parte XenTari es un insecticida biológico, cuyo componente activo es una mezcla de δ -endotoxinas extraídas de *Bacillus thuringiensis*, activas por ingestión contra diferentes especies de insectos plagas de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera e Himenóptera (EPA, 2013). En la Tabla 2-11 se resumen los valores de CL₅₀ calculados por medio del programa Probit para cada uno de los compuestos aislados y los controles utilizados en el ensayo.

Los valores de CL₅₀ calculados para los metabolitos aislados muestran que los compuestos que presentan la mayor actividad son en su orden el flavonol galangina (**C2**), el ácido protocatéquico (**C8**), la flavona crisina (**C5**), y el esteroil glicosilado daucosterol (**C9**); es importante anotar que los dos primeros poseen una CL₅₀ inferior al insecticida biológico utilizado como control positivo en el ensayo. Estudios previos han evidenciado la actividad insecticida de los compuestos **C5** y **C9**; una investigación realizada en el 2003 por Morimoto y colaboradores estableció la actividad antialimentaria de diferentes flavonas, se comparó el efecto del núcleo de fenil benzo pirona con el efecto causado por diferentes compuestos de tipo cromona, en dicho estudio se determinó que las flavonas como la crisina las cuales no poseen sustitución en el anillo B del núcleo flavonoide poseen actividad antialimentaria contra larvas de *Spodoptera litura* (Morimoto *et al.*, 2003), comúnmente conocido como gusano cortador, y que en la actualidad es plaga de diferentes cultivos en Asia, entre los que se cuentan algodón, maíz y vegetales de la familia Cucurbitaceae.

Tabla 2-11. CL₅₀ de los compuestos aislados de la parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre *S. frugiperda*

Sustancia ensayada	CL ₅₀ (ppm)	Sustancia ensayada	CL ₅₀ (ppm)
Dieta Artificial	No se obtuvieron individuos muertos	Monopalmitina (C3)	257,96 *(184.,17-412,30)
Acetona R.A.	No se obtuvieron individuos muertos	N- <i>p</i> -Coumaroil Tiramina (C4)	108,0 *(85,99- 143,26)
DMSO R.A	No se obtuvieron individuos muertos	Crisina (C5)	28,79 *(19,85-39,37)
Lorban	1,702 *(0,721-2,870)	5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona (C6)	85,77 *(66,88-110,2)
Xen Tari	28,14 *(21,64-38,14)	Pinostrobina (C7)	141 *(111,8-178,3)
Uvangoletina (C1)	126,9 *(98,12-167,8)	Ácido Protocatéquico (C8)	17,16 *(13,20-21.57)
Galangina (C2)	13,63 *(10,05-17,44)	Daucosterol (C9)	44,47 *(34,78-55,98)

*Límites de confianza 95%

Por otra parte el esteroil glicosidado, Daucosterol produce efecto tóxico sobre los adultos del gorgojo del arroz, *Sitophylus oryzae* (Coleoptera) generando altos niveles de mortalidad post ingestión y un importante efecto de deterrencia antialimentaria (Pungitore *et al.*, 2005; Sosa *et al.*, 2008), en estudios realizados en la década de los noventa por Lugemwa y colaboradores en los que se determinó la actividad antialimentaria sobre *Heliothis zea*, lepidóptero que ataca cultivos de maiz en países como Perú y Bolivia, sobre agliconas y glicósidos de tipo betulina, se observó un aumento sustancial de la actividad debido posiblemente a la polaridad del glicósido o a interacciones más específicas con un receptor implicado en la discriminación de elección del alimento (Lugemwa *et al.*, 1990). Al ensayar diferentes esteroides y triterpenos estructuralmente relacionados con el daucosterol sobre adultos de *Sitophylus oryzae* para determinar el efecto de la estructura sobre la mortalidad se evidenció que la polaridad del grupo funcional sobre el carbono 3 del núcleo del esteroil es un factor importante en la actividad, ya que la reducción de esta propiedad conlleva a la disminución de la toxicidad (Lugemwa *et al.*, 1990). La presente

investigación se constituye en el primer reporte de actividad insecticida del daucosterol sobre larvas de Lepidópteros.

La actividad insecticida de los compuestos **C2** y **C8** no ha sido previamente reportada, sin embargo compuestos estructuralmente relacionados particularmente compuestos fenólicos, han mostrado actividad insecticida contra diferentes órdenes de insectos plaga. Los metabolitos que en este estudio mostraron tener un mayor efecto sobre las larvas de *S. frugiperda* (**C2**, **C5**, **C8**), poseen una característica estructural común, tienen más de un -OH sobre anillo aromático. Los compuestos fenólicos como los flavonoides o los derivados de ácido benzoico polihidroxilados son conocidos por poseer características antioxidantes (Harborne y Williams, 2000), sin embargo bajo ciertas circunstancias pueden actuar como pro-oxidantes y promover la oxidación de otros compuestos (Prochazkova *et al.*, 2011); debido a sus características estructurales estos metabolitos poseen un bajo potencial de oxidación que les permiten reducir Fe^{+3} y Cu^{+2} para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en procesos de ciclaje redox lo cual origina efectos mutagénicos y genotóxicos (Pérez, 2003); algunos de los mecanismos por los que los flavonoides ejercen su acción pro-oxidante son:

- **Oxidación por radicales fenoxilo de flavonoides:** Los productos finales de eliminación de las especies reactivas de oxígeno son los radicales fenoxilo de los flavonoides los cuales son muy reactivos y pueden ser estabilizados por el glutatión reducido (GSH), o por ácidos nucleicos, para producir quinonas flavonoides, las cuales son productos estables.
- **Inhibición de respiración mitocondrial:** Los flavonoles son capaces de participar en la oxidación NADH (citostólica y mitocondrial), inhibiendo la porción del complejo I (NADH-coenzima Q reductasa) de la cadena respiratoria (Hodnick *et al.*, 1994).
- **Daño directo al ADN:** Algunos flavonoides polihidroxilados pueden inducir daños en el ADN, ya que el Cu^{+2} enlazado a sitios específicos de este puede reaccionar simultáneamente con el compuesto flavonoide de tal forma que se produce un complejo ADN- Cu^{+2} -flavonoide. Por auto oxidación del flavonoide se genera un complejo ADN- Cu^{+1} + O_2^- , el cual produce daño oxidativo de la cadena de ADN. (Yamashita *et al.*, 1999).

Un completo estudio realizado en 1999 por Yoshino y colaboradores (Yoshino *et al.*, 1999), muestra el efecto de seis flavonoides polihidroxilados sobre un amplio espectro de lesiones del ADN en un modelo de célula procariota y uno de célula eucariota. El modelo procariota usado fue plásmido PBR322 el cual es un vector de clonación de *E. coli*, todos los flavonoides polihidroxilados ensayados produjeron efectos de rotura de la cadena de ADN del plásmido siendo más notorios los producidos por los flavonoides miricetina (3', 4', 5, 5', 7-pentahidroxi-flavonol), quercetina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxi-flavonol) y baicaleina (5,6,7-trihidroxi-flavona) y menores los efectos causados por el flavonol galangina (5,7-dihidroxi-flavonol) y la flavona crisina (5,7-dihidroxi-flavona), por lo que se puede inferir que la presencia de un patrón de hidroxilación tipo pirogalol o catecol en uno de los anillos de la estructura del flavonoide es importante para que se produzca la ruptura del ADN procariota. Para determinar el efecto de los mismos flavonoides polihidroxilados en el ADN eucariota se usó como modelo ADN de timo de carnero, en el cual se determinó el efecto teniendo como indicativo la formación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina catalizada por cobre, obteniendo un resultado muy similar al de la célula procariota ya que se observan los efectos en el siguiente orden miricetina>baicaleina>quercetina>galangina, la flavona crisina causa un efecto muy leve; los resultados anteriores permiten inferir que tanto en células procariotas como en eucariotas los flavonoles polihidroxilados poseen efectos pro-oxidantes por reducción del Cu^{+2} siendo mayores los daños en el ADN cuando existe sustitución tipo pirogalol o catecol en alguno de los anillos del flavonoide. Teniendo en cuenta que *S. frugiperda* es un organismo eucariote y comparándolo con el efecto observado en las células de timo de carnero que también son eucariotes es posible que la actividad insecticida que muestra la galangina aislada del extracto de parte aérea de *P. septuplinervium* se deba en alguna medida a su efecto pro-oxidante que causa daño directo en el ADN por reducción de Cu^{+2} y posterior producción del ión superóxido que induce daño oxidativo de la cadena de ácido nucleico de las células el insecto.

En el año 2000 Yu y Abo -Elghar mostraron que compuestos fenólicos de tipo flavonoide actúan como inhibidores de glutatión S-transferasa en *Spodoptera frugiperda*, (Yu y Abo -Elghar, 2000), en dicho estudio compuestos estructuralmente relacionados al flavonol galangina (5, 7-dihidroxi-flavonol) (**C2**) como el canferol (4',5, 7-trihidroxi-flavonol), y a la flavona crisina (**C5**) (5,7-dihidroxi-flavona) como la apigenina (4', 5, 7- trihidroxi-flavona), inhibieron efectivamente la enzima glutatión S-transferasa extraída de intestino medio de larvas de *S. frugiperda*, la apigenina fue el compuesto que presentó la más potente inhibición siendo de manera general los flavonoles y las flavonas los metabolitos más

activos; adicionalmente se observó que cuando el núcleo flavonoide esta glicosidado la actividad disminuye sustancialmente, observándose una inhibición muy pobre de la enzima, teniendo en cuenta lo anterior podemos inferir que los compuestos **C2** y **C5** aislados de parte aérea de la especie vegetal *P. septuplinervium* pueden ser inhibidores de GSH, lo que se traduce en el efecto insecticida observado. El sistema Glutation S-transferasas es un grupo multifuncional de enzimas que activan mecanismos de detoxificación celular, estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico glutatión reducido sobre el centro electrofílico de un gran número de estructuras tóxicas, el glutatión es el antioxidante natural de la célula y ayuda a proteger la célula de especies reactivas como las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Kidd, 2001); por lo que si los flavonoides polihidroxilados inhiben o interrumpen la acción de la enzima se evita la recuperación del sustrato glutatión reducido y por ende se induce estrés oxidativo que pueden conducir en efectos tóxicos y mutagénicos en la célula. (Sahu y Gray, 1996).

A pesar de que son ampliamente conocidos los efectos protectores de los compuestos fenólicos debido a la habilidad de formar complejos con proteínas vía interacciones covalentes o no covalentes, los efectos anti nutritivos de los compuestos fenólicos sobre el crecimiento y desarrollo de insectos fitófagos ha sido ampliamente reportado (Summers y Felton, 1994), estos mismos autores demostraron el efecto pro-oxidante de los ácidos fenólicos ácido cafeico y ácido clorogénico, los cuales poseen como característica estructural común la sustitución orto-dihidroxi, sobre larvas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera), dicho efecto pro-oxidante se detectó por aumento de los niveles de peroxidación lipídica, proteínas oxidadas y hierro libre, los cuales conllevaron a la disminución del crecimiento y el normal desarrollo de las larvas, que sufren de altas mortalidades cuando se incorporan en la dieta los ácido fenólicos orto-di-hidroxilados. Teniendo en cuenta esto y extrapolando a los resultados de este estudio, el ácido protocatéquico (**C8**) aislado de inflorescencias de *P. subtomentosum*, el cual está relacionado con el ácido cafeico y el ácido clorogénico ya que posee la sustitución orto-dihidroxi característica estructural responsable de generar el efecto pro-oxidante observado en el estudio de Summers y Felton; y considerando que tanto *S. frugiperda* como *H. zea* pertenecen a la misma familia y al mismo orden de insectos, podemos concluir que la mortalidad observada sobre las larvas de *S. frugiperda* y causada por el ácido Protocatéquico (**C8**) se debe al importante efecto pro-oxidante que genera la producción de anión superóxido y la liberación de hierro que termina en estrés oxidativo

de los tejidos del intestino medio de las larvas y por tanto los hace un importante componente tóxico para los Lepidópteros.

La presente investigación es el primer reporte de flavonoides aislados de especies del género *Piper* con actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, sin embargo es importante tener en cuenta que es ampliamente reportada la potente actividad de amidas aisladas de especies de este mismo género contra diferentes tipos de insectos, entre ellos larvas de *Spodoptera spp.* (Boonen *et al.*, 2012; Kitayama *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2002).

2.3.2 Efecto de los extractos etanólicos de parte aérea de *P. septuplinervium* y las inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda*

El insecto, *S. frugiperda* produce daños al follaje cuando es larva siendo más voraz en los primeros instar de dicha etapa del ciclo de vida; es por esta razón que los ensayos de determinación de actividad insecticida, cuando se usa el gusano cogollero como insecto blanco, se hacen cuando este se encuentra en larva; sin embargo si dentro de las investigaciones se incluye la búsqueda de sustancias que afecten los demás estadios del ciclo de vida del insecto se está ejerciendo una forma de control de la plaga. Después de realizar la purificación de las fracciones activas, obteniendo 9 sustancias de las que las estructuras con OH fenólicos fueron las más activas, se decidió evaluar el efecto de los extractos etanólicos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda* y ver si se podía afectar el desarrollo normal del organismo, en busca de una manera adicional de control. Las larvas neonatas de *S. frugiperda* se alimentaron con dieta artificial la cual contenía los extractos etanólicos de *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum* a tres concentraciones correspondientes a 300 ppm y 200 ppm, 200 ppm y 100 ppm, 100 ppm y 50 ppm respectivamente, se utilizaron como controles relativo y absoluto, etanol y dieta artificial. Se realizó un análisis sencillo de varianza, usando la prueba de Tuckey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Los parámetros considerados para determinar los efectos en el desarrollo normal de los insectos fueron:

- **Retraso en estado de larva:** se registró la longitud cada 48 horas y se comparó contra los tratamientos control (etanol y dieta artificial).
- **Paso entre estadíos:** una vez el control absoluto (dieta artificial) alcanzó el 80% de pupación se registró el tiempo de paso de estadio a estadio, se comparó el tiempo de retraso en función al control.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados

- **Retraso en estado de larva:**

En la Figura 2-26 y 2-27 se muestra una de las lecturas realizadas, en donde se evidencia el retraso en estado de larva de *S. frugiperda*, generado por los extractos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum*

Figura 2-26. Retraso en el crecimiento de *Spodoptera frugiperda*, generado por el extracto de parte aérea de *P. septuplinervium* al ser administrado en la dieta.

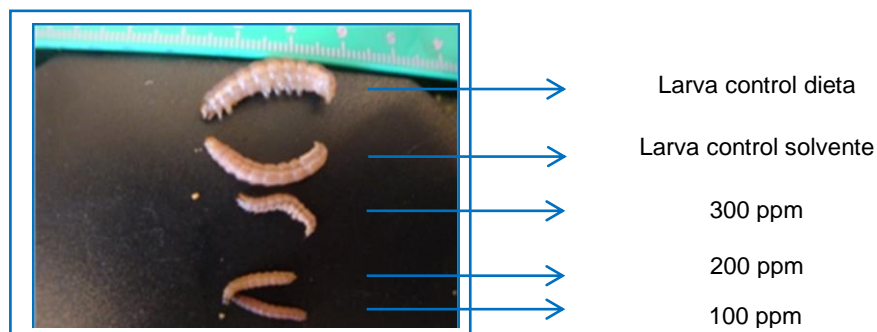
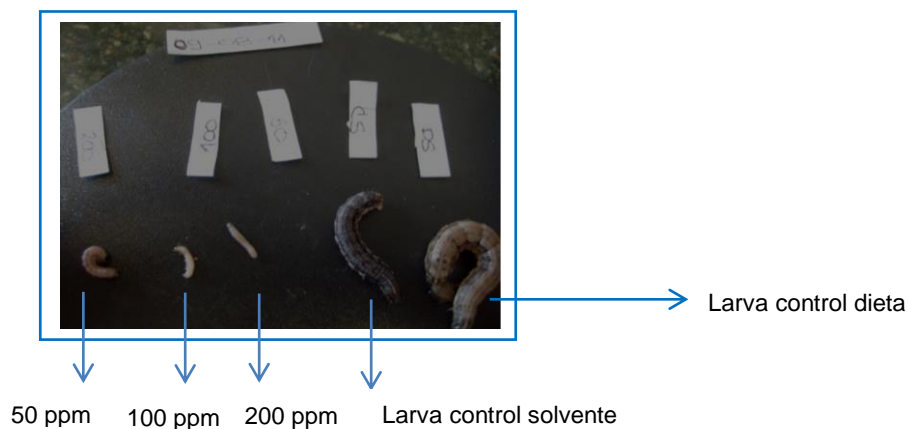


Figura 2-27. Retraso en el crecimiento de *Spodoptera frugiperda*, generado por el extracto de inflorescencias de *P. subtomentosum* al ser administrado en la dieta.



En las Tablas 2-12 y 2-13 se describen la comparación de la longitud de las larvas en cada tratamiento con el control absoluto durante los primeros 19 días de incubación, día en el cual este último alcanzó el 80% de pupación.

Tabla 2-12 Comparación del efecto del extracto de parte aérea de *P. septuplinervium* sobre el tamaño de las larvas de *S. frugiperda* durante los primeros 19 días de incubación.

Dosis	Tamaño de Larva (mm)*								
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15	Día 17	Día 19
300 ppm	3,2 ± 0,44	3,4 ± 0,57	10 ± 0,82	11,8 ± 1,30	13,7 ± 2,06	15,7 ± 4,50	16,0 ± 3,00	23,0 ± 0	19,0 ± 0
200 ppm	4,0 ± 1,87	5,2 ± 1,48	11,2 ± 0,837	12,2 ± 1,30	14,5 ± 1,00	16,0 ± 3,00	18,2 ± 2,50	17,8 ± 0,95	21 ± 0
100 ppm	4,8 ± ,60	7,3 ± 2,13	10,2 ± 1,48	13 ± 4,08	18,2 ± 0,44	17,2 ± 1,50	20,4 ± 2,50	17,3± 4,00	21 ± 3,0
Control solvente	8,8 ± 1,79	15,6 ± 1,95	21 ± 2,9	24 ± 2,05	24,8 ± 2,17	28,0 ± 1,41	28,6 ± 2,60	33,2 ± 1,50	35 ± 0
Control dieta	9,2 ± 1,2	19 ± 2,9	19,8 ± 2,9	25,2 ± 3,1	26,6 ± 1,34	32,0 ± 2,44	28,3 ± 3,50	33,5 ± 2,12	34,5 ± 0,82

*Media ± DS de cinco repeticiones

Tabla 2-13 Comparación del efecto del extracto de inflorescencias de *P. subtommentosum* sobre el tamaño de las larvas de *S. frugiperda* durante los primeros 19 de días de incubación

Dosis	Tamaño de Larva (mm)*								
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15	Día 17	Día 19
200 ppm	3,08 ± 0,73	6,50 ± 0,7	10,8 ± 1,09	13,0 ± 1,73	17,3 ± 0,57	22,6 ± 0,57	26,3 ± 1,15	29,3 ± 1,15	31,0 ± 1,41
100 ppm	3,70± 0,44	5,00 ± 0,35	12,6 ± 2,07	14,4 ± 1,34	20,1 ± 0,74	24,2 ± 1,09	27,2 ± 1,30	27,5 ± 2,88	30,0 ± 0
50 ppm	4,40 ± 0,49	4,70 ± 0,97	10,6 ± 1,51	16,5 ± 1,41	22,2 ± 1,30	24,6 ± 0,89	27,0 ± 1,58	28,4 ± 1,29	30,6 ± 0,57
Control solvent	9,90 ± 0,22	15,8 ± 1,09	20,8 ± 0,83	23,2 ± 2,16	25,8 ± 1,60	28,6 ± 0,89	29,5 ± 1,91	32,6 ± 0,57	33,0 ± 1,73
Control dieta	11,7 ± 0,44	15,9 ± 1,24	18,4 ± 0,54	24,2 ± 1,30	27,0 ± 1,00	31,2 ± 2,06	29,6 ± 2,08	32,5 ± 0,70	33,7 ± 2,06

*Media ± DS de cinco repeticiones

La lectura del tamaño de las larvas evidenció importantes retrasos en el crecimiento durante los primeros 13 días de incubación con los dos extractos etanólicos a las tres concentraciones ensayadas, el análisis de varianza permite inferir diferencias significativas ($p < 0,001$) durante los primeros cinco registros de control de longitud, en donde además se evidencia que el solvente empleado en la extracción no produce efectos en el desarrollo del animal. Las disminuciones de tamaño en los primeros instar larvales son cercanas al 50% en la mayoría de los tratamientos con respecto a los controles empleados los cuales alcanzan un tamaño máximo cercano a los 35,0 mm; el efecto observado anteriormente sobre las larvas de *S. frugiperda* con los extractos ensayados se debe a la presencia de metabolitos fenólicos, lo cual es similar a lo que ocurre en otros lepidópteros como *Helicoverpa zea* y *Spodoptera litura* en los cuales la quercetina (3',4', 5, 7, tetrahidroxi-flavonol) causa detrimento en el desarrollo en los primeros estadios del ciclo de vida debido a la acción pro-oxidante de este tipo de metabolitos que entre otras causa inhibición de las oxidasas y afecta directamente la respiración mitocondrial; en estados más avanzados del desarrollo larval los niveles de oxidasas se incrementan de tal forma que el insecto crea mecanismos de detoxificación (Simmonds, 2001). Summers y Felton reportan que de manera general los ácidos fenólicos *o*-dihidroxisustituidos como el ácido protocatéquico presente en el extracto de inflorescencias de *P. subtomentosum*, tiene un alto efecto sobre la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en el intestino medio de los tejidos de las larvas *H. zea* (Lepidoptera) y por lo tanto conducen a deterioro sobre el crecimiento y el desarrollo de las larvas. (Summers y Felton, 1994)

- **Retraso en el paso de estadio a estadio**

Una vez el control alcanzó el 80% de la pupación se registraron en los demás tratamientos el número de individuos en cada estado del ciclo de vida y el tiempo que demora el paso de larva a pupa y de pupa a adulto, con respecto al control. En la Tabla 2-14 y 2-15 se presenta el efecto sobre la pupación, y la mortalidad producida por los tratamientos después de 19 días de incubación y los patrones de emergencia entre estadios del ciclo de vida del gusano cogollero.

Tabla 2-14. Efecto sobre la pupación y la mortalidad de *S. frugiperda* producida por los extractos de inflorescencias de *P. subtomentosum* y la parte aérea de *P. septuplinervium* después de 19 días de incubación

Tratamiento	L (%) ^a	P (%) ^b	A (%) ^c	M (%) ^d
<i>P. septuplinervium</i> 300 ppm	11,3	6,8	1, 2	80,7
<i>P. septuplinervium</i> 200 ppm	15,9	3,4	5,7	75
<i>P. septuplinervium</i> 100 ppm	13,6	3,4	0	83
<i>P. subtomentosum</i> 200 ppm	8,6	15,7	4,3	71,4
<i>P. subtomentosum</i> 100 ppm	23,0	20	0	57,0
<i>P. subtomentosum</i> 50 ppm	24,5	7,0	1,5	67,0
Control dieta	20	80		

^a L (%): larvas sobrevivientes x 100/total de individuos restantes a día 19

^b P (%): pupas x 100/ total de individuos restantes a día 19

^c A (%): adultos emergentes x 100/ total de individuos restantes a día 19

^d M (%): larvas muertas x 100/total de individuos restantes a día 19

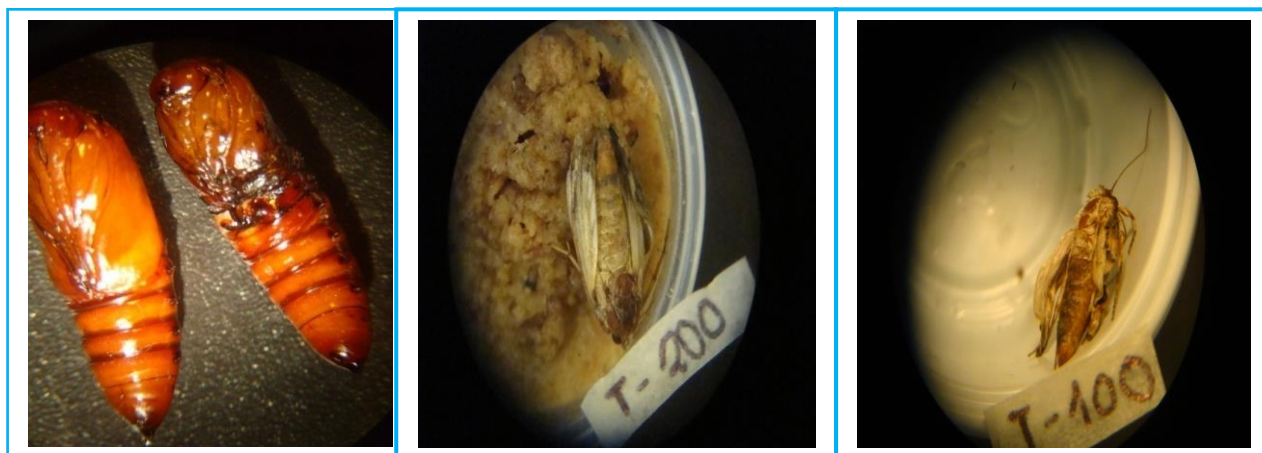
Tabla 2-15 Efecto de los extractos de parte aérea de *P. septuplinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* sobre los patrones de emergencia y paso de estadio a estadio de *S. frugiperda* después del día 19 de incubación

TRATAMIENTO	LARVA A PUPA	PUPA A ADULTO
<i>P. septuplinervium</i> 300 ppm	Larvas no logran pasar a pupa (mueren en día 36)	Día 24 a 38
<i>P. septuplinervium</i> 200 ppm	Larvas no logran pasar a pupa (mueren día 36 a 48)	Día 24 a 34
<i>P. septuplinervium</i> 100 ppm	Larvas no logran pasar a pupa (mueren día 26 a 28)	Día 28 a 36
<i>P. subtomentosum</i> 200 ppm	Larvas no logran pasar a pupa (mueren día 26 a 32)	Día 26 a 30
<i>P. subtomentosum</i> 100 ppm	Dos larvas logran pasar a pupa en el día 32 las pupas mueren. Las demás larvas mueren del día 24 al 32	Día 24 a 30
<i>P. subtomentosum</i> 50 ppm	Larvas no logran pasar a pupa (mueren día 24 a 32)	Día 24 a 32
Control solvent	Día 19 a día 21	Día 26 a día 28
Control dieta	Día 19 a día 20	Día 26 a día 28

Los resultados de la Tabla 2-14 evidencian la influencia de los extractos en la pupación, ya que mientras que el tratamiento control llega al 80% de pupación, los organismos expuestos a los diferentes tratamientos no alcanzan el 20% de pupación; es importante anotar que se observa una alta cantidad de organismos muertos en estado de larva en todos los tratamientos. Una vez se estableció la cantidad de animales en cada estadio en el día 19 de incubación se determinó si existía algún retraso en los pasos entre estadios; como se observa en la Tabla 2-15 las larvas vivas en el día 19 no logran culminar su desarrollo en todos los tratamientos; mientras existe un retardo en la emergencia del adulto en los organismos que en el día 19 alcanzan el estado de pupa.

