



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO INTEGRAL DE *Eugenia winzerlingii*
COMO POTENCIAL AGENTE NATURAL EN EL
CONTROL DE INSECTOS PLAGA**

Tesis que presenta

ANGEL EMMANUEL CRUZ ESTRADA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida Yucatán, Julio 2014





RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Estudio integral de *Eugenia winzerlingii* como potencial agente natural en el control de insectos plaga fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Esaú Ruiz Sánchez, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Director de docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México; a 24 de junio de 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: Angel Emmanuel Cruz Estrada

DEDICATORIA.

A mis padres Enrique R. Cruz Sánchez y Guadalupe E. Estrada Gutiérrez por el apoyo incondicional y comprensión que siempre me han dado.

A mi tío Regulo Estrada Gutiérrez y esposa por brindarme el apoyo familiar que he necesitado en los momentos difíciles.

A mis primas Carlota y Lizzette por su cariño y comprensión en todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

- **Al CONACYT:**
 - Por el financiamiento para el proyecto "Estudio integral de tres especies vegetales endémicas de la península de Yucatán para su incorporación a las alternativas naturales en el control de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas. Fomix Yucatán-Conacyt (Yuc-2011-C09-168624)".
 - Por el apoyo otorgado mediante la beca No. 426803.
- A mis asesoras de tesis, Dra. María Marcela Gamboa Angulo y Dr. Esaú Ruiz Sánchez, por sus consejos y apoyo durante este tiempo.
- A mi comité revisor: Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dr. Raúl Díaz, Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés, Dra. Azucena González Coloma y la Dra. María Fe André por sus sugerencias y consejos para enriquecer este documento de tesis.
- A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal, M en C. Arely Vargas Díaz y M en C. Luis Fernando Torres y Estefanía Mas Espinosa por su apoyo técnico en el laboratorio; a Paulino Simá Polanco y Eduardo Balam Uc por su apoyo en las colectas.
- A la I.Q. Tanit Toledano por su apoyo técnico en la utilización del cromatógrafo gases-masas.
- Al técnico Sergio de Jesús Pérez y Narcedalia Gamboa Angulo por su apoyo en la revisión bibliográfica.
- A mis compañeros Marina Gómez, Daniela Hurtado, Ana Lilia Ruiz por sus acertados consejos para la realización del presente trabajo.
- A la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y al Departamento de Protección Vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias por las instalaciones proporcionadas para realizar el trabajo experimental.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	v
Índice de cuadros	vii
Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción	5
Referencias	7
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, OBJETIVO Y DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	9
1.1 Antecedentes	9
1.1.1 Características generales del género <i>Eugenia</i>	9
1.1.1.1 Propiedades biológicas del género <i>Eugenia</i>	9
1.1.2 Características botánicas de <i>Eugenia winzerlingii</i>	12
1.1.2.1 Distribución geográfica de <i>Eugenia winzerlingii</i>	13
1.1.2.2 Descripción taxonómica (Revilla, 2002)	14
1.1.3 Características generales de las especies de insectos plaga usados en el experimento	14
1.1.3.1 Biología y daños de <i>Bemisia tabaci</i>	15
1.1.3.2 Distribución geográfica.....	16
1.1.3.3 Importancia económica	16
1.1.3.4 Biología y daños de <i>Myzus persicae</i>	17
1.1.3.5 Distribución geográfica.....	17
1.1.3.6 Importancia económica.....	18
1.1.4 Manejo de insectos con productos derivados de plantas	18
1.1.4.1 Modo de acción.....	19
1.1.5 Situación actual y perspectivas de los productos naturales de plantas.....	21
1.1.6 Referencia.....	23
1.2 Preguntas de Investigación.....	32
1.3 Hipótesis.....	33
1.4 Objetivo general.....	34

1.4.1. Objetivos específicos	34
1.5 Diagrama Experimental	35
CAPÍTULO II. VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE <i>Eugenia winzerlingii</i>	
2.1 Introducción	37
2.2 Objetivos	38
2.3 Materiales y métodos.....	39
2.3.1 Recolecta y secado del material vegetal.....	39
2.3.2 Extracción de las hojas de <i>Eugenia winzerlingii</i> por maceración con disolventes orgánicos	39
2.3.3 Bioensayo en ninfas de tercer instar de <i>Bemisia tabaci</i>	40
2.3.4 Bioensayos en adultos de <i>Bemisia tabaci</i>	41
2.3.5 Bioensayo de inhibición del % Índice de asentamiento (%IA) de <i>Myzus persicae</i>	42
2.4 Resultados	43
2.4.1 Extracción de las hojas de <i>Eugenia winzerlingii</i> por maceración con diferentes disolventes	43
2.4.2 Efecto de los extractos de <i>Eugenia winzerlingii</i> en ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> ..	43
2.4.3 Validación de la actividad de los extractos de tres colectas de <i>Eugenia winzerlingii</i>	44
2.4.3.1 Efecto en ninfas de <i>Bemisia tabaci</i>	45
2.4.3.2 Resultados contra adultos de <i>Bemisia tabaci</i>	46
2.4.3.3 Efecto contra <i>Myzus persicae</i>	48
2.5. Discusión.....	50
2.5 Conclusiones	53
2.6 Referencia	54
CAPÍTULO III. <i>Eugenia winzerlingii</i> FATTY ACIDS AND THEIR EFFECT ON <i>Bemisia tabaci</i> GENNADIUS (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) AND <i>Myzus persicae</i> SULZER (HEMIPTERA: APHIDIDAE)	
3.1 Introduction	57
3.2 Material and methods	57

3.2.1 General experimental procedures.....	57
3.2.2 Plant Material and extraction	58
3.2.3 Bioassay-guided isolation of <i>Eugenia winzerlingii</i>	58
3.2.4 Esterification of fatty acids.....	58
3.2.5 GC/MS Analysis	58
3.2.6 <i>Bemisia tabaci</i> and <i>Myzus persicae</i> colony.....	59
3.2.7 Bioassay for settling inhibition of <i>Myzus persicae</i>	59
3.2.8 Bioassay for inhibition of oviposition on <i>Bemisia tabaci</i> adults.....	59
3.2.9 Data analysis.....	60
3.4 Results and discussion	61
3.5 Conclusion	66
3.6 References	67
CAPÍTULO IV. EXPLORACIÓN DE LA PROPAGACIÓN DE <i>Eugenia winzerlingii</i> .	69
4.1 Introducción	69
4.1 Objetivos	71
4.2 Materiales y métodos.....	72
4.2.1 Propagación de la especie <i>Eugenia winzerlingii</i>	72
4.2.1.1 Propagación vegetativa.....	72
4.2.1.2 Propagación por semilla.....	72
4.3 Resultados	74
4.3.1. Resultados de la propagación asexual de <i>Eugenia winzerlingii</i>	74
4.3.2. Resultados de la germinación de semillas de <i>Eugenia winzerlingii</i>	75
4.4 Discusión.....	77
4.5 Conclusiones	79
4.6 Referencia	80
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	83
5.1 Conclusiones generales	83
5.1 Perspectivas.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** a) Árbol con ramas comprimidas y corteza parda a gris, lisa de *Eugenia winzerlingii*, b) Hojas elípticas a obovadas y frutos globosos de *Eugenia winzerlingii*. 13
- Figura 2.** Las figuras ovadas de color roja indican los lugares donde se ha colectado la especie *Eugenia winzerlingii*. (<http://www.tropicos.org/maps/specimenmap.asp>). ----14
- Figura 3.** Estructura de algunos metabolitos secundarios con efecto insecticida aislados de plantas (Dayan *et al.*, 2009). -----19
- ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 4.** Diagrama de la estrategia experimental del trabajo con *Eugenia winzerlingii*. -----35
- Figura 5.** Esquema de extracción de las hojas de *Eugenia winzerlingii* -----40
- Figura 6.** Mortalidad inducida por la aplicación de extractos orgánicos (10 mg mL⁻¹) y acuosos (3% p/v) de *E. winzerlingii* sobre ninfas de *B. tabaci*. ACE2A: hexánico, ACE2B: acetato de etilo, ACE2C: etanólico, ACE2D: acuoso, ACE2E: acetona, ACE2F: etanólico, ACE2G: acuoso, ACE2: etanólico de la colecta actual, ACE1: etanólico evaluado anteriormente, Control negativo (H₂O/EtOH 1:1) y Control positivo (Imidacloprid, 480 µg mL⁻¹). Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$). -----44
- Figura 7.** Mortalidad inducida por la aplicación de extractos orgánicos (10 mg mL⁻¹) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre ninfas de *B. tabaci*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A, ACE3B y ACE3C. A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$). -----45
- Figura 8.** Inhibición de la oviposición inducida por la aplicación de extractos orgánicos (100 µg cm²) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre adultos de *B. tabaci*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A, ACE3B y ACE3C. A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$). -----47
- Figura 9.** Inhibición del asentamiento inducida por la aplicación de extractos orgánicos (100 µg cm²) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre *Myzus persicae*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A,

ACE3B y ACE3C). A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$). -----48

Figura 10. Supervivencia de esquejes de *Eugenia winzerlingii* a los 60 días después de la siembra. EGA: estacas gruesas con AIB, EG: estacas gruesas sin AIB, EDA: tallo medio con AIB, ED: tallo medio sin AIB. Columnas que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). -----74

Figura 11. Propagación vegetativa por esqueje de *Eugenia winzerlingii*. a) Tallos gruesos, b) Tallos medio, c) Brotes de 30 días después de la siembra de los esquejes, d) Hojas bien formadas después de 45 días de la siembra de los esquejes. -----75

Figura 12. Efecto de la aplicación de ácido giberélico ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) en dos tiempos de exposición (24 y 72 h) en el porcentaje de germinación de semillas maduras, macizas y verde de *Eugenia winzerlingii*. S.M= S. maduras, S.M48= S. maduras 48 h de GA3, S.M72= S. maduras 72 h de GA3, S.Mz = S. maciza, S.Mz48= S. maciza 48 h de GA3, S.M72= S. maciza 72 h de GA3, S.V= S. verdes, S.M48= S. verdes 48 h de GA3, S.M72= S. verdes 72 h de GA3. Columnas que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$). -----76

Figura 13. a) Plántula de *Eugenia winzerlingii* a los 40 días después de la siembra de la semilla, b) Semillas maduras de *Eugenia winzerlingii* barrenados por un coleóptero. -----76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Periodos de floración y fructificación de especies del género <i>Eugenia</i> (Reitz y Klein, 1969; Sano <i>et al.</i> , 1995; Silva y Pinheiro, 2007).	9
Cuadro 2. Trabajos realizados con el género <i>Eugenia</i> , presentando algunos principios activos contra diferentes organismos.	10
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de especies del género <i>Eugenia</i>	10
Cuadro 4. Modo de acción de metabolitos secundarios insecticidas (Wink, 2006).	20
Cuadro 5. Colectas realizadas de la planta <i>Eugenia winzerlingii</i>	39
Cuadro 6. Rendimiento de los extractos orgánicos de las hojas de <i>Eugenia winzerlingii</i> siguiendo tres esquemas de extracción.	43
Cuadro 7. Toxicidad (CL ₅₀ y CL ₉₀) de los extractos orgánicos de tres colectas de <i>Eugenia winzerlingii</i> en ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> después de 72 h de exposición.	46
Cuadro 8. Repelencia (CE ₅₀ y CE ₉₀) de los extractos orgánicos de tres colectas de <i>Eugenia winzerlingii</i> en adultos de <i>Bemisia tabaci</i> después de 24 h de exposición.	48
Cuadro 9. Repelencia (CE ₅₀ y CE ₉₀) de los extractos orgánicos de tres colectas de <i>Eugenia winzerlingii</i> en <i>Myzus persicae</i> después de 24 h de exposición.	49
Table 10. Deterrent effect of fractions from <i>Eugenia winzerlingii</i> (50 µg cm ²) on <i>Bemisia tabaci</i> and <i>Myzus persicae</i>	61
Table 11. Chemical constituents on the active fractions from <i>Eugenia winzerlingii</i> by CG-MS.	62
Table 12. Effects of commercial fatty acids and their synthetic esters (50 µg cm ²) on <i>Bemisia tabaci</i> and <i>Myzus persicae</i>	63
Table 13. Effective Antifeedant Doses (EC ₅₀) and 95% Confidence (lower, upper) [µg cm ²] of standards on <i>Myzus persicae</i> and <i>Bemisia tabaci</i>	64
Cuadro 14. Fechas de floración y fructificación de la especie <i>Eugenia winzerlingii</i>	69

RESUMEN

A nivel mundial, hemípteros como *Bemisia tabaci* (Fam. Aleyrodidae) y *Myzus persicae* (Fam. Aphididae) ocasionan grandes pérdidas en la producción agrícola por sus daños directos y indirectos (transmisión de virus). En la actualidad el uso de insecticidas sintéticos constituye la principal medida para controlar estas plagas, desafortunadamente el uso irracional de estos productos ha generado consecuentes problemas en el ambiente, así como la generación de individuos resistentes. Dentro de un manejo integrado de plagas los productos naturales derivados de plantas constituyen una fuente potencial de ingredientes activos para el control de insectos.

En estudios previos realizados en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica del Yucatán, mostraron que el extracto etanólico de *Eugenia winzerlingii* (Fam. Myrtaceae) presentó actividad insecticida e inhibición del asentamiento contra *B. tabaci* y *M. persicae*. Aunado a esto, y a la falta de estudios fitoquímicos de *E. winzerlingii*, se planteó en el presente estudio caracterizar e identificar los compuestos activos de *E. winzerlingii* a fin de buscar nuevas alternativas, amigables con el ambiente, para el manejo de *B. tabaci* y *M. persicae*. Paralelamente, se validó la actividad biológica con tres diferentes colectas y se inició la exploración de la propagación *ex situ* de *E. winzerlingii*.

Como primera parte del trabajo, las hojas de *E. winzerlingii* se sometieron a extracción con disolventes orgánicos en tres diferentes estrategias (A, B y C), y se evaluaron en ninfas de *B. tabaci*. Los extractos de la estrategia B (hexano, acetato de etilo y etanol) mostraron los mejores resultados en la mortalidad de las ninfas. Posteriormente, este esquema se aplicó en dos colectas más y se evaluaron en los adultos de ambos insectos fitófagos. El análisis general de los resultados de las evaluaciones insecticidas y disuasoria de los extractos, validan la alta efectividad y la continua producción de metabolitos activos de las hojas de *E. winzerlingii*. A continuación, la purificación biodirigida de los extractos activos hidrofóbicos llevó a detectar una mezcla de cuatro ácidos grasos en las fracciones activas. Por tal razón, los estándares comerciales de los ácidos decanoico, undecanoico, dodecanoico y tetradecanoico y sus ésteres (etilados y metilados) se evaluaron contra ambos insectos. Los resultados indicaron que todos los ácidos grasos y el tetradecanoato de metilo causaron actividad disuasoria contra *Myzus persicae*. Sin embargo, el ácido dodecanoico fue el más efectivo con una DE_{50} de $1.40 \mu\text{g cm}^2$. Con respecto a *B. tabaci*, todos los ácidos grasos mostraron actividad, sin embargo, el ácido undecanoico fue el más efectivo con

una DE_{50} de $1.11 \mu\text{g cm}^2$. Por último, se exploró la propagación sexual y asexual de *E. winzerlingii*, los resultados mostraron que la propagación por semilla es un buen método de reproducción de *E. winzerlingii* con una germinación $> 80\%$.

ABSTRACT

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) are global plant pests that have caused enormous losses in crop production by their both direct and indirect damages. The managements of these pests have been typically carried out by chemical insecticides, which are associated with environmental pollution. Natural products from plants have been considered one of the most promising sources of insecticides to manage phytophagous insects.

Previous studies carried out at the Biotechnology Unit of the Centro de Investigación Científica de Yucatán have demonstrated that the ethanol extract of *Eugenia winzerlingii* showed insecticide activity and inhibition of settling against *B. tabaci* and *M. persicae*. For the afore mention precedents and due to the lack of phytochemical studies on *E. winzerlingii*, the present work was carried out to characterize and identify the active compounds of *E. winzerlingii* extract to explore new alternative to manage phytophagous insects. In addition, the biological activity of *E. winzerlingii* leaves was also validated on three sample periods. *Ex situ* propagation of the plan was also evaluated as part of the integrative study of this plant species.

In the first part of the work, leaves of *E. winzerlingii* were extracted sequentially with organic solvents in three different strategies (A, B and C) extracts were evaluated on nymphs of *B. tabaci*. Extracts obtained with strategy B (hexane, ethyl acetate and ethanol) showed the highest activity on mortality of nymphs. Subsequently, this extraction strategy was used on leaves collected at two different time periods evaluated on adults of both phytophagous species. In general, the extracts displayed deterrents activity against both phytophagous insects, which suggests the consistent production of compounds with potential insecticidal/deterrent activity of *E. winzerlingii* leaves. The bioassay-guided fractionation of the ethyl acetate extract showed a mixture of fatty acids in the active fractions. To know which fatty acids from *E. winzerlingii* are responsible for the deterrent effect on *B. tabaci* and *M. persicae*, four commercial standards (decanoic, undecanoic, dodecanoic and tetradecanoic acids) and their methyl and ethyl derivatives were evaluated. The results showed that decanoic, undecanoic and dodecanoic acids had higher activities against both species. The lowest EC_{50} against *B. tabaci* was calculated for undecanoic acid ($1.11 \mu\text{g cm}^2$); while on *M. persicae* the lowest EC_{50} was calculated for dodecanoic acid ($EC_{50} = 1.40 \mu\text{g cm}^2$). Furthermore, the sexual and vegetative propagation of *E. winzerlingii* showed that this species can be easily propagated by seeds.

INTRODUCCIÓN

Los insecticidas sintéticos constituyen la principal medida para controlar plagas en la agricultura. Desafortunadamente su uso irracional e incontrolado ha generado consecuentes problemas, como residuos tóxicos en las cosechas, contaminación ambiental y resistencia de las poblaciones insectiles (Gutiérrez-Olivares *et al.*, 2007). Esto nos lleva a la necesidad de buscar nuevas alternativas de control que sean ecoamigables con el ambiente, no tóxicos contra insectos benéficos y menos tóxicos para los mamíferos (Duke *et al.*, 2003).

Los productos naturales derivados de plantas constituyen actualmente una alternativa potencial de ingredientes activos contra insectos plaga y vectores de virus. Estos tienen la ventaja de ser compatibles con otros métodos (control biológico), ya que pueden ser específicos para una especie de insecto o para uno de sus estados de desarrollo, además se ser considerados eco-amigables con el ambiente (Kumar *et al.*, 2008). De igual forma, los productos naturales son utilizados como esqueletos químicos que pueden ser modificados para producir nuevas y más efectivas moléculas que podrían tener nuevos modos de acción (Copping y Duke, 2007; Rattan, 2010).

Los insectos plaga son los principales causantes de grandes pérdidas económicas en la agricultura a nivel mundial. Dentro del orden Hemiptera *Bemisia tabaci* Genn. y *Myzus persicae* Sulz. son insectos polífagos, que afectan a más de 300 cultivos donde causan pérdidas de hasta 100% por sus daños directos y transmisión eficiente de virus. Particularmente *B. tabaci* durante las últimas tres décadas se ha constituido plaga primaria de cultivos hortícolas de importancia económica, tales como chile (*Capsicum* spp.), calabacita (*Cucurbita pepo*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*) (Baldin *et al.*, 2007; Georges *et al.*, 2008; Cilia *et al.*, 2012).

En la actualidad existen metabolitos vegetales utilizados en la agricultura para la protección de cultivos contra insectos plaga. Por ejemplo; el eugenol, aislado de las especies de *Laurus*; el triterpeno azadiractina aislado de *Azadirachta indica* A. Juss; la nicotina, principal componente activo de *Nicotiana tabacum* L. y la karanjina aislada de *Derris indica* (Copping y Duke, 2007; Dayan *et al.*, 2009). Asimismo, las plantas del género *Eugenia* poseen actividad insecticida contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Attagenus japonicas*, *Blatella germanica*, *Culex quinquefasciatus* y *Myzus persicae*, así como inhibición de la alimentación en *Sitophilus oryzae* L. (Medina *et al.*,

2008; Karr y Coats, 1992; Kim *et al.*, 2011; Raghavendra *et al.*, 2011; Raghavendra *et al.*, 2013 y Debnath *et al.*, 2012).

