



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN DE CARDENÓLIDOS DE  
*Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae)  
SECUESTRADOS POR *Syntomeida epilais*  
(Lepidoptera: Arctiini)**

Tesis que presenta

**KAERI YUKEI JIMÉNEZ DOMÍNGUEZ**

En opción al título de

**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México  
2021



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Kaeri Yukei Jiménez Domínguez** titulado “**Identificación de cardenólidos de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) secuestrados por *Syntomeida epilais* (Lepidoptera: Arctiini)**”, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología en Biotecnología de Productos Naturales**, en el Laboratorio de Química Orgánica del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**, bajo la dirección del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. María Azucena Canto Aguilar**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de noviembre de 2021



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos 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.



---

Kaeri Yukei Jiménez Domínguez



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Identificación de cardenólidos de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) secuestrados por *Syntomeida epilais* (Lepidoptera: Arctiini) en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. María Azucena Canto Aguilar.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca de maestría No. 947953.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por creer en mí, más de lo que yo me creo capaz.

A los Dres. Horacio Ballina e Irving May y a la Dra. María Azucena Canto Rodríguez por el acompañamiento durante la maestría y los enriquecedores debates.

A la técnica QBB. Karlina García Sosa por guiarme paso a paso.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Carlos, Stephy, Luis, Mónica, Maricarmen, Jimmy, Lina, Juan Pablo.

A mi familia, pilares de mi vida.

A mis amigos, mis redes de apoyo.



## **DEDICATORIAS**

A mi mama Silvia, la mujer más fuerte y valiente que he conocido.



*There are forces friendly to our struggle to birth ourselves as an intelligent species. But they are quiet and shy; they are to be sought, not in the arrival of alien star fleets in the skies of earth, but nearby, in wilderness solitude, in the ambience of waterfalls, and yes, in the grasslands and pastures now too rarely beneath our feet. No one yet understand the mysterious intelligence within plants or the implications of the idea that nature communicates in a basic chemical language, that is unconscious but profound.*

-Terence Mckenna, Food of the Gods, 1992.

*Organic chemistry lies at the heart of biotic interaction.*

-Jerrold Meinwald, 2009.



---

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Diversidad de defensas químicas de las plantas.....	3
1.2 “Arsenal químico” en Apocynaceae.....	4
1.2.1 Cardenólidos en Apocynaceae.....	6
CAPITULO II.....	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
CAPITULO III.....	30
CAPITULO IV.....	37
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	38
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	42
5.1. CONCLUSIONES.....	42
5.2. PERSPECTIVAS.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	47

---

**LISTADO DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1</b> Estructuras de metabolitos secundarios de defensa vegetal seleccionados de varias clases químicas.....	4
<b>Figura 1.2</b> Clasificación de los glicósidos cardiacos de acuerdo al anillo lactónico.....	7
<b>Figura 1.3</b> Núcleos esteroidales presentes en cardenólidos de Apocynaceae.....	8
<b>Figura 1.4</b> Diferentes restos de azúcares de cardenólidos identificados en Apocynaceae.....	9
<b>Figura 1.5</b> Estructuras químicas de los cardenólidos secuestrados por <i>Syntomeida epilais</i> de su planta hospedera, <i>Nerium oleander</i> .....	13
<b>Figura 1.6</b> Áreas de distribución de <i>Pentalinon andrieuxii</i> y <i>Pentalinon luteum</i> .....	15
<b>Figura 1.7</b> Morfología de <i>P. andrieuxii</i> .....	16
<b>Figura 1.8</b> Fases de <i>Syntomeida epilais</i> .....	17
<b>Figura 1.9</b> Área de distribución de <i>Syntomeida epilais</i> .....	18
<b>Figura 1.10</b> Cardenólidos aislados de <i>Pentalinon luteum</i> .....	19
<b>Figura 2.1.</b> Cría en cautiverio de <i>Syntomeida epilais</i> .....	27
<b>Figura 3.1</b> Perfiles cromatográficos por CCD de extractos crudos y fracciones semipurificadas del extracto de hojas y el látex de <i>Pentalinon andrieuxii</i> y el extracto metanólico de <i>S. epilais</i> .....	31
<b>Figura 3.2</b> Perfiles cromatograficos por CCD de fracciones obtenidas en la purificacion de KP-10B y el extracto de <i>S. epilais</i> .....	32
<b>Figura 3.3</b> Esquema simplificado de la reacción de hidrólisis ácida para la escisión de azúcares de cardenólidos.....	32
<b>Figura 3.4</b> Perfiles cromatográficos por CLAR del producto de hidrolisis ácida de la fracción de polaridad media-baja del látex de <i>P. andrieuxii</i> (KP-33A) (perfil azul) con el perfil del mismo producto enriquecido con 1) gitoxigenina y 2) oleandrigenina (perfil negro).....	33

---

<b>Figura 3.5</b> Perfil cromatográfico por CCD de la purificación de la fracción de polaridad media-baja del látex (KP-33A).....	34
<b>Figura 3.6</b> Perfiles cromatográficos por CCD de la purificación de la fracción de polaridad media-baja del látex (KP-33A) y el extracto metanólico de <i>S. epilais</i> (KP-15) en dos diferentes sistemas de elución.....	35
<b>Figura 3.7</b> Perfil cromatográfico por CLAR de la hidrólisis ácida del extracto metanólico de <i>Syntomeida epilais</i> alimentado con <i>P. andrieuxii</i> (KP-15) (perfil azul) con el perfil del mismo producto enriquecido con oleandrogenina y gitoxigenina (perfil negro).....	36
<b>Figura 4.1</b> Cardenólidos probablemente producidos por <i>P. andrieuxii</i> con estructuras de tipo urechitoxina y 16-deacetil-urechitoxina.....	38
<b>Figura 4.2</b> Larvas de <i>S. epilais</i> desactivando laticíferos de plantas vivas de <i>P. andrieuxii</i> .....	40
<b>Figura 5.1</b> Individuos de <i>Trigona</i> sp. colectando látex de los cortes ocasionados en <i>P. andrieuxii</i> para la extracción del látex y de las heridas en las flores causadas por <i>Xylocopa</i> sp. al robar néctar.....	43
<b>Figura 5.2</b> <i>Xylocopa</i> sp. robando néctar de las flores de <i>P. andrieuxii</i> .....	44