En este ensayo no fue posible tener parejas de adultos hembras y machos suficientes para evaluar el efecto en la oviposición, sin embargo como se observa en la Figura 2-28 tanto en pupas como en adultos se registraron malformaciones muy seguramente por el efecto pro-oxidante de los componentes de los extractos etanólicos ensayados que conllevan a la degradación del ADN del insecto.

Figura 2-28 Mal formaciones causadas a las pupas y los adultos de *S. frugiperda* después de incluir los extractos de parte aérea de *P. septuclinervium* e inflorescencias de *P. subtomentosum* en la dieta.



2.4 Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos en este capítulo podemos proponer a los extractos de parte aérea de *Piper septuplinervium* y a los compuestos determinados como activos, que pueden ser encontrados en otras fuentes vegetales, a ser candidatos para hacer estudios de actividad en condiciones controladas en invernadero y en campo.
- El trabajo fitoquímico desarrollado en *P. subtomentosum* y *P. septuplinervium* contribuye al conocimiento químico de las especies y del género, pues no hay reportes previos a esta investigación sobre el particular. El estudio fitoquímico bioguiado de los extractos de inflorescencias de *P. subtomentosum* y parte aérea de *Piper septuplinervium* condujo al aislamiento de 9 compuestos; los cuales están de acuerdo con la quimiotaxonomía del género *Piper*
- Se propone que la actividad pro-oxidante de los metabolitos fenólicos aislados de las fracciones activas de los extractos estudiados es uno de los mecanismos en los que actúan frente a las larvas de *S. frugiperda*
- Además de determinar que los metabolitos aislados en este trabajo poseen incidencia en la actividad insecticida (larvicida) presentada inicialmente por los extractos, se determinó que la parte aérea de *Piper septuplinervium* y las inflorescencias de *Piper subtomentosum* producen retrasos en el crecimiento normal de las larvas (retrasos del 50%), mal formaciones en las pupas y en los adultos y en algunos casos afectan el sistema enzimático que regula el paso de las larvas al estado de pupa.

2.5. Bibliografía

Abdelwahab, S., Mohan, S., Abdulla, M., Sukari, M., Taha, M., Syam, S., Ahmad, S., Lee, K. The methanolic extract of *Boersenbergia rotunda* (L.) and its major compound Pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 137, 963.

Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B., Farooq S., Ali, M., Khan, M. Biological role of *Piper nigrum* (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2012**, S 1945- S1953.

An, L., Guan, S., Shi, G., Bao, Y., Duan, Y., Jiang, B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺ induced neurotoxicity in PC12 cell. *Food Chemical Toxicology*. **2006**, 44, 436-443.

Avila, M., Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., Cuca, L.E. Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C.DC (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*. **2011**, 40, 25-33.

Ayres, D.C., Loike J.D. (1990) Lignans: Chemical, biological and clinical properties, First Edition; Cambridge University Press: New York , pp 208-212.

Ayyanar, M., Ignacimuthu, S. Ethnobotanical survey of medicinal plants commonly used by Kani tribals in Tirunelveli hills of Western Ghats, India. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 134, 581-864.

Baldoqui, D.C., Kato, M.J., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V., Young, M.C., Furlan, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 899-902.

Bernard, C.B., Krishnamurty, H.G., Chauret, D., Durts, T., Philogene, B.J.R., Sanches-Vindas, P., Hasbun, C., Poveda, L., San Roman, L., Arnason, J.T. Insecticidal Defenses of Piperaceae from the Neotropics. *Journal of Chemical Ecology*. **1995**, 21, 6, 801-813

Bathia, A., Bharti, S., Tewari, S., Sidhu, O., Roy, R. Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* Dunal fruits using GC-MS and NMR spectroscopy. *Phytochemistry*. **2013**, 93, 105-115.

Boonen, J., Bronselaer, A., Nielanst, J., Veryser, L., De tré, G., De Spieheleer, B. Alkamid database: chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**, 142, 563-590.

Carpinella, M.C., Defago, M.T., Valladares, G., Defago, M., Palacios, S.M. Antifeedant and insecticide properties of limonoid from *Melia azederach* (Meliaceae) with potential use for pest management. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 369-374.

Cerón, J.; Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico, Primera Edición., Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, **2004**, 211-221.

Céspedes, C.L., Calderón, J.S., Lina, L., Aranda, E. Growth effects on fall army worm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela spp* (Meliaceae). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 1903-1908.

Chauret, D., Bernard, C., Arnason, J., Durts, T. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *Journal Natural Products*. **1996**, 59, 152-155.

Chen, S., Huang, H., Cheng, M., Wu, C., Ishikawa, T., Peng, C., Chang, H., Wang, C., Wong, S., Chen, I. Neolignans and phenylpropanoids from roots of *Piper taiwaense* and their antiplatelet and antitubercular activities. *Phytochemistry*. **2013**, 93, 203-209.

Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. *An Introduction and Overview*. En S. M. Colegate; R. J. Molyneux, (Eds), *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Segunda Edición. CRC Press. New York. **2008**, pp. 1-3.

Correa, E., Sterner, O., Echeverri, F. Prenylhydroxybenzoic acid compounds with pungent activity from *Piper arieianum* (CDC) leaves. *Phytochemistry*. **2011**, 72, 238-241.

Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. (Eds) **(2005)**. *Anticancer Agents from Natural Products*. Taylor & Francis Group, New York., pp. 1-3.

Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. **(2010)**. Terrestrial Plants as source of novel pharmaceutical agents. En *Comprehensive Natural Products: Chemistry and Biology*. Elsevier, vol. 2, cap. 2, pp. 5-35.

-
- Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M.; Organic Structure Analysis; Oxford University Press: New York, **2010**, pp, 88, 90.
- Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., Brielman, H (**2006**). Natural Products from Plants. Taylor & Francis Group. Second Edition., pp 90-98.
- Danelutte, A., Lago, J., Young, M., Kato, M. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 555-559.
- De Campos, M., Filho, V., DaSilva, R., Yunes, R., Zacchino, S., Juarez, S., Bella Cruz, R., Bella Cruz A. Evaluation of antifungal activity of *Piper solsianum* C. DC. Var. solsianum (Piperaceae). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 28, 8, 1527-1528.
- Dewick, P (**2002**). Medicinal Natural Products, Second Edition; John Willey & Sons: New York,; pp.142, 204.
- De Oliveira A., Mesquita, J., Tempone, A., Lago, J., Guimarães, E., Kato, M.J. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacolophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Experimental Parasitology*. **2012**, 132, 383-387.
- Dyer, L.; Palmer, A (**2004**). *Piper*. A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution, First Edition; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, pp 1-4.
- EPA, 2013. Insecticidas Biológicos. [Consultado: Septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch7.pdf>.
- Facundo, V.A., Bálico, L.J., Lima, D., Santos, A., Morais, S., Da Silva, G., Militão, J. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **2012**, 45, 206-208.
- Facundo, V.A., Braz-Filho R. C-methylated flavonoids from the roots of *Piper carniconnectivum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **2004**, 32, 1215-1217.
- Facundo, V., Morais, S. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **2003**, 31, 111-113.
- Galini, D. L.; Wiemer, D. F. Villiramulins A and B: new phenol derivatives from *Piper villiramulum*. *Journal of Organic Chemistry*. **1993**, 58, 7804-7807.

Ghorbani, A., Langenberger, G., Feng, L., Sauerborn, J. Ethnobotanical study of medicinal plants utilized by Hani ethnicity in Naban River Watershes National Nature Reserve, Yunnan, China. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 134, 651-667.

González-Coloma, A.; Reina, M.; Díaz, C. E.; Fraga, B. M. (2010). *Natural Products-Based Biopesticides for Insect Control*. En: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Volume 3: Development & Modification of Bioactivity. Lewis Mander y Hung Wen Liu (Eds). Elsevier, Oxford: 3, 237 – 268.

Gulzar, T., Uddin, N., Siddiqui, B., Naqvi, S., Begum, S., Tariq, R. New constituents from the dried fruit of *Piper nigrum* Linn., and their larvicidal potential against the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *Phytochemistry Letters*. **2013**, 6, 219-223.

Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. **2006**, 27, 1-93.

Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H (1980). *The Flavonoids*; Chapman and Hall: London, pp 78-126.

Harborne, J., Williams, C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*. 2000, 55, 481-504.

Hermoso, A., Jimenez, I., Mamani, Z., Bazzocchi, I., Piñero, J., Ravelo, A., Valladares, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic relates compounds. Structural Requirements for Activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2003**, 11, 3975-3980.

Herebain, D., Hanisch, B., Marner, F. Strategies for gathering structural information on unknown peaks in the GC/MS analysis of *Corynebacterium glutamicum* cell extracts. *Metabolomics*, **2005**, 1, 317-324.

Hodnick, W., Duval, D., Pardini, R. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochemical Pharmacology*. **1994**, 47, 573-580.

Isman, M. B. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*. **2006**, 51, 45-66.

Kaufman, P. B.; Kirakosyan, A.; McKenzie, M.; Dayanandan, P.; Hoyt, J. E.; Li, C. *The Uses of Plant Natural Products by Humans and Risks Associated with Their Use*. En L. Cseke; A. Kirakosyan; P. Kaufman; S. Warber; J. Duke; H. Brielmann, (Eds), Natural Products from Plants. CRC Taylor & Francis. New York. **2006**, pp. 442–468

Kidd, P. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review*. **2001**, 2, 155-173.

Kitayama, T., Yasuda, K., Kihara, T., Ito, M., Fukumoto, H., Morimoto, M. Piperine analogs in a hydrophobic fraction from *Piper ribersoides* (Piperaceae) and its insect antifeedant activity. *Applied Entomology and Zoology*. **2013**, DOI 10.1007/s13355-013-0204-4.

Koma, S., Omoregie, H. Piperine-Type amides: review of the chemical and biological characteristics. *International Journal of Chemistry*. **2013**, 5, 99-122.

Krief, S., Hladik, C., Haxaire, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 101, 1-15.

Lago, J., Chen, A., Young, M.C., Guimarães, E., de Oliveira, A., Kato, M.J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* and *Piper hostmannianum* C.DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2009**, 2, 96-98.

Lago, J.H.G., Ramos, C.S., Casanova, D.C., Morandi, A., Bergamo, D.C., Cavaleiro, A., Bolzani, V., Furñan, M., Guimarães, E.F., Young, M.C., Kato, M.J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporoides* and *Cladosporium sphaerospermum*. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67, 1783-1788.

Leite, A.C., Kato, M., Soares, R., Guimarães, A., Santos-Mallet, J., Cabral, M. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2012**, 22, 517-521.

López, S., Rojas, A., Ospina, S., Ceron, J. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and coleoptera pest. *FEMS Microbiology Letters*. **2010**, 302, 93-98.

Lugenwa, F., Huang, F., Bentley, M., Mendel, M., Alford, R. A *Heliothis zea* antifeedant from the abundant birchbark triterpene Betulin. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **1990**, 38, 493-496.

Martins, R., Latorre, L., Sartorelli, P., Kato, M. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 843-846.

Malquichagua, K., Delgado, G., Lluncor, L., Young, M.C., Kato, M.J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry*. **2005**, 66, 573-579.

Molina Torres, J., Garcia, A. Alcamidas en plantas, distribución e importancia. Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad de Irapuato del Cinvestav México, **2001**, 377-388.

Morimoto, M., Tanimoto, K., Nakano, S., Ozaki, T., Komai, K. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 389-393.

Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss & Dunen ex Batt & Trab. *Records in Natural Products*. 2012, 6, 292-295.

Nascimento do, J., David, J., Davis, J. Occurrence, Biological Activities and ¹³C NMR data of Amides from *Piper* (Piperaceae). *Química Nova*. **2012**, 35, 2288-2311.

Nunkoo, D., Mahomoodally, M. Ethnopharmacological survey of native remedies commonly used against infectious diseases in the tropical island of Mauritius. *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**, 143, 548-564.

Orjala, J.; Mian, P.; Rali, T.; Sticher, O. Gibbilimbols A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilimum*. *Journal of Natural Products*. **1998**, 61, 939-941.

Park, B., Lee, S., Choi, W., Jeong, C., Song, C., Cho, K. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum*. *Crop Protection*. **2002**, 21, 249-251.

Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C., Boll, P. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 4, 597-673.

-
- Parra, J., Delgado, W., Cuca, L. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2011**, 4, 280-282.
- Parra, J., Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., Cuca, L.E. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*. **2013**, 6, 590-592.
- Pascual-Villalobos, M. J. (1996). Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid, España. p.p. 6-18.
- Perez, G. Los flavonoides: Antioxidantes o pro-oxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. **2003**, 22, 48-57.
- Picking, D., Younger, N., Mitchell, S., Delgado, R. The prevalence of herbal medicine home use and concomitant use with pharmaceutical medicines in Jamaica. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 137, 305-311.
- Plazas, E., Cuca, L.E., Delgado, W. Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*. **2008**, 37, 135 – 144. .
- Procházkova, D., Bousová, I., Wihelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **2011**, 82, 513-523.
- Pungitore, C., Garcia, M., Gianello, J., Sosa, M., Tonn, C. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera:Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. **2005**, 41, 433.
- Regnault-Roger, C., Philogene, B., Vincent, C.. “Biopesticides D’ Origine Végétale”. Tec&Doc-Lavoisier. **2003**, p.p. 46-47
- Ruíz, C., Haddad, M., Albán, J., Bourdy, G., Reategui, R., Castillo, D., Sauvain, M., Deharo, E., Estevez, Y., Arevalo, J., Rojas, R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. *Phytochemistry Letters*. **2011**, 2, 363-366.
- Saga Kitamura, R.O., Romoff, P., Young, M.C., Kato, M.J., Lago, J.H. Chromenes from *Peperomia sarpens* (Piperaceae). *Phytochemistry*. **2006**, 67, 2398-2402.

Sahu, S., Gray, G. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters*. **1996**, 104, 193-196.

Sandberg, F., Perera-Ivarson, P., El-Seedi H. A Swedish collection of medicinal plants from Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 102, 336-343.

Scott, I., Jensen, H., Philogene, B., Arnason, J. A review of *Piper spp* (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemical Reviews*. **2008**, 7, 65-75.

Scott, I., Puniani E., Durst, T., Phelps, D., Merali, S., Assabgui R., Saches-Vindas, P., Poveda, L., Philogene, B., Arnason, T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology*. **2002**, 4, 137-144.

Shimura, H., Matsura, M., Takada, N. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macrantus* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry*. **2007**, 68, 1442-1447.

Silva, G. (2010). "Actividad de polvo, extractos y aceite esencial de *Peumus boldus* Molina solos y en mezcla con *Bacillus thuringiensis* Berliner contra *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie)". Tesis Doctoral, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, México. p 42.

Simmonds, M. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*. **2001**, 56, 245-252.

Singh, S., Prasad, C., Olsen, C., Jha, A., Parmar, V., Wengel, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry*. **1996**, 43, 1355-1360

Sosa, M., Tonn, C. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry Review*. **2008**, 7, 3-24

Summers, C., Felton, G. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti herbivore chemistry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **1994**, 24, 943-953.

-
- Terreux, C., Gupta, M., Hostettmann, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49, 2, 461-464.
- Trindade, F., Stabeli, R., Facundo, V., Cardoso, C., da Silva, M., Gil, L., Silva-Jardim, I., de Almeida, A. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2012**, 22, 979-984
- Thomas, E., Semo, L., Morales, M., Noza, Z., Nuñez, H., Cayuba, A., Noza, M., Humaday, N., Vaya, N., Vaya, J., Van Damme, P. Ethnomedicinal practices and medicinal plant knowledge of the Yuracarés and Trinitarios from Indigenous Territory and National Park Isiboro-Sécure, Bolivian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133, 153-163.
- Valdivia, C.; Marquez, N.; Eriksson, J.; Vilaseca, A.; Muñoz, E.; Sterner, O., Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 4120-4126.
- Valladares, G., Defago, M.T., Palacios, S.M., Carpinella, M.C. Laboratory evaluation of *Melia azederach* (Meliaceae) extracts against the Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomeliadae). *Journal Economical Entomology*. **1997**, 90, 747-750
- Vásquez, J., Jimenez, S., Gomez, I., Rey, J., Henao, A., Marín, D., Romero, J., Alarcon, J. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia-The traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 146, 449-455.
- Viqar, A.; Anwer, B.; *Spectroscopy data of Steroid Glycosides*, Springer, 2007. D.O.I. 10.1007/978-0-387-39571-5_552.
- Williams, D., Stone, M., Hauck, P., Rahman, K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *Journal of Natural Products*. **1989**, 52, 1189-1208.
- Yamashita, N., Tanemura, H., Kawanishi, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II). *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*. **1999**, 425, 107-115.
- Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Murakami, K. Prooxidant activity of flavonoids copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Molecular Genetics and Metabolism*. **1999**, 68, 468-472.

Yu, S., Abo-Elghar, G. Allelochemicals as inhibitors of Glutathione S-Transferases in the Fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **2000**, 68, 173-183.

3. Derivados de flavonoides naturales y sintéticos y su efecto sobre el comportamiento alimentario de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

3.1 Generalidades

Gracias a una serie de estímulos bióticos y abióticos las especies vegetales han desarrollado mecanismos que les han permitido convertirse en los seres vivos dominantes dentro de diversos ecosistemas terrestres, haciendo que muchos individuos con los que comparten su hábitat dependan estrechamente de ellas, generando en estos últimos mecanismos de adaptación que implican procesos de coevolución (Camarena, 2009); estos mecanismos incluyen barreras físicas y químicas pre-existentes y algunas que se activan al ataque de herbívoros, los cuales han desarrollado estrategias para evadir las defensas generadas por las plantas, creándose así un equilibrio dinámico entre plantas e insectos (Harborne, 1982). Las defensas de tipo químico pueden ser directas en forma de sustancias tóxicas, disuasorias, repelentes y reductoras de la digestibilidad (Cornell y Hawkins, 2003), o indirectas mediante sustancias volátiles que atraen a los enemigos naturales de los insectos que atacan a la planta, las sustancias químicas responsables de esta defensa son comúnmente conocidas como metabolitos secundarios los cuales pueden ser metabolizados en las plantas por diferentes vías siendo los terpenos, alcaloides y flavonoides los tipos de metabolitos más comúnmente reportados como defensas químicas en diferentes especies de plantas (Drijfhout. y Morgan, 2010); los mecanismos de defensa químicos que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución tienen un gran potencial en el desarrollo de métodos más racionales para el control de plagas, bien como protectores naturales de las plantas o como modelos para el desarrollo de productos sintéticos (Murray *et al.*, 1999).

De los metabolitos mencionados anteriormente, los flavonoides son los más ampliamente distribuidos en las especies vegetales, biosintéticamente hablando se derivan de ruta mixta, y han sido motivo de múltiples estudios (Harborne, 2000; Treutter, 2006; Simmonds, 2001; Simmonds, 2003; Hilker y Meiners, 2011; Sosa y Tonn, 2008), que han confirmado su rol en diferentes tipos de interacciones que pueden darse entre plantas e insectos, las cuales tienen que ver principalmente con alimentación, oviposición, y captura por parte de los herbívoros de los compuestos flavonoides que poseen las plantas para usarlos como mecanismos de defensa frente a otros depredadores. Simmonds en el 2001 evidenció que la respuesta alimentaria de algunos insectos polívoros frente a compuestos de tipo flavonoide depende del orden del insecto, la concentración ensayada y de la edad del insecto; uno de los ejemplos de esto es el comportamiento observado con la rutina (quercetina-3-O-rutinósido), se ha demostrado que este flavonoide es fagoestimulante en insectos como el ortóptero *Schistocerca americana* más conocido como langosta y las larvas del Lepidóptero *Heliothis virescens*; sin embargo cuando se administra rutina en concentraciones superiores al rango de 10^{-3} M el efecto observado en larvas en los Lepidópteros *Heliothis zea* y de *Helicoverpa armigera*, plagas de algodón y col respectivamente es totalmente contrario ya que el comportamiento fago estimulante no se observa y en cambio el flavonoide rutina produce deterrencia (Simmonds, 2001), lo anterior nos permite inferir que no se puede generalizar el comportamiento de una sustancia sobre diferentes insectos plaga, ni siquiera si pertenecen al mismo orden y que se debe tener muy presente la dosis probada, y el momento del ciclo de vida en la que esta se administra. Que los insectos muestren comportamientos como el expuesto anteriormente permite pensar que de alguna manera estos organismos poseen mecanismos que les permiten percibir y diferenciar diversas clases de sustancias, en este sentido existen estudios que evidencian como las larvas de Lepidópteros, orden al cual pertenecen muchos insectos plaga, tienen receptores sensoriales que responden a un rango de fagoestimulantes y deterrentes como azúcares, aminoácidos, alcaloides y diterpenos (Schoonhoven, 1982); del mismo modo en estudios más recientes se ha evidenciado que especies de Lepidópteros y saltamontes han demostrado tener receptores del gusto que responden a compuestos fenólicos (Bernays y Chapman, 2000; Simmonds *et al.*, 1990), sin embargo se desconoce la especificidad de dichos receptores y si diferencian entre los distintos núcleos de flavonoides (chalconas, flavonas, flavonoles e isoflavonas).

Además de afectar comportamientos alimentarios, se ha demostrado que los flavonoides pueden llegar a influenciar otras funciones propias del ciclo de vida de insectos como la oviposición (Simmonds, 2001); en el caso de Lepidópteros como la mariposa monarca se ha demostrado que los quimiorreceptores de contacto ubicados en los tarsos de hembras adultas tienen la capacidad de responder a una serie de extractos con alto contenido flavonoides, estimulando la oviposición de las hembras. La mayoría de las especies de plantas que estimulan dicho comportamiento tienen la similitud de contener glicósidos de flavonoides estructuralmente relacionados con la quercetina y cuya fracción de azúcar contienen principalmente glucosa, galactosa, y xilosa o galactosa, glucosa, y ramnosa. (Harborne, 2000). Teniendo en cuenta las evidencias anteriormente presentadas en las cuales se expone la importancia de los compuestos de tipo flavonoide en las interacciones planta-insecto, muchos autores han realizado estudios que involucran síntesis y semisíntesis de compuestos de tipo flavonoide o de sus análogos, orientados a obtener diversidad química y determinar si hay o no efecto de las variaciones estructurales sobre diferentes interacciones del sistema biológico en mención. (Romanelli *et al.*, 2010; Duchowicz *et al.*, 2009; Morimoto *et al.*, 2007; Morimoto *et al.*, 2003; Onyilagha *et al.*, 2004; Simmonds, 2001; Ohmura, 2000; Morimoto, 2000). Considerando que la mayoría de los metabolitos aislados de las fracciones activas de las especies estudiadas en este trabajo son de tipo flavonoide y teniendo en cuenta la importancia de este tipo de compuestos en las interacciones planta insecto, en el presente capítulo se mostrará el análisis de la incidencia sobre la mortalidad y el efecto sobre el comportamiento alimentario de *Spodoptera frugiperda* frente a las siguientes sustancias derivadas de flavonoides:

- Los derivados acétilados de la Uvangoletina (**C1**) y la Galangina (**C2**)
- Algunas chalconas con sustituyentes nitrogenados y halogenados obtenidas por condensación de *Claisen-Schmidt*
- Los análogos de carbamatos de dos de las chalconas obtenidas
- Algunos compuestos de tipo flavonoide obtenidos en otros trabajos desarrollados en el grupo de investigación (Prieto, 2012, Chiappe, 2013, Plazas *et al.*, 2008) los cuales tienen patrones de sustitución diferentes a las existentes en los compuestos naturales, semisintéticos, y sintéticos obtenidos en la presente investigación.

3.2 Materiales y Métodos

Las purificaciones de los derivados y de los compuestos sintéticos se realizaron por medio de cromatografía en columna por gravedad (CC), y por aplicación de presión mediante cromatografía flash (CF). La fase estacionaria utilizada para la purificación por CC fue sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh), para la CF fue sílica gel 60 (230-400 Mesh) Macherey–Nagel®. El monitoreo de las cromatografías en columna, el control de pureza, y el seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 HF₂₅₄ Merck y utilizando como reveladores vapores de yodo, luz UV (254 y 365 nm), vainillina/H₃PO₄, anisaldehído/H₃PO₄, y Reactivo de Draggendorff-Munier (Panreac, 2013). Todos los solventes empleados para los procedimientos cromatográficos fueron destilados y secados antes de su uso.

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados en espectrómetros Bruker Avance operando a 300, 400, y 500 MHz (¹H); 75, 100, 125 MHz (¹³C); empleando como solventes: cloroformo deuterado (CDCl₃), acetona deuterada (CD₃)₂CO, y piridina deuterada (C₅D₅N). Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz). Las multiplicidades están asignadas como sigue: s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, dd = doble doblete.

Los análisis de masas se realizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosistem GCMS usando como método de ionización impacto electrónico (IE) y en el espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 Plus Bruker, acoplado a un cromatógrafo líquido Agilent 1100, usando como método de ionización electrospray en modo negativo (ESI). Los análisis de masas de alta resolución se realizaron en un espectrómetro de masas híbrido con analizador de triple cuadrupolo - tiempo de vuelo 5600 AB Sciex. Los fragmentos significativos se indican como m/z (intensidad relativa al pico base=100), con masa exacta determinada para el ión molecular (M) o fragmento iónico adecuado.