Con estos antecedentes y mediante un monitoreo realizado en el Centro de Investigación científica de Yucatán se evaluaron los extractos etanólicos de las hojas de seis plantas de la península de Yucatán contra huevos y ninfas de *B. tabaci*, el extracto etanólico de *Eugenia winzerlingii* a la concentración de 2.5 mg ml⁻¹ mostró la mayor actividad insecticida en ninfas de *B. tabaci* (85.3%), y a la concentración de 10 mg ml⁻¹ causó más del 90% de mortalidad en huevo. De la misma manera, en un estudio fitoquímico preliminar de las hojas de esta especie, las fracciones de baja polaridad y mediana polaridad mostraron actividad disuasoria contra *Myzus persicae* (Comunicación Personal Gamboa Angulo M., 2013).

La efectividad demostrada por las fracciones de *E. winzerlingii* en los dos hemípteros modelos de estudio aunado a la falta de estudios fitoquímicos de la especie, llevaron a plantear en el presente trabajo la validación de la efectividad de sus extractos en diferentes colectas, la purificación e identificación de los principios insecticidas, así como la exploración de diversas estrategias para reproducir la planta *ex situ*, a fin de propagarla, conservarla y hacer un uso biotecnológico sostenible de este importante recurso natural de la región.

REFERENCIAS

- Baldin, E. L. L., D. R. Souza, E. S. Souza y R. A. Beneduzzi (2007). Controle de mosca-branca com extratos vegetais, em tomateiro cultivado em casa-devegetação. *Horticultura Brasileira*, 25, 602-606.
- Cilia, M, M. Bereman, T. Fish, M. J. MacCoss y S. Gray (2012). Homopteran vector biomarkers for efficient circulative plant virus transmission are conserved in multiple aphid species and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 249-262.
- Copping, L. G. y S. O. Duke (2007). Review Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63, 524-554.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell y S. O. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034.
- Debnath, N., S. Das y A. Goswami (2012). Screening of indian medicinal plant derived lipids for bioactivity against rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) yields two antifeedants. *Proceedings of the Zoological Society*, 65, 79-85.
- Duke, S., S. R Baerson, F. E. Dayan, A. M. Rimando, B. E. Scheffler, M. R. Tellez, D. E. Wedge, K. K. Schrader, D. H. Akey, F. H. Arthur, A. J. De Lucca, D. M. Gibson, H. F. Harrison, J. K. Peterson, D. R. Gealy, T. T. Workoski, C. L. Wilson y J. Morris (2003). United States department of agriculture—agricultural research service research on natural products for pest management. *Pest Management Science*, 59, 708-717.
- Georges, K., B. Jayaprakasam, S. Dalavoy y M. Nair (2008). Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, 99, 2037-2045.
- Gutiérrez-Olivares, M., J. C. Rodríguez-Maciel, C. Llanderal-Cázares, A. P. Terán-Vargas, Á. Lagunes-Tejeda y O. Díaz-Gómez (2007). Stability of resistance to neonicotinoids in *Bemisia tabaci* (Gennadius) B biotype, from San Luis Potosí, México. *Agrociencia*, 41, 913-920.
- Karr, L. L. y J. R. Coats (1992). Effects of monoterpenoids on growth and reproduction of the *German cockroach* (Blattodeae: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 85, 425-429.
- Kim, S. I., S. H Chae, H. S. Youn, S. H. Yeon y Y. J. Ahn (2011). Contact and fumigant toxicity of plant essential oils and efficacy of spray formulations containing the

- oils against B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci*. Pest Management Science, 67, 1093-1099.
- Kumar, P., M. Whitten, G. Thoeming, C. Borgemeister y H. M. Poehling (2008). Effects of bio-pesticides on *Eretmocerus warrae* (Hym., Aphelinidae), a parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology, 132, 605-613.
- Medina, B. I. R., C. A. González y A. M. Gamboa (2008). Evaluación insecticida de plantas de la flora Yucateca. Revista Latinoamericana de Química, suplemento especial, 5a Reunión nacional de investigación en productos naturales del 28 al 31 de mayo del 2008 en Guadalajara, Jalisco. 143 p.
- Raghavendra, B. S., K. P. Prathibha y V. A. Vijayan (2011). Larvicidal efficacy of *Eugenia jambolana* Linn. extracts in three mosquito species at Mysore. Journal of Entomology, 8, 491-496.
- Raghavendra, B. S., K. P. Prathibha, V. A. Vijayan (2013). Synergistic effect of *Eugenia jambolana* Linn. and *Solidago canadensis* Linn. leaf extracts with deltamethrin against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. at Mysore. Environmental Science and Pollution Research, 20, 3830-3835.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Protection, 29(9), 913-920.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, OBJETIVO Y DIAGRAMA EXPERIMENTAL

1.1 Antecedentes

1.1.1 Características generales del género *Eugenia*

La familia Myrtaceae es la taxa más grande del orden de las Mirtales, abarcando a más de 140 géneros y más de 3,000 especie (Watson y Dallwitz, 2007). El género *Eugenia* incluye aproximadamente 500 especies, siendo el mayor dentro de la familia. Este género se encuentra dentro de la subfamilia Myrtoideae que incluye a otros géneros de frutos carnosos (Gomes y Pinheiro, 2007). Dentro de las características generales de la familia, las especies tienen hojas simples, glándulas oleíferas, flores polistemonas, ovario medio o ínfero, floema interno y puntuación ornamentada en los vasos xilema (Gomes *et al.*, 2009). Las Mirtáceas se distribuye en zonas neo-trópicas desde México y Florida hasta el noroeste de Argentina, principalmente en regiones centro-oeste y sureste de Brasil donde se encuentran cerca de 350 especies (Cardoso y Lomónaco, 2003; Magina *et al.*, 2012). La floración y fructificación ocurre en diferentes periodos del año según la especie (Cuadro 1).

Cuadro 1. Periodos de floración y fructificación de especies del género *Eugenia* (Reitz y Klein, 1969; Sano *et al.*, 1995; Silva y Pinheiro, 2007).

Especie	Floración	Fructificación
<i>Eugenia beaurepaireana</i>	Marzo-diciembre (predominante en primavera)	Agosto-octubre
<i>E. dysenterica</i>	Agosto	Septiembre-octubre
<i>E. neonitida</i>	Finales de agosto-inicio diciembre	Octubre-principio de enero
<i>E. puniceifolia</i>	Junio-julio	Agosto
	Septiembre -octubre	Noviembre- diciembre
<i>E. rotundifolia</i>	Marzo(lluvias)	Mayo-junio
<i>E. umbelliflora</i>	Febrero, marzo y abril	Julio-octubre
<i>E. uniflora</i>	Agosto a octubre (seca)	Septiembre-noviembre

1.1.1.1 Propiedades biológicas del género *Eugenia*

El género *Eugenia* es ampliamente conocida por sus usos medicinales (Auricchio y Bacchi, 2003) además se han reportado sus cualidades antimicrobianas e insecticidas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Trabajos realizados con el género *Eugenia*, presentando algunos principios activos contra diferentes organismos.

Especie	Actividad	Principio activo	Parte vegetal	Referencia
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Nematicida Antibacteriana Insecticida Antialimentario Acaricida	Eugenol, Eugenol y cariofileno Eugenol No reportado Eugenol	Flores hojas	Li <i>et al.</i> , 2005; Chitwood, 2002; Yang <i>et al.</i> , 2003; Kim <i>et al.</i> , 2011; Han <i>et al.</i> , 2006; Zoubiri y Baaliouamer, 2011.
<i>E. dysenterica</i>	Antifúngico	Óxido de β -cariofileno, α -humuleno, α Terpinol y α -tujeno.	Hojas	Fernández <i>et al.</i> , 2000.
<i>E. jambolana</i>	Antihiperglicemia antihiperinsulinemia insecticida	No se reporto	Fruto hojas	Grover <i>et al.</i> , 2000; Raghavendra <i>et al.</i> , 2013.
<i>E. malaccensis</i>	Antiviral Antifúngico Antimicrobiano Molusquicida	No reportado	Corteza	Locher <i>et al.</i> , 1995; Oliveira <i>et al.</i> , 2006.
<i>E. melanadenia</i>	Insecticida	1,8-cineol, terpinen-4-ol	Hojas	Aguilera <i>et al.</i> , 2004.
<i>E. uniflora</i>	Antiprotozoaria Antimicrobiano	Flavonoides	Hojas	Adewunmi <i>et al.</i> , 2001; Olano <i>et al.</i> , 1996; Chaieb <i>et al.</i> , 2007;
<i>E. uvalha</i>	Acaricida	Aceites esenciales	Hojas	de Assis <i>et al.</i> , 2011.
<i>E. winzerligii</i>	Nematicida Insecticida	No reportado	Hojas	Cristóbal-Alejo <i>et al.</i> , 2006; Gamboa-Angulo <i>et al.</i> , 2008; Cruz-Estrada, 2009.

Los metabolitos secundarios aislados en especies de *Eugenia* incluyen principalmente aceites esenciales, antocianinas, flavonoides polioxigenados y sesquiterpen-lactonas (NAPRALERT Database; Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006, Cuadro 3).

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de especies del género *Eugenia*.

Especie	Familia química	Metabolito	Referencia
<i>E. caryophyllata</i>	Elagitánicos	Sizigininas A, B Eugeniina	Tanaka <i>et al.</i> , 1996.
	Fenilpropanoide	Eugenol	Oliveira <i>et al.</i> , 2005.
<i>E. brasiliensis</i> <i>Lam</i>	Treterpeno	Ácido ursólico α -amirina y β -amirina Betulina Ácido 29-hidroxi-oleanólico	Magina <i>et al.</i> , 2012.
	Polifenoles	Ácido elágico Catequina Quercetina Quercetrina Miricitina Rutina	Reynertson <i>et al.</i> , 2008.

Especie	Familia química	Metabolito	Referencia
<i>E. edulis</i>	Flavonoides	Gossipetina-3,8-dimetiléter-5-O-β-glicósido Gossipetina-3,5-dimetiléter Miricetina-3,5,3'-trimetiléter	Hussein <i>et al.</i> , 2003.
	Polifenoles	Ácido gálico; ácido protocatéquico Epigallocatequina-3-O-galato Quercetina-3-O-β-galactosido Quercetina-3-O-β- (6"-galoilglicosido) Quercetina-3-O-α-arabinofuranósido Canferol-3-O-α-arabinofuranósido Miricitina Quercetina	
<i>E. jambos</i>	Taninos	1-Ogaloilcastalgina Casuarinina	Yang <i>et al.</i> , 2000.
	Flavonoides glicosilados	Quercetina-3-O-β-D-xilopiranosil Miricetina-3-O-β-D-xilopiranosil	
<i>E. jabolana</i>	Flavonoides	Miricetina-3-O-(4"-acetil)-a-L-ramnopiranosido Quercetina Miricetina Miricitrina	Timbola <i>et al.</i> , 2002.
<i>E. javanica</i>	Triterpenos	3-epi-betulinato de metilo Ácido ursólico Ácido jacumárico Ácido arjunólico	Srivastava <i>et al.</i> , 1995.
<i>E. malaccensis</i> L.	Tanino	3,5-diglicosilmalvidina	Noreen <i>et al.</i> , 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 2006.
	Flavonoides	Catequina Miricetina-3-O-(4"-acetil)-a-L-ramnopiranosido Quercetina Mearnsitina Mearnsitrina Miricitrina	
<i>E. moraviana</i>	Triterpeno	Ácido 3β-O-acetil-urs-12-en-28-oico	Lunardi <i>et al.</i> , 2001.
	Triterpenos	Ácido 6-α-Hidroxiβetullínico Ácido platánico Ácido βetullínico β-sitosterol	
<i>E. sandwicensis</i>	Esterol		Gu <i>et al.</i> , 2001.
	Triterpenos	Ácido 3-β-cis-p-cumaroiloxi-2α,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico Ácido 3-β-trans-p-cumaroiloxi-2-α,23-dihidroxiolean-12-en-28-oico Ácido 23-trans-p-cumaroiloxi-2-α,3-β-dihidroxiolean-12-en-28-oico Ácido alfitólico Ácido arjunólico Ácido βetullínico Ácido 2-α,3-α-Dihidroxiβup-20(29)-en-28-óico, ácido 3-β,23-dihidroxiβup-20(29)-en-28-óico Hederagenina Ácido maslínico	
<i>E. umbelliflora</i>	Esteroles	β-sitosterol 3-O-β-D glucopiranosido Siringaldehído	Kuskoski <i>et al.</i> , 2003.
	Polifenol	Ácido gálico	
<i>E. uniflora</i>	Antocianinas	Cianidina-3-O-β-glucopiranosido Delfinidina-3-O-β-glucopiranosido Petunidina-3-O-β-glucopiranosido Pelargonidina-3-O-β-glucopiranosido Peonidina-3-O-β-glucopiranosido Malvidina-3-O-β-glucopiranosido	Lee <i>et al.</i> , 1997.
	Taninos hidrolisables	Eugenina D ₁ y D ₂	

Especie	Familia química	Metabolito	Referencia
	Flavonoides	Miricitrina	
	Antocianinas	Cianidina-3-O- β -glucopiranosido Delfinidina-3-O- β -glucopiranosido	Einbond <i>et al.</i> , 2004.
	Carotenoides	Licopeno Rubixantina Cis-rubixantina β -criptoxantina Cis-licopeno β -caroteno g-caroteno Zeaxantina Luteína Violaxantina β -caroteno-5,6-epóxido	Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya, 2004.
	Triterpeno	Ácido oleanólico	Rajasekaran <i>et al.</i> , 1988.

La presencia de flavonoides polihidroxilados ha sido descrito en varias especies del género *Eugenia*, formadas principalmente por agliconas como la quercetina, miricetina, camferol, mearnsetinat y gossipetina. Los aceites esenciales de las especies de *Eugenia* están formados principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos (Aguilera *et al.*, 2004; González-Coloma *et al.*, 2010). Entre los primeros se encuentran los de esqueleto pinano, compuestos acíclicos como el mirceno. En el caso de los sesquiterpenos encontramos con esqueleto cadinano, cariofilano, humulano y germacrano (Fischer *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2004; Apel *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003; Chaieb *et al.*, 2007; Zoubiri y Baaliouamer, 2011).

1.1.2 Características botánicas de *Eugenia winzerlingii*

La especie *Eugenia winzerlingii* (Figura 1) la conforman arbustos o árboles de hasta de 12 m de altura; con crecimiento joven glabro excepto por los márgenes ciliados de las bractéolas. Con ramas comprimidas y corteza parda a gris, lisa. Hojas elípticas a obovadas, las láminas 4-10 $\times$ 1.5-6.5 cm, 1.5-3 veces más largas que anchas, coriáceas; vena media convexa en el haz y el envés; nervaduras laterales 6-9 por lado, rectas y ascendentes; nervaduras marginales similares a las laterales y arqueadas entre ellas, a 1-3 mm de los márgenes. Glándulas esparcidas e inconspicuas en el haz y envés; base cuneada; márgenes revolutos, decurrentes en el borde interno del pecíolo; ápice agudo o redondeado a retuso; pecíolos 3-5 mm, aplanados adaxialmente. Inflorescencias axilares, solitarias; fasciculadas o cortamente racemosas; eje 0-2 mm; flores 4-8; brácteas 0.7-1 mm, persistentes, triangulares, los

márgenes glabros o fasciculado-ciliados apicalmente, el ápice agudo; botones 2-4 mm, obovoides. Flores pediceladas, los pedicelos 5-12 (~20) mm; bractéolas persistentes, ovados, la base libre, los márgenes escariosos o escarioso-ciliados, el ápice agudo a acuminado; hipanto 1-1.5 mm, campanulado; lobos del cáliz en pares desiguales, ovados, los márgenes escariosos, con algunos pelos o sin éstos, el ápice agudo a redondeado; pétalos 4.5-6 × 3-4 mm, elípticos, los márgenes ciliados, el ápice redondeado; disco 2-3 mm de diámetro, glabro o con algunos pelos esparcidos; estambres 50-60, 5-7 mm; estilo 5.5-7 mm. Frutos 8-12 × 8-12 mm, globosos o débilmente oblatos; pericarpo de paredes delgadas, glandular; cáliz persistente, erecto; color negro-purpúreo en la madurez (Figura 1).



Figura 1. a) Árbol con ramas comprimidas y corteza parda a gris, lisa de *Eugenia winzerlingii*, b) Hojas elípticas a obovadas y frutos globosos de *Eugenia winzerlingii*.

1.1.2.1 Distribución geográfica de *Eugenia winzerlingii*

La especie *E. winzerlingii* es endémica de México, Guatemala y Belice encontrándose a una altitud de 0 a 400 msnm. *E. winzerlingii* se encuentra en bosques bajos periódicamente inundados, con ejemplares en: Campeche (Martínez S. y Téllez 2962, MEXU); Chiapas (Martínez S. 18157, MEXU); Guatemala (Contreras 1619, LL); Quintana Roo (Durán y Olmstead 746, MEXU); Tabasco (Menéndez 277, MICH) y Yucatán (Enriquez 815, MICH) (Figura 2). (<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=22102621>), julio de 2011.



Figura 2. Las figuras ovadas de color rojo indican los lugares donde se ha colectado la especie *Eugenia winzerlingii*. ([http://www.tropicos.org /maps/specimenmap.asp](http://www.tropicos.org/maps/specimenmap.asp)).

1.1.2.2 Descripción taxonómica

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Myrtoideae

Tribo: Myrtae

Género: *Eugenia*

Especie: *Eugenia winzerlingii* Standl.

(Revilla, 2002).

1.1.3 Características generales de las especies de insectos usados en el experimento

El género *Bemisia* está constituido por aproximadamente 37 especies, donde *B. tabaci* Gennadius, cuyo nombre común es mosca blanca, es la especie tipo (Brown *et al.*, 1995) y en la actualidad se especula que este es un complejo con muchos biotipos (Perring, 2001; Jiao *et al.*, 2012). Es un insecto polífago debido al amplio rango de plantas de que se alimenta, siendo capaz de colonizar alrededor de 700 especies (Georges *et al.*, 2008; Barati *et al.*, 2014). Estos hospederos pertenecen a aproximadamente 74 familias (Jing *et al.*, 2003); donde se incluyen dicotiledóneas y

monocotiledóneas, tanto silvestres como cultivadas. Algunas de estas son Brassicaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Malvaceae y Solanaceae (Souza y Vendramim, 2001; Attique *et al.*, 2003).

Existen más de 4,700 especies descritas de pulgones distribuidas por todo el mundo, especialmente en las zonas templadas, sin embargo, sólo 450 especies son consideradas plagas de cultivos comerciales, de las cuales 227 especies han sido reportadas como transmisores de virosis y entre ellos se encuentra la especie *M. persicae*. Los pulgones se han considerado como una de las plagas más graves de los cultivos debido a su gran potencial reproductivo. El principal problema con este grupo de insectos polífagos es la transmisión eficiente de más de 275 especies de virus (Fereres y Moreno, 2009).

1.1.3.1 Biología y daños de *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci es una especie compleja, que comprende un gran número de poblaciones genéticamente variables, algunas de las cuales se denominan biotipos. Estos difieren con respecto a la gama de huéspedes, fecundidad, resistencia a insecticidas y habilidad de transmisión de begomovirus (Berry *et al.*, 2004). En general tiene tres estados de desarrollo que comprende una fase de huevo, cuatro de ninfa y adulto.

El daño directo causado a las plantas por ninfas y adultos se debe a la alimentación, dado que succionan la savia por el envés de las hojas reduciendo el vigor de la planta. También se ha reportado la excreción de sustancias azucaradas que propician el crecimiento del hongo saprófito conocido como fumagina (*Fumago* spp.) que forman una capa sobre la hoja (Aguilar-Medel *et al.*, 2007). Esta capa tiene efecto adverso en la fotosíntesis al impedir la llegada de la luz a la superficie foliar (Gutiérrez-Olivares *et al.*, 2007; Barati *et al.*, 2014), así como la reducción del valor comercial de las partes comestibles y la maduración irregular de los frutos (Aguilar-Medel *et al.*, 2007). El mayor daño se debe a la eficaz transmisión de enfermedades virales como carlavirus, closterovirus, geminivirus, luteovirus, nepovirus y potyvirus, que causan debilitamiento y desórdenes fisiológicos en las plantas (Georges *et al.*, 2008; Prota *et al.*, 2013).

1.1.3.2 Distribución geográfica

El Oriente y la India se han considerado como el centro de origen de *B. tabaci*, de donde se dispersa a África y América (Arcos, 2005). En la actualidad se encuentra en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Ruiz y Trejo, 2001). No obstante en las últimas dos décadas *B. tabaci* ha invadido todos los continentes con excepción de la Antártida (Naranjo *et al.*, 2004).

En México, *B. tabaci* se ha reportado como plaga de importancia económica en Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Durango, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Díaz y Ramírez, 1993).

Otro caso relevante sobre el brote de mosquita blanca lo constituye la zona hortícola de Yucatán, ya que en el ciclo de 1990 se perdieron cerca de 200 Ha de tomate, principalmente en Cansahcab, Dzilam Bravo, Dzitás y Yobain (Anaya *et al.*, 1999; Arcos, 2005).