**LISTADO DE TABLAS**

**Tabla 1.4** Categorías taxonómicas de *S. epilais*.....17

**Tabla 2.1** Datos de colecta de las plantas de *Pentalinon andrieuxii*.....24

**Tabla 2.2** Rendimiento de los extractos crudos y fracciones sometidas a hidrólisis  
ácida.....28



**ABREVIATURAS**

Ma	Millones de años
Hx	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
CLAR	Cromatografía líquida de alto rendimiento
CCD	Cromatografía en capa delgada
CLV	Cromatografía líquida al vacío



**RESUMEN**

Las plantas han desarrollado una diversidad de defensas químicas que cubren casi todas las clases de metabolitos secundarios y que representan una barrera importante contra la herbivoría. Ciertos insectos herbívoros especializados pueden hacer uso de estos metabolitos ingiriéndolos y almacenándolos (secuestro) en su tejido corporal o tegumento para su propia defensa. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la identidad estructural de el o los cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* y establecer su presencia en *Syntomeida epilais*. *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) es una enredadera nativa de la Península de Yucatán que es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de leishmaniosis. El análisis por CLAR de los productos de hidrólisis ácida de las fracciones semipurificadas obtenidas de las hojas y el látex de *P. andrieuxii*, así como del extracto crudo de las polillas en estado adulto de *S. epilais*, mostró la presencia de las geninas de cardenólidos, gitoxigenina y oleandrigenina. Estos resultados permitieron establecer la presencia de cardenólidos de tipo urechitoxina en *P. andrieuxii* y el secuestro de este tipo de metabolitos por parte de *S. epilais*.

---



**ABSTRACT**

Plants have evolved a diversity of chemical defenses that cover almost all classes of secondary metabolites and represent an important barrier against herbivory. Certain specialized herbivorous insects can make use of these metabolites by ingesting and storing them (sequestration) in their body tissue or integument for self-defense. This research aimed to determine the structural identity of the cardenolide(s) in *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) and to establish their presence in *Syntomeida epilais* (Lepidoptera). *P. andrieuxii* is a native vine of the Yucatan Peninsula that is used in traditional Mayan medicine for the treatment of leishmaniasis. HPLC analysis of the acid hydrolysis products of the semi-purified fractions obtained from the leaves and latex of *P. andrieuxii*, as well as the crude extract of the adult moths of *S. epilais*, indicated the presence of cardenolide genins, gitoxigenin and oleandrigenin. These results allowed establishing the presence of urechitoxin-type cardenolides in *P. andrieuxii* and sequestration of this type of metabolites by *S. epilais* for their protection.

---



## INTRODUCCIÓN

La interacción planta-herbívoro es una de las más extendidas y complejas entre los organismos. Los patrones de diversificación de plantas e insectos herbívoros se originaron durante el Paleozoico, hace 300-400 Ma, cuando surgieron las primeras plantas vasculares y artrópodos (Price, 2002; Scott, 1992). Durante el Paleozoico tardío y el Mesozoico temprano, aparecieron importantes grupos de insectos fitófagos pertenecientes a los órdenes Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera. Luego, alrededor de 100 Ma más tarde, las angiospermas emergieron y se diversificaron ampliamente en todo el mundo (Kariñho-Betancourt, 2017; Niklas, 1983). El modelo de "carrera armamentista" (Dawkins y Krebs, 1979) describe una de las formas en las que puede ocurrir la coevolución (Thompson, 1994), y establece cómo la selección recíproca puede llevar a las plantas a escapar de sus herbívoros generando nuevas defensas, a través de mutaciones e intensificando su arsenal químico con el tiempo (Becerra, 2015). En consecuencia, los herbívoros han cambiado sus constituyentes moleculares, fisiológicos y etológicos en respuesta al mecanismo de defensa químico de las plantas (Prado y Demarco, 2018), a tal grado, que muchos metabolitos secundarios disuasorios utilizados por las plantas para su defensa se han convertido en atrayentes alimenticios para los herbívoros especializados (Opitz y Muller, 2009; Blum, 1992). Algunos insectos especializados secuestran los metabolitos secundarios defensivos de las plantas y los utilizan para su propia defensa química. Los insectos pueden secuestrar selectivamente una toxina vegetal de varias que pueden estar disponibles desde el punto de vista dietético, i.e., se sabe que la capacidad de secuestrar y almacenar cardenólidos de plantas hospederas difiere entre las especies de *Danaus* Kluk, 1780. En el estudio de Mebs *et al.* (2012) se reporta que las larvas de dos especies de Danainae Boisduval, 1833, *D. plexippus* y *D. gilippus* Cramer, 1775, respectivamente, criadas en una planta misma planta huésped (*Asclepias curassavica* L.), secuestraron los principales cardenólidos del complejo calotropina/calactina. Sin embargo, *D. gilippus* almacenó 10–12 veces menos calotropina que *D. plexippus*, lo que sugiere un secuestro selectivo de calactina por parte de esta especie. En el caso de la polilla neotropical *Syntomeida epilais* Walker (Lepidoptera: Arctinii), la selectividad de cardenólidos parece depender de la naturaleza del hospedero. *S. epilais* es una polilla conocida por ser una especialista en alimentarse de las especies de Apocynaceae que contienen cardenólidos, específicamente por alimentarse en estado larval de las hojas de *Nerium oleander* L. (adelfa) (Rothschild y Reichstein, 1973), un arbusto nativo de la región mediterránea del cual secuestra los cardenólidos oleandrina y nerigósida. Recientemente, se reportó a la enredadera neotropical *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin

(Apocynaceae) como un nuevo hospedero natural de *S. epilais*. Sin embargo, y aun cuando el conocimiento fitoquímico de *P. andrieuxii* no reporta la presencia de oleandrina y nerigósida, Villegas (2019) reportó la presencia de la genina oleandrogenina en el extracto de hojas de *P. andrieuxii*, dicha genina constituye el mismo núcleo esteroidal de los cardenólidos oleandrina y nerigósida. Por lo tanto, *S. epilais* podría secuestrar diferentes cardenólidos de cada una de sus plantas hospederas (Villegas, 2019). Para comprender la interacción entre las plantas que contienen cardenólidos y los insectos herbívoros, es indispensable la identificación de los productos de defensa en las plantas. Dada la producción de diferentes cardenólidos en las especies hospederas de *S. epilais*, aún no se han establecido las características químicas de los cardenólidos que busca la polilla para seleccionar su planta huésped. Con base en lo anterior, en este trabajo se pretende determinar la identidad estructural de el o los cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* y establecer su presencia en *Syntomeida epilais*.