3.2.1 Material Biológico

Las larvas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), fueron recolectadas y mantenidas de acuerdo al protocolo descrito en los numerales 2.2.3 (Capítulo 2).

3.2.2 Determinación de actividad antialimentaria (Inapetencia)

La actividad antialimentaria de los compuestos naturales, semi-sintéticos y sintéticos contra larvas de *Spodoptera frugiperda* fue evaluada a través de un ensayo de libre elección (Muñoz *et al.*, 2013). En una caja de petri provista de papel filtro húmedo se colocó una larva junto con dos discos de lechuga de 1 cm² de diámetro, uno de los cuales fue impregnado con la solución de la sustancia a evaluar, el otro disco se impregno con el mismo volumen del solvente con el que se disolvió la sustancia de interés. Las cajas selladas se llevaron a condiciones controladas (28 ± 2 °C y 65 ± 5% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz-oscuridad)) y 24 horas después se realizó la lectura del área consumida. Se ensayaron dos concentraciones por sustancia correspondientes a 50 y 10 µg/cm², realizando 10 réplicas por concentración, por sustancia ensayada. En todos los discos el solvente fue retirado por exposición a una corriente en cabina de flujo laminar durante 15 minutos. Como control positivo se usó extracto de semillas de neem. El índice antialimentario (IA) fue calculado por medio de la siguiente relación matemática.

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

Dónde:

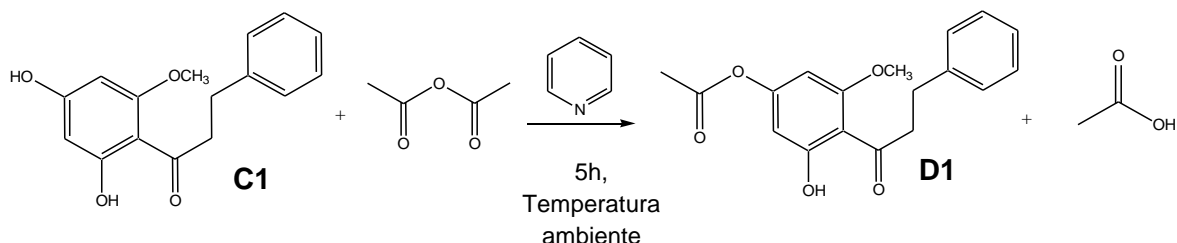
T: Promedio del área consumida en el disco tratado

C: Promedio del área consumida en el disco sin tratar.

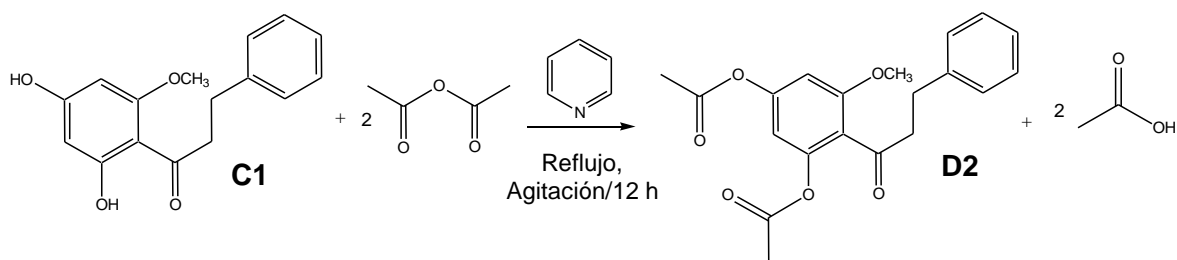
3.2.3 Síntesis y semisíntesis de los compuestos ensayados contra *Spodoptera frugiperda*

3.2.3.1 Derivados acetilados (Hermoso *et al.*, 2003)

Derivados acetilados de la Uvangoletina (D1 y D2)



Siguiendo la metodología convencional de acetilación con anhídrido acético y piridina, a una mezcla de 25 mg de Uvangoletina (**C1**) (0,091 mmol), 10,0 μL de anhídrido acético (0,11 mmol) se adicionaron dos gotas de piridina, la mezcla de reacción fue agitada constantemente durante 5 horas a temperatura ambiente, la reacción fue monitoreada por CCD. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se colocó sobre hielo triturado, se llevó a pH 5 y se extrajo sucesivamente con CHCl_3 ; las fases clorofórmicas se reunieron y se secaron con CaCl_2 , después de retirar el desecante por filtración, el solvente fue eliminado a presión reducida y el residuo fue sometido a CF eluyendo con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose un sólido amorfo amarillento denominado 2'-hidroxi-4'-acetil-6'-metoxi-dihidrochalcona (**D1**) (15 mg, 0.048 mmol, 53%).



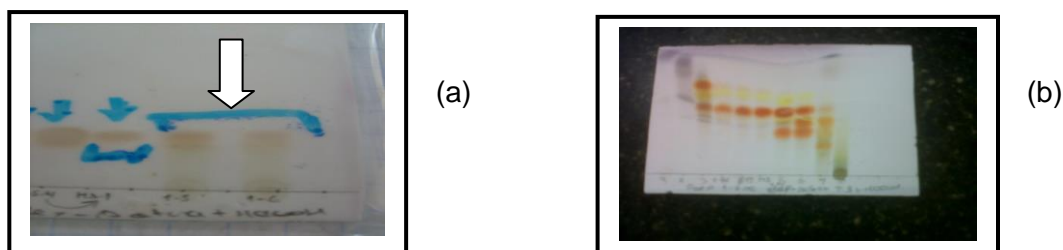
A una mezcla de 25 mg de Uvangoletina (**C1**) (0,091 mmol), 500 μL (5.29 mmol) de anhídrido acético se adicionaron cuatro gotas de piridina, la mezcla de reacción fue agitada constantemente durante 12 horas a reflujo, la reacción fue monitoreada por CCD. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se colocó sobre hielo triturado, se llevó a pH 5 y se extrajo sucesivamente con CHCl_3 ; las fases clorofórmicas se reunieron y se

secaron con CaCl_2 , el solvente fue eliminado a presión reducida y el residuo fue sometido a CF eluyendo con Hexano-AcOEt (7:3), obteniéndose un aceite amarillo denominado 2',4'-diacetil-6'-metoxi-dihidrochalcona (**D2**) (23 mg, 0,065 mmol, 71,4%).

Derivados acetilados de la Galangina

A partir de las fracciones activas F4, F5, F6 (11,5 g) de la parte aérea de *P. septuplinervium*, las cuales fueron reunidas por su perfil por CCD y de las cuales se aislaron la dihidrochalcona uvangoletina (**C1**) y el flavonol galangina (**C2**), se obtuvo una mezcla (2,95 g) con comportamiento similar a **C1** y **C2** frente a la luz UV (254 nm, 365 nm) y vainillina/ H_3PO_4 ; dicha mezcla no se pudo separar por CC y CF, por lo que se decidió acetilarla en un intento por purificarla, en la Figura 3-1 se muestran las CCD eluidas con el sistema EdP-AcOEt-Ácido fórmico (70:30:2) de la mezcla reveladas con vainillina/ H_3PO_4 antes y después de realizar la acetilación, en la Figura 3-1a se señala la corrida correspondiente a la mezcla antes de acetilar, mientras que en la Figura 3-1b se observa el control de la columna de fraccionamiento de la mezcla después de haberse sometido a la acetilación. La reacción se realizó de la misma forma que para la obtención de los derivados acetilados de la uvangoletina, modificando las cantidades de anhídrido acético y piridina por tratarse de una mezcla de peso muy superior al empleado en el caso de la obtención de **D1** y **D2** utilizando exceso de anhídrido acético, la reacción se mantuvo en reflujo por 12 horas.

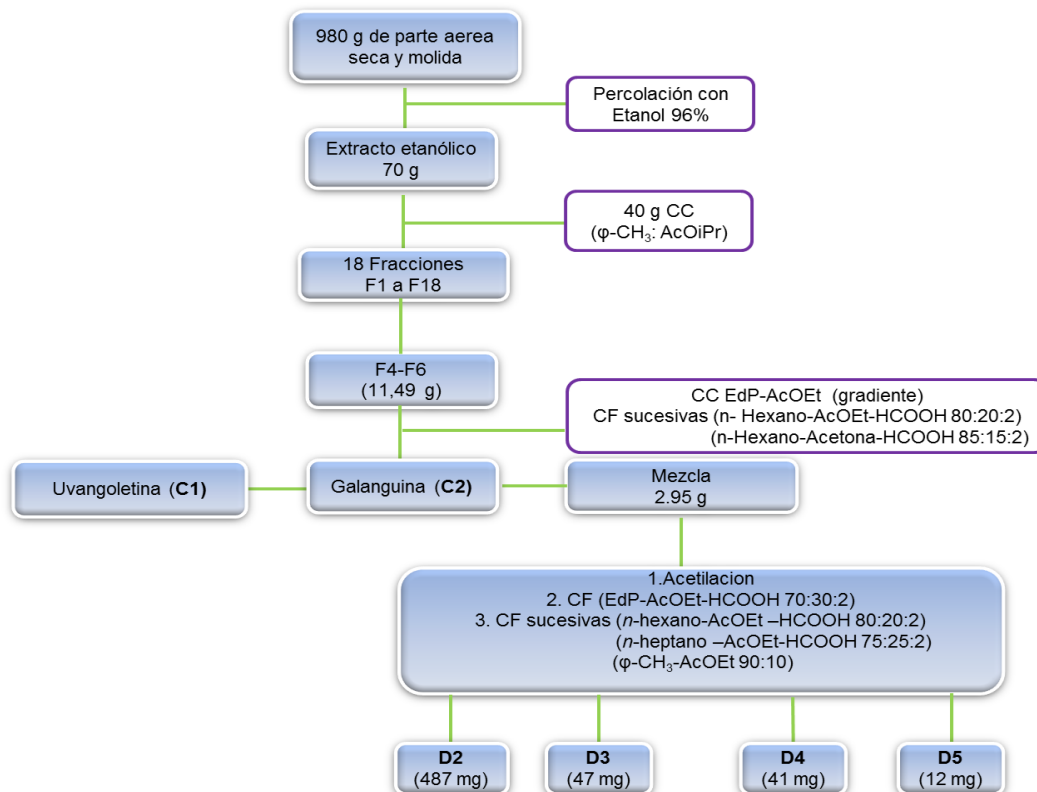
Figura 3-1. Perfiles de CCD reveladas con vainillina/ H_3PO_4 y eluidas con EdP-AcOEt- HCOOH 70:30:2 de la mezcla antes y después de la acetilación



La mezcla acetilada fue sometida a fraccionamiento por CF con el sistema de elusión EdP-AcOEt- HCOOH (70:30:2), de la cual se obtuvieron 8 fracciones totales, marcadas como MA1 a MA8, las fracciones MA2a MA7se sometieron a CF sucesivas con los sistemas de disolventes *n*-hexano-AcOEt-Ácido fórmico (80:20:2), *n*-heptano-AcOEt-Ácido fórmico (75:25:2); ϕ - CH_3 - AcOiPr (90:10) obteniendo **D2** (487 mg) y **D3** (47 mg),

D4 (41 mg), **D5** (12 mg), los tres últimos derivados corresponden a derivados acetilados de la galangina (**C2**). En la Figura 3-2 se presenta el procedimiento de obtención y purificación de la mezcla acetilada.

Figura 3-2. Procedimiento de obtención y purificación de la mezcla acetilada

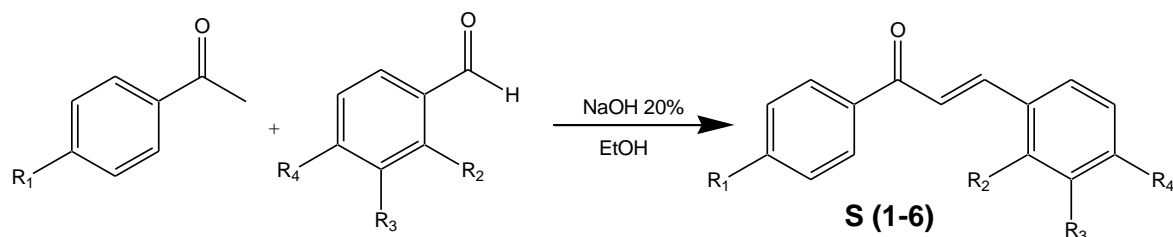


3.2.3.2. Síntesis de chalconas

Por medio de la reacción de *Claisen-Schmidt* (Lawrence *et al*, 2001), el método más comúnmente usado para la síntesis de chalconas y que involucra la condensación de una acetofenona con un aldehído aromático, se obtuvieron las chalconas **S1** a **S6**. La reacción involucró cantidades equimolares de acetofenonas y aldehídos aromáticos, las cuales fueron disueltas en etanol, el procedimiento se llevó a cabo en medio básico, por lo que fueron adicionados 2 mL de solución de NaOH 20%. Las mezclas de reacción se sometieron a reflujo y el progreso del procedimiento de síntesis fue seguido por CCD. Una vez las reacciones finalizaban el crudo obtenido se enfrió y se filtró. El sólido resultante se purificó por recristalización (RC) o por cromatografía en columna (CC). En

la Figura 3-3 y la Tabla 3-1 se muestran el esquema general de la reacción de *Claisen-Schmidt*, y las condiciones de reacción.

Figura 3-3. Esquema general de reacción para obtención de **S1-S6**



$R_1=\text{H}$	$R_2=R_3=R_4=\text{H}$	S1
$R_1=\text{H}$	$R_2=R_3=\text{H}$ $R_4=\text{N}(\text{CH}_3)_2$	S2
$R_1=\text{NH}_2$	$R_2=R_4=\text{H}$ $R_3=\text{NO}_2$	S3
$R_1=\text{NH}_2$	$R_2=R_3=\text{H}$ $R_4=\text{N}(\text{CH}_3)_2$	S4
$R_1=\text{NH}_2$	$R_2=\text{Cl}$ $R_3=R_4=\text{H}$	S5
$R_1=\text{NH}_2$	$R_2=R_3=\text{H}$ $R_4=\text{CH}_3$	S6

Tabla 3-1. Condiciones de reacción para obtención de **S1-S6**

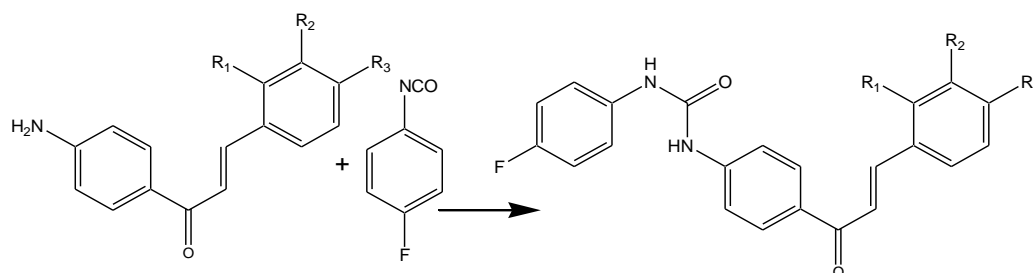
Chalcona (mmol)	Acetofenona (mmol)	Benzaldehído (mmol)	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (min)	Método de purificación
S1 (0,72)	0,96	0,96	75	120	RC
S2 (0,40)	0,80	0,80	50	120	RC
S3 (0,60)	0,75	0,75	80	210	CC
S4 (0,64)	0,75	0,75	85	95	CC
S5 (0,70)	0,78	0,78	89	180	CC
S6 (0,17)	0,84	0,84	20	120	CC

3.4.2.3 Preparación de análogos de carbamatos a partir de chalconas sintéticas.

- Preparación de análogos de carbamato a partir de las chalconas **S3** y **S5**

Una mezcla equimolar de la chalcona y *p*-fluoro-fenil-isocianato fue sometida a reflujo en CH₂Cl₂ o acetona (solvente dependiente de la solubilidad de la chalcona), la reacción fue controlada por CCD. Después de finalizada la reacción el solvente fue evaporado y el crudo de reacción fue extraído sucesivamente con CH₂Cl₂ y purificado por cromatografía en columna eluyendo con CH₂Cl₂- MeOH en diferentes proporciones. En la Figura 3-4 y la Tabla 3-2 se presenta el esquema general de reacción de obtención de los análogos de carbamato, y las condiciones de reacción en cada caso

Figura 3-4. Reacción general de obtención de análogos de carbamatos



S (7-8)

R₁=R₃=H R₂=NO₂

S7

R₁=Cl R₂=R₃=H

S8

Tabla 3-2. Condiciones de obtención de los análogos **S7** y **S8**

Análogo (mmol)	Chalcona (mmol)	Isocianato (mmol)	Solvente de reacción	Tiempo de reacción (min)	Rendimiento (%)
S7 (0.056)	0.111	0.111	CH ₂ Cl ₂	150	50.4
S8 (0.089)	0.116	0.116	CH ₂ Cl ₂	180	76.7

3.3 Resultados y discusión

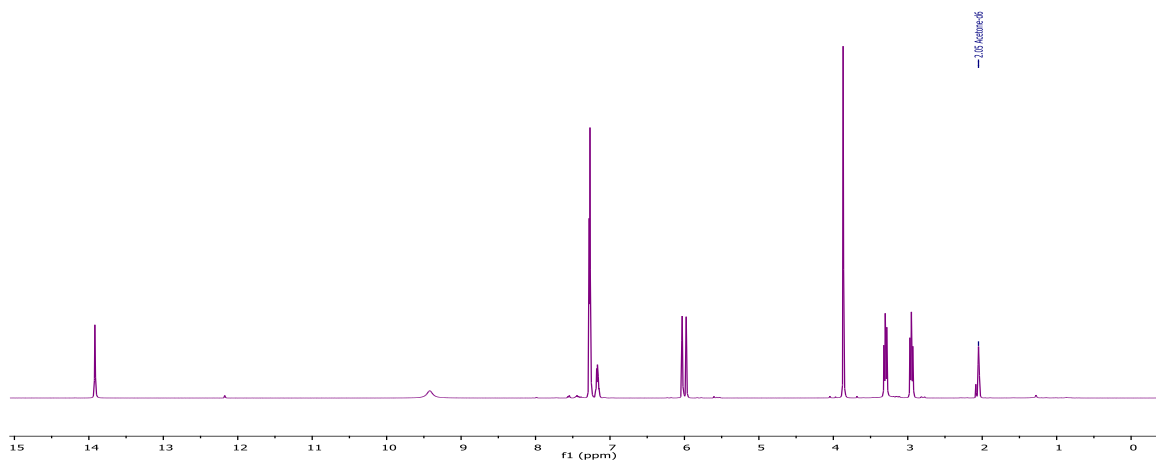
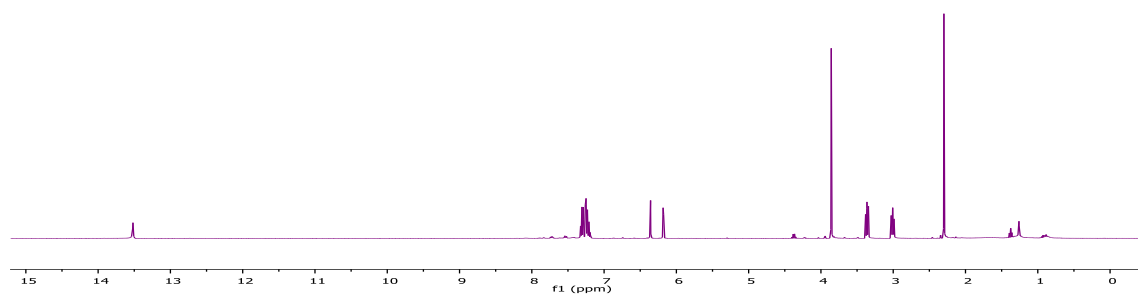
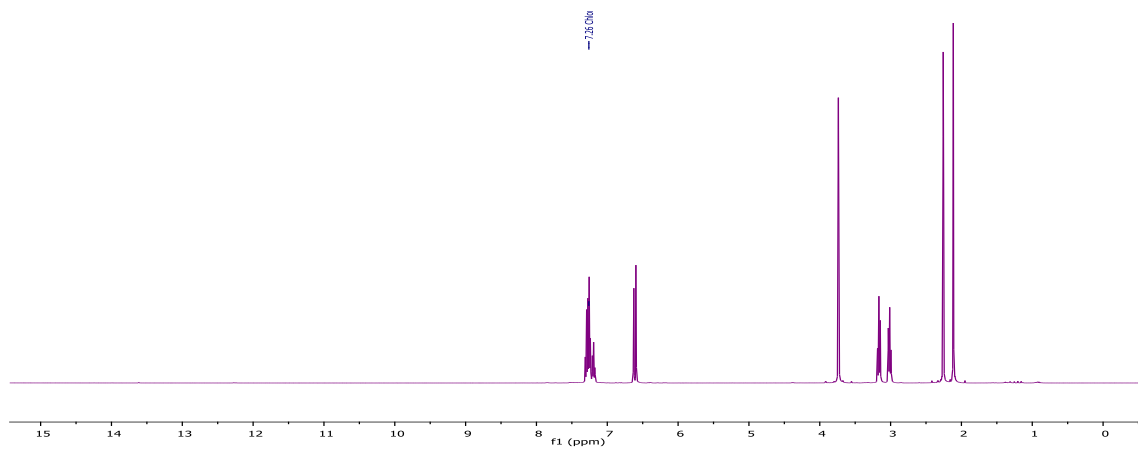
3.3.1 Análisis espectroscópico

3.3.1.1. Análisis espectroscópico de los compuestos semisintéticos

Para confirmar la identidad de los derivados semisintéticos de flavonoides se compararon los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de estos, con los espectros de los flavonoides naturales uvangoletina (**C1**) y galangina (**C2**) en busca de señales diferentes que permitan confirmar la presencia de los grupos incluidos en la estructura de los flavonoides naturales.

- **Derivados acetilados (D1 y D2) de uvangoletina (C1)**

Por medio de acetilación con anhídrido acético y piridina, y a partir de la uvangoletina (2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-dihidochalcona) extraída de la parte aérea de *P. septuplinervium* se obtuvieron dos derivados acetilados cuya diferencia estructural es el número de grupos acetilo sobre la estructura del producto natural del que proceden, el cual presenta dos hidroxilos fenólicos susceptibles de ser acetilados. Los derivados **D1** y **D2**, fueron identificados haciendo uso de la comparación de algunos de sus espectros de resonancia magnética nuclear con los espectros de RMN de la uvangoletina; en la Figura 3-5 se presentan los espectros de RMN ^1H de la uvangoletina (**C1**) (Figura 3-5a), el derivado **D1** (Figura 3-5b), y el derivado **D2** (Figura 3-5c).

Figura 3-5. Comparación de los espectros de RMN ^1H de los compuestos **C1**, **D1** y **D2****Figura 3-5a.** RMN ^1H de la Uvangoletina **C1**, 400 MHz, Acetona d_6 **Figura 3-5b.** RMN ^1H del compuesto **D1**, 400 MHz, CDCl_3 **Figura 3-5c.** RMN ^1H del compuesto **D2**, 400 MHz, CDCl_3

Al comparar los espectros de RMN ^1H de los compuestos **C1**, **D1** y **D2** se observa la presencia de señales características que indican las modificaciones realizadas en el producto natural. En la Figura 3-5b se observa una señal singlete en δ 2,30 característica de un metilo del grupo acetilo (Hermoso *et al.*, 2003), lo que nos confirma la efectiva acetilación de la uvangoletina (**C1**); adicionalmente en el mismo espectro se observa una señal singlete en δ 13,5 que por su desplazamiento y comparando con los datos espectroscópicos de la uvangoletina (**C1**) (Avila *et al.*, 2011) corresponde a la señal del protón del grupo hidroxilo de la posición 2' de la dihidrochalcona que hace puente de hidrógeno intramolecular con el grupo carbonilo adyacente; la presencia de esta última señal en el espectro de RMN ^1H del compuesto **D1** indica que el grupo acetilo se encuentra en la posición 4' de la estructura de la dihidrochalcona, el derivado **D1** se nombró como: 2'-hidroxi-4'-acetil-6'-metoxi-dihidrochalcona. El espectro de RMN ^1H del derivado **D2** evidencia la presencia de dos singletes en δ 2,11 y δ 2,26, que aunado a la ausencia de la señal del protón fenólico de la posición 2' de la dihidrochalcona que aparece en δ 13,9 en **C1** y en δ 13,5 en **D1**, indica que el compuesto **D2** corresponde al derivado diacetilado de la uvangoletina el cual se denominó: 2',4'-diacetil-6'-metoxi-dihidrochalcona. Un factor que da indicios de la obtención de los derivados acetilados es el cambio en la solubilidad; el compuesto natural **C1** del cual se originaron los derivados acetilados **D1** y **D2** es soluble en acetona, se espera que los derivados obtenidos después de la acetilación de dicho compuesto sean menos polares por lo tanto solubles en un solvente de mas baja polaridad como el cloroformo, como efectivamente se observa. Después de realizar la búsqueda en las diferentes bases de datos de las estructuras de los derivados acetilados de la uvangoletina, se determinó que **D1** no posee reportes previos en la literatura. En las Tablas 3-3 y 3-4 se presentan los datos espectroscópicos y las constantes físicas de los compuestos **D1** y **D2**; en las Figuras 3-6 y 3-7 se presentan los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **D1** y **D2**.