1.1.3.3 Importancia económica

Bemisia tabaci es catalogada como una plaga importante que origina serios problemas en muchos cultivos (Erdogan *et al.*, 2008; Baldin *et al.*, 2013). Durante las últimas tres décadas *B. tabaci* ha producido grandes pérdidas en cultivos hortícolas tales como chile (*Capsicum* spp.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicon*) (Aguilar-Medel *et al.*, 2007). Además de ser una plaga directa, es un vector de más de 110 virus de plantas (Chu *et al.*, 2008).

La mosca blanca de hoja plateada (*B. argentifolii* Bellows & Perring, *B. tabaci* biotipo B) invadió el Valle de Mexicali, B. C. y la región de San Luis Río Colorado, Sonora en 1992, afectando los cultivos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), melón (*Cucumis melo* L.), sandía (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). En ese año, las pérdidas se estimaron en 100 millones de pesos (Nava-Camberos y Cano-Ríos, 2000). En los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí donde se cultiva chile (*Capsicum* spp.) y jitomate (*Solanum lycopersicon*) ocasionó el 40% de pérdidas atribuidas a la transmisión de enfermedades virales al cultivo (Gutiérrez-Olivares *et al.*, 2007). Este insecto se convirtió en un serio problema fitosanitario en México desde 1995 (Medina *et al.*, 2004). En la Comarca Lagunera ubicada en parte del suroeste del estado de Coahuila y noroeste de Durango ha causado entre el 40 y

el 100% de pérdidas en el rendimiento de cultivos hortícolas y el incremento en el número de aplicaciones de insecticidas en el algodónero, calabaza, melón y tomate (Nava-Camberos y Cano-Ríos, 2000).

En el estado de Yucatán en el ciclo agrícola 1989-1990 se reportó la pérdida de más del 50% en rendimiento del cultivo del tomate debido al daño ocasionado por esta plaga ([Http://www.cesvy.org.mx/mb1.htm](http://www.cesvy.org.mx/mb1.htm)).

1.1.3.4 Biología y daños de *Myzus persicae*

Myzus persicae es un insecto de cuerpo blando, aspecto globoso y con un tamaño entre 1-10 mm. Hay pulgones ápteros (sin alas) y alados. Los primeros tienen el tórax y abdomen unido, y los segundos perfectamente separados. El color puede variar del blanco al negro, pasando por amarillo, verde y pardo. Sin embargo, se considera que el daño directo causado por los pulgones como plaga de cultivos puede considerarse inferior al de otro tipo de insectos, ya que el mayor problema que presentan los pulgones es su capacidad para actuar como vectores de virus. *M. persicae* es polífago y está adaptado a alimentarse de un amplio rango de huéspedes (Cilia *et al.*, 2012).

El daño directo causado por *M. persicae* en las plantas se debe esencialmente al efecto sumidero que provoca su alimentación de tipo picador-chupador ya que se produce un constante consumo de nutrientes, especialmente aminoácidos y carbohidratos. La presencia de pulgones puede llegar a producir ciertas alteraciones fisiológicas en la planta debidas probablemente a la toxicidad de ciertos compuestos presentes en la saliva del insecto. Tiene cierta importancia la proliferación de micosis asociadas a la producción de melaza por parte de los pulgones y a la disminución del intercambio gaseoso de la planta. Sin embargo, el mayor problema que presentan los pulgones para los cultivos es su capacidad para actuar como vectores de virus patógenos de plantas. Los pulgones son el grupo más importante de vectores de virus por las especiales características de su biología y alimentación, así como por la morfología de su aparato bucal (Cilia *et al.*, 2012).

1.1.3.5 Distribución geográfica

Se encuentra distribuido en todo el mundo y su polifagia le permite producir grandes poblaciones de individuos alados que visitan y colonizan distintos cultivos, se hallan difundidos extensamente en toda Europa, América del Norte, Central y del Sur, África, Japón y Australia principalmente (Vasicek *et al.*, 2001).

1.1.3.6 Importancia económica

Myzus persicae es un áfido holocíclico (alterna reproducción sexual y partenogénesis) que es capaz de usar como hospederas a plantas pertenecientes a más de cincuenta familias, incluyendo importantes cultivos hortícolas. Es una plaga importante con respecto a la transmisión de enfermedades virosas y menor o esporádica de otra manera. En Centroamérica esta plaga es hospedante del cultivo de papa, tomates, lechuga, ejotes, arvejas, chile, cebolla, cucurbitáceas, tabaco y durazno, principalmente (Silva *et al.*, 2012).

1.1.4 Manejo de insectos con productos derivados de plantas

En su papel co-evolutivo, las plantas producen metabolitos secundarios con propiedades biológicas que se pueden utilizar en el control de insectos plaga o como base estructural para el desarrollo de nuevos insecticidas, con nuevos sitios de acción que no sean tóxicos para los mamíferos e insectos benéficos (Céspedes *et al.*, 2000; Copping y Duke, 2007; Zoubiri y Baaliouamer, 2011). Bajo este contexto, las plantas resurgen como una opción al combate de plagas en diversos tipos de agricultura, dando origen a los insecticidas botánicos (Baldin *et al.*, 2013).

En la agricultura tradicional, estos insecticidas son una opción económica de fitoprotección; en la agricultura orgánica se han usado los insecticidas vegetales tanto de antaño, como los surgidos actualmente con la moda ecológica para producción orgánica. En la agricultura comercial se considera fuente de nuevas sustancias que permiten manejar la resistencia de las plagas a los insecticidas organosintéticos (Gutiérrez-Olivares *et al.*, 2007; Erdogan *et al.*, 2008).

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años y para defenderse del ataque de los insectos han desarrollado mecanismos de protección, como la repelencia y la acción insecticida (Gatehouse, 2002). De las casi 700,000 especies de plantas que hay en el mundo (la mayoría en los trópicos), solamente algunas se conocen y se han investigado con fines de aprovechamiento. Existen alrededor de 60 familias de plantas con propiedades plaguicidas y solamente pocas especies han sido aprovechadas hasta el momento para el control de plagas y enfermedades (Dimetry, 2012).

Dentro de las alternativas orgánicas para contrarrestar el efecto nocivo que causan los insectos plagas, se tiene a la rotenona (Chem Sect®, Cube Root®, Chem-Fish®)

obtenida a partir de las raíces del barbasco (*Lonchocarpus nicou* Aublet), el tetranortriterpenoide azadiractina (Azatin®, Align®, Bio-neem®) extraído de las semillas del neem (*Azadirachta indica* Juss.) y las piretrinas (Evergreen®, Pyrocide®) de las flores secas de *Tanacetum cinerariaefolium* (Figura 3). Estos bioinsecticidas presentan varias ventajas, tales como ser biodegradables, menos tóxicos que los plaguicidas convencionales, no desequilibran la biodiversidad de los agroecosistemas y son considerados como de bajo riesgo a la salud humana (Iannacone y Lamas, 2002).

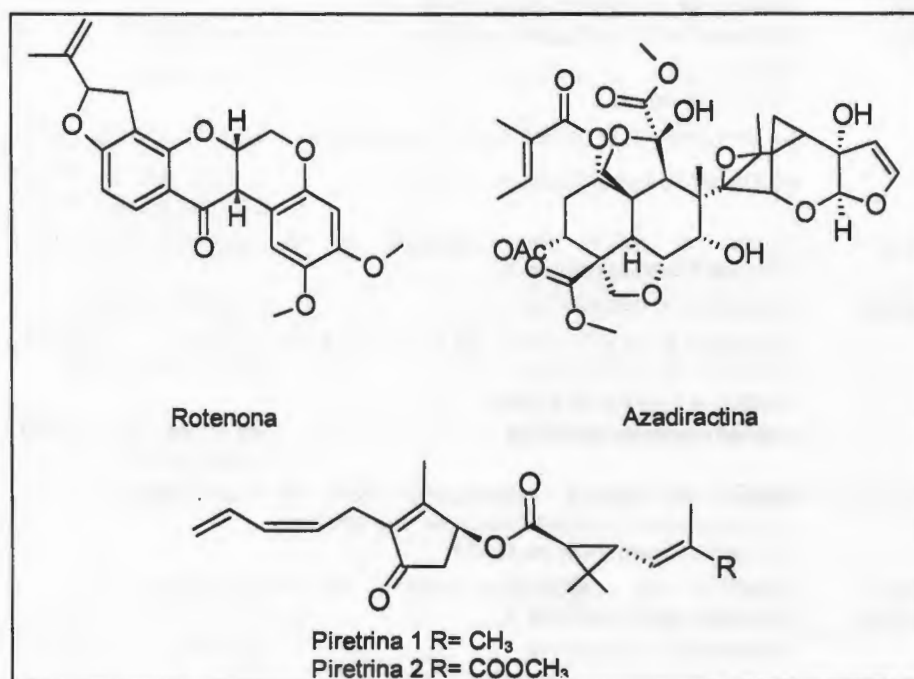


Figura 3. Estructura de algunos metabolitos secundarios con efecto insecticida aislados de plantas (Dayan *et al.*, 2009).

1.1.4.1 Modo de acción

Los metabolitos secundarios vegetales con actividad tóxica pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología del insecto (Cuadro 4). Los modos de acción más conocidos son aquellos que afectan el sistema nervioso, endócrino, digestivo, replicación del ADN y la producción de energía (Wink, 2003). En el primero, actúan como agonistas de neurotransmisores o interfiriendo con los canales implicados en la transmisión del impulso nervioso (Wink, 2000); en el sistema endócrino actúan como reguladores del

crecimiento que inhiben la formación de la muda o alterando la función de las hormonas que regulan estos mecanismos (Mordue y Blackwell, 1993). En el sistema digestivo tienen función de reductores de la digestibilidad o inhibiendo la actividad de enzimas hidrolíticas (Koul *et al.*, 1996); Algunos metabolitos pueden inhibir enzimas implicadas en la respiración celular (Miyoshi, 1998).

Cuadro 4. Modo de acción de metabolitos secundarios insecticidas (Wink, 2006).

Compuesto	Modo de acción	Autor
Aceites esenciales	Inhibición de la acetilcolinesterasa	Rattan, 2010.
	Bloqueo de receptores octopamina	
Alcaloides	Interfieren en la replicación del DNA	Wink, 2003.
	Interfiere en el transporte de membranas de los canales de calcio	Isman, 2006.
	Inhiben enzimas en la producción de energía	Copping y Duke, 2007.
	Agonistas de la acetilcolina	Sultana <i>et al.</i> , 2002; Copping y Duke, 2007.
Flavonoides	Inhiben la NADH deshidrogenasa en el transporte respiratorio de e-	Copping y Duke, 2007.
Terpenoides	Repelentes y disuasorios	Ave <i>et al.</i> , 1987.
	Interfieren en la producción de la hormona de la muda y de la hormona juvenil	Mordue y Blackwell, 1993; Isman, 2006.
	Inhiben la síntesis de quitina	Koul <i>et al.</i> , 1996; Isman, 2006.
	Inhiben enzimas digestivas	
	Acción neurotóxica interfiriendo con el neuromodulador octopamina y en los canales de cloro dependientes de GABA.	
Glucósidos cianogénicos	Inhibición del citocromo oxidasa en el transporte respiratorio de e-	Wink, 2003.
	Repelencia y disuasorios	Erickson y Fenny, 1974.
Cumarinas	Reaccionan de forma irreversible con el ADN	Berenbaum, 1991.
Taninos y Ligninas	Reductores de la digestibilidad	Lara y Márquez, 1996.
Quinonas	Reductores de la digestibilidad	Felton <i>et al.</i> , 1992.
Piretrinas	Interfieren con la transmisión del impulso nervioso	Isman, 2006.
Saponinas	Repelentes y disuasorios	Soulé <i>et al.</i> , 2000.
	Alteran la estructura de membrana	Pelah <i>et al.</i> , 2002.
Esteres de glucosa	Bloquea los espiráculos (asfixia)	Isman, 2006.
	Rompe cutículas cerosas y membranas en el integumento induciendo a desecación	

1.1.5 Situación actual y perspectivas de los productos naturales de plantas

En las últimas tres décadas, existen muchos estudios de extractos y aleloquímicos de plantas con efecto biológicos sobre insectos plaga, así como la búsqueda de los principios activos de los extractos promisorios. Sin embargo, en los últimos 15 años sólo se ha desarrollado dos insecticidas botánicos con éxito comercial, los productos derivados del neem y los productos basados en aceites esenciales que están constituidos generalmente de monoterpenos, sesquiterpenos y fenoles (Isman *et al.*, 2011).

Esta situación se debió principalmente a la falta de armonía de los datos requeridos para el registro de los nuevos bioplaguicidas, siendo el resultado de la falta de experiencia y carencia de lineamientos por parte de las instituciones (EPA y la OCDE) y por lo consiguiente los bioplaguicidas fueron regulados bajo los mismos lineamientos que los insecticidas sintéticos (FIFRA) (Neale, 2000). Además, los insecticidas naturales poseen efectos biológicos (a largo o mediano plazo) contra los insectos plaga, ya que actúan como inhibidores de crecimiento, antialimentarios, repelentes y disuasorios en lugar de mostrar actividad fumigante como los insecticidas sintéticos, que en su momento fueron los requeridos para una agricultura intensiva y extensiva con muy poco conocimiento de las consecuencias ambientales. Esto explica los pocos productos naturales botánicos que se encuentran actualmente en la agricultura convencional (Isman y Akhtar, 2007).

Actualmente los productos naturales nuevamente están ganando gran interés por la demanda del mercado de vegetales y frutos libres de plaguicidas. Esto es debido a que los bioplaguicidas se consideran amigables con el medio ambiente, seguros y compatibles con un Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Copping y Menn, 2000; Dimetry, 2012). En algunos países, el desarrollo de lineamientos apropiados para el registro de los nuevos bioplaguicidas tiene la oportunidad de desarrollarse e incorporarse en un manejo integrado de plagas en poco tiempo (Dayan *et al.*, 2009; Sporleder y Lacey, 2013).

En Estados Unidos están registrados 50 ingredientes activos botánicos para la protección de plantas y 11 están registrados en la Unión Europea (Bailey *et al.*, 2010). Esto significa que los productos naturales en el futuro cercano jugarán un papel importante en el control de plagas en países en desarrollo e industrializados y es

indispensable que los países ricos en biodiversidad realicen la bioprospección de su flora, apoyándose del conocimiento tradicional y de la quimiotaxonomía para conocer el potencial biológico y el uso sostenible de sus recursos naturales (Dimetry, 2012).

1.1.6 Referencia

- Adewunmi, C. O., J. M. Agbedahunsi, A. C. Adebajo, A. J. Aladesanmi, N. Murphy y J. Wando (2001). Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 19-24.
- Aguilar-Medel, S., J. C. Rodríguez-Maciel y C. Santillan-Ortega (2007). Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homóptera:Aleyrodidae) biotipo B colectadas en Baja California y Sinaloa, México. *Interciencia*, 32, 266-269.
- Aguilera, L. J. E. Tacoronte, A. Navarro, M. Leyva, A. Bello, M. T. Cabrera y M. C. Marquetti (2004). Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* (Myrtales: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 35, 131-134.
- Anaya, R. S., G. H. Mejía y N. J. Romero (1999). Diagnósis comparativa de las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* Genn. y *B. argentifolii* B. y P. (Homóptera: Aleyrodidae), in: *Hortalizas plagas y enfermedades*, Anaya, R. S. y N. J. Romero (ed). trilla México D. F. 141 p.
- Apel, M. A., M. Sobral, E. E. S. Schapoval, A. T. Henriques, C. Menut y J. M. Bessiere (2005). Volatile constituents of *Eugenia mattsosii* Legr. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 284-285.
- Arcos, A. P. (2005). Estudio de poblaciones de *B. tabaci* Genn (Homóptero:Aleyrodidae) en malezas asociadas al cultivo de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario # 2. Conkal Yuc. pp. 1-4, 7, 9.
- Attique, M. R., M. Rafiq, A. Ghaffar, Z. Ahmad y A. I. Mohyuddin (2003). Hosts of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton areas of Punjab, Pakistan. *Crop Protection*, 22, 715-720.
- Auricchio, M. T y E. M. Bacchi (2003). Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotánicas, químicas e farmacológicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62, 55-61.
- Ave, D. A., P. Gergoy y W. Tingey (1987). Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 44, 131-138.
- Azevedo-Meleiro, C. H. y D. B. Rodríguez-Amaya (2004). Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 385-396.

- Bailey, A., D. Chandler, W. P. Grant, J. Greaves, G. Prince y M. Tatchell (2010). Pest management with biopesticides, in *Biopesticides: pest management and regulation*, Bailey, A., D. Chandler, W. P. Grant, J. Greaves, G. Prince y M. (ed). Tatchell CABI Publishing. Preston, UK. pp. 71-130.
- Baldin, E. L. L., A. E. M. Crotti, K. A. L. Wakabayashi, J. P. G. F Silva, G. P. Aguiar, E. S. Souza, R. C. S. Veneziani y M. Gropp (2013). Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. *Journal of Pest Science*, 86, 301-308.
- Baldin, E. L. L., D. R. Souza, E. S. Souza y R. A. Beneduzzi (2007). Controle de mosca-branca com extratos vegetais, em tomateiro cultivado em casa-devegetação. *Horticultura Brasileira*, 25, 602-606.
- Barati, R., G. Golmohammadib, H. Ghajariea, M. Zarabic and R. Mansouri (2014). Efficiency of some herbal pesticides on reproductive parameters of silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), *Archives of Phytopathology Plant Protection*, 47, 212-221.
- Berenbaum, M. R. (1991). "Coumarins", In: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Rosenthal, G. y M. R. Berenbaum. (ed). Academic Press, San Diego. pp. 221-249.
- Berry, S. D., V. N. Fondong, C. Rey, D. Rogan, C. M. Fauquet and J. K. Brown (2004). Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava plants in Sub-Saharan Africa. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 852-859.
- Brown, J. K., D. R. Frohlich y R. C. Rosell (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or Species Complex?. *Annual Review Entomology*, 40, 511-534.
- Cardoso, G. L. y C. Lomônaco (2003). Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. *Revista Brasileira de Botânica*, 26, 2037-2045.
- Céspedes, C. L., J. S. Calderón, L. Lina y E. Aranda (2000). Growth effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 1903-1908.
- Chaieb, K., H. Hajlaoui, T. Zmantar, A. B. Kahla-Nakbi, M. Rouabhia, K. Mahdouani y A. Bakhrouf (2007). The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytotherapy Research*, 21, 501-506.

- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology, 40, 221-249.
- Chu, D., W. Fang-Hao, T. Yun-Li, L. Guo-Xia, F. Zhong-Xue y B.Yu-Ping (2008). Genetic differentiation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q based on mitochondrial DNA markers. Insect Science, 15, 115-123.
- Cilia, M., M., Bereman, T. Fish, M. J. MacCoss, S. Gray (2012). Homopteran vector biomarkers for efficient circulative plant virus transmission are conserved in multiple aphid species and the whitefly *Bemisia tabaci*. Journal of Integrative Agriculture, 11, 249-262.
- Copping, L. G. y J. J. Menn (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science, 56, 651-676.
- Copping, L. G. y S. O. Duke (2007). Review natural products that have been used commercially as crop protection agents. Pest Management Science, 63(6), 524-554.
- Cristóbal-Alejo, J., J. M. Tun-Suárez, S. Moguel-Catzín, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, P. Simá-Polanco, R. S. Peraza-Sánchez y M. M. Gamboa-Angulo (2006). In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. Nematropica, 36, 89-98.
- Cruz-Estrada, A. E. (2009). Efecto de extractos vegetales en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Maestro en Ciencias, opción: Biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 93 p.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell y S. O. Duke (2009). Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 4022-4034.
- de Assis, C. P. O., M. G. C. Gondim Jr., H. A. A. de Siqueira, C. A. G. da Câmara (2011). Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). Journal of Stored Products Research, 47, 311-315.
- Díaz, P. R. y J. L. Ramírez (1993). Bioecología y control integrado de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Genn. (Homóptera: Aleyrodidae), SARH., pp. 3-7.
- Dimetry, N. Z. (2012). Prospects of botanical pesticides for the future in integrated pest management programme (IPM) with special reference to neem uses in Egypt. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 45, 1138-1161.
- Einbond, L. S., K. A. Reynertson, X. D. Luo, M. J. Basile y E. J. Kennelly (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. Food chemistry, 84, 23-28.