## CAPÍTULO I

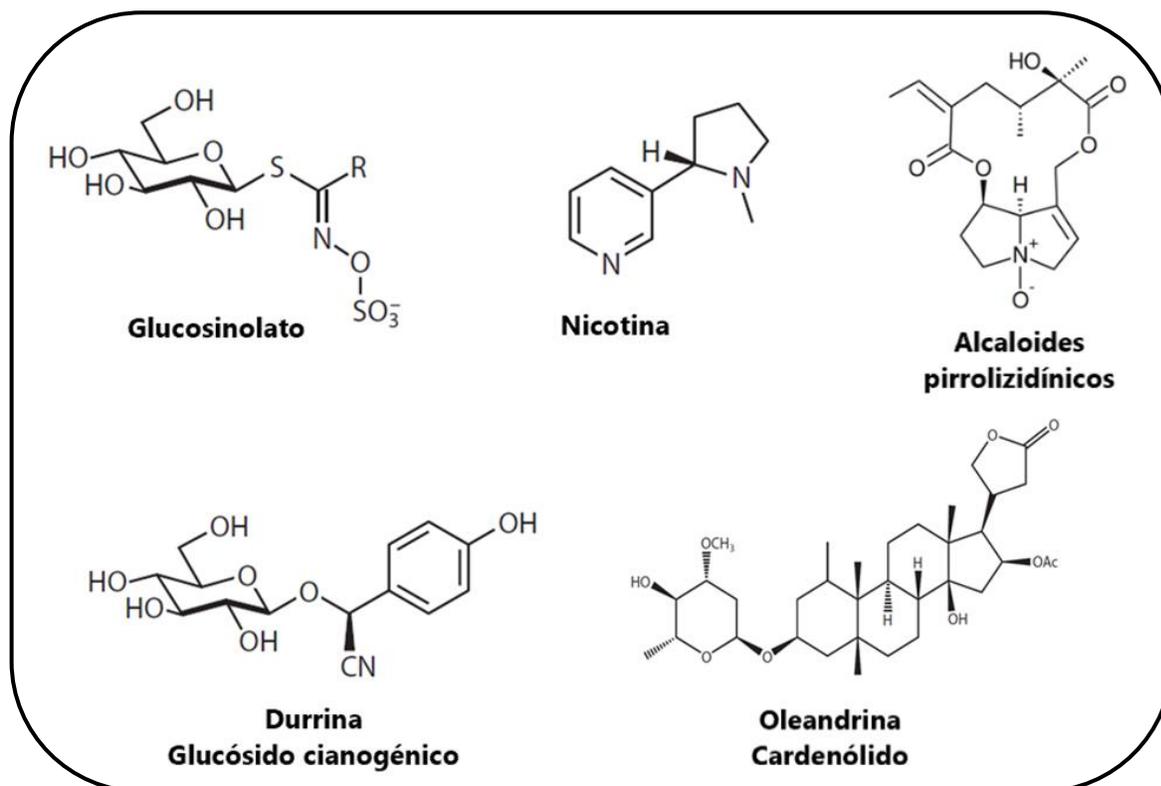
### 1. ANTECEDENTES

#### 1.1 Diversidad de defensas químicas de las plantas

A medida que las plantas terrestres adquirieron complejidad e independencia del agua para la reproducción, las relaciones con los animales se diversificaron, proporcionando beneficios y también desafíos para las plantas (Pacini et al., 2008). Las plantas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios que han evolucionado para una diversidad de funciones que van desde permitir a las plantas hacer frente a presiones abióticas (i.e., Radiación UV, sequía, calor) (Ramakrishna y Ravishankar, 2011), mediar interacciones como metabolitos de defensa contra herbívoros (Mithöfer y Boland, 2012) y microorganismos patógenos (Bais *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2010), para la atracción de polinizadores o animales dispersores de frutos (Kessler *et al.*, 2008), hasta servir como compuestos de señalización (Karban *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2006). Estas funciones no son de ninguna manera exclusivas: los metabolitos pueden estar involucrados en interacciones con estreses tanto abióticos como bióticos, como se demostró para los isoprenoides volátiles (Vickers et al. 2009). Las plantas han desarrollado una gran cantidad de diferentes defensas químicas que representan una barrera importante para la herbivoría: algunas son constitutivas y otras son inducidas después del ataque y pueden ser provocadas específicamente por ciertos agresores (Leitner *et al.*, 2005; Wittstock y Gershenzon, 2002). Muchos metabolitos secundarios actúan directamente sobre el herbívoro, mientras que otros actúan indirectamente a través de la atracción de organismos de otros niveles tróficos que, a su vez, protegen la planta (Mithöfer y Boland, 2012; Schnee *et al.*, 2006; Kappers *et al.*, 2005; Kessler y Baldwin, 2001). Una enorme diversidad de metabolitos secundarios de las plantas son tóxicos, repelentes o antinutritivos para herbívoros de todo tipo, entre estos se encuentran los glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, cardenólidos, taninos, alcaloides y terpenoides (Figura 1.1) (Mithöfer y Boland, 2012; Bennett y Wallsgrave, 1994).

Los metabolitos secundarios actúan de diversas maneras en los herbívoros, ya sea disuadiendo el ataque o afectando su crecimiento, desarrollo, sobrevivencia, reproducción y respiración (Anaya y Espinosa García, 2006). Muchos fitoquímicos estructuralmente diversos actúan como antinutrientes que interfieren con la biodisponibilidad de los nutrientes modificando químicamente el nutriente, formando complejos menos activos con el nutriente o dificultando la digestión, absorción o utilización del nutriente (Felton y Gatehouse, 1996). Mientras que otros, actúan con frecuencia mediante la interrupción de la membrana, la inhibición del transporte de iones, la

inhibición de los procesos de transducción de señales, la inhibición del metabolismo o la interrupción del control hormonal de los procesos fisiológicos (Mithöfer y Maffei, 2017; Mithofer y Boland, 2012; Wittstock y Gershezon, 2002).