Tabla 3-3. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **D1**

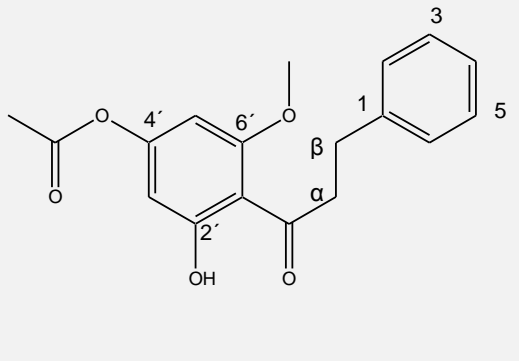
	Nombre:	2'-hidroxi-4'-acetil-6'-metoxi-dihidrochalcona
	Estado físico	Sólido amorfo amarillo
	Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₈ O ₅
	Peso molecular	314 g/mol
	Punto de fusión	165-166 °C
EM-IE m/z (%) : 43 (100), 167(50), 91 (25)		
HRMS : 315,1234 [M+H ⁺]		
RMN ¹H (400 MHz, CDCl ₃): δ 3,00 (t, J=7,35 Hz, H-β), 3,40 (t, J=7,35 Hz, H-α), 6,18 (d, J=2,17 Hz, H-3'), 6,36 (d, J=2,19 Hz, H-5'), 7,18-7,26 (m, H3/H4/H6), 7,28-7,34 (m, H2/H5), 2,30 (s, CH ₃ -C=O), 3,85 (s, OCH ₃), 13,5 (s, OH)		
RMN ¹³C [100 MHz, (CDCl ₃): 30,5 ppm (C-β), 46,3 (C-α), 96,1 (C-5'), 104,0 (C-3'), 109,2 (C-1'), 126,2 (C-4), 128,58 (C-2/C-6), 128,6 (C-3/C-5), 141,5 (C-1), 156,7 (C-4'), 162,5 (C-6'), 166,2 (C-2'), 205,7 (C=O), 21,3 (CH ₃ -C=O), 56,0 (OCH ₃), 168,6 (CH ₃ -C=O).		

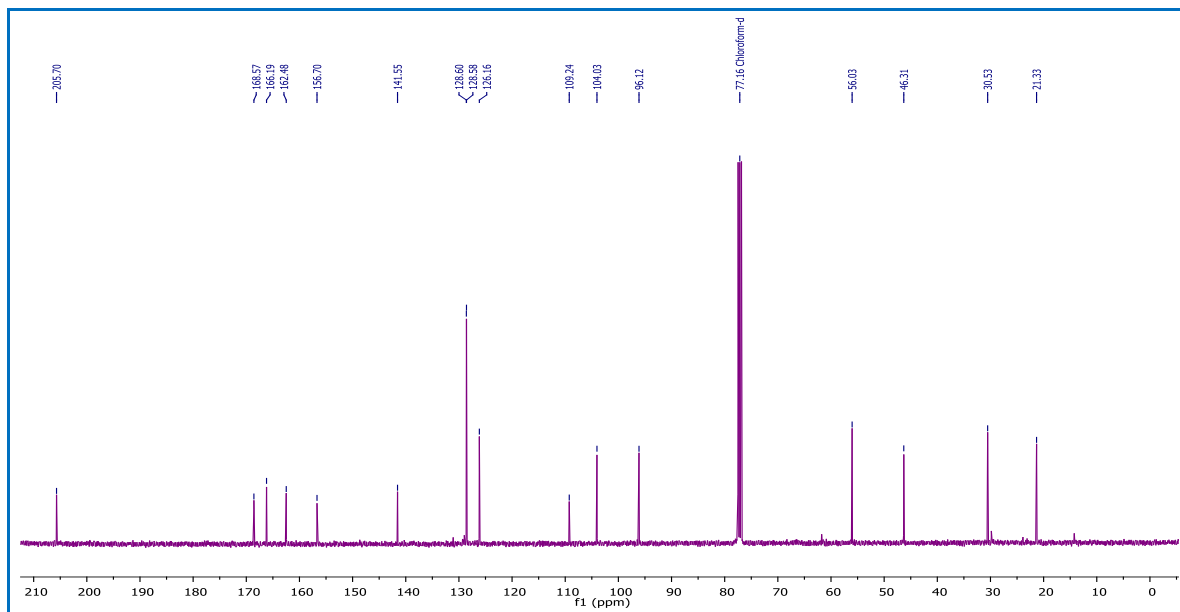
Figura 3-6. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **D1**, 100MHz, CDCl₃.

Tabla 3-4. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **D2**

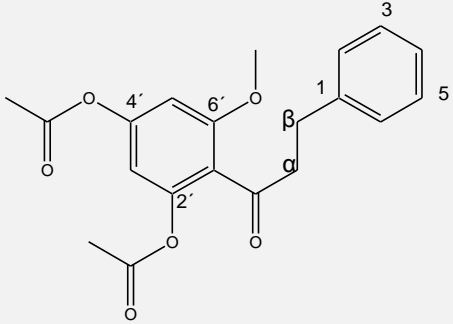
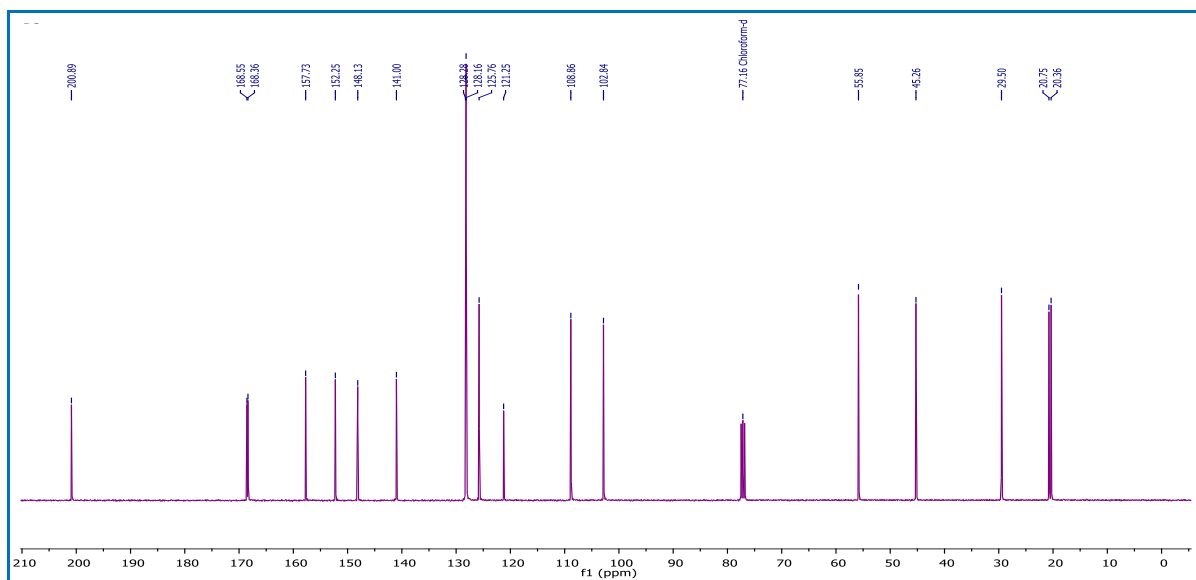
	Nombre:	2',4'-diacetyl-6'-metoxi-dihidrochalcona
	Estado físico	aceite amarillo
	Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₀ O ₆
	Peso molecular	356 g/mol
EM-ESI: 379,03 [M ⁺ +Na ⁺] EM-IE m/z (%) : 43 (100), 167 (35), 91 (15)		
RMN ¹H [400 MHz, CDCl ₃]: δ 3,00 (t, J=7,50 Hz, H-β), 3,20 (t, J=7,35 Hz, H-α), 6,59 (d, J=1,96 Hz, H-3'), 6,63 (d, J=1,96 Hz, H-5'), 7,19 (ddd, J=6,16; 3,27; 1,57 Hz, H4), 7-23-7,32 (m, H2/H3/H5/H5), 2,10 (s, CH ₃ -C=O), 2,26 (s, CH ₃ -C=O), 3,70 (s, OCH ₃)		
RMN ¹³C [100 MHz, (CDCl ₃): 29,5ppm(C-β), 45,3 (C-α), 102,8 (C-5'), 108,8 (C-3'), 121,2 (C-1'), 125,8 (C-4), 128,1 (C-2/C-6), 128,3 (C-3/C-5), 141,0 (C-1), 148,1 (C-4'), 157,7 (C-6'), 152,2 (C-2'), 200,9 (C=O), 20,4 (CH ₃ -C=O 2'), 20,8 (CH ₃ -C=O 4'), 55,8 (OCH ₃), 168,4 (CH ₃ -C=O 4'), 168,6 (CH ₃ -C=O 2').		
Datos descritos en: Barrero <i>et al</i> , 1997		

Figura 3-7. Espectros de RMN ¹³C del compuesto **D2**, 100 MHz, CDCl₃

- **Derivados acetilados de la galangina**

A partir de la acetilación con anhídrido acético y piridina de la mezcla extraída de la F4-F6, fracciones obtenidas de la columna de fraccionamiento del extracto etanólico de parte aérea de *P. septuplinervium* se obtuvieron 4 compuestos (Figura 3-2), el derivado **D2** (2',4'-diacetil-6'-metoxi-dihidrochalcona), previamente obtenido por acetilación de la uvangoletina (**C1**) y tres compuestos más, los cuales por comparación con el espectro de RMN ¹H de **C2**, corresponden a los derivados acetilados de la galangina. En la Figura 3-8 se presentan los espectros de RMN ¹H de los compuestos galangina (**C2**) (Figura 3-8a), **D3** (Figura 3-8b), **D4** (Figura 3-8c), y **D5** (Figura 3-8d)

El paralelo realizado entre los espectros de RMN ¹H de los compuestos **D3**, **D4**, y **D5**, y el espectro de RMN ¹H del compuesto **C2**, evidencia la similitud de los perfiles de RMN ¹H en lo que respecta a las señales que conforman el núcleo flavonoide (δ 6-8), sin embargo existen diferencias que indican las modificaciones estructurales de las sustancias **D3**, **D4** y **D5** con respecto al producto natural **C2**. Los aspectos considerados en la comparación entre los perfiles de RMN ¹H presentados en la Figura 3-8 fueron:

- Numero de señales correspondientes a los protones del metilo del grupo acetilo: las Figuras 3-8b, 3-8c, y 3-8d muestran señales singletes que integran cada una para 3 hidrógenos en el rango de δ 2,30-2,50 características de los metilos de los grupos acetilo (Plazas *et al.*, 2008), las cuales no se encuentran en el espectro del compuesto **C2**, la diferencia entre cada uno de los compuestos **D3**, **D4**, y **D5**, es el número de acetilos dentro de la molécula ya que de acuerdo a lo observado en los espectros presentados en la Figura 3-8 el compuesto **D3** (Figura 3-8b) presenta tres singletes (δ 2,30; 2,33; 2,43), el compuesto **D4** (Figura 3-8c) dos singletes (δ 2,22; 2,34) y el compuesto **D5** (Figura 3-8d) presenta un singlete (δ 2,30).
- Ausencia de la señal del protón fenólico quelatado con carbonilo cercano: el espectro de RMN ¹H del compuesto natural **C2** muestra la presencia de una señal desplazada a campo bajo en δ 12,1 correspondiente al protón del OH fenólico sobre el carbono 5 del núcleo flavonoide (Facundo y Morais, 2003) (Figura 3-8a), esta señal no se observa en el espectro de RMN ¹H del compuesto **D3** (Figura 3-8b), lo que hace presumir la ausencia del OH 1-3 al grupo carbonilo. En el caso de los espectros de RMN ¹H de los compuesto **D4** (Figura 3-8c) y **D5** (Figura

3.8d), se observa la señal del protón fenólico en δ 12,2 y 12,3 respectivamente, lo que indica la presencia de OH fenólico 1-3 al carbonilo en la estructura de dichos compuestos.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se determinó que los compuestos **D3**, **D4** y **D5** corresponden a los derivados triacetilado (3, 5, 7-triacetil-flavona), diacetilado (3,7-diacetil-5-hidroxi-flavona) y monoacetilado (3-acetil-5,7-dihidroxi-flavona) del compuesto **C2** (3, 5, 7-trihidroxi-flavona) respectivamente. Después de realizar la búsqueda en las diferentes bases de datos se concluyó que el derivado diacetilado del compuesto **C2** (compuesto **D4**) no posee reportes previos en la literatura. Los espectros de RMN ^1H de los compuestos **D3**, **D4**, y **D5** fueron registrados en equipos diferentes, teniendo en cuenta la cantidad de muestra y la disponibilidad de máquina.

En las Tablas 3-5,3-6, y 3-7, se presentan los datos espectroscópicos y las constantes físicas de los compuestos **D3**, **D4**, **D5**; de igual forma en las Figuras 3-9, 3-10, y 3-11 los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **D3**, **D4**, y **D5** respectivamente

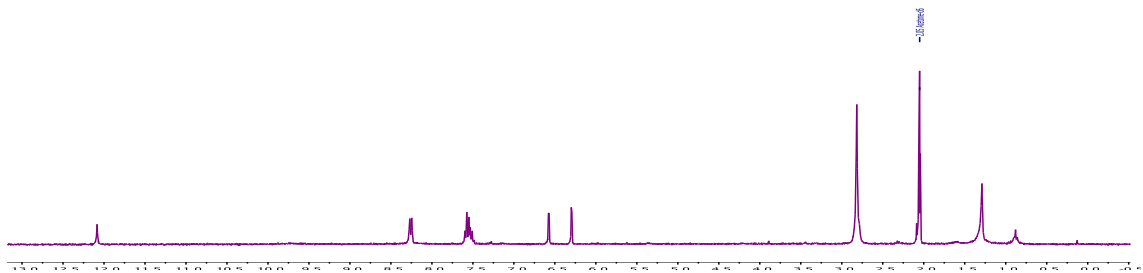
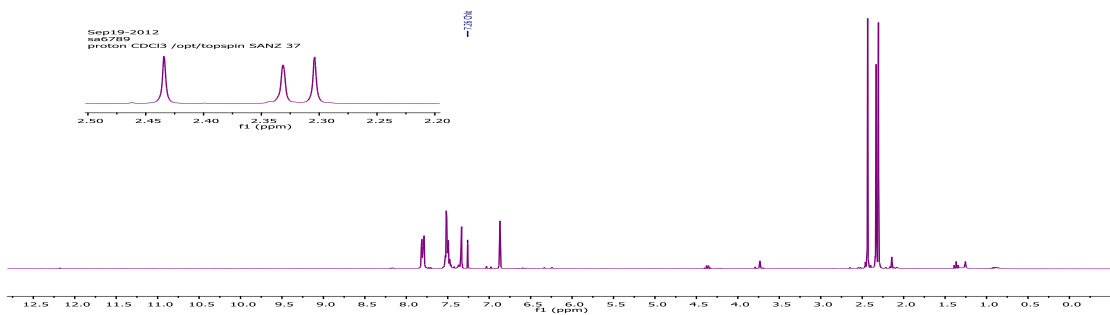
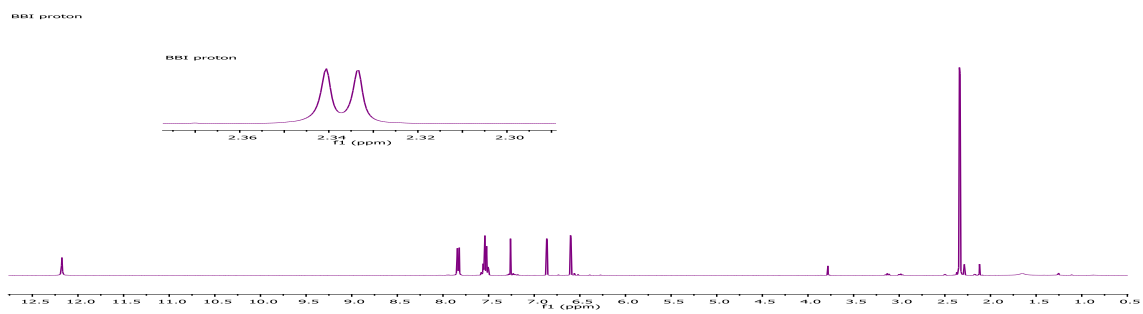
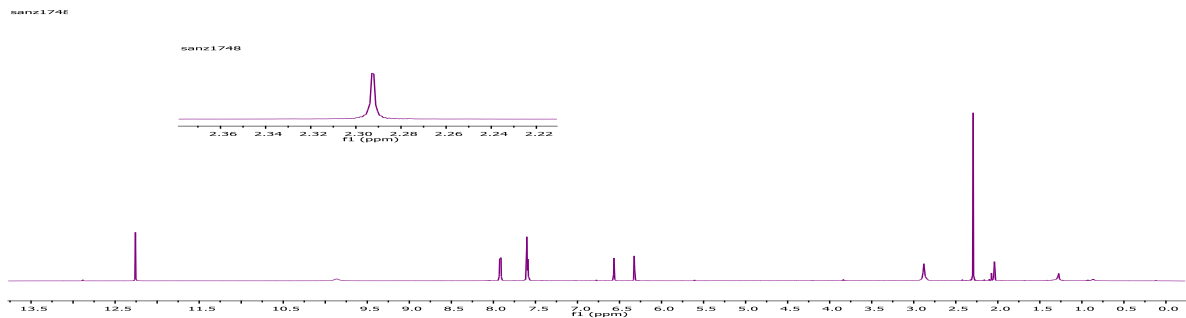
Figura 3-8. Comparación espectros de RMN ^1H de los compuestos **C2**, **D3**, **D4**, **D5**.**Figura 3-8a.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **C2**, 300 MHz, Acetona d_6 **Figura 3-8b.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **D3**, 300 MHz, CDCl_3 **Figura 3-8c.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **D4**, 400 MHz, CDCl_3 **Figura 3-8d.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **D5**, 500 MHz, Acetona d_6

Tabla 3-5. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **D3**

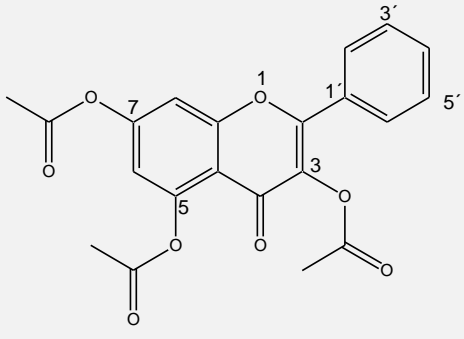
	Nombre:	3,5,7-triacetil-flavona
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₆ O ₈
	Peso molecular	396 g/mol
	Punto de fusión	118-120 °C
EM-ESI: 419,06 [M ⁺ +Na ⁺] EM-IE m/z (%) : 43 (100), 270 (38), 77 (25), 105 (15)		
RMN ¹H [300 MHz, CDCl ₃]: δ 6,87 (d, J=2,19 Hz, H6), δ 7,34 (d, J=2,18 Hz, H8), δ 7,46 – 7,54 (m, H3'/H4'/H5'), δ 7,80 (dd, J=7,50, 2,20 Hz, H2'/H6'), δ 2,30 (s, CH ₃ -C=O 3), δ 2,33 (s, CH ₃ -C=O 5), δ 2,34 (s, CH ₃ -C=O 7)		
RMN ¹³C [75 MHz, CDCl ₃]: 109,1 ppm(C8), 113,9 (C6), 114,8 (C10), 128,2 (C2'/C6'), 128,8 (C3'/C5'), 129,5 (C1'), 131,6 (C4'), 133,9 (C3), 150,5 (C5), 154,2 (C9), 15 CH ₃ -C=O 5,8 (C7), 157,1 (C2), 170,4 (C4), 20,6 (CH ₃ -C=O 3), 21,1 (CH ₃ -C=O 7), 168,0 (CH ₃ -C=O 3/7), 169,4 (CH ₃ -C=O 5).		
Datos descritos en: Ji <i>et al</i> , 1996.		

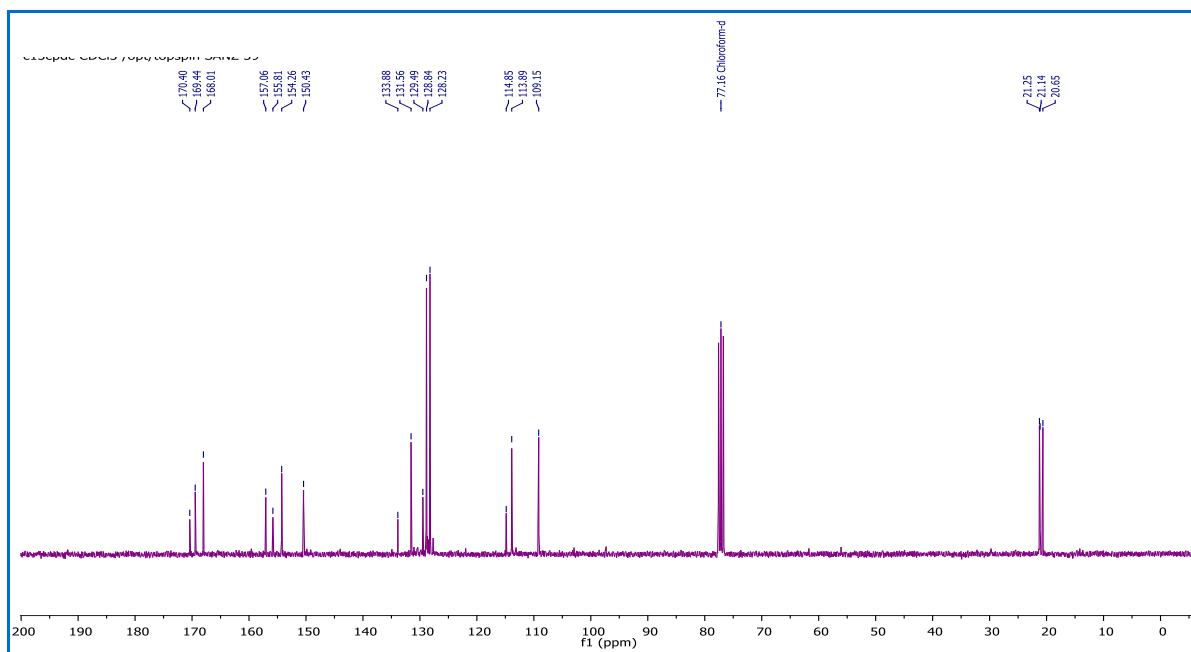
Figura 3-9. Espectros de RMN ¹³C del compuesto **D3**, 75 MHz, CDCl₃

Tabla 3-6. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **D4**

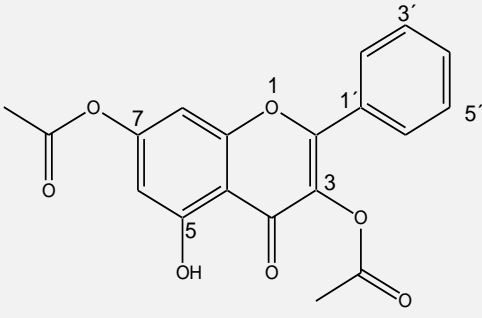
	Nombre:	3,7-diacetil-5-hidroxi-flavona
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₄ O ₇
	Peso molecular	354 g/mol
	Punto de fusión	169-171 °C
EM-ESI: 355,17 [M ⁺ +H ⁺]		
EM-IE m/z (%): 43 (100), 77 (12), 270 (10) HRMS: 355,0814 [M+H ⁺]		
RMN ¹H [400 MHz, CDCl ₃]: δ 6,60 (d, J=2,03 Hz, H6), δ 6,86 (d, J=2,03 Hz, H8), δ 7,50–7,58 (m, H3'/H4'/H5'), δ 7,83 (dd, J=7,87, 1,86 Hz, H2'/H6'), δ 2,33 (s, CH ₃ -C=O 3), δ 2,34 (s, CH ₃ -C=O 7), 12,2 (S, OH)		
RMN ¹³C [100 MHz, CDCl ₃]: 101,3 ppm (C8), 105,6 (C6), 109,0 (C10), 129,0 (C2'/C6'), 128,4 (C3'/C5'), 129,5 (C1'), 131,9 (C4'), 132,1 (C3), 161,9 (C5), 156,4 (C9), 157,7 (C7), 156,2 (C2), 176,5 (C4), 20,6 (CH ₃ -C=O 3), 21,3 (CH ₃ -C=O 7), 168,0 (CH ₃ -C=O 3), 168,4 (CH ₃ -C=O 7).		