- Erdogan, C., G. Moores, M. Gurkan, K. Gorman y I. Denholm (2008). Insecticide resistance and biotype status of populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Turkey. *Crop Protection*, 27, 600-605.
- Erickson, J. M. y P. Feeny (1974). Sinigrin: A chemical barrier to the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*. *Ecology*, 55, 103-111.
- Felton, G. W., K. K. Donato., R. M. Broadway y S. S. Duffey (1992). Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dietar protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 38, 277-285.
- Fereres, A. y A. Moreno (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, 141, 158-168.
- Fernández, O. F. L., S. C. Santos, C. M. A. Oliveira, L. M. Lião, P. H. Ferri, J. R. Paula, H. D. Ferreira, B. H. N. Sales y M. R. R. Silva (2000). Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 111-117.
- Fischer, D. C. H., R. P. Limberger, A. T. Henriques y P. R. H. Moreno (2005). Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 499-500.
- Gamboa-Angulo, M. M., J. Cristóbal-Alejo, I. Medina-Baizabal, F. Chl-Romero, R. Méndez-González, S. Moguel-Catzín, P. Simá-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatán península, México. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955-1959.
- Gatehouse, J. E. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, 156, 145-169.
- Georges, K., B. Jayaprakasam, S. Dalavoy y M. Nair (2008). Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, 99, 2037-2045.
- Gomes, S. A. L. y M. C. B. Pinheiro (2007). Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 21, 235-247.
- Gomes, S., N. Somavilla, K. M. Gomes-Bezerra, S. C. Miranda, P. S. De-Carvalho y D. Graciano-Ribeiro (2009). Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botanica Brasilica*, 23, 223-238.
- González-Coloma, A., M. Reina, C. Díaz, B. M. Fraga (2010). Natural product-based biopesticides for insect control, in: *Natural Products Chemistry, Comprehensive*, Mander, L. y H. W. Liu (ed). Elsevier, Amsterdam. pp. 237-263.
- Grover, J. K. V. Vats y S. S. Rathi (2000). Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects

- on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 461-470.
- Gu, J. Q., E. J. Park, L. Luyengi, M. E. Hawthorne, R. G. Mehta, N. R. Farnsworth, J. M. Pezzuto y A. D. Kinghorn (2001). Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry*, 58, 121-127.
- Gutiérrez-Olivares, M., J. C. Rodríguez-Maciel, C. Llanderal-Cázares, A. P. Terán-Vargas, Á. Lagunes-Tejeda y O. Díaz-Gómez (2007). Stability of resistance to neonicotinoids in *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) B biotype, from San Luis Potosí, México. *Agrociencia*, 41, 913-920.
- Han, M. K.; S. I. Kim y Y. J. Ahn (2006). Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 42, 15-22.
- [Http://www.cesvy.org.mx/mb1.htm](http://www.cesvy.org.mx/mb1.htm)
- Hussein, S. A. M., A. N. M. Hashem, M. A. Seliem, U. Lindequist y M. A. M. Nawwar (2003). Polyoxigenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry*, 64, 883-889.
- Iannaccone, J. A. y G. Lamas (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 92-101.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.
- Isman, M. B. y Y. Akhtar (2007). Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides, in: *Insecticides design using advanced technologies*, Ishaaya, I., A. R. Horowitz y R. Nauen. (ed). Springer. Berlin Heidelberg. pp. 235-248.
- Isman, M. B., S. Miresmailli, y C. Machial (2011). Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 10, 197-204.
- Jiao, X., W. Xie, S. Wang, Q. Wu, L. Zhou, H. Pan, B. Liu, y Y. Zhang (2012). Host preference and nymph performance of B and Q putative species of *Bemisia tabaci* on three host plants. *Journal Pest Science*, 85, 423-430.
- Jing, Y., J. Huang, R. Ma y J. Han (2003). Host plant preferences of *Bemisia tabaci* Gennadius. *Entomologia Sinica*, 10, 109-114.
- Kim, S. I., S. H. Chae, H. S. Youn, S. H. Yeon y Y. J. Ahn (2011). Contact and fumigant toxicity of plant essential oils and efficacy of spray formulations containing the

- oils against B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci*. Pest Management Science, 67, 1093-1099.
- Koul, O., J. S. Shankar y R. S. Kapil (1996). The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. Entomology Experimentalis et applicata, 79, 43-50.
- Kuskoski, E. M., J. M. Vega, J. J. Rios, R. Fett, A. M. Troncoso y A. G. Asuero (2003). Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 5450-5454.
- Lara, O. F. y A. Márquez (1996). Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México, D.F. 137 p.
- Lee, M., S. Nishimoto, L. Yang, A. Y. Yen, T. Hatano, T. Yoshida y T. Okuda (1997). Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. Phytochemistry, 44, 1343-1349.
- Li, Y., C. Xu, Q. Zhang, J. Y. Liu y R. X. Tan (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. Journal of Ethnopharmacology, 98, 329-333.
- Locher, C. P., M. T. Burch, H. F. Mower, J. Berestecky, H. Davis, B. Van Poel, A. Lasure, B. D. A. Vanden y A. J. Vlietinck (1995). Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 49, 23-32.
- Lunardi, I., J. L. B. Peixoto, C. C. Silva, I. T. A. Shuquel, E. A. Basso y G. J. Vidotti (2001). Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. Journal of Brazilian Chemical Society, 12, 180-183.
- Magina, M. D. A., E. M. Dalmarco, J. B. Dalmarco, G. Colla, M. G. Pizzolatti y I. M. C. Brighente (2012). Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. Química Nova, 35, 1184-1188.
- Medina, R. G., I. P. Torres, R. Bujanos, R. De La Torre, R. G. Guevara y M. M. González (2004). Reproducción y limpieza de mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) utilizada como vector en pruebas de transmisión de geminivirus en Chile (*Capsicum annuum* L). Memorias de la Primera Convención Mundial del Chile, Biotecnología. pp. 106-114.
- Miyoshi, M. (1998). Structure-activity relationships of some complex I inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1364, 326-244.
- Mordue, (Luntz), A. J. y A. Blackwell (1993). Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology. 39, 903-924.

- Naranjo, S. E., L. A. Cañasa y P. C. Ellsworth (2004). Mortalidad de *Bemisia tabaci* en un sistema de cultivos múltiples. *Horticultura internacional*, 43, 14-21.
- Nava-Camberos, A. y P. Cano-Ríos (2000). Umbral económico para la mosquita blanca de la hoja plateada de melón en la comarca lagunera, México. *Agrociencia*, 34, 227-234.
- Neale, M. (2000). The regulation of natural products as crop-protection agents. *Pest Management Science*, 56, 677-680.
- Noreen, Y., G. Serrano, P. Perera y L. Bohlin (1998). Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Medic*, 64, 520-524.
- Olano, I., P. Alonso, M. P. Cerdeiras, J. Fernández, F. Ferreira, P. Moyna, M. Soubes, A. Vázquez, S. Vero y M. J. Bassagoda (1996). Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. Part II. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 111-115.
- Oliveira, A. M., M. M. S. Humberto, J. M. Silva, R. F. A. Rocha y A. E. G. Sant'Ana (2006). Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 618-624.
- Oliveira, R. N. y I. J. M. Dias y C. A. G. Câmara (2005). Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 39-43.
- Pelah, D., Z. Abramovich, A. Markus y Z. Wiesman (2002). The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 407-409.
- Perring, T. M. (2001). The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, 20, 725-737.
- Pino, J. A., R. Marbot, A. Bello y A. Urquiola (2003). Essential Oil of *Eugenia meladenia* Krug et Urb. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 256-258.
- Prota, N., M. H. J. Bouwmeester y M. A. Jongsma (2013). Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (*Bemisia tabaci*) and aphids (*Myzus persicae*). *Pest Management Science*, DOI: 10.1002/ps.3610.
- Raghavendra B. S., K. P. Prathibha y V. A. Vijayan (2013). Synergistic effect of *Eugenia jambolana* Linn. and *Solidago canadensis* Linn. leaf extracts with deltamethrin against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. at Mysore. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3830-3835.

- Rajasekaran, M., J. S. Bapna, S. Lakshmanan, A. G. Ramachandran, A. J. Veliath y M. Panchanadam (1988). Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 24 (1), 115-121.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29, 913-920.
- Reitz, R. D. y R. M. Klein (1969). Mirtáceas. In: *Flora Ilustrada Catarinense* (Reitz, P. R., ed), I parte. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 63 p.
- Revilla, J. (2002). Plantas úteis da bacia amazônica. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 858 p.
- Reynertson, K. A., H. Yang, B. Jiang, M. J. Basile y E. J. Kennelly (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109, 883-890.
- Ruiz, S. E. y R. J. A. Trejo (2001). Plagas del cultivo del chile. Mérida, Yuc: En memorias de seminario de chile habanero. 52-53 p.
- Sano, S. M., C. E. L. Fonseca, J. f. Ribero, F. M. Oga y A. J. B. Luiz (1995). Folhacao, floracao, fruticacao e crescimento inicial da cagaiteira em Planaltina, DF. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30, 5-14.
- Silva, A. L. G y M. C. B. Pinheiro (2007). Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 21(1), 235-247.
- Silva, A. X., L. D. Bacigalupe, M. Luna-Rudloff, C. C. Figueroa (2012). Insecticide Resistance Mechanisms in the Green Peach Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) II: Costs and Benefits. *PLoS ONE*, 7, 1-9.
- Slowing, K., E. Carretero y A. Villar (1994). Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 43, 9-11.
- Soulé, S., C. Guéntner, A. Vazquez, V. Argandona, P. Moyna y F. Ferreira (2000). An aphid repellent glycoside from *Solanum laxum*. *Phytochemistry*, 55, 217-222.
- Souza, A. y J. Vendramim (2001). Atividade inseticida de extratos aquosos de Meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) *Neotropical Entomology*, 30, 133-137.
- Sporleder M. y L. A. Lacey. (2013). Biopesticides, in: *Insect pests of potato. Global perspectives on biology and management*, Giordanengo, P., C. Vincent y A. Alyokhin. (ed). Elsevier Inc. Amsterdam. pp. 463-486.
- Srivastava, R., A. K. Shaw y D. K. Kulshrestha (1995) Triterpenoids and chalcone from *Syzgium samarangense*. *Phytochemistry*, 38, 687-689.

- Sultana, I., C. Hosokawa, K. Nishimura, I. Ikeda y Y. Ozoe (2002). Benzylidene anabaseines act as high-affinity agonists for insect nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 637-643.
- Tanaka, T., Y. Orii, G. I. Nonaka, I. Nishioka y I. Kouno (1996). Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. *Phytochemistry*, 43, 1345-1348.
- Timbola, A. K., B. Szpoganicz, A. Branco, F. D. Monache y M. G. Pizzolatti (2002). A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia*, 73, 174-176.
- Vasicek, A., F. De Le Rossa y A. Paglioni (2001). Aspectos biológicos y poblacionales de *Aulacorthum solani*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphidoidea) en Pimiento (*Capsicum annum* L.). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 27, 439-446.
- Vila, R., J. Iglesias, S. Cañigüeral, A. I. Santana, P. Solís y M. P. Gupta (2004). Constituents and biological activity of the essential oil of *Eugenia acapulcensis* Steud. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 384-386.
- Watson, L. y M. J. Dallwitz (2007). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://delta-intkey.com> Version: 1st June 2007.
- Wink, M. (2000). Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels". In *Bioactive Natural Products*, (ed), Elsevier, Atta-Ur-Rahman. pp. 3-129.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Wink, M. (2006). Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections, in: *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, Rai, M. y M.C. Carpinella (ed). Elsevier. Amsterdam. pp. 251-268.
- Yang, L. L., C. Y. Lee y K. Y. Yen (2000). Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters*, 157, 65-75.
- Yang, Y., S. Lee, W. Lee, D. Choi, y Y. Ahn (2003). Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4884-4888.
- Zoubiri, S. y A Baaliouamer, (2011). Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*, doi:10.1016/j.jscs.2011.11.015.

1.2 Preguntas de investigación

¿Puedo mejorar la extracción de los metabolitos hidrofóbicos de las hojas de *Eugenia winzerlingii* utilizando disolventes de mediana polaridad (acetona o acetato de etilo) y por lo consiguiente proponer un esquema de extracción más eficiente de los principios activos?

¿Mantienen los extractos de las hojas de *Eugenia winzerlingii* su actividad insecticida y disuasoria (CL₅₀ y CE₅₀) contra *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae* en diferentes fechas de colecta de material vegetal?

¿Se pueden aislar los metabolitos activos de *E. winzerlingii* y conocer la toxicidad y efecto disuasorio (CL₅₀ y CE₅₀) de éstos sobre *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*.

¿Cuál es el mejor método (sexual o asexual) para reproducir la especie *E winzerlingii* en vivero?

1.3 Hipótesis

- La extracción de los principios activos (metabolitos de mediana polaridad) de las hojas de *Eugenia winzerlingii* es más eficiente mediante el uso del disolvente acetona.
- Los extractos de las hojas de *E. winzerlingii* de diferentes fechas de colecta tienen la misma actividad insecticida y disuasoria en ninfas de *Bemisia tabaci*, y en adultos de *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*.
- Los metabolitos activos de *Eugenia winzerlingii* aislados de manera biodirigida tienen actividad en la inhibición de asentamiento de adulto de *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*.
- La reproducción sexual de *Eugenia winzerlingii* es factible de realizarse en vivero fuera de su hábitat natural.

1.4 Objetivo general

Extraer selectivamente los componentes hidrofóbicos de las hojas de *Eugenia winzerlingii*, validar su actividad en diferentes colectas y caracterizar sus metabolitos con actividad disuasoria e insecticida.

1.4.1. Objetivos específicos

- Evaluar tres esquemas de extracción de los principios activos de las hojas de *E. winzerlingii* utilizando disolventes de polaridad ascendente.
- Monitorear la actividad insecticida de los extractos orgánicos obtenidos de las particiones (hexano, AcOEt, acetona y EtOH) en ninfas de *Bemisia tabaci*.
- Evaluar contra *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae* los extractos de tres colectas de *E. winzerlingii* obtenidos con el esquema de extracción recomendado.
- Caracterizar los metabolitos insecticidas provenientes del aislamiento biodirigido de los extractos de *E. winzerlingii*.
- Determinar las dosis efectivas de los metabolitos activos de *E. winzerlingii* en los estados adultos de *B. tabaci* y *M. persicae*.
- Evaluar *ex situ* la propagación vegetativa y sexual de *Eugenia winzerlingii*.

1.5 Diagrama experimental

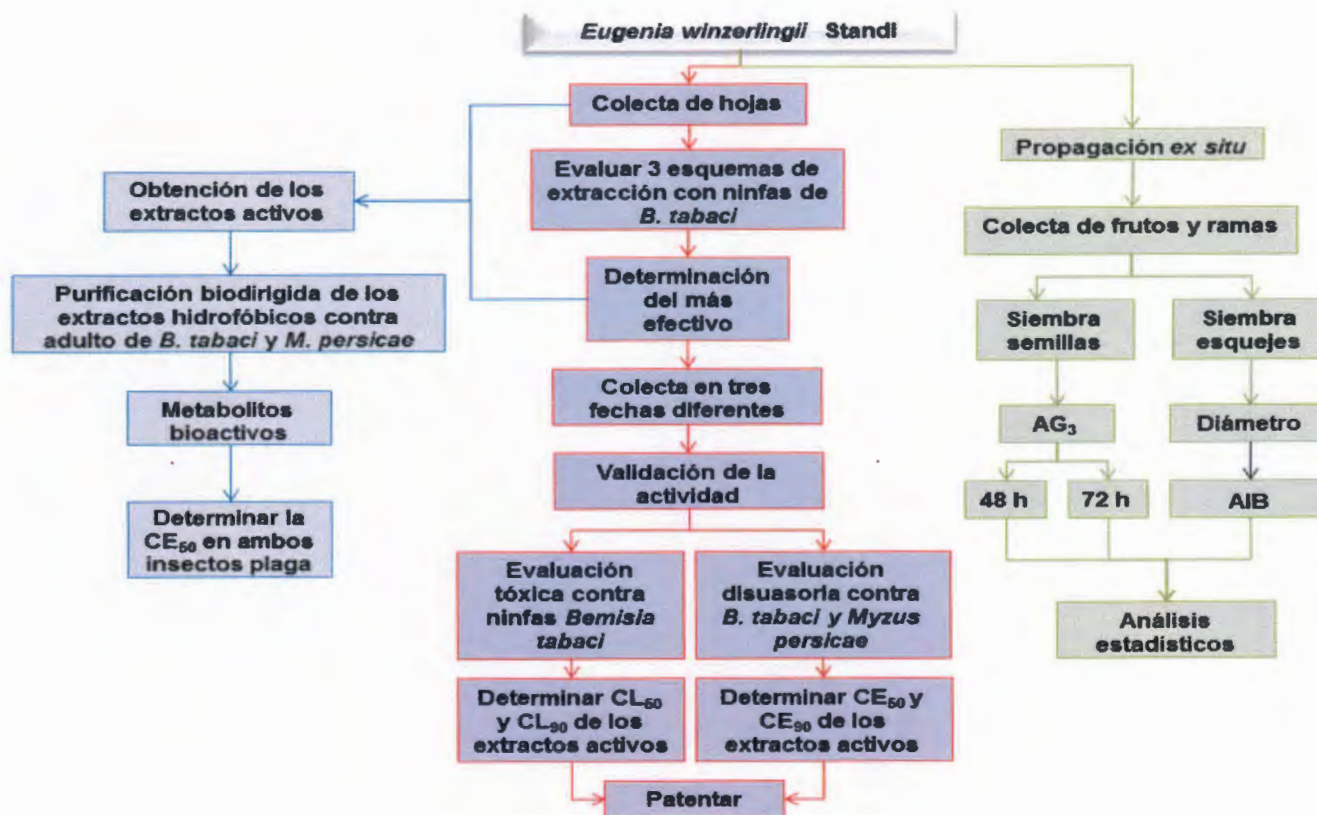


Figura 4. Diagrama de la estrategia experimental del trabajo con *Eugenia winzerlingii*.

CAPÍTULO II. VALIDACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *Eugenia winzerlingii*

2.1 Introducción

Eugenia winzerlingii es una planta endémica de la región peninsular y con base en los antecedentes quimiotaxonómicos de la familia y género se identificó como fuente potencial de bioinsecticidas. Esta información se confirmó con estudios previos realizados en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del CICY.

Los extractos acuosos y etanólicos tienen la capacidad de necrosar los huevos y ninfas de *B. tabaci*, respectivamente (Cruz-Estrada, 2009); por otra parte, el extracto etanólico y sus correspondientes fracciones de baja y mediana polaridad (82.2-95%), tuvieron un fuerte efecto disuasorio en los adultos de *M. persicae*. Sin embargo, los rendimientos de las fracciones hidrofóbicas activas son bajas comparadas con el residuo etanólico inactivo por el método de extracción líquido-líquido a partir del extracto etanólico (Comunicación personal Gamboa-Angulo M., 2013). Por lo anterior, se planteó la opción de utilizar una extracción directa con disolventes orgánicos de baja y media polaridad, monitoreando el rendimiento y la actividad contra las ninfas de *B. tabaci*. También se consideró conveniente establecer un ensayo disuasorio contra los adultos de *B. tabaci*, reconocidos y eficientes vectores de begomovirus. Finalmente, se planteó monitorear la actividad insecticida y disuasoria en diferentes fechas de colecta de las hojas de *E. winzerlingii* con la finalidad de validar su actividad y por ende la producción constante de los principios activos. Lo anterior permitirá a futuro integrar la información en una propuesta de patente de la actividad biológica de las hojas de *E. winzerlingii*.

2.2 Objetivos

- Evaluar tres esquemas de extracción de los principios activos de las hojas de *E. winzerlingii* utilizando disolventes de polaridad ascendente.
- Monitorear la actividad insecticida de los extractos orgánicos obtenidos de la extracción sucesiva (hexano, AcOEt, acetona y EtOH) en ninfas de *Bemisia tabaci*.
- Evaluar contra *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae* los extractos de tres colectas de *E. winzerlingii* obtenidos con el esquema de extracción recomendado.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Colecta y secado del material vegetal

La colecta 1 de las hojas de *E. winzerlingii* se realizó en el municipio de Morocoy, Quintana Roo en el año 2001, la colecta 2 y 3 se realizaron en el municipio de Xpuhil, Campeche en el año 2010 (Cuadro 5). Las hojas se secaron en una cámara de lámparas por cinco días a una temperatura de 50-60°C. Posteriormente se trituraron manualmente y se almacenaron (Cruz-Estrada *et al.*, 2013), un ejemplar se depositó en el herbario del CICY.

Cuadro 5. Colectas realizadas de la planta *Eugenia winzerlingii*.