**Figura 1.1** Estructuras de metabolitos secundarios de defensa vegetal seleccionados de varias clases químicas.

## 1.2 “Arsenal químico” en Apocynaceae

Una de las familias más grandes e importantes en las angiospermas, reconocida por ser una rica fuente de metabolitos secundarios bioactivos y tóxicos es la familia Apocynaceae Juss. Por esta razón, muchos de los géneros de la familia como *Rauwolfia* Gled., *Catharanthus* G. Don, *Allamanda* L., *Strophanthus* DC., *Asclepias* L. e *Himatanthus* Willd. ex Schult., son ampliamente utilizados en medicina tradicional en todo el mundo (Wong *et al.*, 2013; Hutchings, 1989; Bisset, 1989; Van Beck *et al.*, 1984; Schultes, 1979) y también como venenos para la caza (González-

Rocha y Rosa Cerros-Tlatilpa, 2015; Juárez-Jaimes et al., 2007; Alvarado-Cárdenas, 2004; Chimal y Corona, 2003). Carl Linnaeus nombró al género *Asclepias* en honor al dios griego de la medicina *Asklepios*, hijo de Apolo, debido a su extenso uso como grupo medicinal de plantas (Quattrocchi, 1999). Mucha atención se ha dirigido a dos aspectos que probablemente hayan resultado de interacciones coevolutivas fuertes: (1) la química secundaria de Apocynaceae, y (2) sus interacciones planta-herbívoro (Fishbein et al., 2017).

Apocynaceae presenta una distribución global con una gran diversidad en los trópicos y subtrópicos y es una familia extremadamente diversa en términos morfológicos y químicos, así como una de las más importantes productoras de látex. Las especies de Apocynaceae son más conocidas por su producción de alcaloides indol mono-terpénicos (i.e., *Rauwolfia* spp.), alcaloides esteroideos (i.e., *Holarrhena* spp.) y cardenólidos (i.e., *Nerium oleander*) (Agrawal et al., 2012; Endress et al., 1990). También producen metabolitos secundarios como esteroides, saponinas y otros triterpenos. Probablemente los más conocidos por su amplio uso en medicina tradicional son los complejos alcaloides indólicos que se encuentran en varias tribus de Rauvolfoideae (Hegnauer, 1989; Kiskurek et al., 1983; Bisset, 1961). En el resto de la familia, los alcaloides indólicos están ausentes, ya que han sido reemplazados principalmente por alcaloides esteroideos y cardenólidos (Endress y Bruyns, 2000; Endress et al., 1990; Hegnauer, 1970). Un tipo de alcaloide menos común, los pirrolizidínicos, se encuentran en especies de cuatro tribus del clado APSA (Apocynoideae Burnett, Periploicoideae Endl., Secamonoideae Endl., Asclepiadoideae Burnett) (Morales et al., 2017; Colegate et al., 2016; Burzynski et al., 2015).

Una de las características que distinguen a Apocynaceae de las demás familias que pertenecen al orden Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl es la presencia de látex. Los laticíferos son células altamente especializadas definidas por su característica anatomía y su distintivo citoplasma, comúnmente conocido como látex. A pesar de su naturaleza inusual, el contenido de los laticíferos tiene una importancia tradicional y contemporánea como toxinas o valiosos bioproductos (Hagel et al., 2008). Algunos metabolitos secundarios y proteínas que se encuentran en el látex de las apocináceas tienen un papel de defensa confirmado o potencial contra los insectos herbívoros (Konno, 2011), debido a que proveen un sitio para almacenar metabolitos de defensa y, a menudo, el látex presenta propiedades similares al pegamento (Hagel et al., 2008).

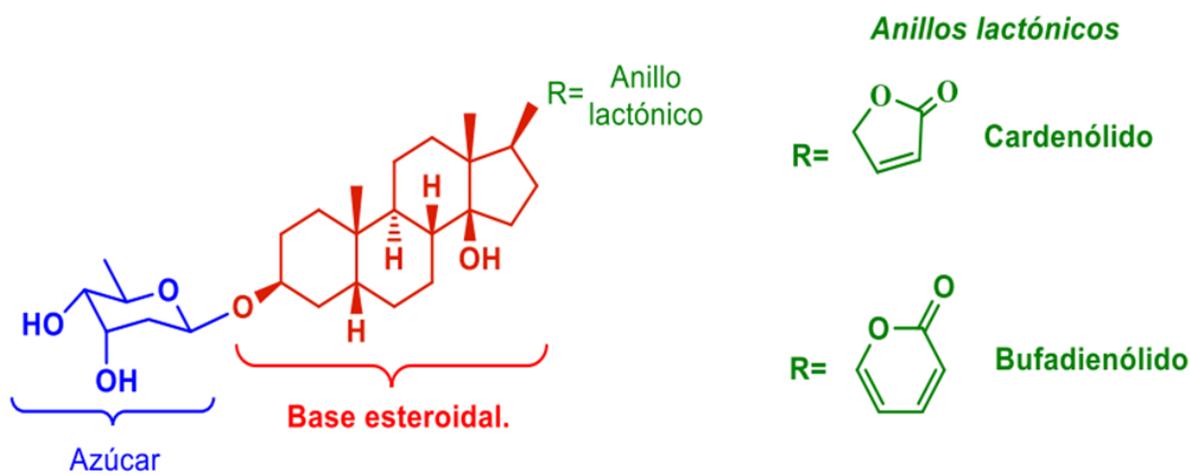
Los primeros sistemas de los que se ha podido inferir que los ingredientes de látex juegan un papel importante en la defensa de las plantas contra los insectos herbívoros son los conformados por plantas de Apocynaceae que poseen látex que contiene cardenólidos y sus herbívoros especialistas. Esta inferencia está respaldada por el comportamiento para eludir el látex de las especies de Apocynaceae en las que se especializan los insectos mediante el corte de venas y zanjas (Dussourd y Denno, 1991). Se ha observado que las mandíbulas de los escarabajos *Tetraopes* sp. Dalman in Schönherr, 1817 quedaban atrapadas y pegadas con látex de *Asclepias* L, cuando este se colocaba artificialmente en las mandíbulas (Dussourd y Eisner, 1987). Además, un gran porcentaje de larvas de mariposa monarca recién eclosionadas fueron encontradas atrapadas por el látex de *Asclepias* sp. (Zalucki et al., 2001a; Zalucki y Brower, 1992). Esta evidencia sugiere que el látex con cardenólidos defiende a las plantas de los insectos herbívoros, tanto química como mecánicamente, al atraparlos, inmovilizarlos e intoxicarlos.