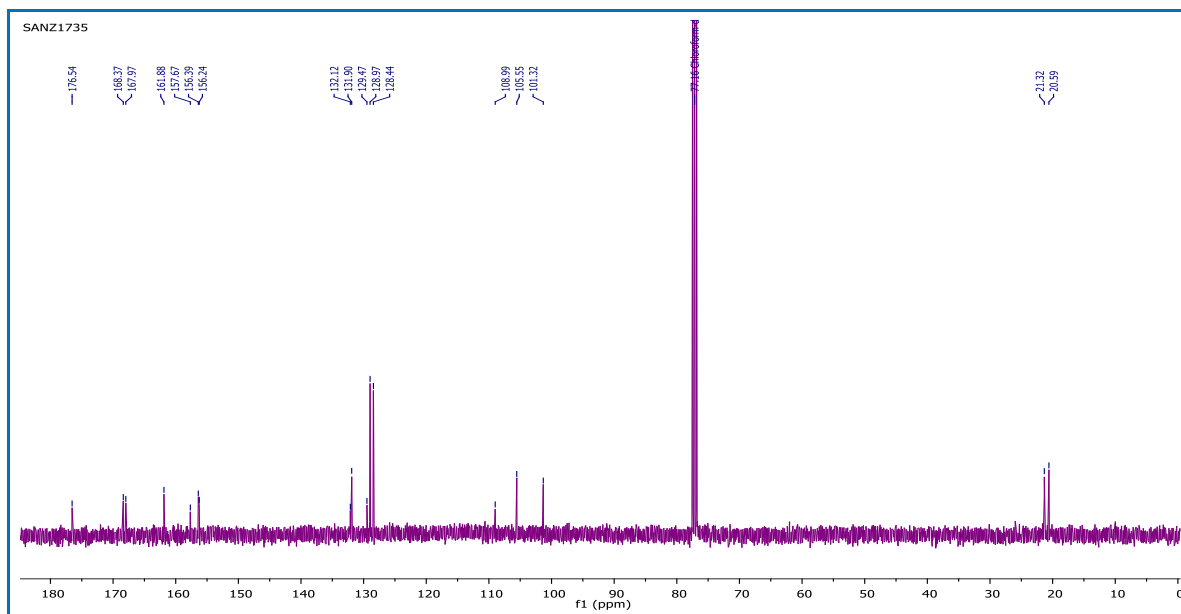
Figura 3-10. Espectros de RMN ¹³C del compuesto **D4**, 100 MHz, CDCl₃

Tabla 3-7. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **D5**

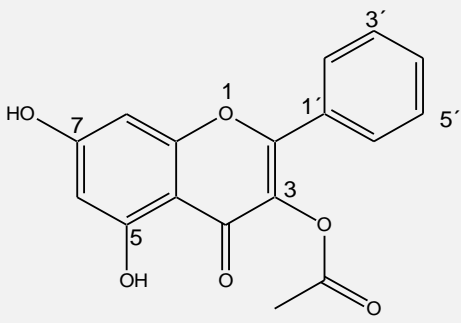
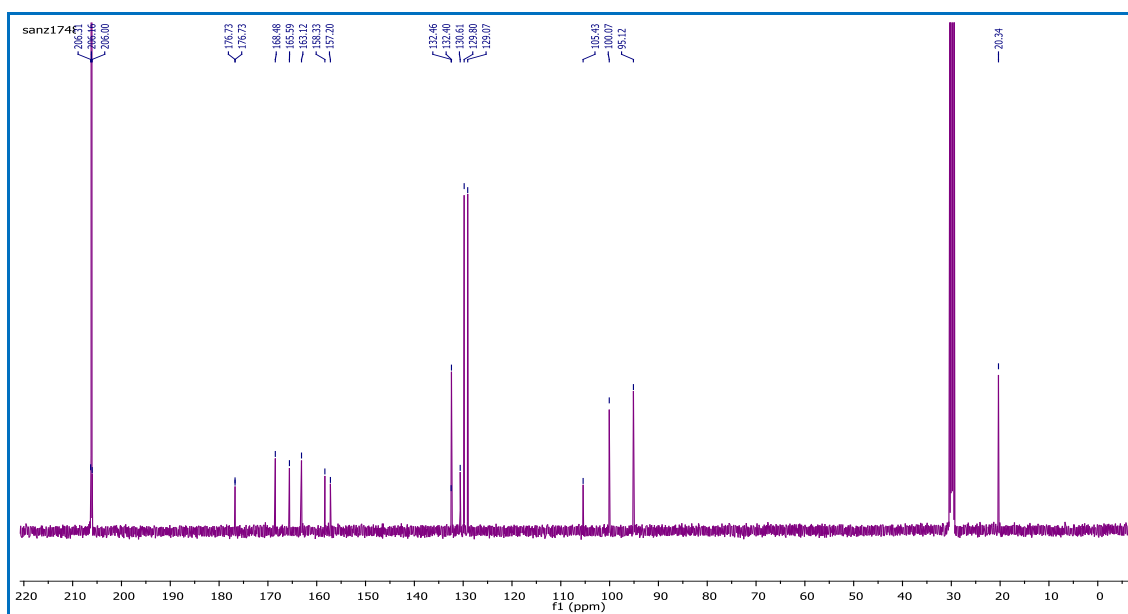
	Nombre:	3-acetil-5,7-dihidroxi-flavona
	Estado físico	Sólido amorfo blanco
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
	Peso molecular	312 g/mol
	Punto de fusión	198-199 °C
EM-IE <i>m/z</i> (%): 43 (100), 42 (25), 77 (20), 270 (12),		
RMN ¹H [500 MHz, Acetona <i>d</i> ₆]: δ 6,33 (d, <i>J</i> =2,01 Hz, H6), δ 6,57 (d, <i>J</i> =2,03 Hz, H8), δ 7,57–7,63 (m, H3'/H4'/H5'), δ 7,91-7.95 (m, H2'/H6'), δ 2,30 (s, CH ₃ -C=O 3), 12,3 (S, OH)		
RMN ¹³C [125 MHz, Acetona <i>d</i> ₆]: 95,1 ppm (C8), 100,1 (C6), 105,4 (C10), 129,1 (C3'/C5'), 129,8 (C2'/C6'), 130,6 (C1'), 132,5 (C4'), 132,4 (C3), 163,1 (C5), 158,3 (C9), 165,6 (C7), 157,2 (C2), 176,7 (C4), 20,3 (CH ₃ -C=O 3), 168,5 (CH ₃ -C=O 3).		
Datos descritos en: Natoli <i>et al</i> , 1990		

Figura 3-11. Espectros de RMN ¹³C del compuesto **D5**, 125 MHz, Acetona *d*₆

3.3.1.2. Análisis espectroscópico de los compuestos sintéticos.

- **Compuestos carbonílicos α , β -insaturados (Chalconas)**

La obtención de los compuestos **S1** a **S6** se realizó por síntesis de *Claisen-Schmidt*, mediante condensación de acetofenonas y benzaldehídos. La identidad de los compuestos se verificó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (RMN y EM) y por comparación con la literatura. El espectro de RMN ^1H de los compuestos **S1** (Figura 3-12a), **S2** (Figura 3-13a), **S3** (Figura 3-14a), **S4** (Figura 3-15a), **S5** (Figura 3-16a), y **S6** (Figura 3-17a); muestra en cada caso la presencia de un par de señales dobletes en: δ 7,89 (d, 15,7, 1H)/ δ 7,80 (d, 15,7, 1H); δ 7,72 (d, 15,5 Hz, 1H)/ δ 7,43 (d, 15,5 Hz, 1H); δ 8,09 (d, 15,4, 1H)/ δ 7,72 (d, 15,6, 1H); δ 7,67 (d, 15,3, 1H)/ δ 7,56 (d, 15,4, 1H); δ 8,13 (d, 15,7, 1H)/ δ 7,48 (d, 15,7, 1H); δ 7,77 (d, 15,6, 1H)/ δ 7,51 (d, 15,6, 1H), las cuales por su desplazamiento y valor de constante de acoplamiento evidencian la presencia de protones ubicados sobre un doble enlace con configuración *trans*; (San Feliciano *et al*, 2008) las señales anteriormente descritas junto a la señal ubicada a campo bajo en los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **S1** (Figura 3-12b), **S2** (Figura 3-13b), **S3** (Figura 3-14b), **S4** (Figura 3-15b), **S5** (Figura 3-16b), **S6** (Figura 3-17b) en 190 ppm, 189,6 ppm; 185,6 ppm; 187,2 ppm; 188,0 ppm; 188,4 ppm; característica de carbono carbonílico confirma la presencia de la cetona α,β -insaturada presente en los compuestos tipo chalcona. (Ninomiya *et al*, 2010)

La diferencia espectroscópica en los compuestos carbonílicos sintetizados se encuentra en los desplazamientos y las multiplicidades de los protones aromáticos los cuales dependen de la sustitución existente en los anillos aromáticos de la estructura de la chalcona; por ejemplo los compuestos **S3** a **S6**, los cuales provienen de la misma acetofenona (*p*-aminoacetofenona); presentan en el espectro RMN ^1H (Figuras 3-14a, 3-15a, 3-16a, 3-17a) dos señales dobletes en δ 7,98 (d, 8,71 Hz, 2H)/ δ 6,63 (d, 8,71 Hz, 2H); δ 7,93 (d, 8,74 Hz, 2H)/ δ 6,73 (d, 8,82 Hz, 2H); δ 7,92 (d, 8,66 Hz, 2H)/ δ 6,69 (d, 8,64 Hz, 2H); y δ 7,93 (d, 8,70 Hz, 2H)/ δ 6,70 (d, 8,70 Hz, 2H), que por el valor de sus desplazamientos y constantes de acoplamiento corresponden a protones aromáticos en posición orto; el valor de la integración de cada señal indica la presencia de sistemas simétricos es decir un anillo 1,4 sustituido con el mismo ambiente químico en la estructura de la chalcona. Lo anterior se ve corroborado por las señales del espectro de

RMN ^{13}C de los compuestos **S3** a **S6** (Figuras 3-14b, 3-15b, 3-16b, 3-17b) en: 131 ppm/112,7 ppm; 131,2 ppm/112,5 ppm; 131,4 ppm/114,1 ppm; 114,1 ppm/ 131,2 ppm respectivamente, las cuales corresponden a dos carbonos de metinos aromáticos que poseen el doble de la intensidad de los demás lo que indica que cada señal es debida a dos carbonos que deben tener ambientes químicos similares, es decir ser simétricos.

En las Tablas 3-8 a 3-14 se presentan las constantes físicas y los datos espectroscópicos de los compuestos **S1** a **S6**; de la misma forma en la Figuras 3-12 a 3-17 se presentan los espectros de RMN ^1H , ^{13}C de los compuestos S1 a S6.

Tabla 3-8. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S1**

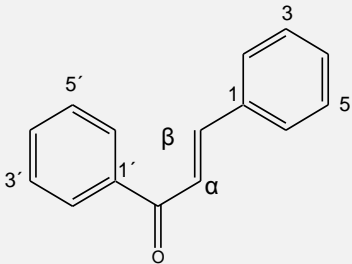
	Nombre:	Chalcona
	Estado físico	Sólido blanco
	Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}$
	Peso molecular	208 g/mol
	Punto de fusión	50-52 °C
EM-IE m/z (%): 207 (100), 208 (38), 179 (12,5), 77 (13), 103 (11).		
RMN ^1H [400 MHz, Acetona d_6]: δ 7,44-7,50 (m, H3'/H4'/H5'), δ 7,54-7,60 (m, H3/H5), δ 7,62-7,69 (m, H4'), δ 7,80 (d, J= 15,7 Hz, H α), δ 7,85 (dd, J= 6,5 y 3,1 Hz, H2/H6), δ 7,89 (d, J= 15,7 Hz, H β), δ 8,16 (dd, J=8,4 y 1,3 Hz, H 2'/H6')		
RMN ^{13}C [100 MHz, Acetona d_6]: 122,9 ppm (C α), 129,3 (C2/C6), 129,5 (C2'/C6'), 129,6 (C3'/C 5'), 129,8 (C3/C5), 131,3 (C4), 133,7 (C4'), 136,0 (C1), 139,2 (C1'), 144,8 (C β), 190 (C=O).		

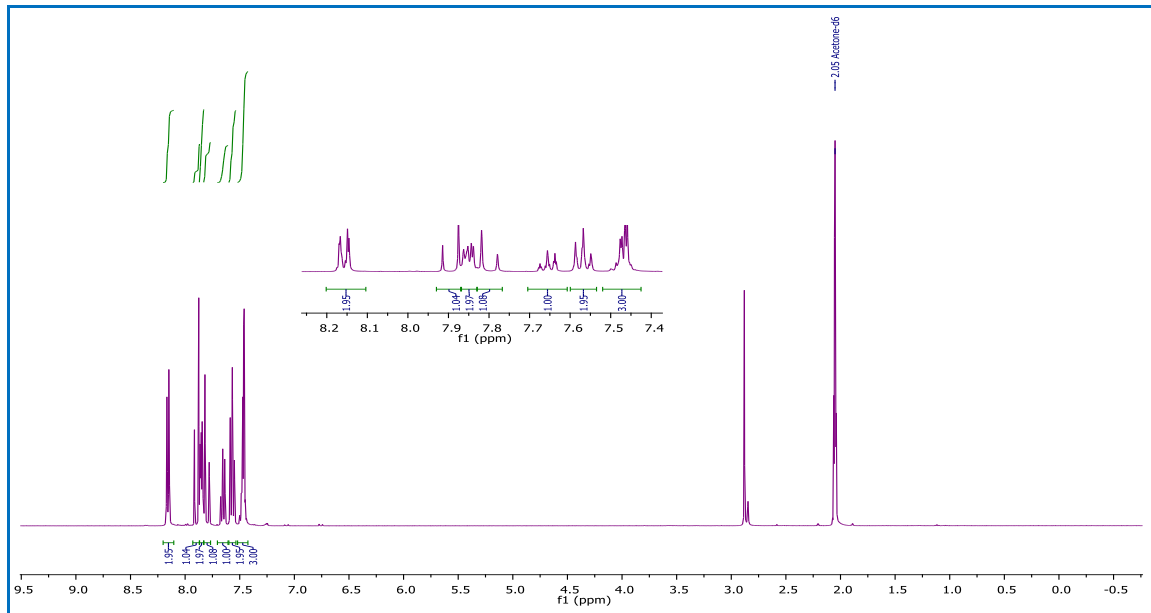
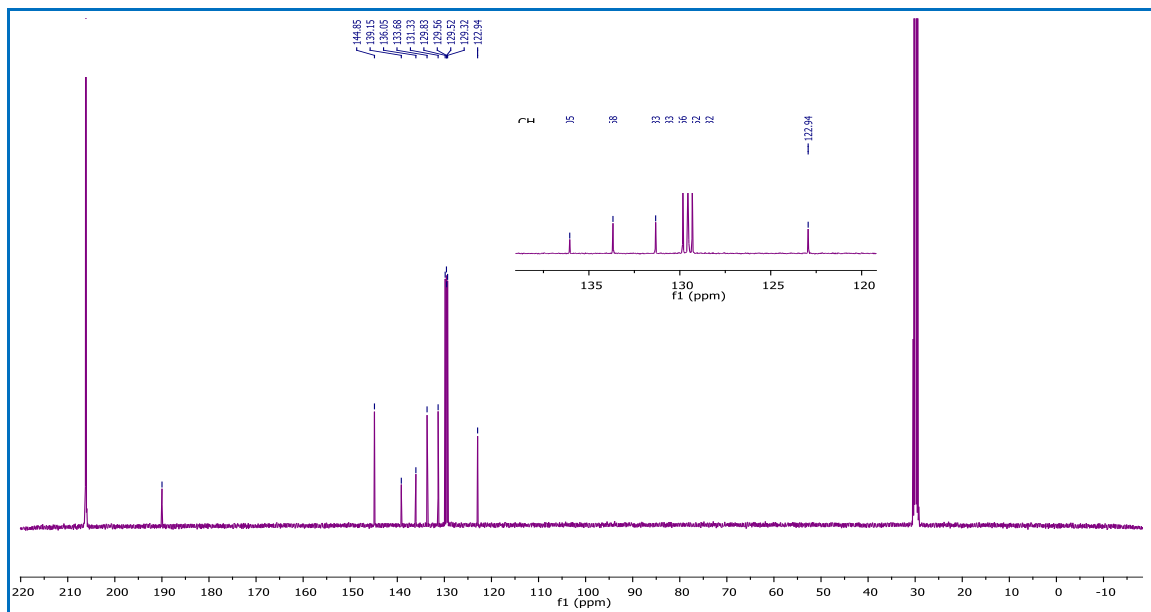
Figura 3-12. Espectros del compuesto **S1****Figura 3-12a.** Espectro de RMN ^1H del compuesto **S1**, 400 MHz, Acetona d_6 **Figura 3-12b.** Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S1**, 100 MHz, Acetona d_6 

Tabla 3-9. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S2**

	Nombre:	4-dimetil-amino-chalcona
	Estado físico	Sólido naranja
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₇ ON
	Peso molecular	251 g/mol
	Punto de fusión	103-105 °C
EM-IE <i>m/z</i> (%): 77 (100), 251 (50), 51 (42), 121 (35), 105 (32), 174 (32), 250 (22), 252 (8)		
RMN ¹H [300 MHz, ACN <i>d</i>₃]: δ 6,73 (d, J=9,0 Hz, H3/H5), δ 7,43 (d, J=15,4 Hz, H _α), δ 7,47-7,57 (m, H3'/4'/5'), δ 7,59 (d, J= 8,79 Hz, H2/H6), δ 7,72 (d, J=15,5 Hz, H _β), δ 8,02 (dd, J= 8,34 y 1,42 Hz, H2'/H6'), δ 3,02 (s, N-(CH ₃) ₂).		
RMN ¹³C [75 MHz, Acetona <i>d</i>₆]: 112,6 ppm (C3/C5), 117,0 (C _α), 123,3 (C1), 128,9 (C2/C6"), 129,2 (C3'/C5'), 131,2 (C2/C6), 132,9 (C4'), 139,8 (C1'), 145,9 (C _β), 153,0 (C4), 189,6 (C=O), 40,1 (N-(CH ₃) ₂)		
Datos descritos en: Wu, <i>et al</i> , 2011		

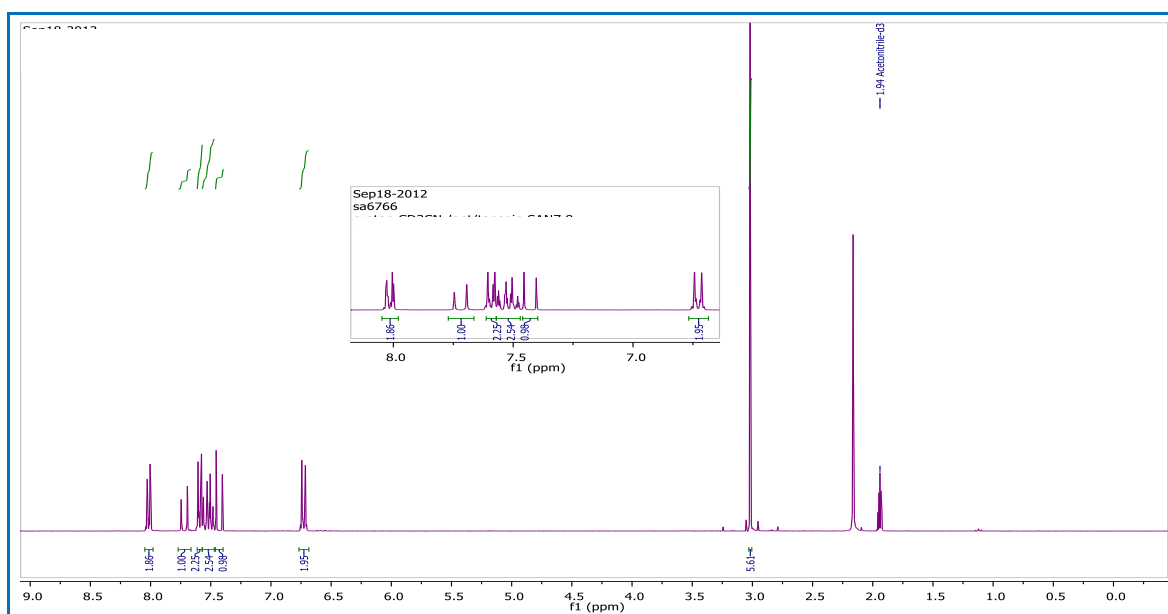
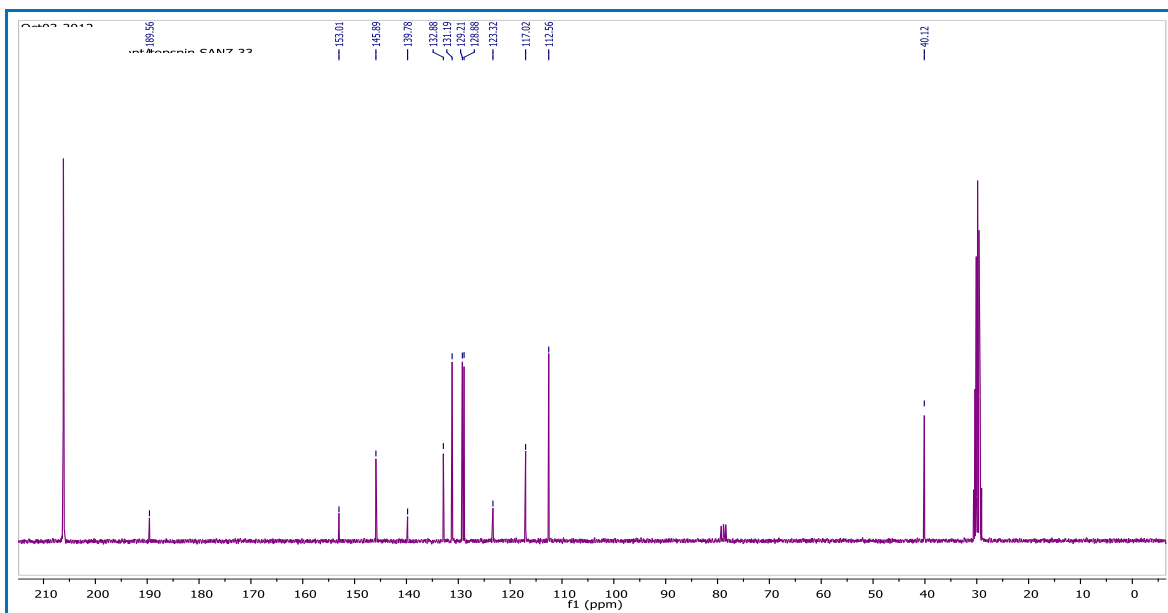
Figura 3-13. Espectros del compuesto **S2****Figura 3-13a.** Espectro de RMN ¹H del compuesto **S2**, ACN *d*₃, 300 MHz

Figura 3-13b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S2**, Acetona d_6 , 75 MHz**Tabla 3-10.** Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S3**

	Nombre:	3-nitro-4'-amino-chalcona
	Estado físico	Sólido amarillo oscuro
	Fórmula molecular	$\text{C}_{15} \text{H}_{12} \text{N}_2 \text{O}_3$
	Peso molecular	268 g/mol
	Punto de fusión	203-205 °C
EM-IE m/z (%): 120 (100), 65 (82), 92 (70), 102 (30), 268 (25)		
RMN ^1H [300 MHz, $\text{DMSO } d_6$]: δ 6,63 (d, $J=8,71$ Hz, $\text{H}_{3'}/\text{H}_{5'}$), δ 7,72 (d, $J=15,6$ Hz, H_α), δ 7,72 (t, $J=8,0$ Hz, H_5), δ 7,98 (d, $J=8,71$ Hz, $\text{H}_{2'}/\text{H}_{6'}$), δ 8,09 (d, $J=15,4$ Hz, H_β), δ 8,23 (dd, $J=7,87$ y $1,93$ Hz, H_6), δ 8,29 (d, $7,87$ Hz, H_4), δ 8,73 (d, $J=1,80$ Hz, H_2), δ 6,22 (brs, NH_2)		
RMN ^{13}C [75 MHz, $\text{DMSO } d_6$]: 112,7ppm ($\text{C}_{3'}/\text{C}_{5'}$), 122,6 (C_α), 124,1 (C_2), 125,1 (C_4), 125,3 ($\text{C}_{1'}$), 130,3 (C_5), 131,4 ($\text{C}_{2'}/\text{C}_{6'}$), 134,8 (C_6), 137,2 (C_1), 138,9 (C_β), 148,4 (C_3), 154,2 ($\text{C}_{4'}$), 185,6 ($\text{C}=\text{O}$)		
Datos descritos en: Tomar <i>et al</i> , 2010.		

Figura 3-14. Espectros del compuesto **S3**

Figura 3-14a. Espectro de RMN ^1H del compuesto **S3**, $\text{DMSO } d_6$, 300 MHz

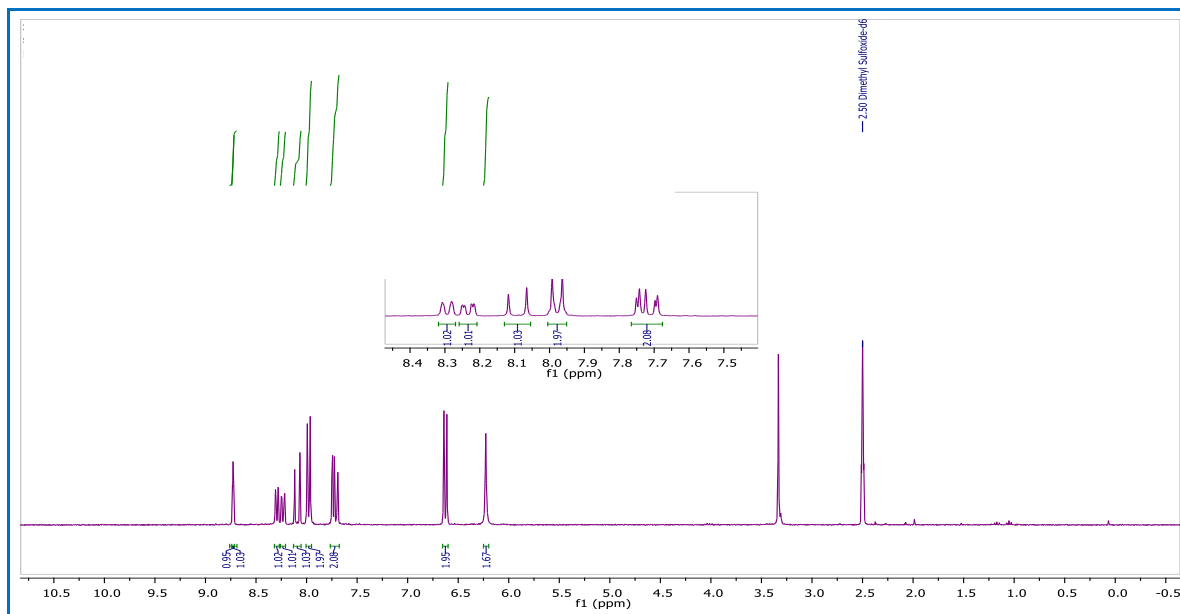


Figura 3-14b. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S3**, $\text{DMSO } d_6$, 75 MHz.

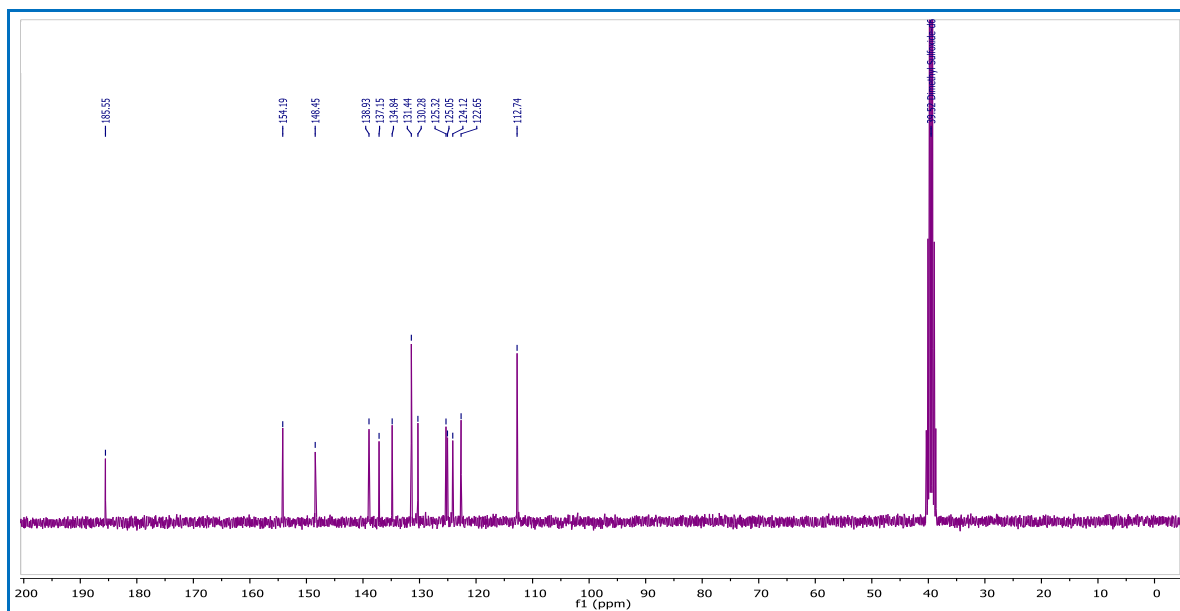


Tabla 3-11. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S4**.