Colectas	Clave	Lugar de colecta	Fecha de colecta
Colecta 1	ACE1	Morocoy, Quintana Roo.	18 de octubre de 2001
Colecta 2	ACE2	Dos lagunas, Campeche (Calakmul)	12 de febrero de 2010
Colecta 3	ACE3	Dos lagunas, Campeche (Calakmul)	10 de noviembre de 2010

2.3.2 Extracción de las hojas de *Eugenia winzerlingii* por maceración con disolventes orgánicos

- A. Las hojas de *E. winzerlingii* (Colecta 2) se sometieron a extracción por maceración con tres estrategias de aplicación de los disolventes.
- B. Las hojas secas y trituradas (20 g) de *E. winzerlingii* se maceraron exhaustivamente (3×) con hexano (ACE2A) y el material restante se dividió en dos partes. La primera parte se extrajo con acetato de etilo (ACE2B), EtOH (ACE2C) y finalmente con agua en ebullición (ACE2D) a una concentración del 3% en relación p/v.
- C. La segunda parte del material vegetal residual del esquema b, se extrajo exhaustivamente con acetona (ACE2E), etanol (ACE2F) a temperatura ambiente y con agua en ebullición (ACE2G) al 3% p/v (Figura 5).

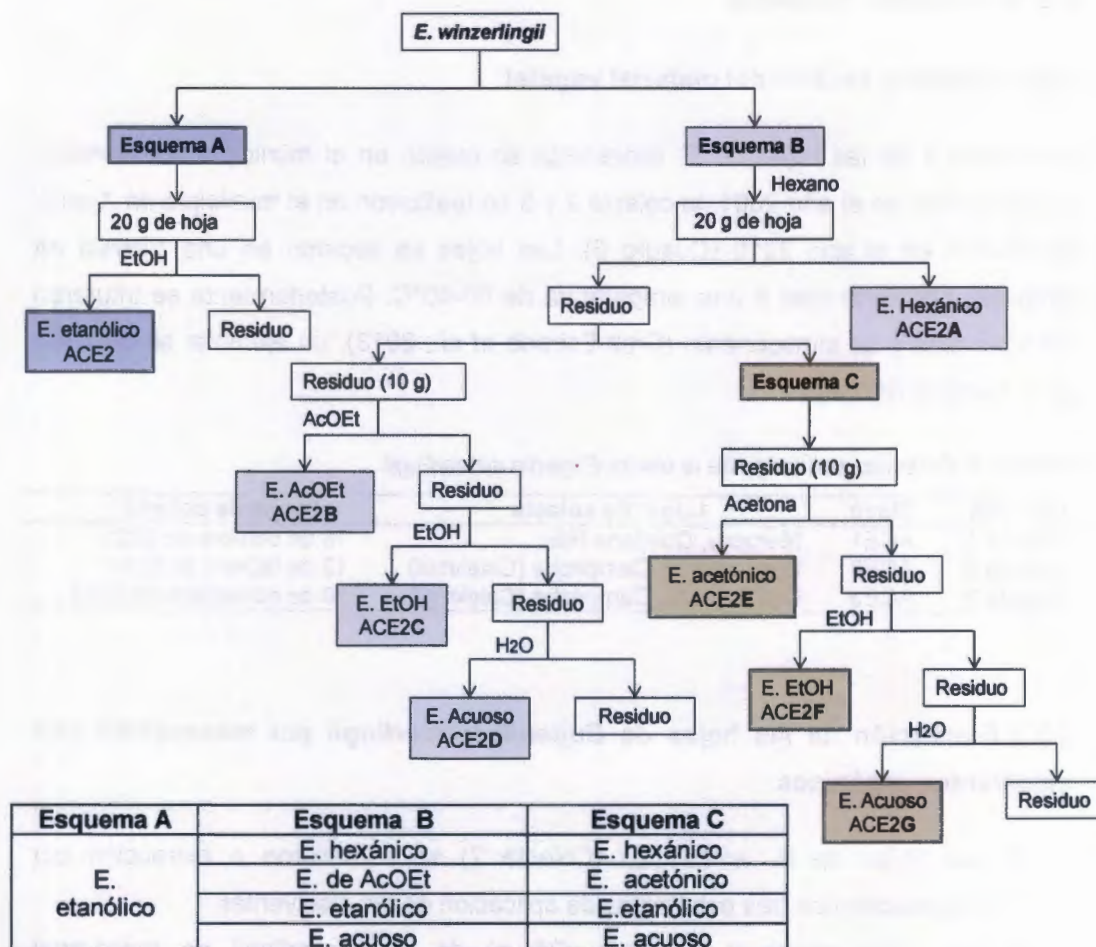


Figura 5. Esquema de extracción de las hojas de *Eugenia winzerlingii*

Todos los extractos secos de diferente polaridad se mantuvieron en refrigeración y se evaluaron contra el estado de ninfa de *B. tabaci*.

2.3.3 Bioensayo en ninfas de tercer instar de *Bemisia tabaci*

Para obtener los huevos, se utilizó la metodología descrita por Muñiz y Nombela (2001). Las plantas ovipositadas se trasladaron a un invernadero en condiciones de temperatura ambiente, con fotoperiodo natural, donde se mantuvieron por 15 días. Posteriormente se cortaron las hojas de las plantas y se contabilizaron 30 ninfas sésiles aproximadamente y se transfirieron a cajas Petri con agar al 2%. El extracto (10 μ L) se aplicó directamente sobre las ninfas a una concentración de 10 mg mL⁻¹ (100 μ g). Como testigos se empleó el insecticida comercial Imidacloprid (480 μ g mL⁻¹)

y agua:etanol (1:1); como vehículo de aplicación y un testigo absoluto (agua) (Iannacone y Lamas, 2002).

Cada tratamiento se realizó con cinco réplicas y se incubaron bajo condiciones de laboratorio, a una temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa del $75 \pm 8\%$ con fotoperiodo natural. El conteo de ninfas emergidas se realizó al tercer día.

La actividad de los extractos se determinó con base en el porcentaje de mortalidad de *B. tabaci* (ninfas necrosadas). El análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$) se realizó con el paquete estadístico SAS ver. 8.1.

2.3.4 Bioensayos en adultos de *Bemisia tabaci*

Los adultos que se emplearon en este bioensayo se obtuvieron de las colonias puras del Instituto Tecnológico de Conkal. Las hojas de chile habanero se cortaron en discos (2 cm^2), los cuales se dividieron a la mitad (1 cm^2) y se depositaron, separados (el haz hacia arriba), sobre una capa de agar sin gelificar (2%). Al enfriar el medio, un medio disco se impregnó con la muestra (10 μL , tratamiento) previamente disuelta en EtOH:DMSO + Tween 20 al 0.6% (99.5:0.5) y agua (1:1) y la otra mitad con esta mezcla de disolventes (10 μL , control). Con una trampa de succión se capturaron 26 moscas de la colonia y se depositaron, mediante un orificio de 3 mm de diámetro, en las cajas Petri de $1.5 \times 3 \text{ cm}$. Por último, se colocaron las cajas Petri en posición invertida para evitar la deshidratación del agar junto con las secciones de hoja de chile habanero.

Después de 24 horas se contaron los huevos ovipositados en el tratamiento y el control, calculando la inhibición del índice de asentamiento, %IO, para cada tratamiento mediante la fórmula:

$$\% \text{ IO} = [1 - (\% \text{ T} / \% \text{ C})] \times 100$$

%T: porcentaje de huevos sobre la superficie tratada

%C: porcentaje de huevos sobre la superficie control

Los extractos se ensayaron a $100 \mu\text{g cm}^2$. Los productos que a esta dosis presentaron un índice de repelencia significativo se sometieron a experimentos dosis-respuesta (50, 20, 10 $\mu\text{g cm}^2$) para calcular la cantidad de extracto que se necesita para inhibir el 50 y 90% del índice de oviposición de *B. tabaci* (CE_{50} y

CE₉₀) mediante análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico SAS 8.11.

Los tratamientos se realizaron con cinco réplicas, incubado bajo condiciones de laboratorio, a temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa del $75 \pm 8\%$ con un fotoperiodo natural.

2.3.5 Bioensayo de inhibición del % índice de asentamiento (%IA) de *Myzus persicae*

En cada experimento se utilizaron cajas de plástico de $3 \times 3 \times 1.5$ cm, tapadas y con ventilación, colocando en la tapa una capa fina de agar al 2% (20 réplicas por tratamiento). Posteriormente un disco de hoja de *Capsicum annuum* (2 cm²) se cortó a la mitad (1 cm²), y ambos medios se colocaron por separado en agar sin gelificar. Posteriormente, un medio disco se impregnó con la muestra (10 µL) a evaluar (tratamiento) disuelta en acetona/agua (80:20), y la otra mitad se impregnó con la mezcla de disolventes (10 µL) como control. En la tapa de cada caja se depositaron 10 insectos y se incubaron a 22 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) en posición invertida. Después de 24 horas se contaron los pulgones asentados en el tratamiento y en el control, calculando el porcentaje de inhibición del índice de asentamiento, %IA, para cada tratamiento mediante la fórmula.

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

%T: porcentaje de pulgones sobre la superficie tratada

%C: porcentaje de pulgones sobre la superficie control

Los extractos se ensayaron a 100 µg cm². Los productos que a esta dosis presentaron un índice de repelencia significativo se sometieron a experimentos dosis-respuesta (50, 20, 10 µg cm²) para poder calcular sus dosis efectivas (CE₅₀ y CE₉₀ = dosis a la que se produce un 50 y 90% de inhibición de asentamiento) mediante análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico SAS 8.11.

2.4 Resultados

2.4.1 Extracción de las hojas de *Eugenia winzerlingii* por maceración con diferentes disolventes

Las hojas de *E. winzerlingii* secas y molidas de la colecta dos (Cuadro 6) se sometieron a otros dos esquemas de extracción diferentes al utilizado originalmente, mismos que se enfocaron a la parte hidrofóbica. Se observa que el más alto rendimiento (5.5%) correspondió al esquema A, seguido del esquema 2 (5.4%). Con el segundo esquema, el material vegetal se utilizó una extracción sucesiva con disolventes de polaridad ascendente, que incluyen hexano para obtener los componentes de baja polaridad (ACE2A, Figura 5).

Cuadro 6. Rendimiento de los extractos orgánicos de las hojas de *Eugenia winzerlingii* siguiendo tres esquemas de extracción.

	Clave	Rendimiento (%)
Esquema 1	ACE2	5.5
Esquema 2	ACE2A (Hexano)	0.4
	ACE2B (AcOEt)	1.4
	ACE2C (EtOH)	2.4
	ACE2D (H ₂ O)	19.8
Esquema 3	ACE2E (Acetona)	2.1
	ACE2F (EtOH)	2.9
	ACE2G (H ₂ O)	26.4

2.4.2 Efecto de los extractos de *Eugenia winzerlingii* en ninfas de *Bemisia tabaci*

Todos los extractos obtenidos en los tres esquemas aplicados se evaluaron a las concentraciones indicadas, contra las ninfas de *B. tabaci*. En paralelo, se evaluó el extracto etanólico ACE1 que presentó actividad contra las ninfas de *B. tabaci* en estudios anteriores. Los resultados se muestran en la Figura 6, donde se puede observar que el extracto original ACE1 (22.8%) no demostró los efectos antes reportados, no así cuando los extractos se obtienen recientemente, ya que el extracto extraído y evaluado en el mismo periodo de tiempo (ACE2), causan una alta mortalidad en las ninfas (> 90%). Con estos resultados, se puede deducir que los largos periodos de almacenamiento (tres años en el presente trabajo) afecta la actividad de los extractos y reducen su efectividad.

Todos los extractos orgánicos de los tres esquemas de extracción causaron alta mortalidad ($> 85\%$) en ninfas de *B. tabaci* a 10 mg mL^{-1} . Los extractos acuosos no tuvieron efecto alguno en las ninfas.

Los dos extractos de mediana polaridad de acetato de etilo (ACE2B) y de acetona (ACE2E), evaluados contra ninfas de *B. tabaci* mostraron efectos significativamente diferentes según la prueba de rango múltiple Tukey ($p \leq 0.05$, Figura 6). El extracto ACE2B causó mortalidad efectiva de 99.1% y ACE2E de 87.7% .

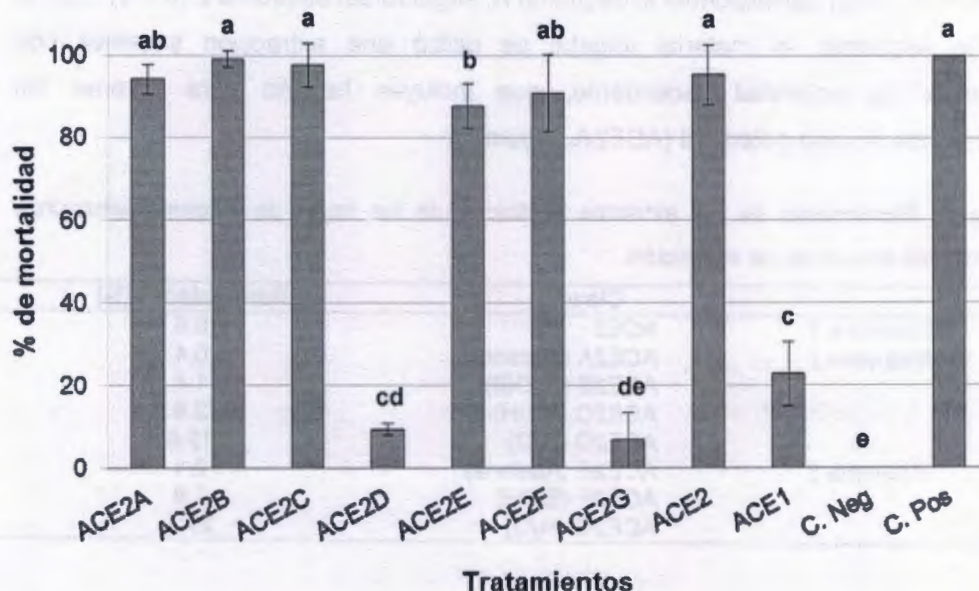


Figura 6. Mortalidad inducida por la aplicación de extractos orgánicos (10 mg mL^{-1}) y acuosos ($3\% \text{ p/v}$) de *E. winzerlingii* sobre ninfas de *B. tabaci*. ACE2A: hexánico, ACE2B: acetato de etilo, ACE2C: etanólico, ACE2D: acuoso, ACE2E: acetona, ACE2F: etanólico, ACE2G: acuoso, ACE2: etanólico de la colecta actual, ACE1: etanólico evaluado anteriormente, Control negativo ($\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH } 1:1$) y Control positivo (Imidacloprid, $480 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$).

2.4.3 Validación de la actividad de los extractos de tres colectas de *Eugenia winzerlingii*

Los extractos orgánicos de las tres colectas obtenidos siguiendo el esquema de extracción B, hexano, acetato de etilo y etanol, se evaluaron contra las ninfas y adultos de *B. tabaci*, así como contra los adultos de *M. persicae*. Los resultados muestran una alta actividad tóxica y disuasoria contra los organismos evaluados.

2.4.3.1 Efecto en ninfas de *Bemisia tabaci*

La toxicidad de los extractos se determinó evaluando la mortalidad de las ninfas en un ensayo de no elección. Los resultados mostraron mortalidad mayor de 90% en todos los tratamientos a la concentración inicial de 10 mg mL⁻¹ (Figura 7).

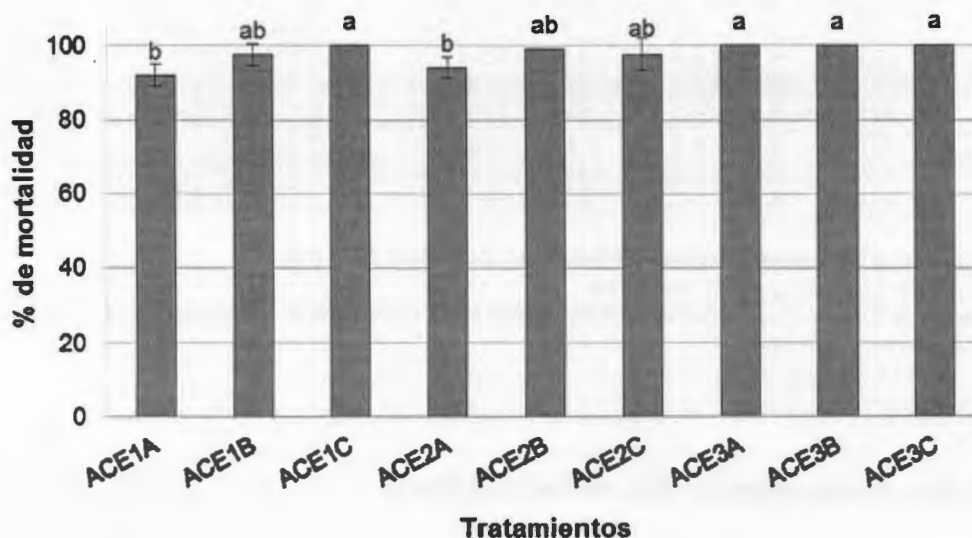


Figura 7. Mortalidad inducida por la aplicación de extractos orgánicos (10 mg mL⁻¹) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre ninfas de *B. tabaci*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A, ACE3B y ACE3C). A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$).

Como se puede observar en el Cuadro 7, los extractos obtenidos de material vegetal de diferentes fechas y épocas del año tuvieron un efecto similar. Dentro de las colectas, los extractos de mediana polaridad presentaron las CL₅₀ más bajas, siendo el correspondiente a la colecta uno (Octubre, 2001) el más activo (0.25 mg mL⁻¹), pero estadísticamente igual al efecto obtenido con los extractos de la colecta dos (Febrero 2010 a 0.41 mg mL⁻¹).

Cuadro 7. Toxicidad (CL_{50} y CL_{90}) de los extractos orgánicos de tres colectas de *Eugenia winzerlingii* en ninfas de *Bemisia tabaci* después de 72 h de exposición.

Fecha	Tratamiento	n	Pendiente $\pm$ DE	CL_{50} (Límites fiduciales)	CL_{90} (Límites fiduciales)	P
Octubre 2001	ACE1A	5	1.82 $\pm$ 0.12	3.19 (2.89-3.49)e	16.02 (13.45-20.04)f	<0.0001
	ACE1B	5	1.17 $\pm$ 0.18	0.25 (0.08-0.47)a	3.10 (2.50-3.74)b	<0.0001
	ACE1C	5	5.82 $\pm$ 0.29	4.85 (4.67-5.04)f	8.06 (7.65-8.56)e	<0.0001
Febrero 2010	ACE2A	5	2.64 $\pm$ 0.13	4.50 (4.23-4.78)f	13.27 (12.26-15.82)f	<0.0001
	ACE2B	5	2.52 $\pm$ 0.29	0.41 (0.29-0.52)a	1.32 (1.20-1.46)a	<0.0001
	ACE2C	5	4.47 $\pm$ 0.20	2.64 (2.51-2.76)d	5.11 (4.80-5.47)d	<0.0001
Noviembre 2010	ACE3A	5	5.12 $\pm$ 0.26	2.41 (2.30-2.52)cd	4.29 (4.03-4.60)c	<0.0001
	ACE3B	5	5.12 $\pm$ 0.47	0.80 (0.73-0.85)b	1.41 (1.34-1.52)a	<0.0001
	ACE3C	5	6.17 $\pm$ 0.29	2.22 (2.14-2.31)c	3.58 (3.37-3.84)b	<0.0001

n = número de grupos evaluados que contienen 30 individuos cada uno.

Los valores de CL_{50} y CL_{90} están en mg mL⁻¹.

Los valores de CL_{50} y CL_{90} seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes.

2.4.3.2 Resultados contra adultos de *Bemisia tabaci*

La actividad disuasoria de los extractos se determinó evaluando la inhibición del porcentaje del índice de oviposición (%IO) de los adultos de *B. tabaci* utilizando un ensayo de libre elección.

Los resultados de la evaluación detectaron valores de IO > 70% en seis extractos. Estos incluyeron a uno de la primera colecta (ACE1B); los tres de la segunda (ACE2A, ACE2B, ACE2C) y dos de la tercera (ACE3A y ACE3B, Figura 8), con lo cual se observó que las tres colectas tienen la capacidad de inhibir la oviposición de *B. tabaci*. Los de mayor actividad correspondieron a los tres extractos de acetato de etilo (ACE1B, ACE2B y ACE3B) con un IO > 89%.