### 1.2.1 Cardenólidos en Apocynaceae

Los cardenólidos en Apocynaceae se distribuyen principalmente en los géneros *Nerium* L., *Thevetia* L., *Cerbera* L., *Apocynum* L. y *Strophanthus* DC. Son toxinas notables debido a que actúan de manera específica inhibiendo la enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa (también llamada bomba sodio-potasio). La Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa es una bomba catiónica unida a la membrana que transporta activamente los iones Na<sup>+</sup> fuera de la célula y K<sup>+</sup> dentro de ella. Los gradientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> establecidos por esta enzima son vitales para una variedad de procesos fisiológicos de los animales que incluyen transducción de señales neuronales, contracción muscular y la osmorregulación (Yang et al., 2019; Lingrel, 2010).

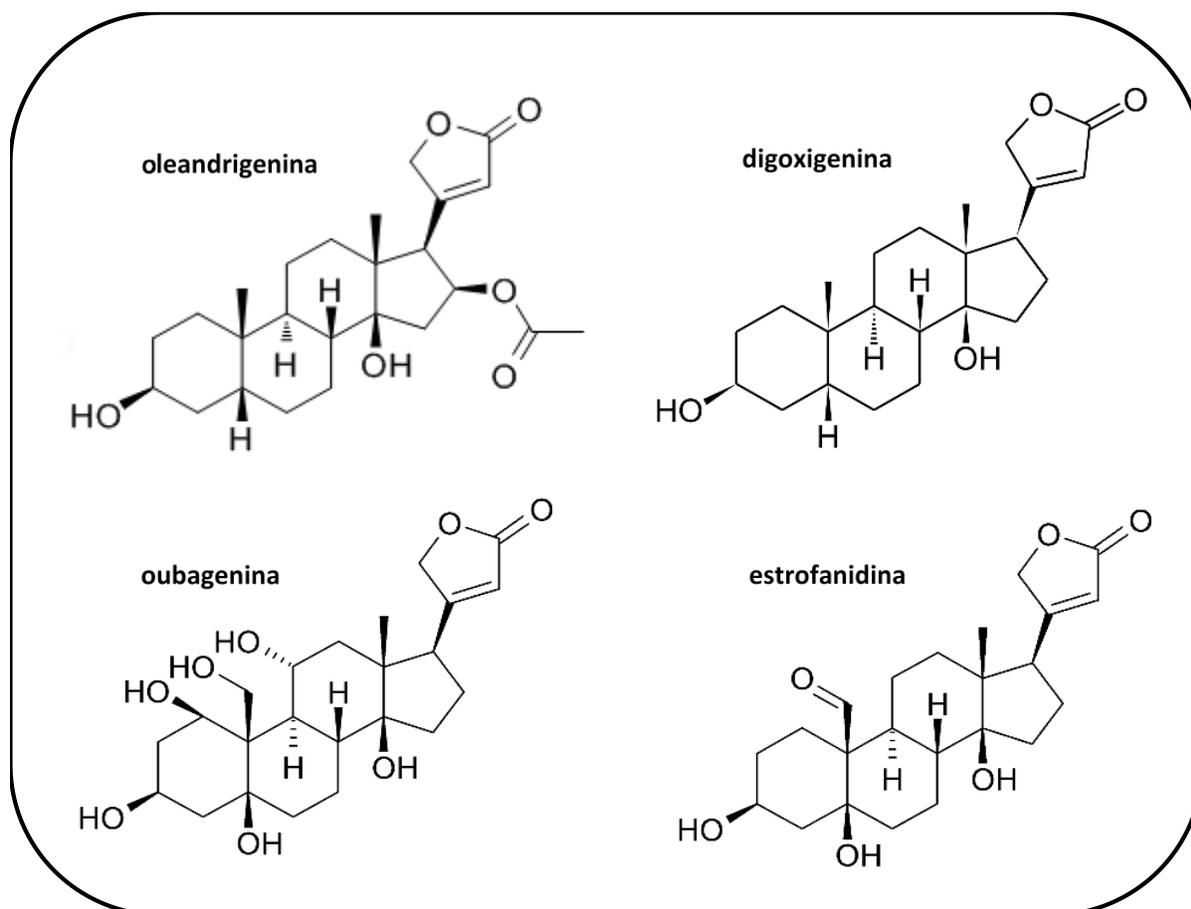
A diferencia de otros glicósidos defensivos, como los glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, etc., los cardenólidos no se activan por escisión del glicósido (Yatime et al., 2011). Los cardenólidos se unen a un sitio conservado que se encuentra en la subunidad  $\alpha$  de la enzima, desde el lado extracelular con el anillo de lactona profundamente insertado en el dominio transmembrana y con el glicósido en dirección al medio extracelular (Yatime et al., 2011; Ogawa et al., 2009). La unión de los cardenólidos a la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa ocurre mediante enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos de la proteína (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa) y los grupos oxhidrilo del cardenólido (De Pont et al., 2009). Adicionalmente, las interacciones de van der Waals y las electrostáticas también pueden desempeñar un papel en la unión de los cardenólidos a la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa (Paula et al., 2005). En dosis terapéuticas, algunos cardenólidos tienen efectos beneficiosos para mejorar la insuficiencia cardíaca a través de un efecto indirecto sobre las

concentraciones de calcio intracelular; sin embargo, en concentraciones más altas tiene efectos tóxicos, que pueden ser letales (Carfora *et al.*, 2020; Farkhondeh *et al.*, 2020). Las plantas pueden sintetizar y almacenar cardenólidos con impunidad, ya que carecen de la vulnerable enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$  (Heckel, 2014). Los cardenólidos son un grupo de esteroides derivados de los triterpenoides, son una clase química dentro de los glucósidos cardíacos que comprende dos clases principales de compuestos, cardenólidos y bufadienólidos, los cuales difieren en la estructura de su genina (Figura 1.2). Estructuralmente, los cardenólidos presentan 23 carbonos en una estructura esteroideal de cuatro anillos de carbono fusionados: ciclopentano-perhidrofenantreno, que incluye una lactona de cinco miembros en la posición  $\beta$  en C17 y un glicósido en la posición