	Nombre:	4'-amino-4-dimetilamino-chalcona
	Estado físico	Sólido naranja
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O
	Peso molecular	266 g/mol
EM-IE <i>m/z</i> (%): 65 (100), 120 (95), 121 (75), 92 (75), 119 (72), 266 (72)		
RMN ¹H [300 MHz, Acetona <i>d</i>₆]: δ 6,73 (d, J=8,82 Hz, H3'/H5'), δ 6,78 (d, J=9,00 Hz, H3/H5), δ 7,56 (d, J=15,4 Hz, Hα), δ 7,63 (d, J=8,68 Hz, H2'/6'), δ 7,67 (d, J=15,3 Hz, Hβ), δ 7,93 (d, J=8,74 Hz, H2'/H6'), δ 3,04 (brs, N-(CH ₃) ₂)		
RMN ¹³C [75 MHz, Acetona <i>d</i>₆]: 112,5 ppm (C3'/C5'), 113, 8 (C3/C5), 117,4 (Cα), 123,8 (C1), 128,3 (C1'), 130,6 (C2/C6), 131,2 (C2'/C6'), 143,5 (Cβ), 152,5 (C4), 153,5 (C4'), 187,2 (C=O), 40,2 (N-(CH ₃) ₂)		
Datos descritos en Wu <i>et al</i> , 2011		

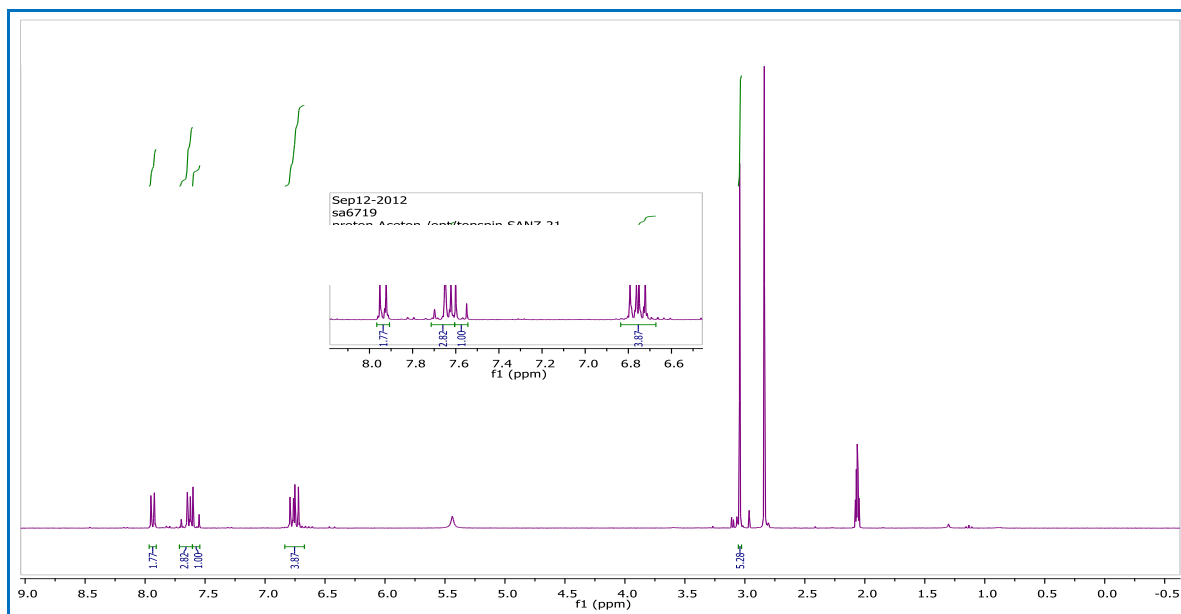
Figura 3-15. Espectros del compuesto S4**Figura 3-15a.** Espectro de RMN ¹H del compuesto **S4**, Acetona *d*₆, 300 MHz

Figura 3-15b. Espectro de RMN ^{13}C de compuestos **S4**, Acetona d_6 , 75 MHz

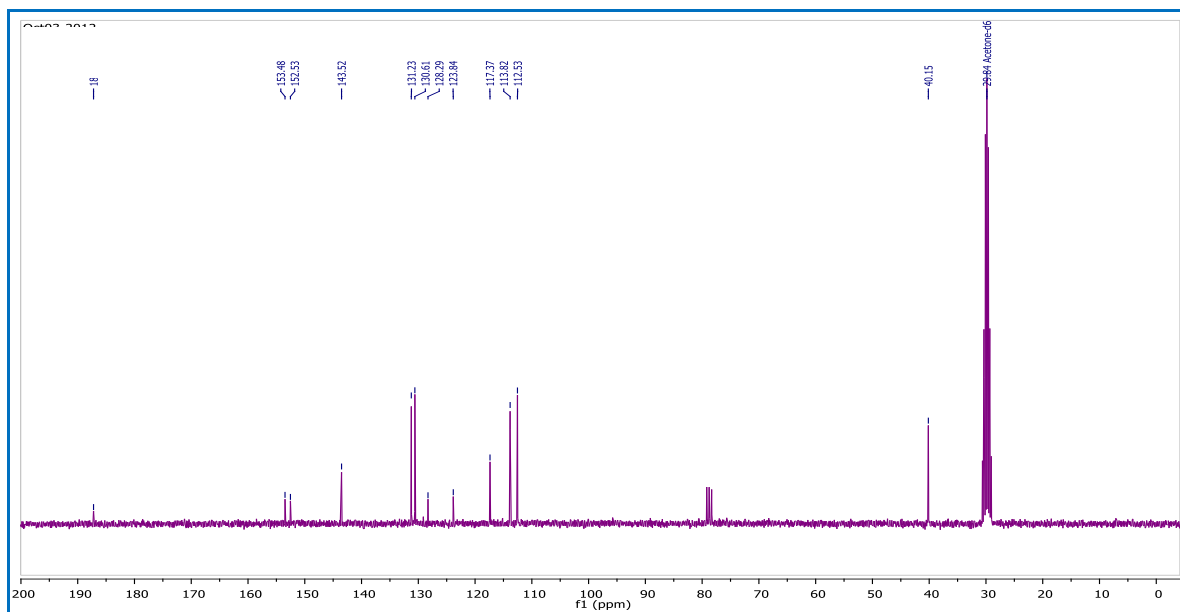


Tabla 3-12. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S5**.

	Nombre:	4'-amino-4'-cloro-chalcona
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NClO}$
	Peso molecular	257.4 g/mol
	Punto de fusión	138-140 °C
EM-IE m/z (%): 65 (100), 120 (60), 92 (55), 222 (48), 75 (40), 257 (30)		
RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 6,69 (d, $J=8,65$ Hz, $\text{H3}'/\text{H5}'$), δ 7,24-7,30 (m, $\text{H4}/\text{H5}$), δ 7,40-7,44 (m, H3), δ 7,48 (d, $J=15,7$ Hz, $\text{H}\alpha$), δ 7,70-7,76 (m, H6), δ 7,92 (d, $J=8,66$ Hz, $\text{H2}'/\text{H6}'$), δ 8,13 (d, $J=15,7$ Hz, $\text{H}\beta$), δ 4,22 (brs, NH_2).		
RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3]: 114,1 ppm ($\text{C3}'/\text{C5}'$), 125,0 ($\text{C}\alpha$), 127,1 (C5), 127,8 (C6), 128,3 ($\text{C1}'$), 130,3 (C3), 130,8 (C4), 131,4 ($\text{C2}'/\text{C6}'$), 133,8 (C1), 135,4 (C2), 139,1 ($\text{C}\alpha$), 151,4 ($\text{C4}'$), 188,1 (C=O)		
Datos descritos en: Wu <i>et al</i> , 2011		

Tabla 3-13. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S6**

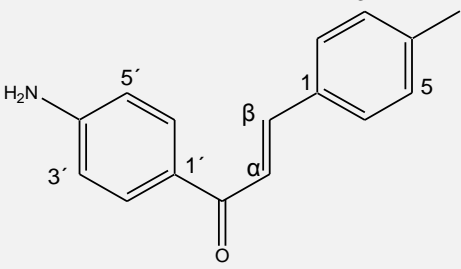
	Nombre:	4'-amino-4-metil-chalcona
	Estado físico	Sólido amarillo claro
	Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₅ NO
	Peso molecular	237 g/mol
EM-ESI: [M+H ⁺] 238,03		
RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃]: δ 6,70 (d, J=8,70 Hz, H3'/H5'), δ 7,21 (d, J=8,0 Hz, H3/H5), δ 7,51 (d, J=15,6 Hz, Ha), δ 7,53 (d, J=8,1 Hz, H2/H6), δ 7,77 (d, J=15,6 Hz, Hβ), δ 7,93 (d, J=8,7 Hz, H2'/H6'), δ 2,38 (brs, CH ₃)		
RMN ¹³C [100 MHz, CDCl₃]: 114,1 ppm (C3'/C5'), 121,1 (Cα), 128,4 (C2/C6), 128,8 (C1'), 129,8 (C3/C5), 131,2 (C2'/C6'), 132,9 (C1), 140,6 (C4), 143,4 (Cβ), 151,1 (C4'), 188,4 (C=O), 21,6 (-CH ₃)		
Datos descritos en: Tomar <i>et al</i> , 2010.		

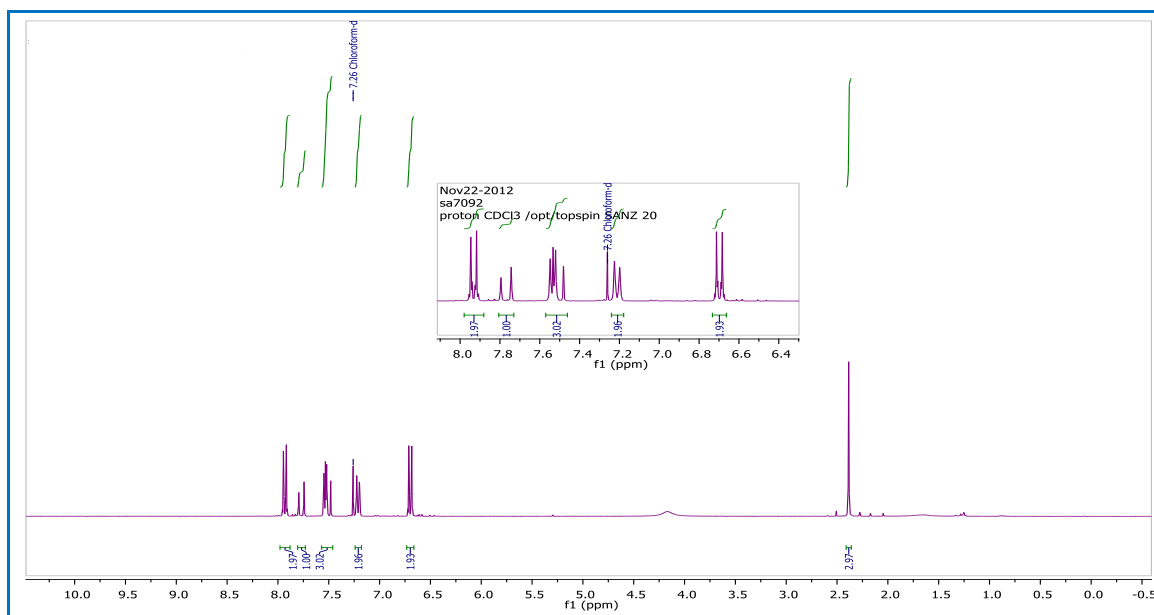
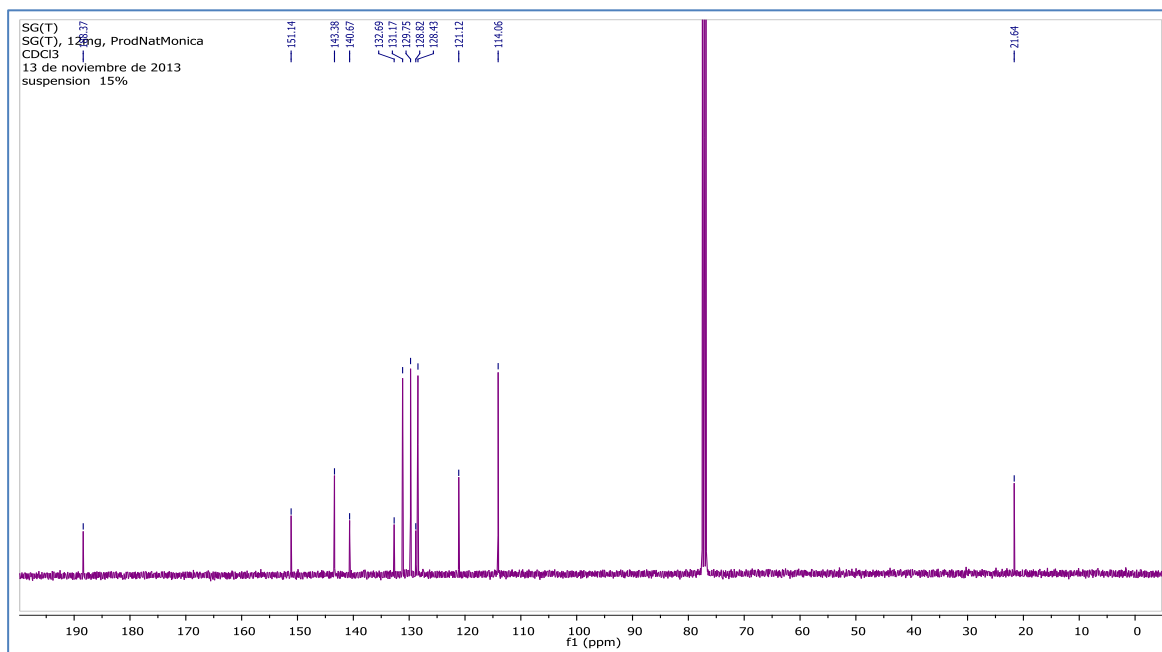
Figura 3-17. Espectros del compuesto **S6****Figura 3-17a.** Espectro de RMN ¹H del compuesto **S6**, CDCl₃, 300 MHz

Figura 3-17b. Espectro de RMN ^{13}C de compuesto **S6**, CDCl_3 , 100 MHz

- **Análogos de carbamatos**

A partir de las chalconas 4'-amino-3-nitro-chalcona (**S3**) y 4'-amino-2-cloro-chalcona (**S5**) por condensación de p-fluoro-fenil isocianato se obtuvieron los análogos nitrogenados de carbamatos denominados (*E*)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(3-(nitrofenil)acrilóil)-bencil)-urea (**S7**) y (*E*)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(2-(clorofenil)acrilóil)-bencil)-urea (**S8**). La identidad de los compuestos obtenidos se verificó empleando técnicas espectroscópicas, específicamente RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas. En las Figuras 3-18 y 3-19 se presenta la comparación de los espectros de RMN ^1H de las Chalconas **S3** y **S5** con sus respectivos análogos de carbamato **S7** y **S8**; en ambos casos se observa que el espectro de RMN ^1H de los análogos presentan las señales correspondientes al fragmento de chalcona, junto con la aparición de dos señales en δ 7,5-7,6 (m, 2H) / δ 7,0-7,1 (m, 2H) para el análogo **S7** y en δ 7,8-7,87 (m, 2H) / δ 7,08-7,15 (m, 2H) para el análogo **S8**; las señales mencionadas anteriormente se deben al fragmento proveniente del p-fluoro-fenil-isocianato, cuya multiplicidad es el resultado de los acoplamiento H-H de los protones aromáticos y los acoplamiento H-F entre protones del anillo aromático y el átomo de flúor que sustituye dicho anillo. Al comparar los espectros de RMN ^{13}C de las Chalconas **S3** y **S5** con los de sus respectivos análogos de carbamatos se observa la aparición de dos carbonos cuaternarios desplazados a campo bajo en 154,6 ppm para **S7** y 154,1 ppm para **S8**, el cual corresponde al carbono carbonílico unido a los dos átomos de nitrógeno del análogo formado. Adicionalmente se observan las señales de los carbonos provenientes del fragmento de isocianato las cuales presentan desdoblamiento, este fenómeno es debido a que el flúor natural es 100% mono isotópico apareciendo como ^{19}F con número cuántico de spin $\frac{1}{2}$ por lo tanto produce acoplamiento con ^{13}C y ^1H . Es así que las señales de carbono e hidrógeno se desdoblamiento por el acoplamiento con el átomo de flúor, los valores de desplazamiento de los carbonos que acoplan con el átomo de flúor se calculan como el promedio de los desplazamientos de las señales observadas en el espectro. En las Figuras 3-20 y 3-21 se presentan los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos **S7** y **S8**.

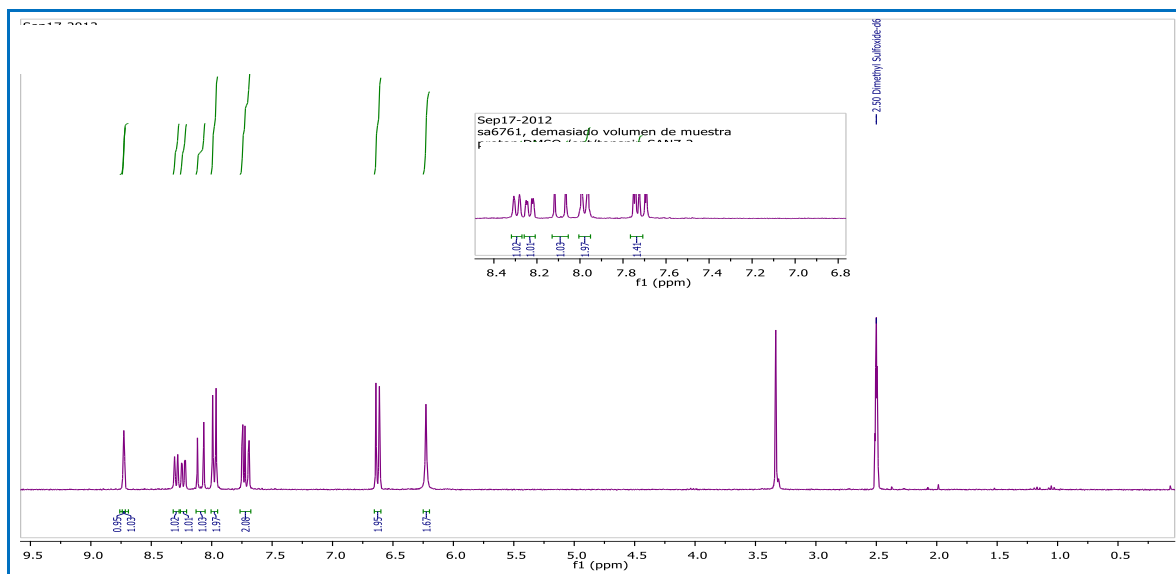
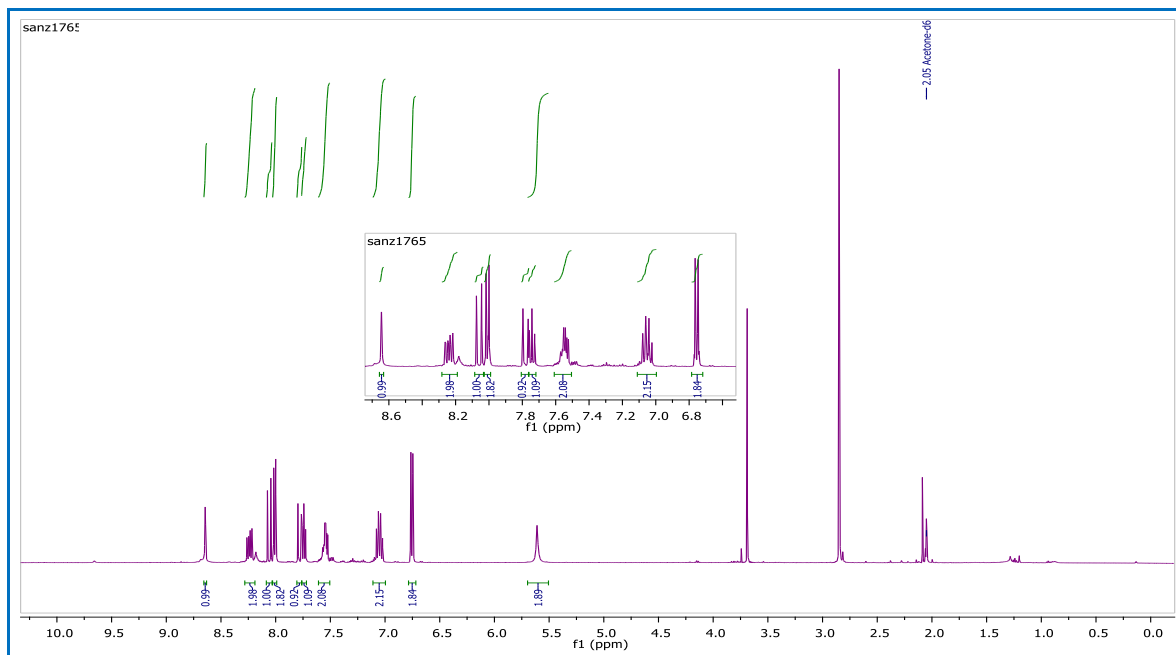
Figura 3-18. Comparación de los espectros de RMN ^1H de los compuesto **S3** y **S7****Figura 3-18a.** Espectro RMN ^1H del compuesto **S3**, 300 MHz, DMSO d_6 **Figura 3-18b.** Espectro RMN ^1H del compuesto **S7**, 500 MHz, Acetona d_6 

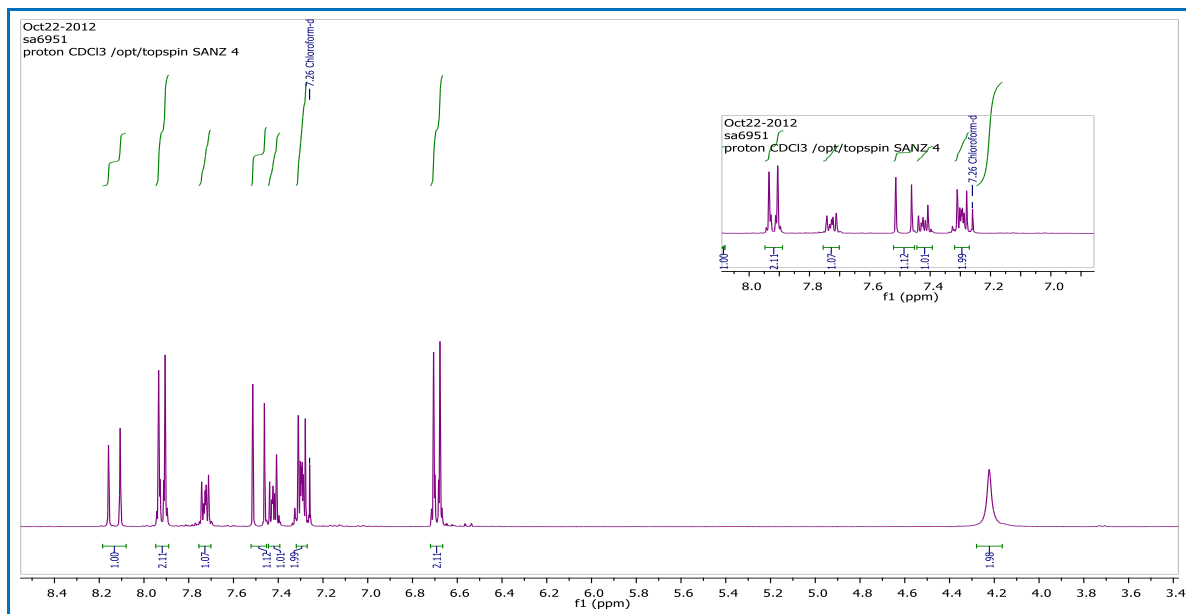
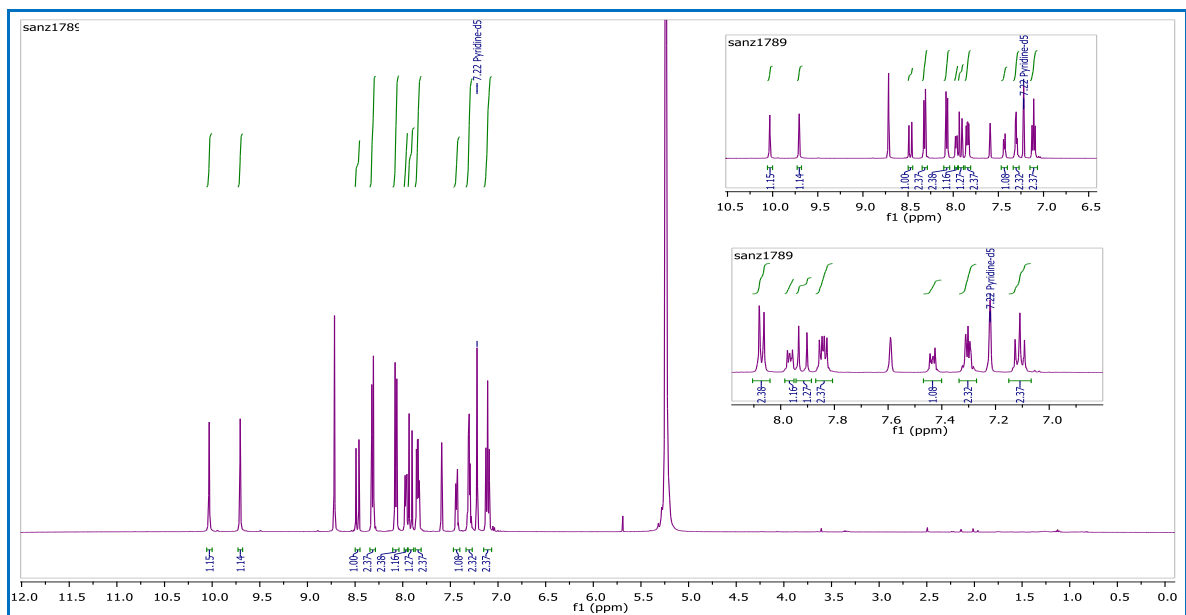
Figura 3-19 Comparación de espectros de RMN ^1H de los compuestos **S5** y **S8****Figura 3-19 a.** Espectro RMN ^1H del compuesto **S5**, 300 MHz, CDCl_3 **Figura 3-19b.** Espectro RMN ^1H del compuesto **S8**, 500 MHz, Piridina d_5 

Figura 3-20. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S7**, 125 MHz, Acetona d_6 .