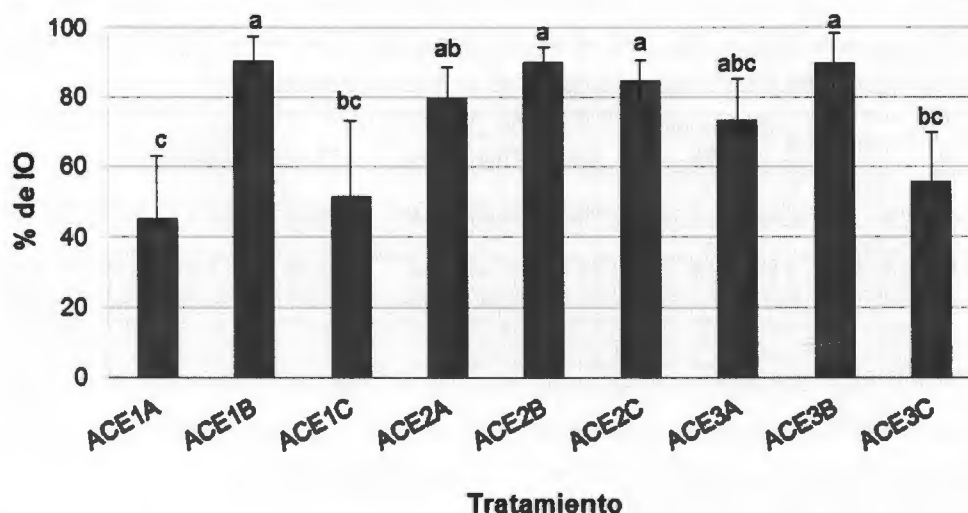


Figura 8. Inhibición de la oviposición inducida por la aplicación de extractos orgánicos ($100 \mu\text{g cm}^2$) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre adultos de *B. tabaci*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A, ACE3B y ACE3C. A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$).

Los extractos ACE2C (etanólico) y ACE1B (acetato de etilo) mostraron las menores CE_{50} (23.82 y 27.86 mg mL^{-1} , respectivamente), siendo estadísticamente diferentes a los otros tratamientos. Sin embargo, las CE_{50} más bajas se observaron en los tres extractos de acetato de etilo, donde estadísticamente son iguales ACE1B ($74.62 \mu\text{g cm}^2$) y ACE3B ($81.16 \mu\text{g cm}^2$), seguidos por el tratamiento ACE2B (Cuadro 8).

Cuadro 8. Repelencia (CE_{50} y CE_{90}) de los extractos orgánicos de tres colectas de *Eugenia winzerlingii* en adultos de *Bemisia tabaci* después de 24 h de exposición.

Fecha	Tratamiento	n	Pendiente $\pm$ DE	CE_{50} (Límites fiduciales)	CE_{90} (Límites fiduciales)	P
Octubre 2001	ACE1A	-	-	-	-	-
	ACE1B	5	2.99 ± 0.14	27.86 (26.01-29.67)a	74.62 (68.80-81.92)a	<0.0001
	ACE1C	-	-	-	-	-
Febrero 2010	ACE2A	5	3.61 ± 0.15	45.51 (43.29-47.78)d	102.95 (95.77-111.80)c	<0.0001
	ACE2B	5	3.39 ± 0.15	38.04 (36.06-40.07)bc	90.97 (84.28-99.26)bc	<0.0001
	ACE2C	5	1.69 ± 0.12	23.82 (20.74-26.70)a	136.48 (114.81-170.58)e	<0.0001
Noviembre 2010	ACE3A	5	1.67 ± 0.12	33.35 (29.93-36.72)b	194.78 (159.34-252.70)e	<0.0001
	ACE3B	5	3.98 ± 0.16	38.68 (36.85-40.53)c	81.16 (76.16-87.15)ab	<0.0001
	ACE3C	-	-	-	-	-

n = número de grupos evaluados que contienen 16 individuos cada uno.

Los valores de CE_{50} y CE_{90} están en $\mu\text{g cm}^2$.

Los valores de CE_{50} y CE_{90} seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes.

2.4.3.3 Efecto contra *Myzus persicae*

La evaluación contra *M. persicae* se realizó en un ensayo de libre elección (disuasorio) a $100 \mu\text{g cm}^2$. Los resultados indicaron que todos los extractos poseen la capacidad de inhibir el asentamiento de *M. persicae* (> 85%, Figura 9).

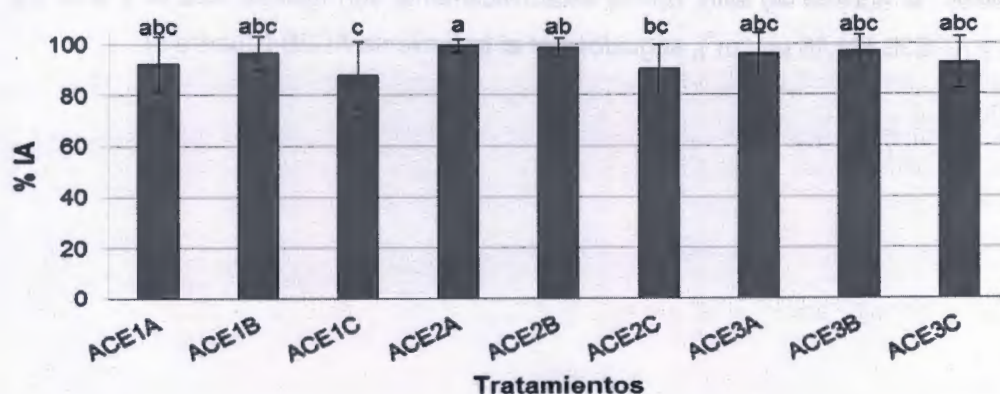


Figura 9. Inhibición del asentamiento inducida por la aplicación de extractos orgánicos ($100 \mu\text{g cm}^2$) de tres colectas de *E. winzerlingii* sobre *Myzus persicae*. Colecta 1: ACE1A, ACE1B, ACE1C; Colecta 2: ACE2A, ACE2B y ACE3C; Colecta 3: ACE3A, ACE3B y ACE3C. A: hexano, B: acetato de etilo, C: etanol. Los promedios en las columnas (desviación estándar) que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$).

Como se puede observar en el Cuadro 9, todos los extractos afectaron de manera similar a *M. persicae*. Donde el extracto de baja polaridad, ACE3A de la colecta tres presentó la menor CE_{50} ($1.20 \mu\text{g cm}^2$) para inhibir el asentamiento de este insecto, el extracto ACE2B de mediana polaridad exhibió la menor CE_{90} ($26.22 \mu\text{g cm}^2$).

Cuadro 9. Repelencia (CE_{50} y CE_{90}) de los extractos orgánicos de tres colectas de *Eugenia winzerlingii* en *Myzus persicae* después de 24 h de exposición.

Fecha	Tratamiento	n	Pendiente $\pm$ DE	CE_{50} (Límites fiduciales)	CE_{90} (Límites fiduciales)	P
Octubre 2001	ACE1A	15	1.34 ± 0.10	7.92 (6.26-9.53)b	70.70 (59.19-88.50)c	<0.0001
	ACE1B	15	2.14 ± 0.12	12.78 (11.50-14.03)c	50.82 (45.45-57.91)c	<0.0001
	ACE1C	15	1.78 ± 0.10	20.12 (18.26-22.02)d	105.36 (90.36-126.62)d	<0.0001
Febrero 2010	ACE2A	15	1.48 ± 0.13	5.05 (3.72-6.40)b	36.63 (31.82-43.44)b	<0.0001
	ACE2B	15	1.45 ± 0.14	3.41 (2.22-4.62)ab	26.22 (22.76-30.80)a	<0.0001
	ACE2C	15	1.82 ± 0.10	12.48 (11.01-13.93)c	63.07 (55.33-73.68)c	<0.0001
Noviembre 2010	ACE3A	15	0.75 ± 0.11	1.10 (0.31-2.27)a	56.08 (42.54-84.68)c	<0.0001
	ACE3B	15	1.28 ± 0.12	3.72 (2.43-5.05)b	37.23 (31.76-45.24)b	<0.0001
	ACE3C	15	2.23 ± 0.11	15.29 (13.97-16.61)c	57.59 (51.65-65.36)c	<0.0001

n = número de grupos evaluados que contienen 20 individuos cada uno.

Los valores de CE_{50} y CE_{90} están en $\mu\text{g cm}^2$.

Los valores de CE_{50} y CE_{90} seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes.

2.5. Discusión

Los resultados de investigaciones previas en el grupo de trabajo guiaron a confirmar el antecedente quimiotaxonómico de las propiedades insecticidas del género *Eugenia*, en los extractos de la especie *E. winzerlingii*, endémica de la región peninsular. Los resultados de la presente aportación indican claramente, que aún con el tiempo de colecta de 10 años, las hojas aún conservan sus propiedades insecticidas (ACE2), la cual se reduce en el extracto etanólico con el tiempo. Esto se puede atribuir a la degradación de los metabolitos activos por la luz, el oxígeno o la temperatura, por tal razón es conveniente conocer y optimizar las condiciones adecuadas para el almacenamiento de los extractos.

La aplicación de los tres esquemas de extracción y la evaluación biológica de los diferentes extractos obtenidos de *E. winzerlingii*, se realizó con el objetivo de conocer la forma más eficiente de obtener los principios activos hidrofóbicos. Estos se guiaron por el efecto tóxico sobre las ninfas de *B. tabaci*, el cual se estableció en estudios previos en el grupo de trabajo y ser susceptibles a los metabolitos no polares. El disolvente acetona, dada su polaridad, extrae mayor cantidad de metabolitos con respecto al acetato de etilo. No obstante, el extracto de este último disolvente mostró un elevado porcentaje (99.1%) de mortalidad contra las ninfas de *B. tabaci*, al igual que el extracto etanólico crudo total. Por tal razón, el método de extracción B se considera el mejor para extraer los principios activos hidrofóbicos de *E. winzerlingii*.

El análisis general de los resultados de la evaluación insecticida y disuasoria de los extractos de las hojas de *E. winzerlingii* en las tres colectas, validan la alta efectividad y la continua producción de metabolitos activos en la especie.

En general, todos los extractos mostraron una mayor actividad contra el insecto plaga *M. persicae* en el ensayo de libre elección, de los cuales el extracto hexánico de la colecta tres y el extracto de acetato de etilo de la colecta dos presentaron la más baja CE_{50} (ACE3A y ACE2B: 1.10 y 3.41 $\mu\text{g cm}^2$, respectivamente). Por otro lado, los adultos de *B. tabaci* mostraron mayor resistencia, requiriendo veinte veces más extracto que los tratamientos más efectivos (ACE2C y ACE3A: 23.22 y 33.35 $\mu\text{g cm}^2$, respectivamente) para controlar al 50% de la población. Con estos resultados se corrobora la actividad descrita por Gamboa Angulo, 2013 (comunicación personal) del extracto etanólico de *E. winzerlingii* contra *M. persicae*, la cual mostró una CE_{50} de 32.4 $\mu\text{g cm}^2$. Comparando los resultados se puede observar que los extractos

aumentan 10 veces su actividad al ser separados sucesivamente con disolventes de polaridad ascendente. Esto significa, que la actividad mostrada por los extractos de baja y media polaridad está dada por metabolitos hidrofóbicos. En la literatura se han reportado varias especies de *Eugenia* con actividad insecticida (Choi *et al* 2010; Han *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2011) donde solo los aceites esenciales han mostrado una alta actividad contra un amplio rango de insectos plaga (Bakkali *et al.*, 2008; Kordali *et al.*, 2007, Zoubiri y Baaliouamer, 2011).

El estadio ninfal de *B. tabaci* es altamente sensible a los extractos de las tres colectas, con un rango de CL_{50} de 0.25 - 4.50 mg mL⁻¹. Entre estos, los más efectivos correspondieron a los extractos de acetato de etilo (ACE1B, ACE2B y ACE3B: 0.25, 0.41, 0.80 mg mL⁻¹). En la inhibición de la oviposición de *B. tabaci*, el extracto más efectivo correspondió al extracto etanólico de una sola colecta (ACE2C), sin embargo, los extractos hexánicos y de acetato de etilo mostraron una buena actividad en las tres colectas evaluadas (Cuadro 8). Es importante comparar los perfiles cromatográficos de las tres colectas para identificar los posibles metabolitos responsable de la actividad ninficida y disuasoria de los diferentes extractos de *E. winzerlingii*.

En la literatura se ha reportado la actividad insecticida de extractos orgánicos del género *Eugenia*. Por ejemplo, el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* posee actividad insecticida contra adultos de *B. tabaci* biotipo Q con una CL_{50} de 0.26 mL cm⁻³. En cuanto a la actividad contra ninfas, no existen reportes del género *Eugenia*, sin embargo, los extractos de *Petiveria alliacea*, *Trichilia arborea*, *Citrullus colocynthis* y *Mentha microphylla* mostraron un rango de CL_{50} entre 1.14 y 5.00 mg mL⁻¹ (Cruz *et al.*, 2013; Sayeda *et al.*, 2009). Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio, los extractos de acetato de etilo (ACE1B, ACE2B y ACE3B) mostraron una mayor efectividad contra las ninfas con una menor CL_{50} .

Con respecto a la inhibición de la oviposición de *B. tabaci* existe pocos reportes, los aceites esenciales de *Plectranthus neochilus* (1% v/v) y *Corymbia citriodora* (0.5% v/v) han mostrado una inhibición de oviposición > 50%, así también, el aceite vegetal de *Arachis hypogaea* a una concentración del 3 % exhibe una inhibición del 100% (Baldin *et al.*, 2013; Fenigstein *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010). Para el fitófago *M. persicae*, no se encontraron reportes del género *Eugenia*. Sin embargo, los extractos orgánicos de *Euchium wildpretii*, *Flourensia oolepis* y *Stellera chamaejasme* reportan un rango de CE_{50} entre 5.34 - 27.08 µg cm² (García *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Santana *et al.*,

2012), siendo mayor que las concentraciones reportadas de los extractos orgánicos más activos de *E. winzerlingii* (ACE3A y ACE3B: 1.10 y 3.41 $\mu\text{g cm}^2$).

Los resultados de la actividad biológica así como los rendimientos de los extractos llevaron a seleccionar el segundo esquema de extracción (B) para la maceración masiva del material vegetal de *E. winzerlingii*, que se utilizará para la búsqueda de los principios activos hidrofóbicos guiada por ensayos.

2.5 Conclusiones

Los disolventes orgánicos tienen la capacidad de extraer los principios activos de las hojas de *E. winzerlingii*. El esquema de extracción B (hexano, acetato de etilo y etanol), mostró los mejores resultados en las evaluaciones en ninfas de *B. tabaci*.

El análisis general de los resultados de las evaluaciones insecticidas y disuasorias de los extractos de las hojas de *E. winzerlingii* en las tres colectas, confirman la alta efectividad y la continua producción de metabolitos activos en la planta *E. winzerlingii*.

E. winzerlingii es una planta que ofrecen una alternativa para el control de *B. tabaci* y *M. persicae*.

2.6 Referencia

- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck y M. Idaomar (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Baldin, E. L. L., A. E. M. Crotti, K. A. L. Wakabayashi, J. P. G. F. Silva, G. P. Aguiar, E. S. Souza, R. C. S. Veneziani, M. Groppo (2013). Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. *Journal of Pest Science*, 86, 301-308.
- Choi, H. Y., Y. C., Yang, S. H. Lee, J. M. Clark y Y. J. Ahn (2010). Efficacy of spray formulations containing binary mixtures of clove and eucalyptus oils against susceptible and pyrethroid/malathion-resistant head lice (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 47(3), 387-391.
- Cruz-Estrada, A. E. (2009). Efecto de extractos vegetales en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, opción Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Pp. 72, 73.
- Cruz-Estrada, A., M. Gamboa-Ángulo, R. Bórges-Argáez, E. Ruiz-Sanchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-9.
- Fenigstein, A. M., Eliyahu, S. Gan-Mor y D. Veierov (2001). Effects of five vegetable oils on the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica*, 29, 197-206.
- García, M., A. González-Coloma, O. J. Donadel, C. E. Ardanaz, C. E. Tonn y M. E Sosa (2007). Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 181-187.
- Han, M. K., S. I. Kim y Y. J. Ahn (2006). Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research*, 42(1), 15-22.
- Iannaccone, J. A. y G. Lamas (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 92-101.
- Kim, S. I., S. H. Chae, H. S. Youn, S. H. Yeon y Y. J. Ahn (2011). Contact and fumigant toxicity of plant essential oils and efficacy of spray formulations containing the oils against B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 67(9), 1093-1099.

- Kordali, S., M. Kesdek y A. Cakir (2007). Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) Industrial Crops and Products, 26(3), 278-297.
- Liu, T-X., H-H. Xu y W-C. Luo (2006). Opportunities and potentials of botanical extracts and products for management of insect pests in cruciferous vegetables. In Naturally Occurring Bioactive Compounds, Eds1nd.; Rai, M., Carpinella, M.C.; Elsevier; Amsterdam. 2006; Vol. 3., pp. 171-197.
- Muñiz, M. y G. Nombela (2001). Differential variation in development of the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* on sweet pepper *Capsicum annum* L. at constant temperatures. Environmental Entomology, 30, 720-727.
- Santana, O., M. Reina, B. M. Fraga, J. Sanzd, A. González-Coloma (2012). Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. Chemistry & Biodiversity, 9, 567-576.
- Sayeda, F. F., H. M. Torkey, y H. M. Abou-Yousef (2009). Natural extracts and their chemical constituents in relation to toxicity against whitefly (*Bemisia tabaci*) and Aphid (*Aphis craccivora*). Australian Journal of Basic & Applied Sciences, 3, 3217-3223.
- Yang, N-W., A-L. Li, F-H. Wan, W-X. Liu y D. Johnrson (2010). Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. Crop Protection, 29, 1200-1207.
- Zoubiri, S. y A. Baaliouamer (2011). Potentiality of plants as source of insecticide principles. Journal of Saudi Chemical Society, doi:10.1016/j.jscs.2011.11.015

CAPÍTULO III. *Eugenia winzerlingii* FATTY ACIDS AND THEIR EFFECT ON *Bemisia tabaci* GENNADIUS (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) AND *Myzus persicae* SULZER (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

3.1 Introduction

Eugenia winzerlingii Standl. (Myrtaceae) is an endemic plant in the southeast of México (States of Campeche, Quintana Roo and Yucatán), Belice and Guatemala. In previous studies, the organic extracts from leaves of *E. winzerlingii* showed activity on *Bemisia tabaci* Gennadius (Cruz-Estrada *et al.*, 2009) and *Myzus persicae* Sulzer. Particularly, the medium polarity extract showed effects on adults of both species. An exploratory GC-MS analysis of these active extracts detected *n*-alkanes as the major components on hexane extract, and clovandiol, eicosane and sitosterol from ethyl acetate extract (Cruz-Estrada *et al.*, 2014), as well fatty acids as minor components in both extracts. To the best of our knowledge no phytochemical studies have been previously carried out on *E. winzerlingii*.

In the present work a bioassay-guided fractionation of the ethyl acetate extract against adults of *B. tabaci* and *M. persicae* was carried out to determine the compounds with deterrent activity of *E. winzerlingii* leaves. A mixture of four fatty acids as main constituents on the different active fractions of ethyl acetate extract with effects on settling and oviposition inhibition on *M. persicae* and *B. tabaci* was observed. Furthermore, these activities were verified by the commercial standards of decanoic, undecanoic, dodecanoic, and tridecanoic acids, and their methyl and ethyl synthetic esters.

3.2 Material and methods

3.2.1 General experimental procedures

Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) were used for column chromatography (Merck, Kieselgel F254, 230–400 mesh), and pre-coated silica gel plates (Merck, Kieselgel 60 F254) was used for TLC. Detection in TLC was achieved under UV to 254 and 365 nm and by spraying with phosphomolybdic acid reagent, followed by heating for 5 min at 105 °C.

Commercial fatty acids (purity > 98%) were purchased from Sigma Aldrich. Fatty acid esters were prepared by methylation and ethylation of commercial acids.

3.2.2 Plant Material and extraction

Fresh leaves of *E. winzerlingii* were collected (November, 2010) in Calakmul, Campeche. A voucher specimen (PM-2503) was deposited in the herbarium of the Centro de Investigación Científica de Yucatán. The leaves of *E. winzerlingii* were dried for three days in a heating chamber (50-60 °C) and manually grounded. Dried and milled leaves (3 K) were extracted sequentially with hexane and ethyl acetate (3×), EtOAc (3×). The solvent was separated by filtration and eliminated under low-pressure at 40 °C to obtain the hexane and EtOAc crude extracts (0.4, and 2.1% yield, respectively).

3.2.3 Bioassay-guided isolation of *Eugenia winzerlingii*

A. Hexane extract (ACE1, 14.0 g) was chromatographed on silica gel in a VLC, eluted with mixtures of *n*-hexane-acetone to yield eight fractions (ACE1a-1h).

B. EtOAc extract (37.7 g) was filtrated by clay tonsil, eluted with mixtures of *n*-hexane-ethyl acetate, producing a free extract of chlorophylls and alkanes. The filtered extract (ACE2, 8.5 g) was passed through silica gel, eluted with mixtures of *n*-hexane-EtOAc to give six fractions (ACE2a-2f). All the fractions were evaluated on adults of *B. tabaci* and *M. persicae* adults. The most active fractions ($\geq 90\%$) against the two pest insects were analyzed by GC-MS.