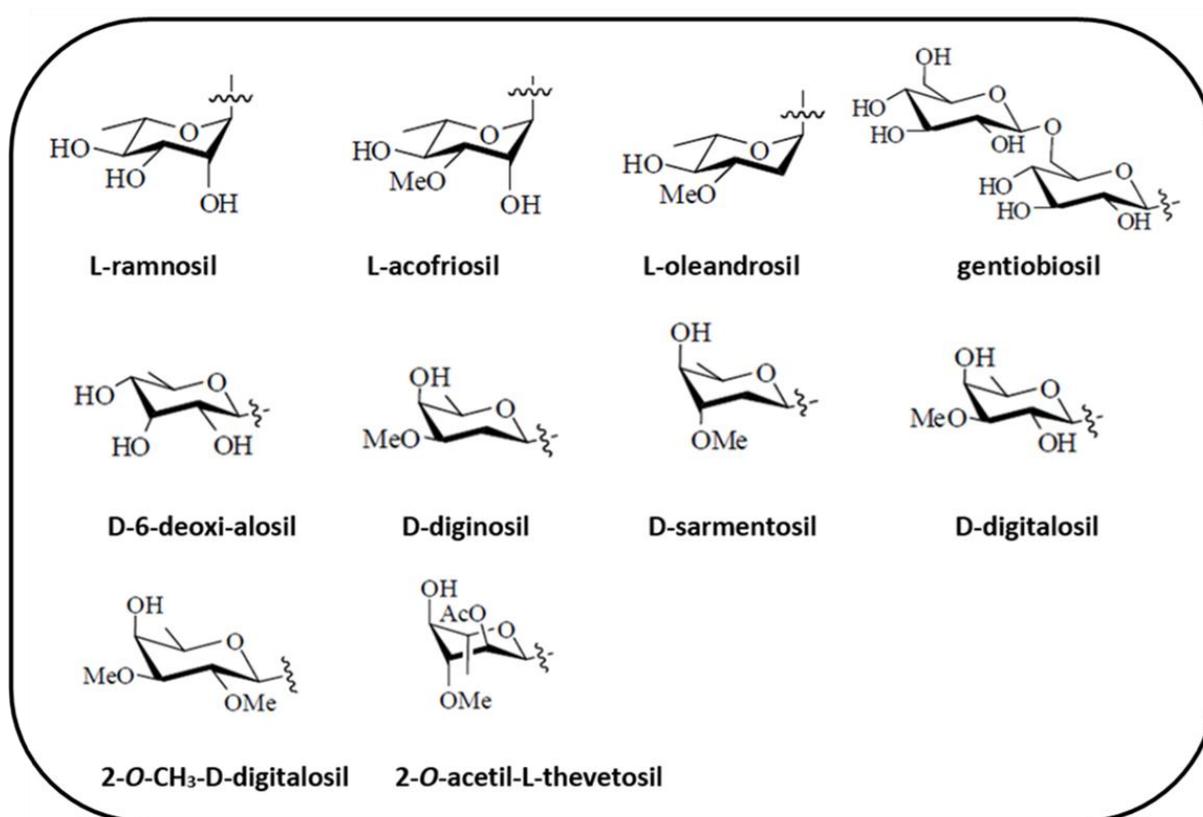
**Figura 1.2** Clasificación de los glicósidos cardíacos de acuerdo al anillo lactónico. (Castillo y Córdoba, 2015).

$\beta$  de C3. La presencia de grupos carbonilo, hidroxilo, aldehído, epóxido y olefina en otras posiciones da lugar a varios tipos de geninas. Aunque el número actual de tipos de genina es relativamente pequeño, la variación en el resto glucósido, ya sea  $\alpha$  o  $\beta$  en la posición 3, ha conducido a un número considerable de cardenólidos. Algunos ejemplos de geninas de cardenólidos presentes en Apocynaceae son oleandrigenina, digoxigenina, ouabagenina y estrofantidina (Figura 1.3) (Dager, 2016).



**Figura 1.3** Geninas presentes en los cardenólidos de la familia Apocynaceae.

Los glicósidos de cardenólidos generalmente están presentes con una a tres unidades de monosacáridos. Puede incluir glucosa o ramnosa junto con otros desoxiazúcares cuya ocurrencia natural es, hasta ahora, conocida solo en asociación con glicósidos cardíacos (Dager, 2016). En total, se han caracterizado diecisiete azúcares diferentes en este grupo de metabolitos secundarios (Figura 1.4), que incluyen D-glucosa, gentiobiosia, gentiotriosa, 6-desoxi-hexosas (e.g. 6 desoxi-alosa) o 2, 6-didesoxi-hexosas (por ejemplo, L-oleandrosa, D-sarmentosa), algunas de las cuales son 3-metil éteres (e.g. L-acofriosa, L-thevetosa, D-digitalosa, D-diginosa) o 2-metil éteres (e.g. 2-O-CH<sub>3</sub>-D-digitalosa) o 2-acetil éteres (e.g. 2-O-acetil-L-thevetosa). Sin embargo, los más frecuentemente encontrados son glucosa, galactosa, manosa, ramnosa y digitalosa (Wen *et al.*, 2016).



**Figura 1.4** Diferentes restos de azúcares de cardenólidos identificados en Apocynaceae.

### 1.3 Secuestro de cardenólidos en la interacción planta-insecto

Los insectos mejoraron coevolutivamente los constituyentes moleculares, fisiológicos y conductuales en respuesta a mecanismos de defensa físicos y químicos de las plantas (Brown y Trigo 1995; Schoonhoven et al. 2006; Opitz y Müller, 2009; Prado y Demarco, 2018). Las estrategias empleadas por los insectos incluyen:

1. *Selección de plantas.* Los insectos pueden evitar el consumo de plantas tóxicas tan pronto como puedan detectarlas visualmente, olfativamente o por contacto. Estos mecanismos de evitación pueden ser determinados genéticamente o por un proceso de aprendizaje (Nealis y Nault, 2005).