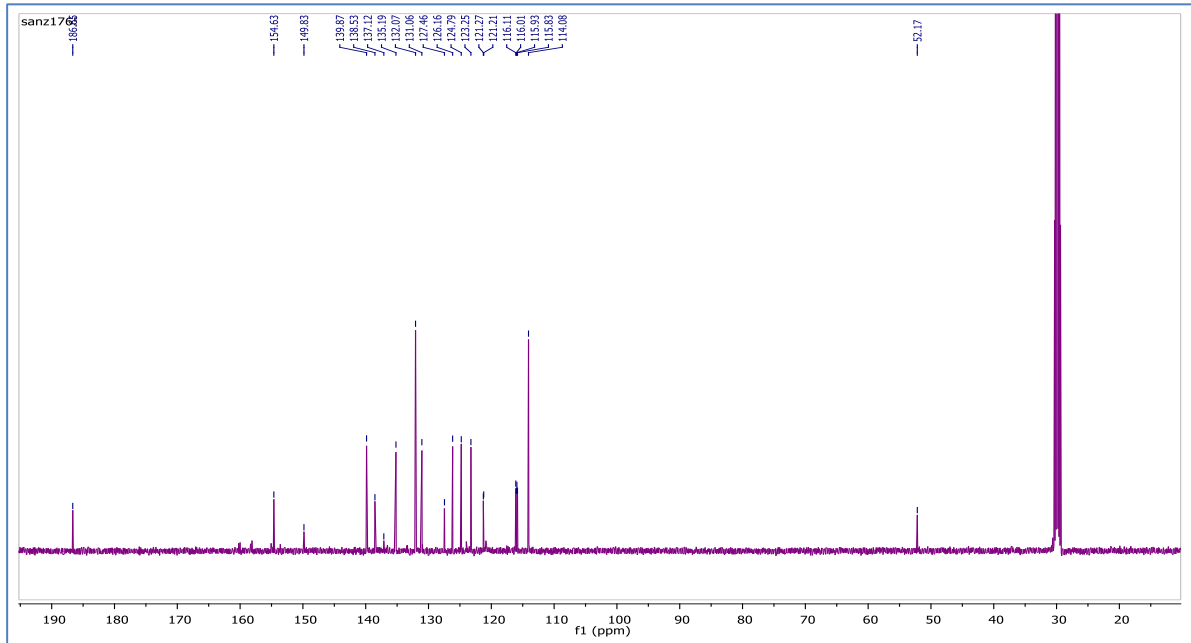


Figura 3-21 Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S8**, 125 MHz, Piridina d_5

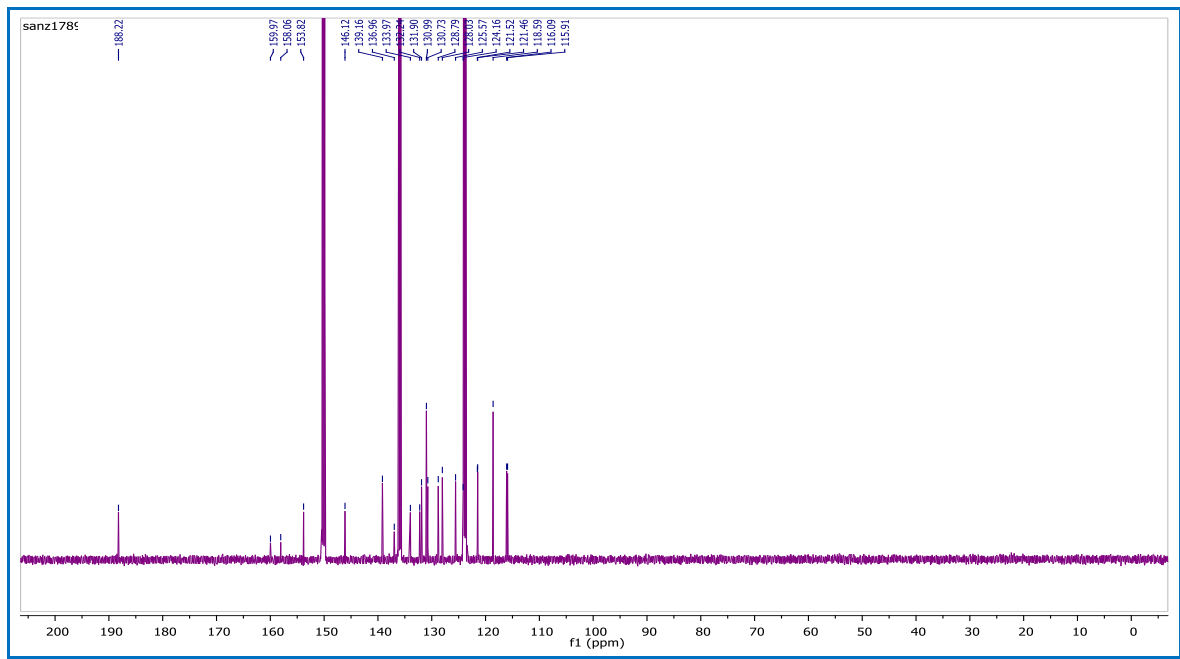
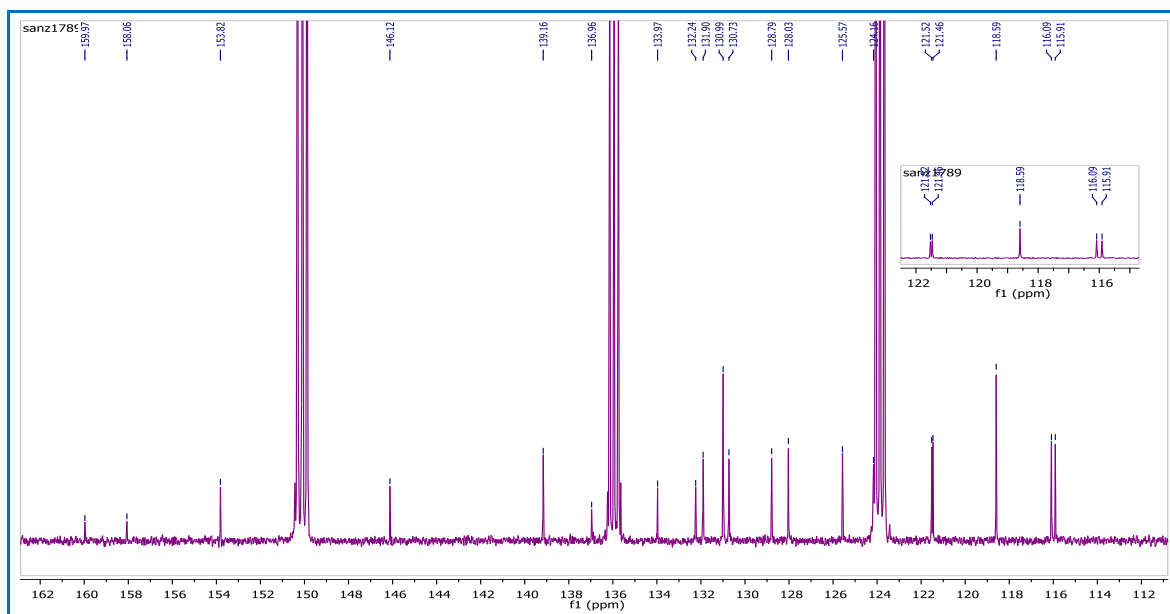


Figura 3-21a. Ampliaciones del espectro de RMN ^{13}C del compuesto **S8**, 125 MHz, Piridina d_5



Después de realizar la búsqueda de las estructuras de los compuestos **S7** y **S8** en las diferentes bases de datos, no se encontraron reportes previos en la literatura. En las Tablas 3-14 y 3-15 se muestran las constantes físicas y los datos espectroscópicos de los compuestos **S7** y **S8**.

Tabla 3-14. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S7**

	Nombre:	(E)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(3-nitrofenil)acriloil)-bencil-urea
	Estado físico	Sólido naranja
	Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₆ N ₃ FO ₄
	Peso molecular	405 g/mol
	Punto de fusión	188-190 °C
ESI-MS <i>m/z</i> (%): [M-H ⁺] 403,92		
RMN ¹H [500 MHz, Acetona <i>d</i>₆]: δ 6,75 (d, J=8,76 Hz, H3'/5'), δ 7,0-7,10 (m, H3''/H5''), δ 7,5-7,6 (m, H2''/6''), δ 7,73 (d, J=7,98 Hz, H5), δ 7,70 (d, J=15,6 Hz, Hα), δ 8,00 (d, J= 8,74 Hz, H2'/H6'), δ 8,06 (d, J= 15,5 Hz, Hβ), δ 8,22 (d, J=7,8 Hz, H6), δ 8,25 (dd, J=5,3 y 2,2 Hz, H4), δ 8,64 (t, J=1,9 Hz, H2), δ 5,60 (s, -NH)		
RMN ¹³C [125 MHz, Acetona <i>d</i>₆]: 114,1 ppm (C3'/C5'), 116,0 (C3''/C5''), 121,24 (C2''/C6''), 123,2 (C2), 124,8 (4), 126,2 (Cα), 127,5(C1'), 131,1 (C5), 132,1 (C2'/C6'), 138,5 (C1), 135,2 (C6), 137,1 (C1''), 138,5 (C1), 139,9 (Cβ), 149,8 (C3), 154,5 (C4'/C=O amida), 159,2 (C4''), 186,6 (C=O cetona),		

Tabla 3-15. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **S8**

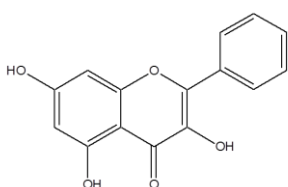
	Nombre:	(E)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(2-clorofenil)acriloil)-bencil-urea
	Estado físico	Sólido amarillo
	Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ FCIO ₂
	Peso molecular	394 g/mol
	Punto de fusión	224-226 °C
ESI-MS <i>m/z</i> (%): [M-H ⁺] 392,91		
RMN ¹H [500 MHz, Piridina <i>d</i>₅]: δ 7,08-7,15 (m, H3''/H5''), δ 7,34-7,27 (m, H3/H5), 7,40-7,45 (m, H4), δ 7,82-7,87 (m, H2''/H6''), δ 7,92 (d, J=15,5 Hz, Hα), δ 7,95-7,99 (m, H5), δ 8,07 (d, J=8,7 Hz, H3'/H5'), δ 8,32 (d, J=8,7 Hz, H2'/H6'), δ 8,47 (d, J=15,6 Hz, Hβ), δ 9,70 (brs, N-H), δ 10,0 (brs, N-H)		
RMN ¹³C [125 MHz, Piridina <i>d</i>₅]: 116 ppm (C3''/C5''), 118,6 (C3',C5'), 121,5 (C2''/C6''), 125,6 (Cα), 128 (C5), 128,8 (C6), 130,7 (C4), 130,9 (C2'/C6'), 131,9 (C2), 132,2 (C3), 134 (C1), 137,0 (C1'), 139,2 (Cβ), 146,1 (C4'), 153,8 (C=O amida), 159 (C4''), 189 (C=O cetona).		

3.3.2 Análisis de resultados actividad insecticida y antialimentaria:

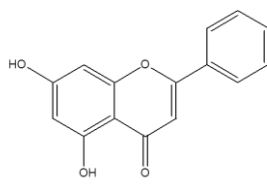
Una serie de compuestos de tipo flavonoide o de estructura análoga a estos se sometió a ensayos biológicos con el fin de determinar su efecto sobre la mortalidad y el comportamiento alimentario de *Spodoptera frugiperda*. Para facilitar el análisis, los resultados se presentan agrupados por tipos de compuestos.

3.3.2.1. Compuestos tipo 2-Fenil-benzo- γ -pirona

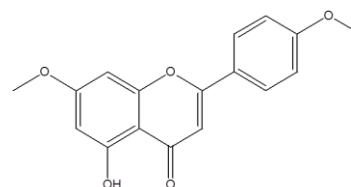
Las estructuras de los compuestos de tipo flavona sometidos a ensayos de actividad antialimentaria e insecticida se presentan a continuación



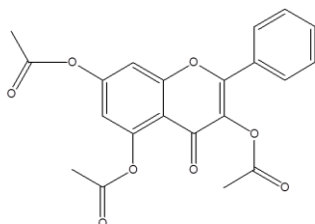
C2



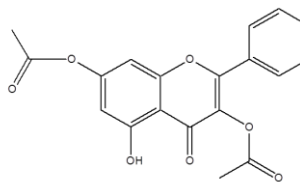
C5



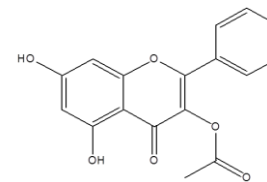
C6



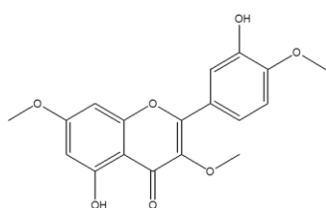
D3



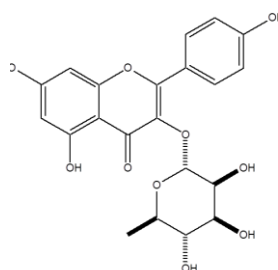
D4



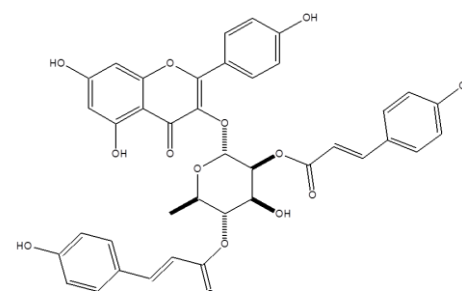
D5



E1



E2



E3

Los compuestos con núcleo 2-fenil-benzo- γ -pirona **C2**, **C5**, y **C6** fueron aislados por medio del fraccionamiento bioguiado de los extractos de parte aérea de *Piper septuplinervium* e inflorescencias de *Piper subtomentosum* descrito en capítulo 2 del presente trabajo; las flavonas **D3**, **D4**, y **D5** fueron obtenidas, por acetilación de la mezcla

de flavonoides extraída a partir de las fracciones F4-F6, las cuales fueron producto del fraccionamiento bioguiado del extracto de parte aérea de *Piper septuplinervium*, el procedimiento de la purificación de las flavonas **D3** a **D5** se describe en las páginas 131 y 132 del presente capítulo. La flavona **E1** fue aislada de la hojas de la especie *Crotón shideanus* (Euphorbiaceae) (Chiappe A, 2013), mientras que las flavonas **E2** y **E3** fueron aisladas de las hojas de *Compsonera capitelata* (Miristicácea) (Prieto J, 2012). En la Tabla 3-16 se presentan los valores de los índices antialimentarios calculados como porcentaje para cada una de las estructuras 2-fenil-benzo- γ -pirona ensayadas.

Tabla 3-16. Índices antialimentarios (% IA) para los compuestos de núcleo 2-Fenil-benzo- γ -pirona

Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
C2	50	70,6 \pm 3,31
	10	51,1 \pm 3,92
C5	50	55,8 \pm 3,88
	10	39,4 \pm 2,99
C6	50	46,1 \pm 4,72
	10	34,0 \pm 3,46
D3	50	42,6 \pm 2,53
	10	36,5 \pm 2,10
D4	50	55,4 \pm 2,79
	10	44,3 \pm 1,99
D5	50	66,8 \pm 4,12
	10	53,2 \pm 4,08
E1	50	54,5 \pm 2,74
	10	41,9 \pm 3,96
E2	50	57,2 \pm 5,29
	10	Fagoestimulante
E3	50	83,9 \pm 4,13
	10	42,5 \pm 2,90
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El control positivo utilizado en el ensayo fue el extracto de semillas del neem el cual está compuesto por limonoides con reconocida actividad antialimentaria sobre Lepidópteros. De acuerdo a lo reportado por Muñoz y colaboradores en 2013, los rangos seleccionados para determinar la potencia de la acción ejercida por las sustancias ensayadas fue el siguiente:

Superior a 75% alta inhibición

50-75% inhibición moderada

30-50% inhibición débil

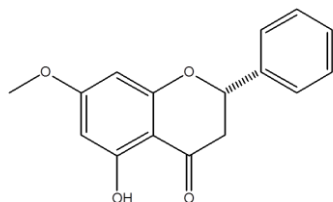
Inferior a 20% no hay inhibición

El análisis de varianza realizado muestra diferencias significativas en el efecto fagodisuasivo causado por los compuestos con núcleo flavona tratados a las dos concentraciones utilizadas. De las 9 flavonas ensayadas, 7 producen efectos fago disuasivos superiores al 50% en alguna de las concentraciones ensayadas, siendo la flavona E3 (Kaempferol-3-O-(2'',4''-di-*E*-p-coumaroil)-ramnósido) la sustancia que causa los porcentajes de inhibición más altos a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. De manera general los resultados obtenidos permiten concluir que las estructuras de tipo 2-fenil-benzopirona sustituidas con grupo OH producen mayores efectos antialimentarios, viéndose disminuida la actividad cuando los grupos OH se sustituyen por metil éteres y metil esterres, siendo mayores las disminuciones cuando el sustituyente es metil éter. Simmonds en el 2001 reporta que los glicósidos de flavonoide a bajas concentraciones pueden actuar como fagoestimulantes, en este trabajo se ensayaron dos glicósidos de flavonoide: la azfelina (**E2**) y el Kaempferol-3-O-(2'',4''-di-*E*-p-coumaroil)-ramnósido (**E3**), cuya diferencia estructural es que en **E3** existen dos unidades de p-coumaroil sustituyendo los OH sobre el carbono 2 y 4 de la unidad de ramnosa, la inhibición de la alimentación causada por estos dos compuestos es diferente, a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ E2 produce una inhibición moderada (57,2%) mientras que **E3** produce una alta inhibición (83,9 %), y a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ **E2** tiene efecto fagoestimulante, mientras que **E3** causa inhibición antialimentaria moderada, lo que indica que la presencia del fragmento p-coumaroil como sustituyente del azúcar potencia la acción antialimentaria del compuesto. Adicionalmente al comparar los resultados de IA en las estructuras de 2-fenil-benzopirona ensayadas la ausencia de

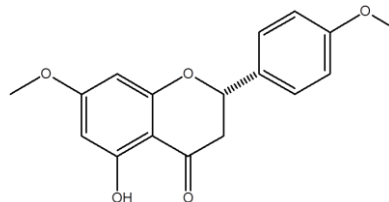
sustitución en el anillo B favorece la acción fagodisuasora comportamiento observado por Morimoto y colaboradores en larvas de *Spodoptera litura* (Morimoto *et al*, 2000; 2003).

3.3.2.2. Flavanonas

Las estructuras de los compuestos de tipo flavanona (2-fenil-2H-γ-benzopirona) sometidos a ensayos de actividad antialimentaria e insecticida se presentan a continuación



C7



E4

La flavanona **C7** fue aislada en la presente tesis doctoral a partir del fraccionamiento bioguiado de las inflorescencias de *Piper subtomentosum*, mientras que la flavanona **E4** se aisló de las inflorescencias de *Piper hispidum* (Plazas *et al*, 2008). En la Tabla 3-17 se presentan los valores de IA calculados para las dos flavanonas ensayadas.

Tabla 3-17. Índices antialimentarios (% IA) para los compuestos de tipo flavanona.

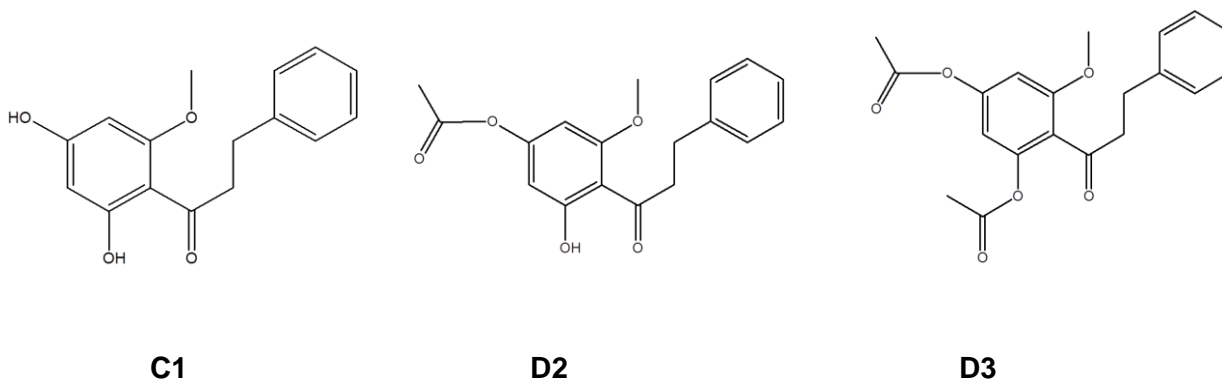
Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
C7	50	70,8 \pm 3,42
	10	53,1 \pm 3,69
E4	50	43,3 \pm 4,40
	10	26,4 \pm 4,33
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El análisis de varianza realizado, muestra diferencias significativas entre los índices antialimentarios de las dos flavanonas ensayadas, a las concentraciones seleccionadas para el ensayo. El compuesto **C7** aislado de las inflorescencias de la especie *P.*

subtomentosum presenta acción fagodisuasora moderada a las dos concentraciones ensayadas, mientras que el compuesto **E4** presenta una inhibición leve a la concentración más alta ensayada y nula a la mínima concentración. Teniendo en cuenta que la única diferencia estructural entre los compuestos **C7** y **E4**, es que esta última presenta una metoxilación en la posición 4' de la flavanona, podemos concluir que la sustitución en el anillo B de la flavanona provoca una disminución sustancial de la actividad antialimentaria. Díaz y colaboradores (Díaz *et al*, 2009) reportan el IA (%) contra *S. frugiperda* de la pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona) a 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (%IA= 91 y 70 respectivamente), la diferencia estructural entre la pinocembrina y el compuesto **C7**, es la presencia de un grupo $-\text{OCH}_3$ en la posición 7 de la flavanona; la acción fagodisuasiva del compuesto 5,7-dihidroxiado es sustancialmente mayor comparado con el efecto causado por el 5-hidroxi-7-metoxi, por lo que en el núcleo 2-fenil-2H-benzopirona al igual que en el núcleo 2-fenil-benzopirona la presencia de OH es un factor determinante en la acción antialimentaria.

3.3.2.3. Dihidrochalconas

Las estructuras de las dihidrochalconas sometidas a ensayos de actividad antialimentaria e insecticida se presentan a continuación



La dihidrochalcona **C1** fue obtenida a partir del fraccionamiento bioguiado del extracto etanólico de parte aérea de *Piper septuplinervium*, las dihidrochalconas **D2** y **D3** se obtuvieron por acetilación de **C1**. En la Tabla 3-18 se presentan los valores de IA calculados para las dihidrochalconas ensayadas.

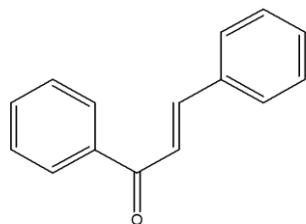
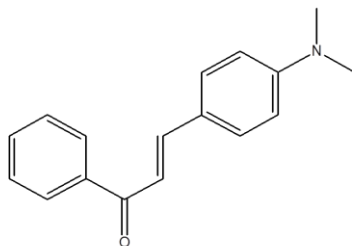
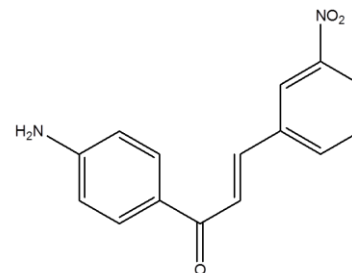
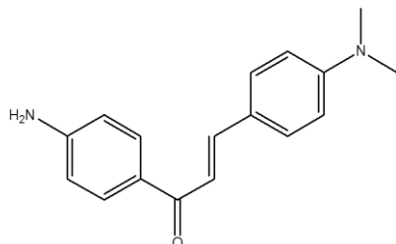
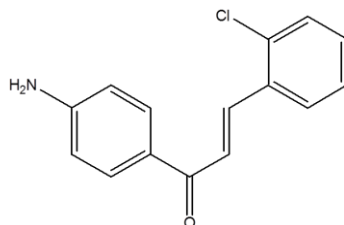
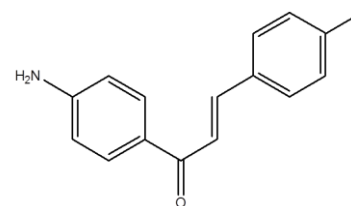
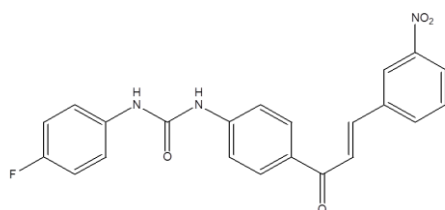
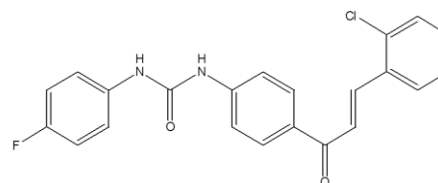
Tabla 3-18. Índices antialimentarios IA (%) de las dihidrochalconas ensayadas

Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
C1	50	49,5 \pm 3,33
	10	39,6 \pm 3,18
D1	50	56,5 \pm 4,43
	10	52,9 \pm 5,5
D2	50	76,2 \pm 4,43
	10	68,3 \pm 7,10
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El análisis de varianza realizado muestra que existen diferencias significativas entre los índices antialimentarios de las dihidrochalconas ensayadas; los resultados revelan que los compuestos acetilados **D1** y **D2** producen efecto antialimentario superior al 50% a las dos concentraciones estudiadas, siendo la 2'-4'-diacetil-6'-metoxi-dihidrochalcona **D2** la que causa los mayores efectos. Comparando los IA causados por compuestos con estructura 2-fenil-benzopirano sustituidas con acetilos **D3**, **D4**, y **D5** (Tabla 3-16) con estructuras dihidrochalcona con sustituyentes acetilados **D1** y **D2** (Tabla 3-18), podemos inferir que el mecanismo de acción antialimentario sobre *Spodoptera frugiperda* que ejercen los dos tipos de estructuras es diferente ya que en las flavonas el efecto es proporcional al número de OH sobre la estructura, mientras que en las dihidrochalconas la acción antialimentaria es inversamente proporcional al número de OH sobre la estructura de dihidrochalcona. Simmonds en el 2003 reporta la actividad antialimentaria e inhibición de crecimiento larval de los salicilatos acetilados aislados de especies de Sauces sobre larvas de *Operophtera brumata* (Lepidoptera), el cual es un polífago que ataca especies maderables y frutales de importancia económica en Estados Unidos (Simmonds, 2003).