3.2.4 Esterification of fatty acids

Fatty acids (100 mg) or an organic fraction from *E. winzerlingii* (30 mg), and 10 mL of acidified methanol or ethanol (1% sulfuric acid) were placed in flasks. The solution was vigorously stirred for about 12 h. Subsequently, the solution was eliminated and suspended in an aqueous solution of 20% Na₂CO₃ (20 ml). The aqueous layer was then extracted three times with CHCl₃ (20 ml). The solvent was distilled off, to leave fatty acid ester (Abdelillah *et al.*, 2013).

3.2.5 GC-MS Analysis

All active fractions and fatty acid esters were analyzed by GC-MS using an Agilent Technologies 6890N chromatograph coupled to an Agilent Technologies 5975B mass selective detector, with Ultra 1 column [methyl siloxane, 25 m long, 0.52 mm i.d., 0.5 µm film thickness, helium at flow rate = 1.0 ml/min, T_1 = 150 °C, gradient = 10 °C/min,

$T_2 = 280\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20 min)]. Each fraction was analyzed using 0.4 μL of sample at 2%. Major components were identified using the mass spectral library (NIST 05) of the equipment.

3.2.6 *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae* colony

Adult whiteflies were collected from habanero pepper (*Capsicum chinense*) at the Instituto Tecnológico de Conkal, in Conkal, Yucatan, Mexico. The stock colony of *B. tabaci* was maintained on habanero pepper plants in entomological cages (1.2 × 1.2 × 1.0 m) of aluminum and anti-aphid mesh. These cages were kept in a greenhouse at 25-35 $^{\circ}\text{C}$, 55-75% relative humidity and natural light.

The aphid *M. persicae* was reared on bell pepper (*C. annuum*) plants. The insects were maintained at $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60-70% r.h with a 16:8 h. (L:D) in a growth chamber (Castillo *et al.*, 2009; Cruz-Estrada *et al.*, 2013).

3.2.7 Bioassay for settling inhibition of *Myzus persicae*

Each experiment consisted in plastic boxes (3 × 3 × 1.5 cm) with ventilated lids and coated with a thin layer of 1% agar. Leaf disks (2 cm^2) were cut from a fully expanded *C. annuum* leaf, divided into two half-disks, and placed on the agar layer before its complete solidification so that the lower leaf surface would not be exposed to the insects. Each sample was applied on a half-disk, and the other with the control (solvent). Each treatment consisted of 20 boxes with 10 insects inside. The boxes were incubated at 22 $^{\circ}\text{C}$ (18L:6D) in an upside-down position under indirect light, and the number of aphids that settled on the treatment and control half-disk were recorded after 24 h.

Active samples were tested in serial dilutions for extracts and fractions, 10, 5 and 0.25 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, and pure compounds 5, 0.25 and 0.13 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. The index for settling inhibition (%IA) was calculated for each extract at an initial dose of 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the fractions; commercial fatty acids and their derivatives 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [%IA = $[1 - (\%T / \%C)] \times 100$, where %T and %C are the number of insects on the treated and control leaf pieces, respectively.

3.2.8 Bioassay for inhibition of oviposition on *Bemisia tabaci* adults

For the bioassay, two leaf sections of habanero pepper (ca. 1 cm^2), cut and treated as previously mentioned in the *M. persicae* bioassay, the two half-disks were set on 2% agar bed contained in a Petri dish (3 cm diameter). Extracts, negative and positive

control were set as previously mentioned. After solvent evaporation (60 min), sixteen *B. tabaci* adults were placed per Petri dish. These were set in an upside-down position and incubated at 26 ± 2 °C, $75 \pm 8\%$ relative humidity and natural light. The numbers of eggs on the leaf sections were recorded after 24 h and active samples were diluted, and the index of oviposition inhibition (%IO) as described to *M. persicae*.

3.2.9 Data analysis

The percentages of activity were determined and transformed to arcsine square-root values for analysis of variance (ANOVA). Treatment means were compared and separated by the Tukey test at the $P \geq 0.05$ level (SAS Institute, 1999). Means ($\pm$ SE) of untransformed data are reported. Data from dose-response experiments used to calculate EC_{50} and EC_{90} by probit analysis.

3.4 Results and discussion

In previous works the ethyl acetate extract from *E. winzerlingii* leaves showed high deterrents effect on *B. tabaci* and *M. persicae*. In the present work, deterrents effects were confirmed with the new plant material collected.

The bioassay-guided fractionation of the ethyl acetate extract was conducted with adults of both species.

This extract was filtered through tonsil and the active extract ACE2 was separated by silica gel column and fractions tested against targets. In this way, five fractions (ACE2b-2f) exhibited good inhibition on both species (%IA and %IO values of ≥ 80) (Table 10). The most active fractions (ACE2b-2c) were analyzed by GC-MS, where it was showed that fatty acids were the major components. Among them, five fatty acids (decanoic, undecanoic, dodecanoic, tridecanoic and tetradecanoic acids) were identified. To verify these results, all active fractions were methylated and GC-MS studies revealed mainly the same fatty acids previously detected from original fractions and hexadecanoic acid in fraction ACE2B; as well as tridecanoic and tetradecanoic acids in fraction ACE2C (Table 11).

Table 10. Deterrent effect of fractions from *Eugenia winzerlingii* ($50 \mu\text{g cm}^2$) on *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae*.

Fractions	% inhibition of oviposition of <i>Bemisia tabaci</i>	% of setting inhibition of <i>Myzus persicae</i>
	Adults	Adults and nymphs
ACE2	$87.98 \pm 6.48 \text{ ab}$	$96.94 \pm 5.54 \text{ a}$
ACE2a	$63.41 \pm 7.57 \text{ c}$	-
ACE2b	$90.90.12 \pm 2.07 \text{ ab}$	$97.59 \pm 4.81 \text{ a}$
ACE2c	$93.32 \pm 3.66 \text{ a}$	$91.26 \pm 12.21 \text{ b}$
ACE2d	$84.55 \pm 12.02 \text{ abc}$	$89.70 \pm 9.28 \text{ b}$
ACE2e	$79.97 \pm 16.38 \text{ abc}$	$87.79 \pm 11.28 \text{ b}$
ACE2f	$92.65 \pm 10.34 \text{ a}$	$89.83 \pm 10.21 \text{ b}$
Control +	$72.2 \pm 5.5 \text{ bc}$	-

Mean repellent ($\pm$ standard error) followed by the same letter within the same column are not significantly different (Tukey, $P < 0.05$).

Table 11. Chemical constituents on the active fractions from *Eugenia winzerlingii* by CG-MS.

Compound assignment	Retention time (min)	% relative abundance
ACE2b		
Decanoic acid	7.93	16.7
Ethyl decanoate	8.26	3.04
Undecanoic acid	9.36	14.2
Ethyl undecanoate	9.67	7.27
Dodecanoic acid	10.66	13.51
Ethyl dodecanoate	10.95	14.54
Ethyl Tridecanoate	12.13	4.09
Ethyl Tetradecanoate	13.23	3.47
ACE2bM		
Methyl decanoate	7.02	6.55
Methyl undecanoate	8.59	17.46
Methyl dodecanoate	9.98	43.56
Methyl tridecanoate	11.24	13.67
Methyl 12-methyltridecanoate	12.40	12.77
Methyl hexadecanoate	14.51	2.45
ACE2c		
Decanoic acid	7.9	5.56
Undecanoic acid	9.33	1.78
2 (4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	9.72	1.1
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	18.31	2.51
Sitosterol	26.85	11.29
ACE2cM		
Methyl decanoate	7.04	7.08
Methyl undecanoate	8.6	17.89
Methyl dodecanoate	9.99	37.81
2-tetradecene	11.02	3.9
Methyl tridecanoate	11.25	10.58
Methyl tetradecanoate	12.41	7.51
1-octadecene	13.3	4.81
5-eicosene, (E)-	15.31	4.26
1-docosene	17.13	2.83

Compounds were tentatively identified by comparison to the NIST05 chemical database. Only compounds with a probability of matching mass spectra > 0.9 are shown.

To know which fatty acids from *E. winzerlingii* are responsible for the deterrent effect on *B. tabaci* and *M. persicae*, four commercial standards (decanoic, undecanoic, dodecanoic, and tetradecanoic acids) and their methyl and ethyl derivatives were evaluated. The results showed that decanoic, undecanoic, and dodecanoic acids had higher activities against both targets (IA and IO values 80%); moderate effects of

tetradecanoic acid was observed on *M. persicae* (%IA value of 76.16%, Table 12). The lowest EC_{50} against *B. tabaci* was displayed by undecanoic acid ($1.11 \mu\text{g cm}^2$), followed by dodecanoic acid ($9.84 \mu\text{g cm}^2$); and on *M. persicae* was observed with dodecanoic and undecanoic acids ($EC_{50} = 1.40$ and $3.40 \mu\text{g cm}^2$, respectively), which are statistically equal (Table 13). All esterified derivatives showed no deterrent ability on *B. tabaci*, and only tetradecanoate esters were able to inhibit the settling of *M. persicae*. Surprisingly, methyl tetradecanoate increased its effect (%IA value of 93.29%) with an EC_{50} of $3.20 \mu\text{g cm}^2$. These results confirm that the effect of the ethyl acetate extracts and their fractions attributed to the presence of fatty acids, mainly to decanoic, undecanoic, dodecanoic and tetradecanoic acids and ethyl tetradecanoate.

Table 12. Effects of commercial fatty acids and their synthetic esters ($50 \mu\text{g cm}^2$) on *Bemisia tabaci* and *Myzus persicae*.

Fractions	% of settling inhibition of <i>Myzus persicae</i> ^a	% inhibition of oviposition of <i>Bemisia tabaci</i> ^a
	Adults	Adults and nymphs
Decanoic acid	89.68 ± 11.16 ab	98.24 ± 3.95 a
Undecanoic acid	83.34 ± 15.09 abc	94.33 ± 7.35 a
Dodecanoic acid	97.64 ± 6.33 a	94.68 ± 6.51 a
Tetradecanoic acid	76.16 ± 20.81 bcd	59.09 ± 20.63 abc
Methyl decanoate	36.34 ± 39.54 e	10.13 ± 13.91 de
Methyl undecanoate	33.83 ± 31.74 e	15.67 ± 31.66 cde
Methyl dodecanoate	48.76 ± 35.63 de	0.0 ± 0 e
Methyl tetradecanoate	93.29 ± 11.35 ab	16.43 ± 22.81 bcde
Ethyl decanoate	34.40 ± 30.76 e	30.67 ± 36.18 bcde
Ethyl undecanoate	37.38 ± 34.06 e	46.62 ± 26.49 bcd
Ethyl dodecanoate	52.67 ± 34.14 cde	62.88 ± 26.80 ab
Ethyl tetradecanoate	77.42 ± 19.38 bcd	42.24 ± 30.32 bcd
α-tocopherol	23.92 ± 27.57 e	30.94 ± 6.59 bcde
γ-tocopherol	29.97 ± 30.03 e	44.23 ± 21.03 bcde
Lupeol	22.48 ± 24.22 e	27.45 ± 10.15 bcde

^aFor an extract showing a good anti-settling activity is achieved only with %IA greater than 80% (Garcia *et al.*, 2007).

Table 13. Effective Antifeedant Doses (EC_{50}) and 95% Confidence (lower, upper) [$\mu\text{g cm}^2$] of standards on *Myzus persicae* and *Bemisia tabaci*.

Substance	EC_{50} ($\mu\text{g cm}^2$)		P
	<i>M. persicae</i> ^a	<i>B. tabaci</i> ^b	
Decanoic acid	7.85 (6.57-9.02)b	16.36 (15.61-17.13)c	<0.0001
Undecanoic acid	3.85 (2.09-5.58)a	1.11 (0.29-2.24)a	<0.0001
Dodecanoic acid	1.40 (0.48-2.51)a	9.84 (8.73-10.88)b	<0.0001
Methyl tetradecanoate	3.20 (1.87-4.52)a	n.c ^c	<0.0001

^an = number of groups tested containing 10 individuals each, ^bnumber of groups tested containing 26 individuals each. ^cValues followed by the same letter within the same column are not significantly different.

The deterrent activity of decanoic, dodecanoic acid and other fatty acids have been previously reported against several pest insects, including *M. persicae* (Jones *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012). Hexadecanoic acid has previously been shown with no effects on *M. persicae* (Santana *et al.*, 2012). The other fatty acids herein detected have not been tested yet against these insect species. Only the methyl tetradecanoate has been tested against different pest insects, showing repellent activity on several species of ants, culicids and flies (Henderson and Jeanne, 1989; Henderson *et al.*, 1991; Sivakumar *et al.*, 2011).

As far as we know, no data on effect of fatty acids on inhibition of the oviposition of *B. tabaci* has been previously reported. Evaluation on *B. tabaci* adults carried out using potassium salts of pelargonic acid (Savona®) that showed no effect at 5 mg ml⁻¹ (Javed and Matthews, 2010). However, behavioral effects on whitefly have been previously reported, in this context, essential oils obtained from *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae) (1%) and *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Lamiaceae (0.5%) efficiently reduced the oviposition (82.07 and 69.3%, respectively) of *B. tabaci* (Baldin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010) and a crude extract and methanol fraction of *Quassia amara* L. ex Blom (Simaroubaceae) showed a deterrent activity > 90% on *B. tabaci* (Flores *et al.*, 2008).

A number of acids of plant origin are sold for insect control; these include citric acid, oleic acid, pelargonic acid and related fatty acids, recommended for use against a wide range of insect, including ants, aphids, beetles, caterpillars, leafhoppers, mealybugs, mites, thrips and whitefly in ornamentals, vegetables, shrubs and fruit trees and sold under different trade names by many manufacturers. For example, SharoShooter sold by St Gabriel and M-Pede by Mycogen (Copping and Menn, 2000; Copping and Duke, 2007). Insecticide effect of the fatty acids could interfere with the cell membrane

constitution of the target organism, leading to a breakdown of the integrity of the membrane and death (González-Coloma *et al.*, 2010).

3.5 Conclusion

The concentrations of short chain fatty acids in the leaves of the plants play an important role in the behavior of *B. tabaci* and *Myzus persicae*.

Short chain fatty acids confer insecticidal properties to *E. winzerlingii* leaves. More studies should be carried out with this promissory species to develop a safer and valuable botanical insect deterrent for agricultural use.

3.6 References

- Abdelillah, A., B. Houcine, D. Halima, C. S. Meriem, Z. Imane, S. D. Eddine, M. Abdallah, C. S. Daoudi and A. D. Eddine (2013). Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 443-448.
- Baldin, E. L. L., A. E. M. Crotti, K. A. L. Wakabayashi, J. P. G. F. Silva, G. P. Aguiar, E. S. Souza, R. C. S. Veneziani and M. Gropp (2013). Plant-derived essential oils affecting settlement and oviposition of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato. *Journal of Pest Science*, 86, 301-308.
- Castillo, L., A. González-Coloma, A. González, M. Díaz, E. Santos, E. Alonzo-Paz and M. J. Bassagoda (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Industrial crops and products*, 29, 235-240.
- Copping L. G. and J. J. Menn (2000) Review. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 2000, 56, 651-676.
- Copping L. G. and S. O. Duke (2007). Review Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63, 524-554.
- Cruz-Estrada, A. E. (2009). Efecto de extractos vegetales en el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, opción Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Pp. 72, 73.
- Cruz-Estrada, A., M. Gamboa-Angulo, R. Bórges-Argáez, E. Ruiz-Sanchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-9.
- Flores, G., L. Hilje, G. A. Mora and M. Carballo (2008). Antifeedant activity of botanical crude extracts and their fractions on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) adults: III. *Quassia amara* (Simaroubaceae). *Revista de Biología Tropical*, 56, 2131-2146.
- González-Coloma, A., M. Reina, C. Díaz, B. M. Fraga (2010). Natural product-based biopesticides for insect control, in: *Natural Products Chemistry, Comprehensive*, Mander, L. y H. W. Liu (ed). Elsevier, Amsterdam. pp. 237-263.
- Henderson, G. and R. L. Jeanne (1989). Response of Aphid-Tending Ants to a Repellent Produced by Wasps (Hymenoptera: Formicidae, Vespidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 82, 516-519.

- Henderson, G., J. D. Wells and R. L. Jeanne (1991). Methyl palmitate and methyl myristate repel flies. *Fla Entomol. Florida Entomologist*, 74, 365–368.
- Javed, M. A. and G. A. Matthews (2010) Bioresidual and integrated pest management status of a biorational agent and a novel insecticide against whitefly and its key parasitoids. *Int. J. Pest Manage. International Journal of Pest Management*, 48, 13-17.
- Jones, A. M. P., J. Klun, C. L. Cantrell, D. Ragone, K. R. Chauhan, P. N. Brown and S. J. Murch (2012) Isolation and identification of mosquito (*Aedes aegypti*) biting deterrent fatty acids from male inflorescences of breadfruit (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 3867-3873.
- Santana, O., M. Reina, B. M. Fraga, J. Sanz and A. González-Coloma (2012). Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 567-576.
- Sivakumar, R., A. Jebanesan, M. Govindarajan and P. Rajasekar (2011). Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 706-710.
- Yang, N-W., A-L. Li, F-H. Wan, W-X. Liu and D. Johnson (2010). Effects of plant essential oils on immature and adults sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop protection*, 29, 1200-1207.

CAPÍTULO IV. EXPLORACIÓN DE LA PROPAGACIÓN DE *Eugenia winzerlingii*

4.1 Introducción

La propagación de plantas se realiza por vía sexual o asexual. En la reproducción sexual se fusionan un gameto femenino y uno masculino formando un embrión que dará lugar a un individuo. En la propagación asexual se utilizan partes de las plantas como bulbos, hojas, raíces, rizomas y tallos, que darán lugar a una planta idéntica a la progenitora (Sharma, 2005).

En la literatura existen varios reportes de propagación por semillas y esquejes dentro de la familia Myrtaceae. Por ejemplo, *Eugenia stipitata* ha sido propagada por semilla, mostrando un 93% de germinación a los 58 días después de la siembra (Anjos, 1998; Mendes y Mendonça, 2012). De la misma manera semillas de las especies *Eugenia calycina* y *Eugenia dysenterica* germinan de manera regular (Souza *et al*, 2001; Duarte *et al.*, 2006; Bülow *et al.*, 1994). En cuanto a la especie *Eugenia winzerlingii* no se han encontrado reportes de propagación por semilla, sin embargo, existen reportes de fechas de floración y fructificación que permite establecer programas para la recolección de las semillas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Fechas de floración y fructificación de la especie *Eugenia winzerlingii*.

Lugar de colecta	Fructificación	Floración	Fecha de colecta
Carmen, Campeche	Fruto chicos morados (abundancia regular)		10-05-83
Othón P. Blanco, Quintana Roo	Fruto rojos oscuro (abundancia escasa)		20-05-83
Ocosingo, Chiapas	Frutos verdes		07-12-84
Othón P. Blanco, Quintana Roo	Frutos rojos (abundancia regular)		16-05-84
Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo		Flores umbeladas axilares	17-01-84
Othón P. Blanco, Quintana Roo	Frutos verdes (abundancia regular)		22-11-84
Ocosingo, Chiapas	Frutos verdes		25-02-85
Champutón, Campeche		Flores café rojizo	02-12-96
Champutón, Campeche	Frutos verdes		28-01-99
Othón P. Blanco, Quintana Roo	Frutos verdes y purpura oscuro		29-04-99
Petén, Guatemala	Frutos rojizos		20-02-00

Lugar de colecta	Fructificación	Floración	Fecha de colecta
Othón P. Blanco, Quintana Roo	Frutos verdes	Flores color crema (abundancia regular)	05-12-01
Petén, Guatemala			18-03-02
Champotón, Campeche		Pedúnculos de las flores color crema	10-11-10

En cuanto a la reproducción vegetativa, existen pocos reportes del género *Eugenia* y estos han mostrado poco éxito (Picón, 1985). Sin embargo, es posible reproducir por esquejes los miembros de la familia Myrtaceae. Por ejemplo, se ha reportado a la especie *Psidium guajava* L. con mucho éxito en el enraizamiento de esquejes, el cual fue mayor al 75% cuando se aplicó 2000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (Zietemann y Roberto, 2007; Yamamoto *et al.*, 2010).

Con estos antecedentes se plantea en el presente capítulo la exploración de la propagación de la planta *E. winzerlingii* por semilla y vegetativa (estacas) para eventualmente contar con materia prima y continuar las investigaciones con esta especie.