2. *Manipulación de las defensas químicas.* Los insectos evitan las defensas alimentándose solo de aquellas partes de la planta que contienen cantidades mínimas de el o los productos químicos tóxicos o mediante el corte de zanjas a través de las hojas para despresurizar los canales y eliminar la exudación tóxica en su sitio de alimentación (Dussourd y Denno, 1991).
3. *Excreción de toxinas vegetales.* Los insectos poseen intestinos que no son permeables a los metabolitos secundarios y permiten una rápida excreción de toxinas (Zagrobelny *et al.*, 2004)
4. *Sobreproducción de enzimas de desintoxicación.* La resistencia metabólica a menudo resulta de la sobreproducción de "enzimas de desintoxicación" que pueden metabolizar los xenobióticos. Las enzimas de desintoxicación generalmente incluyen tres superfamilias principales: las monooxigenasas del citocromo P450 (P450 o CYP para los genes), las glutatión S-transferasas (GST) y las carboxilesterasas (COE). Entre estas, las P450 parecen tener un papel clave en las interacciones planta-insecto (Lu *et al.*, 2020).
1. *Secuestro de metabolitos tóxicos.* Los compuestos vegetales también pueden ser secuestrados y posteriormente utilizados como una sustancia defensiva, concentrándolos en partes específicas de los tejidos del cuerpo del insecto (i.e., tegumento), ya sea de forma activa (bombas de eflujo) o pasiva y con frecuencia de manera altamente selectiva (Opitz y Müller, 2009).

Los insectos que son resistentes a las toxinas vegetales generalmente combinan varios rasgos de resistencia (por ejemplo, conductuales y metabólicos), y estos rasgos son frecuentemente inducibles en lugar de constitutivos.

A pesar de la toxicidad universal de muchos metabolitos secundarios contra los animales, algunos insectos herbívoros especializados pertenecientes a diferentes órdenes (e.g. Lepidoptera, Coleoptera, Heteroptera etc.) son capaces de alimentarse de plantas que los contienen almacenándolos en su tejido corporal o tegumento para su propia defensa (Agrawal *et al.*, 2012). El secuestro se define como "la captación, transporte, modificación, almacenamiento y despliegue selectivos de metabolitos secundarios de la planta para el propio beneficio del insecto" (Heckel, 2014; Opitz y Müller, 2009). Los insectos demuestran su protección mediante señales llamativas de advertencia (aposematismo), a menudo combinadas con un comportamiento gregario (Bowers, 1992). Sin embargo, el secuestro no está necesariamente relacionado con el aposematismo (Fitzgerald *et al.*, 2008) porque las características desagradables (sabor amargo y efectos nocivos) de los insectos aposemáticos también puede

deberse a defensas químicas derivadas de precursores que se obtienen de las plantas (Kuhnert *et al.*, 2008), a defensas sintetizadas *de novo* (Klitzke y Brown 2000; Pasteels *et al.*, 1988) debido a defensas mecánicas (Guilford 1990), o las especies pueden ser simplemente imitadoras (Platt *et al.*, 1971). Más allá del simple consumo, el secuestro requiere adaptaciones para el transporte, metabolismo y almacenamiento de las toxinas. La selectividad de la captación puede realizarse mediante uno o mediante una combinación de muchos mecanismos. Después de la ingestión, las toxinas de la planta entran en contacto con la envoltura peritrófica. La envoltura peritrófica puede estar involucrada en el proceso de secuestro ya que las toxinas de las plantas podrían unirse a la envoltura y podrían quedar retenidas en el intestino. Por lo tanto, evitará que algunas toxinas lleguen al epitelio intestinal y evitará el secuestro. El epitelio intestinal representa la siguiente capa de selectividad y el secuestro puede modularse mediante funciones de barrera pasiva (por ejemplo, mediante difusión de compuestos lipofílicos) o podría estar mediada por vehículos activos, así como el metabolismo mediante la degradación enzimática y la captación selectiva (i.e. portadores de eflujo que consumen ATP como glucoproteínas-p) (Dobler *et al.*, 2015; Petschenka *et al.*, 2013b). Las proteínas, como los portadores de eflujo, median en una barrera activa para evitar que las toxinas lleguen a la cavidad corporal. Una posibilidad de cómo se pueden secuestrar las toxinas polares es a través de proteínas portadoras específicas. Se ha sugerido la participación de portadores en el secuestro de compuestos vegetales desde el lumen intestinal hacia el hemocele, pero no se ha demostrado funcionalmente a nivel de portadores individuales. La interacción de los parámetros físicos y biológicos determinará la cantidad de compuesto que ingresará a la cavidad corporal y la cantidad que se desechará (Petschenka y Agrawal, 2016).

En el caso del secuestro de cardenólidos solo se han descrito mecanismos limitados de tolerancia en los insectos (Birnbaum y Abbot, 2017). En las estrategias comportamentales destacan la despresurización de los canales laticíferos y con ello la eliminación/disminución de la exudación tóxica en su sitio de alimentación (Konno, 2011; Dussourd, 2009; Chambers *et al.*, 2007; Dussourd y Denno, 1991). Las especies de insectos de diferentes órdenes que secuestran cardenólidos muestran otra adaptación común a esta clase de metabolitos secundarios, e.g. las especies del género *Danaus* (Lepidoptera), *Chrysochus* Chevrolat in Dejean, 1836 (Coleoptera) u *Oncopeltus* Stal, 1868 (Heteroptera) poseen Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasas resistentes a cardenólidos. En el caso de *D. plexippus* (Linnaeus, 1758) y *Chrysochus* la resistencia a cardenólidos está asociada a dos sustituciones de aminoácidos en la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa (sitios Q111 y N122) (Petschenka *et al.*, 2017; Opitz y Müller, 2009; Labeyrie y Dobler, 2004; Holzinger y Wink, 1996). Sin embargo,

no todos los insectos adaptados a cardenólidos poseen estas mutaciones adaptativas; hay otros insectos generalistas y especialistas que albergan Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasas sensibles a cardenólidos, pero que utilizan mecanismos de transporte pasivo y activos para alimentarse con éxito de plantas que contienen cardenólidos y, según sea el caso, secuestrarlos.