3.2.3.4. Chalconas

Las estructuras de las Chalconas sometidas a ensayos de actividad antialimentaria e insecticida se presentan a continuación.

**S1****S2****S3****S4****S5****S6****S7****S8**

Todos los compuestos con estructura chalcona fueron sintetizados como parte de esta investigación. Las Chalconas **S1** a **S6** fueron obtenidas por condensación de *Claisen-Schmidt*, mientras que los compuestos **S7** y **S8** (análogos de carbamatos) fueron el resultado de la condensación de las **S3** y **S5** con *p*-fluoro-fenil-isocianato. En la Tabla 3-19 se presentan los índices antialimentarios de los compuestos de tipo chalcona ensayados.

Tabla 3-19. Índices antialimentarios IA (%) de las chalconas ensayadas

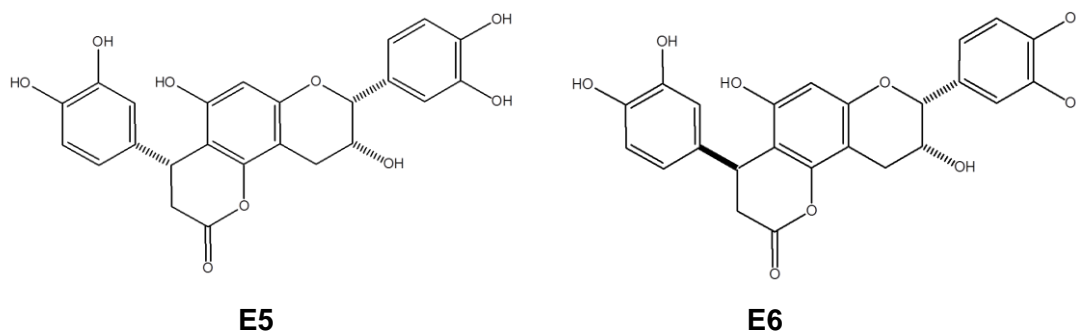
Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
S1	50	45,2 \pm 5,61
	10	28,3 \pm 4,55
S2	50	Fagoestimulante
	10	Fagoestimulante
S3	50	60,8 \pm 3,36
	10	40,2 \pm 2,07
S4	50	Fagoestimulante
	10	Fagoestimulante
S5	50	62,7 \pm 4,56
	10	47,1 \pm 5,50
S6	50	39,2 \pm 3,19
	10	24,6 \pm 2,31
S7	50	73,6 \pm 3,26
	10	58,0 \pm 2,81
S8	50	79,7 \pm 2,69
	10	66,8 \pm 2,38
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El análisis de varianza realizado muestra que hay diferencias significativas entre los efectos que causan las chalconas ensayadas sobre el comportamiento alimentario de *Spodoptera frugiperda* a las concentraciones usadas en el ensayo, de las 9 chalconas ensayadas, las estructuras **S3** (4'-amino-3-nitro-chalcona) y **S5** (4'-amino-2-cloro-chalcona) producen inhibiciones moderadas de la alimentación a la concentración más alta ensayada, mientras que las estructuras **S7** y **S8** producen alta inhibición de la alimentación a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e inhibición moderada a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; el resto de las chalconas

ensayadas producen inhibiciones débiles, nulas, o son fagoestimulantes. Los resultados obtenidos permiten concluir que la presencia de sustituyentes desactivantes sobre el anillo B de la chalcona es un factor que aumenta efecto fagodisuasivo de este tipo de estructuras como es el caso de los compuestos **S3** y **S5** que poseen sustitución nitro en la posición 3 y cloro en la posición 2 respectivamente. El efecto de estos mismos compuestos es potenciado cuando se adiciona al grupo amino de la posición 4' de la chalcona un isocianato para obtener los análogos de carbamato con núcleo chalcona **S7** y **S8**, que producen un aumento considerable en el efecto fagodisuasivo. Las chalconas **S2** y **S4** estimulan el consumo de alimento en las larvas del gusano cogollero a las dos concentraciones ensayadas, dichas estructuras poseen una característica estructural común y es la presencia de un grupo dimetilamino en la posición 4 de la chalcona, de manera general las chalconas con sustituyentes activantes sobre el anillo B de la chalcona producen bajas o nulas inhibiciones de la alimentación de *Spodoptera frugiperda*.

3.2.3.5- Catequinas

Los compuestos **E5** y **E6** fueron aislados de la madera de la especie *Compsonera capitellata* (Myricaceae) (Prieto, 2012). Las estructuras tipo catequina evaluadas en el ensayo de actividad antialimentaria fueron las siguientes.



En la Tabla 3-20 se presentan los índices antialimentarios de las estructuras tipo catequina ensayadas

Tabla 3-20. Índices antialimentarios IA (%) de las catequinas ensayadas

Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
E5	50	28,5 \pm 4,70
	10	18,7 \pm 2,73
E6	50	38,9 \pm 4,42
	10	28,9 \pm 3,09
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El análisis de varianza realizado, muestra que existen diferencias significativas entre los índices antialimentarios calculados para las catequinas ensayadas, las cuales son estereoisómeros, sin embargo los valores de los índices antialimentarios de las catequinas ensayadas muestran que los compuestos producen una inhibición muy débil a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que a la más baja concentración no se observa inhibición alguna. Los resultados encontrados en esta investigación coinciden con lo reportado por Díaz en el 2009, quienes realizaron un estudio sobre el comportamiento alimentario de varias estructuras flavonoides sobre el comportamiento alimentario de *Ephilacna paenulata* (Coleoptera), plaga de especies frutales de la familia Cucurbitaceae, la catequina ensayada en dicho estudio produce inhibiciones leves a $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, y $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, y a concentraciones más pequeñas se encuentra efecto fagoestimulante. Todo lo anterior nos permite concluir que los compuestos con estructura catequina no producen inhibición de la alimentación en insectos polípagos (Díaz *et al*, 2009).

3.2.3.6. Aril propanos

De la madera de la especie *Compsonera capitelata* (Miristicaceae) se aislaron dos aril propanos (Prieto, 2012), los cuales tiene estructura análoga a las dihidrochalcona, las estructuras de los compuestos ensayados se presentan a continuación. En la Tabla 3-21 se presentan los índices antialimentarios de los aril propanos ensayados.

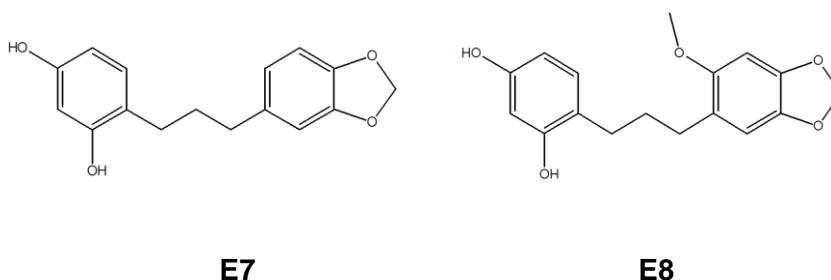


Tabla 3-21. Índices antialimentarios IA (%) de los aril propanos ensayados

Sustancia ensayada	Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	IA (%) \pm DS
E7	50	76,7 \pm 3,45
	10	56,4 \pm 6,19
E8	50	75,9 \pm 2,81
	10	54,5 \pm 7,42
Extracto de Neem	50	96,6 \pm 3,53
	10	81,8 \pm 3,33

El análisis de varianza realizado muestra que no existen diferencias significativas entre los índices antialimentarios que producen las dos estructuras de aril propanos ensayados las cuales difieren en la presencia de un grupo metoxi, sin embargo ambas estructuras poseen un fragmento metilendioxfenil, que según algunos autores es el responsable de la notable actividad insecticida y antialimentaria generada por los compuestos derivados de fenilpropanoide por actuar sobre el sistema P-450 y afectar el sistema de respiración celular (Regnault-Roger C *et al*, 2003).

3.4. Conclusiones

- A partir de la acetilación de los compuestos extraídos de la parte aérea de *Piper septuplinervium* Uvangoletina (**C1**) y Galangina (**C2**) se obtuvieron dos compuestos sin previos reporte en la literatura, el 2'-hidroxi-4'-acetil-6'-metoxi-dihidrochalcona (**D1**) y la 3,7-diacetil-5-hidroxi-flavona (**D4**).
- Por síntesis se obtuvieron dos nuevos compuestos de tipo uretano análogos de carbamatos, (*E*)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(3-(nitrofenil)acriloil)-bencil)-urea (**S7**) y (*E*)-1-(4-fluorofenil)-3-(3-(2-(clorofenil)acriloil)-bencil)-urea (**S8**): Los compuestos **S7** y **S8** producen alta deterrencia en larvas de *S. frugiperda* de acuerdo al ensayo de actividad antialimentaria realizado, potenciando la actividad que presenta la chalcona que se usa como nucleófilo en la condensación con el isocianato para la formación del uretano.
- Las acetilaciones realizadas en los metabolitos con estructura dihidrochalcona potencian el efecto antialimentario del compuesto natural. Se determinó que no todos los núcleos flavonoides con hidroxilos fenólicos poseen alto poder deterrente contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. De forma contraria los flavonoides cuya estructura posee el núcleo 2-fenil-benzo- γ -pirona, aumentan su actividad antialimentaria con el aumento del número de OH fenólicos sobre la estructura.
- En la estructura de la serie de chalconas que fueron sintetizadas y ensayadas para evaluar su efecto en el comportamiento alimentario de *S. frugiperda*, se determinó que cuando existe un sustituyente activante en la posición 4 del anillo B de la chalcona, la actividad fagosdisuasora disminuye. La sustitución dimetil amino genera un efecto fagoestimulante en las larvas a las dos concentraciones ensayadas.
- Los compuestos aril propanos ensayados mostraron una actividad más alta que el núcleo flavonoide análogo correspondiente a las dihidrochalconas, es probable que la sustitución metilendioxfenil tenga una alta incidencia en el comportamiento observado.

3.5. Bibliografía

Avila, M., Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., Cuca, L.E. Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C.DC (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*. **2011**, 40, 25-33

Barrero, A., Herrador, M., Arteaga, P., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M. Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subspecies ramosissima. *Journal of Natural Products*. **1997**, 60, 65-68.

Bernays, E., Chapman, R. Plant secondary compounds and Grasshoppers: Beyond plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*. **2000**, 26, 1773-1794.

Camarena, G. Señales en la interacción planta – insecto. *Revista Chapingo Serie de Ciencias Forestales y del Ambiente*. **2009**, 15, 81-85.

Chiappe, A. **(2013)** Estudio Fitoquímico de las hojas de *Crotón shideanus* (Euphorbiaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, pp 46-49

Cornell, H.V. y Hawkins B.A.. Herbivore responses to plant secondary compounds: A test of phytochemical coevolution theory. *The American Naturalist*. **2003**, 161, 507-522.

Díaz, G., Carpinella, M., Palacios, S. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresource Technology*. **2009**, 100, 3669-3673.

Drijfhout, F.P.; Morgan, D.E. **(2010)**. Terrestrial natural products as antifeedants. En *Comprehensive Natural Products: Chemistry and Biology*. Elsevier , vol. 4, cap. 11, pp 458-502.

Duchowicz, P., Goodarzi, M., Ocsachoque, M., Romanelli, G., Ortiz, E., Autino, J., Bennardi, D., Ruiz, D., Castro, E. QSAR analysis on *Spodoptera litura* antifeedant activities for flavone derivatives. *Science of the Total Environment*. **2009**, 408, 277-285.

Facundo, V., Morais, S. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **2003**, 31, 111-113.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge UK.

Harborne, J.B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, New York. **1982**, pp 356.

Harborne, J., Williams, C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 481-504.

Hermoso, A., Jimenez, I., Mamani, Z., Bazzochi, I., Piñero, J., Ravelo, A., Valladares, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural Requirements for activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2003**, 11, 3975-3980.

Hilker, M., Meiners, T. Plants and insect eggs: How do they affect each other?. *Phytochemistry*. **2011**, 72, 1612-1623.

Ji, X., Melman, N., Jacobson, K. Interactions of flavonoids and other phytochemicals with adenosine receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1996**, 39, 781-788.

Lawrence, N., Rennison, D., McGown, A., Ducki, S, Gul, L., Hadfield, J., Khan N. Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones. *Journal of Combinatorial Chemistry*. **2001**, 3, 421-426.

Morimoto, M., Fukumoto, H., Nozoe, T., Hagiwara, A., Komai, K. Synthesis and insect antifeedant activity of aurones against *Spodoptera litura* larvae. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 700-705.

Morimoto, M., Kumeda, S., Komai, K. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D.Don. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 1888-1891.

Morimoto, M., Tanimoto, K., Nakano, S., Ozaki, T., Nakano, A., Komai, K. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 389-393.

Murray, K. D., Hasegawa S., Alford, A.R. Antifeedant activity of *Citrus* limonoids against Colorado potato beetle: comparison of aglycones and glucosides. *Entomologia Experimentalis Applicata*. **1999**, 92, 331-334.S

Muñoz, E., Lamilla, C., Marín, J.C., Alarcon, J., Céspedes, C. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 42, 137-144.

Natoli, M., Nicolosi, G., Platelli, M. Enzyme-Catalyzed alcoholysis of flavone acetates in organic solvent. *Tetrahedron Letters*. **1990**, 31, 7371-7374.

Ninomiya, M., Efdi, M., Inuzuka, T., Koketsu, M. Chalcone glycosides from aerial parts of *Brassica rapa* L. 'hidabeni', turnip. *Phytochemistry Letters*. **2010**, 3, 96-99

Ohmura, W., Doi S., Aoyama, M., Ohara, S. Antifeedant activity of flavonoids and related Compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *Journal of Wood Science*. **2000**, 46, 149.153.

Onyilagha, J., Lazorko, J., Gruber, M., Soroka, J., Erlanson, M. Effect of flavonoids on feeding preference and development of crucifer pest *Mamestra configurata*. *Journal of Chemical Ecology*. **2004**, 30, 109 - 124.

Panreac, 2013. [Consultado diciembre 2013]. Disponible en http://www.panreac.es/pdf/prod_para_laborat_CAST.pdf.

Plazas, E., Cuca, L.E., Delgado, W. Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*. **2008**, 37, 135 – 144.

Prieto, J. Estudio fitoquímico de *Compsonera capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. Tesis de Doctorado en Ciencias-Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2012, pp. 44-48

Regnault-Roger, C., Philogene, B., Vincent, C. "Biopesticides D' Origine Végétale". Tec&Doc-Lavoisier. **2003**, pp. 69.

Romanelli, G., Virla, E., Duchowicz, P., Gaddi, A., Ruiz, D., Bennardi, D., Valle Ortiz, E., Autino, J. Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 6290-6295.

San Feliciano, A., Pérez, A., del Olmo, E., Martínez, J.C., Pérez, C., Jiménez, C., Ravelo, A. Manual de determinación estructural de compuestos naturales. CYTED, **2008**, 578.

Schoonhoven, L.M. Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **1982**, 31, 57-69.

Simmonds, M. Flavonoids – insects interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 21-30.

Simmonds, M. Importance of flavonoids in insect – plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*. **2001**, 56, 245-252.

Simmonds, M., Blaney, W., Delle Monache, F., Marini Bettolo, G. Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *Journal of Chemical Ecology*. **1990**, 16, 365-380

Sosa, M., Tonn, C. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry Reviews*. **2008**, 7, 3-24.

Tomar, V., Bhattacharjee, G., Kamaluddin, Rajakumar, S., Srivastava, K., Puri, S. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**, 45, 745-751.

Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*. **2006**, 4, 147-157

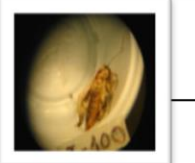
Wu, J., Li, J., Cai, Y., Pan, Y., Ye, F., Zhang, Y., Zhao, Y., Yang, S., Li, X., Liang, G. Evaluation and Discovery of Novel Synthetic Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 54-8110-8123

4. Resumen final

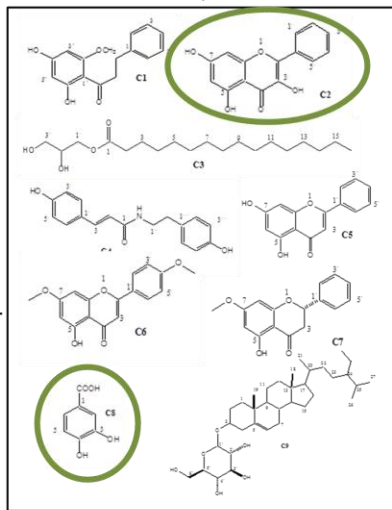
El estudio realizado en las especies *P. septuplinervium* y *P. subtomentosum* el cual contempló el estudio químico y de actividad insecticida de los aceites esenciales, el estudio bioguiado de los extractos crudos y la evaluación de actividad antialimentaria de flavonoides naturales, semisintéticos, y sintéticos; evidenció la presencia de sustancias con interesantes propiedades insecticidas demostradas en condiciones de laboratorio y que pueden ser extrapoladas a invernadero y campo en la búsqueda de opciones de control de *S. frugiperda*. A continuación se presentan los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo.



Los extractos crudos a concentraciones menores a CL_{50} producen disminución del 50% del crecimiento de las larvas, y malformaciones en las pupas y los adultos.

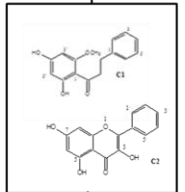


El aislamiento fitoquímico bioguiado condujo al aislamiento de 9 compuestos C1 a C9, de los cuales los compuestos C2 (13,63 ppm) y C8 (17,16 ppm), poseen la más alta actividad insecticida debida a la acción pro-oxidante que ellos producen y que causa daños en el ADN provocándoles la muerte.



Los flavonoides son los metabolitos mayoritarios y los más activos de los extractos. Los flavonoides poseen un papel importante en las relaciones planta-insecto

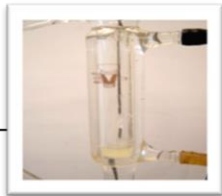
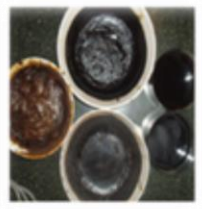
Modificaciones estructurales



síntesis de chalconas



P. septuplinervium
COL 517695



La evaluación de los AE en el ciclo de vida del insecto evidencio importantes efectos en los diferentes estadios



Disminución del 75% del tamaño de las larvas con respecto al control

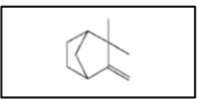


P. subtomentosum
COL 516758

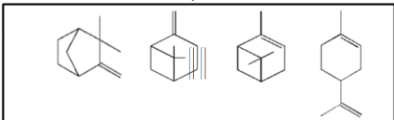
Los AE poseen alta cantidad de monoterpenos (48%) y (77%), dichos compuestos son los responsables de la mortalidad observada en las larvas y causada por toxicidad fumigante, debido a la neurotoxicidad de sus vapores. Los aceites no poseen una actividad repelente importante, ni provocan toxicidad por contacto.



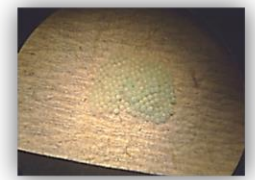
El AE de *P. septuplinervium* causa mortalidades cercanas al 90%, el inhibe el normal desarrollo de las larvas sobrevivientes



El canfeno, es el metabolito que presentó la mayor toxicidad fumigante $CL_{50} > 0,57$ mg/L de aire

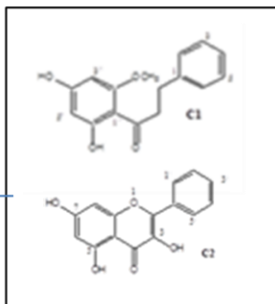


Monoterpenos activos de los AE

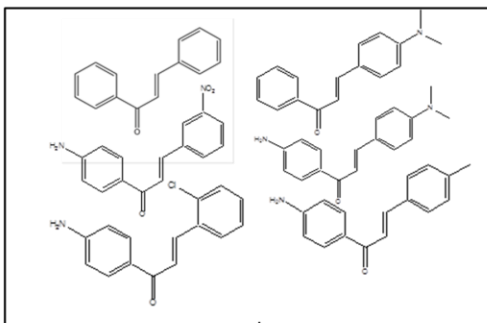


Disminución e inhibición de la oviposición del insecto, producida por algunos de los AE ensayados

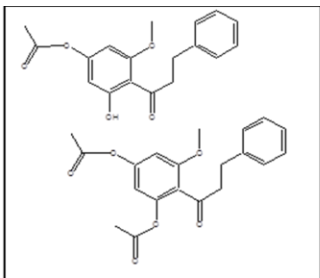
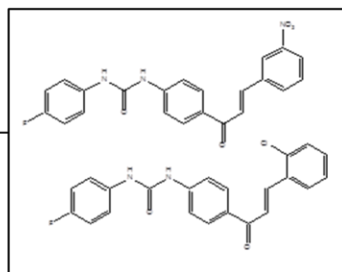
Los flavonoides son los metabolitos mayoritarios y los más activos de los extractos. Los flavonoides poseen un papel importante en las relaciones planta-insecto



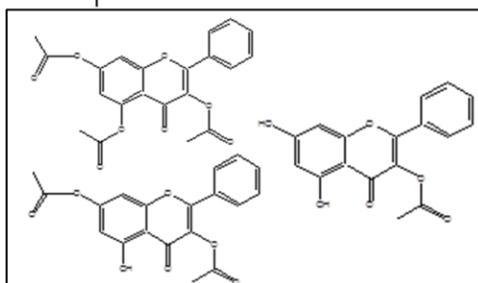
Síntesis de chalconas (Condensación de Claisen-schmitt)



Síntesis de análogos de carbamatos, a partir de chalconas



Acetilaciones



Flavonoides naturales, modificados, y sintéticos se sometieron a ensayo de actividad anti alimentaria

Establecimiento de relaciones estructura-actividad

5.Recomendaciones Generales y Proyecciones de Investigación

En países en vía de desarrollo como Colombia en donde según estadísticas gubernamentales la segunda actividad económica contribuyente al PIB es la agricultura, que además es base de la cultura de sus habitantes y donde existe agrupada en apenas el 0.7% de la superficie continental mundial el 10% de la biodiversidad terrestre total; es importante el que con ayuda de las ciencias básicas como la química se aporte en el desarrollo de soluciones a los problemas reales con el uso de recurso propio, siempre explotado de una manera racional. El estudio realizado sobre las especies de la familia Piperaceae *Piper septulinervium* y *Piper subtomentosum*, permitió comprobar que son una fuente de productos naturales que en el futuro pueden ser usados como agentes fitosanitarios. Los resultados obtenidos permiten plantear la siguiente recomendaciones y proyecciones de investigación.

- Hacer ensayos de encapsulación y liberación controlada de los aceites esenciales o la mezcla de los componentes activos en condiciones de laboratorio y extrapolar en condiciones controladas y en campo.
- Realizar ensayos de estabilidad acelerada de los compuestos activos para determinar el tipo de formulación en que pueden ser administrados.
- Realizar ensayos de crecimiento con los compuestos determinados como activos en los extractos a concentraciones más bajas que las CL₅₀, para establecer si pueden llegar a causar efectos de control en otros estadios del ciclo de vida del insecto.

- Hacer ensayos de formulación con los extractos de las especies estudiadas y probar la efectividad del producto sobre el ciclo de vida del insecto en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.
- Aumentar la serie de uretanos, probando el efecto de diferentes compuestos nitrogenados y diferentes isocianatos en busca de aumentar la actividad antialimentaria observada en el caso de los compuestos **S7** y **S8**
- Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antialimentaria con los compuestos semisintéticos, realizar otro tipo de modificaciones estructurales en compuestos con núcleo flavonoide, en busca de potenciar la actividad antialimentaria que ellos presentan.
- Probar una serie de estructuras de arilpropanos con sustituyentes diferentes al metilendioxi, en busca de determinar con certeza si la actividad antialimentaria evidenciada en este estudio en este tipo de estructuras es debida al fragmento metilendioxifenil de los compuestos **E7** y **E8**.
- Realizar ensayos de crecimiento con los compuestos semisintéticos y sintéticos que mostraron alta inhibición de la alimentación de las larvas de *S. frugiperda* con el fin de ver si además de este efecto se puede realizar control en los demás estadios del ciclo de vida del insecto.