4.1 Objetivos

- Evaluar el efecto del diámetro del tallo en el enraizamiento de los esquejes de *E. winzerlingii*.
- Medir el efecto de la aplicación de AIB en talco en el enraizamiento y número de brotes de los esquejes de *E. winzerlingii*.
- Evaluar el efecto del ácido geberélico en la germinación de semillas de tres estados de desarrollo de *E. winzerlingii*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Propagación de la especie *Eugenia winzerlingii*

4.2.1.1 Propagación vegetativa

La colecta de ramas se realizó el dos de marzo de 2011 en la reserva ecológica de Calakmul a 10 Km al sur de la localidad Xcan-ha. Las plantas no presentaban flores ni frutos. Las ramas semileñosas de la parte media de las plantas se cortaron, deshojaron y transportaron al vivero del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Para el establecimiento del experimento, se cortaron estacas de aproximadamente 16 cm de largo y se seleccionaron dos grosores de estaca (1.18 ± 0.15 y 1.88 ± 0.09 cm). Las estacas se colocaron en un recipiente con agua para evitar la deshidratación. Posteriormente, se eliminó una parte de la corteza (en la base del tallo) en una yema axilar donde posteriormente se aplicó Raizone® (0.06% de ácido indol butírico) en talco (Yamamoto *et al.*, 2010). Previamente se preparó el sustrato (sustrato:tierra:arena, 1.0-1.5-0.5) y se hidrató hasta capacidad de campo y se procedió a llenar las charolas de 36 cavidades (400 cm³). Las estacas se sembraron a 2 cm de profundidad.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con cuatro réplicas. Se sembraron un total de 64 estacas. Un total de cuatro tratamientos se evaluaron: estacas gruesas (1.88 ± 0.09 cm) con AIB (0.06%) y sin AIB, y estacas delgadas (1.18 ± 0.15 cm) con AIB (0.06%) y sin AIB. Cada unidad experimental consistió de cuatro esquejes.

Las charolas con los esquejes se dejaron en condiciones de invernadero con una humedad relativa de $64.2 \pm 7.8\%$, temperatura de 35.1 ± 2.3 °C y fotoperiodo natural. El conteo de esquejes prendidos (%) y el número de brotes (%) por esquejes se realizó a los 60 días después de la siembra. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey ($p = 0.05$) se realizó con el paquete estadístico SAS v. 8.1.

4.2.1.2 Propagación por semilla

Los frutos se colectaron en la reserva ecológica de Calakmul a 10 Km al sur de la localidad Xcan-ha, en el mes de marzo. Las ramas con frutos se transportaron al invernadero del CICY donde se cosecharon los frutos verdes, macizos y maduros, posteriormente se colocaron en cajas de cartón para secarlas por un periodo de tres días bajo sombra (Sano *et al.*, 1995).

Las semillas se sembraron 20 días después de la cosecha en charolas de plástico con sustrato (cosmocel) a una profundidad de 1 cm. El experimento se estableció con nueve tratamientos y cinco réplicas (10 semillas por réplica), para esto, las semillas maduras, macizas y verdes se dividieron en tres lotes (50 semillas por lote). El primer lote de semillas maduras, macizas y verde se trataron con ácido giberélico (Biogib 10ps, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 72 horas, el segundo lote fue tratado con ácido giberélico (Biogib 10ps, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 48 horas y el tercer lote no se le aplicó ningún tratamiento (control). El experimento se estableció en condiciones de invernadero con una humedad relativa de $64.2 \pm 7.8\%$, temperatura de 35.1 ± 2.3 °C y fotoperiodo natural.

El efecto de los tratamientos se determinó por el porcentaje de germinación de las semillas de *E. winzerlingii* a los 75 días después de la siembra. El análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$) se realizó con el paquete estadístico SAS ver. 8.1.

4.3 Resultados

4.3.1. Resultados de la propagación asexual de *Eugenia winzerlingii*

Para la propagación de los esquejes de *E. winzerlingii* se evaluaron dos diámetros de tallo (1.18 ± 0.15 y 1.88 ± 0.09 cm) y la aplicación de AIB (0.6%).

En la evaluación a los 60 días después del tratamiento, los esquejes presentaban hojas bien formadas de color verde. Los mejores resultados se observaron en el tratamiento de estacas delgadas con raizone (EDA, 70%). El tratamiento estacas delgadas sin raizone® (ED) presentó la más baja supervivencia (35%, Figura 10). En la prueba de rango múltiple no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.5$) entre los tratamientos de estacas gruesas con AIB (EGA) y estacas gruesas sin AIB (EG).

En la evaluación a los 90 días después del trasplante, los esquejes de los cuatro tratamientos presentaron lesiones necróticas en las hojas y en los brotes.

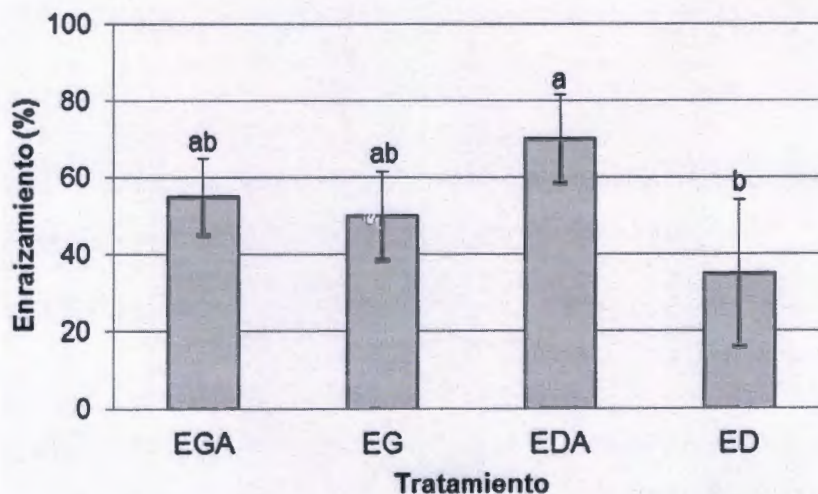


Figura 10. Supervivencia de esquejes de *Eugenia winzerlingii* a los 60 días después de la siembra. EGA: estacas gruesas con AIB, EG: estacas gruesas sin AIB, EDA: tallo medio con AIB, ED: tallo medio sin AIB. Columnas que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).



Figura 11. Propagación vegetativa por esqueje de *Eugenia winzerlingii*. a) Tallos gruesos, b) Tallos medio, c) Brotes de 30 días después de la siembra de los esquejes, d) Hojas bien formadas después de 45 días de la siembra de los esquejes.

4.3.2. Resultados de la germinación de semillas de *Eugenia winzerlingii*

Los frutos de *E. winzerlingii* se colectaron a principios del mes de marzo. Para determinar la viabilidad de las semillas se realizó una prueba de germinación de las semillas extraídas de frutos maduros, macizos y verdes. En este caso, se evaluó el efecto del ácido giberélico (250 mg ml^{-1}) en dos tiempos de exposición (48 y 72 h) para cada estado fisiológico de la semilla.

La germinación de las semillas no mostró diferencia estadística significativa ($p \geq 0.5$, Figura 12) por efecto de la aplicación de ácido giberélico, esto significa que las

semillas tienen una alta capacidad de germinación (> 80%), así también se puede observar que ninguno de los estados fisiológicos de las semillas presenta problemas de germinación (Figura 13).

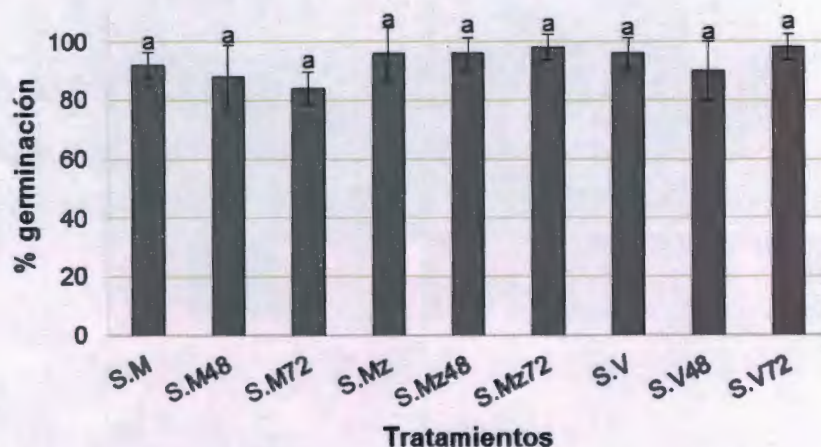


Figura 12. Efecto de la aplicación de ácido giberélico ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) en dos tiempos de exposición (24 y 72 h) en el porcentaje de germinación de semillas maduras, macizas y verde de *Eugenia winzerlingii*. S.M= S. maduras, S.M48= S. maduras 48 h de GA3, S.M72= S. maduras 72 h de GA3, S.Mz = S. maciza, S.Mz48= S. maciza 48 h de GA3, S.M72= S. maciza 72 h de GA3, S.V= S. verdes, S.M48= S. verdes 48 h de GA3, S.M72= S. verdes 72 h de GA3. Columnas que no comparten al menos una literal son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de rango múltiple Tukey ($p < 0.05$).



Figura 13. a) Plántula de *Eugenia winzerlingii* a los 40 días después de la siembra de la semilla, b) Semillas maduras de *Eugenia winzerlingii* barrenados por un coleóptero.

4.4 Discusión

Extractos de la planta *E. winzerlingii* presentaron actividad insecticida y disuasoria contra los insectos plaga *M. persicae* y *B. tabaci*. Esta planta es endémica de la Península de Yucatán y se encuentra distribuida dentro de áreas protegidas, por tal razón un aspecto muy importante es explorar vías de propagación para asegurar el abastecimiento de biomasa. La familia Myrtaceae se puede propagar exitosamente tanto sexual (semilla) como asexualmente (estacas). Por lo consiguiente, se evaluó ambas vías de reproducción de *E. winzerlingii*.

La colecta de estacas se realizó a principios del mes de marzo, como lo reporta Tavares y colaboradores (1995), quienes obtuvieron los mejores resultados en la supervivencia de esquejes herbáceos de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). Sin embargo, en este caso la propagación por estacas no fue exitosa; es importante mencionar que las estacas formaron brotes y hojas 15 días después de la siembra, pero, a los 90 días, las hojas se marchitaron y necrosaron. No hubo la formación de callo, ni raíces. Esto pudo deberse a la alta cantidad de cinetina y adeninas que inducen la producción de yemas y la emisión de brotes inhibiendo la formación de las raíces (Kersten, 1987). Hartmann y Kester (1990) afirman que la capacidad de enraizamiento de algunas especies puede ser alterada mediante la eliminación de yemas, porque existe una relación entre el enraizamiento y número de yemas en las ramas (Tavares *et al.*, 1995). Por otra lado, la supervivencia de las estacas también está influenciado por la fecha de colecta (estación del año) ya que determina las condiciones fisiológicas (concentración de auxinas y carbohidratos) de la planta colectada (Quintero *et al.*, 2008).

En la reproducción por semilla se observó alta germinación (Figura 13), lo cual coincide con el trabajo realizado por Souza y colaboradores (2001) donde encontraron 92% de germinación en *Eugenia dysenterica*, así como en trabajos más recientes en los que se reporta una germinación entre 81 y 92% para *E. dysenterica* (Ferreira *et al.*, 2006; Mendes y Mendonça, 2012).

Las plantas provenientes de semillas presentan variabilidad genética (Rajashekar *et al.*, 2012), lo que puede llevar a variación en su contenido metabolito; y por consecuencia de la actividad biológica, esta variación puede ser una ventaja en el control de plagas, ya que los insectos no se encontrarán constantemente en la misma presión de selección y por consecuencia no generarán resistencia. Por otra parte, para

la comercialización de productos orgánicos (extractos de plantas) es necesario establecer parámetros estandarizados, esto lleva a la búsqueda de plantas elite que produzcan los principios activos de manera constante y sin variaciones drásticas en su concentración, lo que nos permite garantizar la efectividad del producto en el campo.

En general, estos resultados son muy importantes para estudios en un futuro cercano, ya que se tiene a la disposición plantas de *E. winzerlingii* provenientes de semilla, donde se puede evaluar y seleccionar plantas elite que sobre produzcan los principios activos contra *M. persicae* y *B. tabaci*. Sin embargo, es necesario establecer un método de propagación asexual que garantice la reproducción de estas plantas elite, con el objetivo de utilizar los extractos en una agricultura tradicional o intensiva dentro de un manejo integrado de plagas. Todo esto nos permitirá, darle un valor agregado a esta especie endémica para su conservación y uso sustentable.

4.5 Conclusiones

Los esquejes de diámetro medio con la aplicación de AIB presentaron la mayor sobrevivencia (70%) a los 60 días de aplicado el tratamiento, sin embargo a los 90 días, los brotes se necrosaron.

Se recomienda evaluar otros métodos de propagación y otras concentraciones de AIB con estacas colectadas en distintas estaciones del año.

La propagación por semilla es un buen método de reproducción de *E. winzerlingii*, ya que se obtiene alto porcentaje de germinación sin la utilización de ácido giberélico. Además, las semillas pueden extraerse de cualquiera de los tres estados fisiológicos de los frutos.

El trabajo exploratorio de la propagación de *E. winzerlingii* indica la necesidad de continuar en la búsqueda de plantas elite productoras de principios activos constantes para continuar en el desarrollo de un producto comercial sustentable.

4.6 Referencia

- Anjos, A. M. G. (1998). Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçáboi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia* McVaugh - Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas. 78 p.
- Bülöw, J. F. W., R. Carmona y T. V. Parente (1994). Armazenamento e tratamento de sementes de pitangavermelha-do-cerrado (*Eugenia calycina*). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 29, 961-970.
- Duarte, E. F., R. V. Naves, J. D. Borges y N. N. R. Guimarães (2006). Germinação e vigor de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* MART. ex DC.) em função de seu tamanho e tipo de coleta. Pesquisa Agropecuária Tropical, 36, 173-179.
- Ferreira, D. E., R. V. Naves, J. D. Borges y N. N. R. Guimarães (2006). Germinação e vigor de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* MART. ex DC.) em função de seu tamanho e tipo de coleta. Pesquisa Agropecuária Tropical, 36, 173-179.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester. (1990). Propagación de plantas: principios y prácticas. México: Ed Continental, 760 p.
- Kersten, E. (1987). Propagação vegetativa dos citros por métodos não convencionais. Piracicaba: ESALQ. 20 p.
- Mendes, A. M. S. y M.S. Mendonça (2012). Tratamentos pré-germinativos em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata*). Revista Brasileira de Fruticultura, 34, 921-929.
- Picón, B. C. (1985). Métodos de injertacion y productos enraizantes en araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). Iquitos, Perú: UNAP/FA. 52 p.
- Quintero, S. A. I., D. A. R. Trejo, E. G. Nolasco y R. B. Beas (2008) Propagación vegetativa de la vara de perilla (*Symphoricarpos microphyllus* H.B.K.). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 14, 21-26.
- Rajashekar, Y., N. Bakthavatsalam y T. Shivanandappa (2012). Botanicals as Grain Protectants, Psyche: A Journal of Entomology, doi:10.1155/2012/646740.
- Sano, S. M., C. E. L. Fonseca, J. F. Ribeiro, F. M. Oga y A. J. B. Luiz (1995). Leafing, flowering, fruiting and inicial growth of cagaitera, in Planaltina, de Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 30, 5-14.
- Sharma, V. K. (2005). Propagation of Plants. Indus Publishing Company, Pp: 13, 14 y 15.
- Souza, E. R. B., I. F. Carneiro, R. V. Naves, J. D. Borges, W. M. Leandro y L. J. Chaves (2001). Emergência e crescimento de cagaita (*Eugenia dysenterica*

- DC.) em função do tipo e do volume de substratos. Pesquisa Agropecuária Tropical, 31, 89-95.
- Tavares, M. S. W., E. Kersten y F. Siewerdt (1995). Efeitos do ácido indolbutírico e da época de coleta no enraizamento de estacas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) Scientia Agricola, (Piracicaba), 52, 310-317.
- Yamamoto, L. Y., R. S. Borges, M. Sorace, B. F. Rachid, J. M. F. Ruas, O. Sato, A. M. Assis y S. R. Roberto (2010). Enraizamento de estacas de *Psidium guajava* L. 'Século XXI' tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco e álcool . Ciência Rural, Santa Maria, 40, 1037-1042.
- Zietemann, C. y S. R. Roberto (2007). Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. paluma e século XXI. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 29, 031-036.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones generales

En los últimos treinta años se han publicado miles de estudios de productos naturales derivados de plantas en la búsqueda de alternativas naturales para el control de insectos plaga. Sin embargo, un tercio de estos estudios no aportan indicios suficientes para el desarrollo de un producto natural para la agricultura convencional o para el uso de los pequeños agricultores. Esto se debe principalmente a la falta de reproducibilidad de los resultados, así como a la falta de caracterización o datos químicos. Este panorama señala que los estudios deben realizarse de manera multidisciplinaria, integrando diferentes enfoques para el desarrollo sustentable de un producto natural para la agricultura convencional o hacia la utilización de los extractos en una agricultura de subsistencia.

En el presente trabajo se desarrolló un estudio integral de la planta *E. winzerlingii*, cuyo trabajo experimental incluyó cuatro etapas principales, de las cuales las conclusiones son las siguientes:

El esquema de extracción con disolventes de polaridad ascendente, muestra que la actividad insecticida y disuasoria se concentra en el extracto de acetato de etilo, el cual presentó la menor CL_{50} y CE_{50} , contra los organismos evaluados. El extracto etanólico residual no muestra actividad significativa.

La persistencia de la actividad biológica de las tres recolectas de las hojas de *Eugenia winzerlingii* confirman la biosíntesis constante de los principios activos de esta especie.

Todas las fracciones activas provenientes del extracto hexánico y de acetato de etilo de *E. winzerlingii* contienen ácido decanoico, ácido undecanoico y ácido dodecanoico, los cuales causan una alta actividad disuasoria contra *M. persicae* y *B. tabaci*. El ácido undecanoico presentó la mayor actividad contra los adultos de *B. tabaci* y el ácido dodecanoico contra *M. persicae*. Se concluye que los ácidos grasos son los causantes de la actividad disuasoria de las fracciones hidrofóbicas activas de *E. winzerlingii* contra los dos insectos fitófagos.

La extracción de los metabolitos activos de las plantas debe ser acompañada de la reproducción de la especie para su utilización sustentable, particularmente si son plantas endémicas. La planta *E. winzerlingii* endémica de la Península de Yucatán,

tiene un alto éxito reproductivo por semilla, sin embargo, es necesario establecer un método de propagación asexual para la propagación de plantas elite que sobreproduzcan los principios activos.

De manera integral, los resultados del presente estudio resaltan la factibilidad de usar extractos de *E. winzerlingii* para el manejo de *Bemisia tabaci* y *Myzus persicae*. Ambos insectos fitófagos cosmopolitas son catalogados muy importantes a nivel mundial, ya que son vectores eficientes de diferentes virus, que causan pérdidas en la producción de hasta el 100%.

Este trabajo aporta un valor agregado a la especie endémica del sureste de México *Eugenia winzerlingii*, lo cual contribuye a su conocimiento fitoquímico y propiedades biológicas para hacer de ella un recurso genético importante para el desarrollo de productos biotecnológicos.

5.1 Perspectivas

El presente trabajo es una aportación que debe ser continuada desde diversos aspectos, por lo que se enlistan una serie de puntos a atender:

- Los estudios de citotoxicidad, ecotoxicidad y residualidad de los extractos y ácidos grasos de *E. winzerlingii* son recomendables de realizar para verificar su inocuidad.
- La extracción de los metabolitos activos hidrofóbicos debe ser optimizada y se recomienda evaluar otros métodos como el de ultrasonido, y con disolventes supercríticos.
- Realizar colectas seriadas de la planta *E. winzerlingii* con el fin de posteriormente determinar la época del año con la mayor producción de metabolitos activos.
- Los metabolitos activos de los extractos hidrofóbicos deben ser cuantificados.
- Realizar estudios sinérgicos con mezclas de los ácidos grasos para determinar el efecto en los insectos plaga.
- Identificar los metabolitos hidrofílicos activos del extracto etanólico y acuoso.
- Verificar la actividad y la producción de los metabolitos activos en plantas sembradas *ex situ* y establecer plantas élites que sobreproduzcan los principios activos.

- Validar la actividad en invernadero y campo para elaborar un formulado comercial, o proponer la utilización de los extractos en una agricultura de subsistencia.
- El espectro de acción de los extractos y principios activos de *E. winzerlingii* puede incrementarse al evaluarlos contra otros patógenos.
- Evaluar otros métodos de propagación asexual, para asegurar la reproducción de plantas élite que produzcan en altas concentraciones los metabolitos activos.