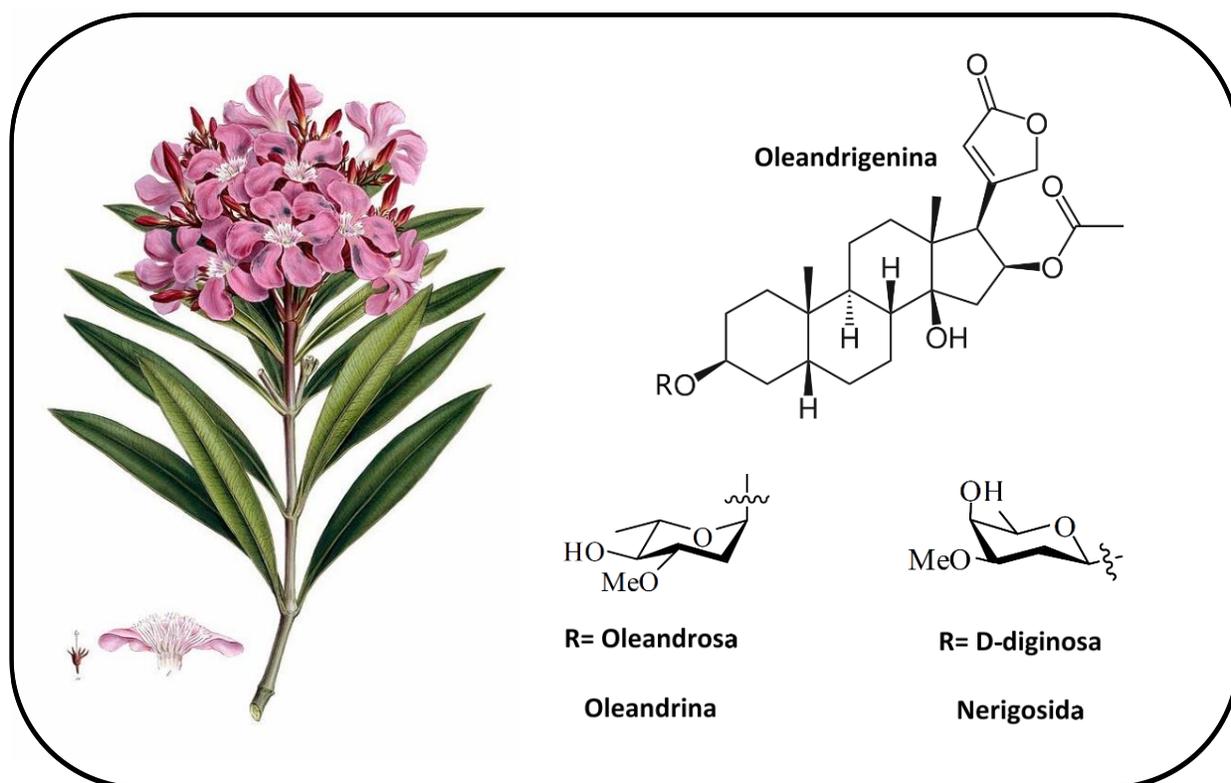
Los mecanismos de transporte pasivos y activos parecen evitar que los cardenólidos se muevan a través del perineo del insecto y lleguen al sistema nervioso, donde las Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasas se expresan predominantemente (Petschenka *et al.*, 2012; Petschenka *et al.*, 2013a; Petschenka *et al.*, 2013b). Dos especies de lepidópteros, *Daphnis nerii* L. (secuestra cardenólidos) y *Manduca sexta* L. (generalista), expresan las glucoproteínas-P, que son bombas de eflujo que protegen los tejidos nerviosos sensibles contra toxinas y fármacos (Birnbaum y Abbot, 2017; Petschenka *et al.*, 2013b; Petschenka y Dobler, 2009). Los cardenólidos a menudo se almacenan en áreas compartimentadas (glándulas, espacios dorsolaterales, exoesqueleto, etc.) y, en consecuencia, las concentraciones en la hemolinfa se pueden mantener bajas, lo que puede ayudar a proteger los tejidos sensibles como el sistema nervioso contra los efectos tóxicos (Aardema *et al.*, 2012; Petschenka *et al.*, 2012; Dobler *et al.*, 2011; Petschenka y Dobler, 2009; Dobler, 2004; Torrie *et al.*, 2004; Feng y Lingrel, 1994; Burns y Price, 1993; Scudder y Meredith, 1982).

### 1.3.1 Selectividad en el secuestro de cardenólidos

Muchos metabolitos secundarios disuasorios utilizados por las plantas para su defensa se han convertido en atrayentes alimenticios para los herbívoros especializados (Opitz y Muller, 2009; Blum, 1992). Los insectos pueden secuestrar selectivamente una toxina vegetal de varias que pueden estar disponibles desde el punto de vista dietético. Esta hipótesis ayuda a explicar las preferencias de alimentación relativamente restringidas de muchos insectos, i.e., se sabe que la capacidad de secuestrar y almacenar cardenólidos de plantas hospederas difiere entre especies de *Danaus*. En el estudio de Mebs *et al.* (2012) se reporta que las larvas de dos especies de Danainae, *D. plexippus* y *D. gilippus*, criadas en una planta misma planta huésped (*Asclepias curassavica*) secuestraron los principales cardenólidos del complejo calotropina/calactina; sin embargo, *D. gilippus* almacenó de 10 a 12 veces menos calotropina que *D. plexippus*, lo que sugiere un secuestro selectivo de calactina en *D. gilippus*.

En el caso de la polilla neotropical *Syntomeida epilais* Walker (Lepidoptera: Arctiini), la selectividad de cardenólidos parece depender de la naturaleza del hospedero. *S. epilais* es una especie conocida por ser especialista en alimentarse de las especies de Apocynaceae que

contienen cardenólidos, específicamente por alimentarse en estado larval de las hojas de *Nerium oleander* L. (adelfa) (Von Nicksch-Roseneck *et al.*, 1990; Wink y Schneider, 1990; Rothschild y Reichstein, 1973;), un arbusto nativo de la región mediterránea del cual secuestra los cardenólidos oleandrina y nerigósida (Figura 1.5). Recientemente, se reportó la enredadera neotropical *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin (Apocynaceae) como un nuevo hospedero natural de *S. epilais*. Sin embargo, el conocimiento fitoquímico de *P. andrieuxii* no reporta la presencia de oleandrina y nerigósida; recientemente Villegas (2019) reportó la presencia de la genina oleandrigenina en la fracción de mediana polaridad del extracto de hojas de *P. andrieuxii*, dicha genina constituye el mismo núcleo esteroide de los cardenólidos oleandrina y nerigósida. Por lo tanto, *S. epilais* podría secuestrar diferentes cardenólidos de cada una de sus plantas hospederas (Villegas, 2019). Con base en lo anterior, en este trabajo se pretende determinar la identidad estructural de el o los cardenólidos que selectivamente secuestra *S. epilais* de *P. andrieuxii*



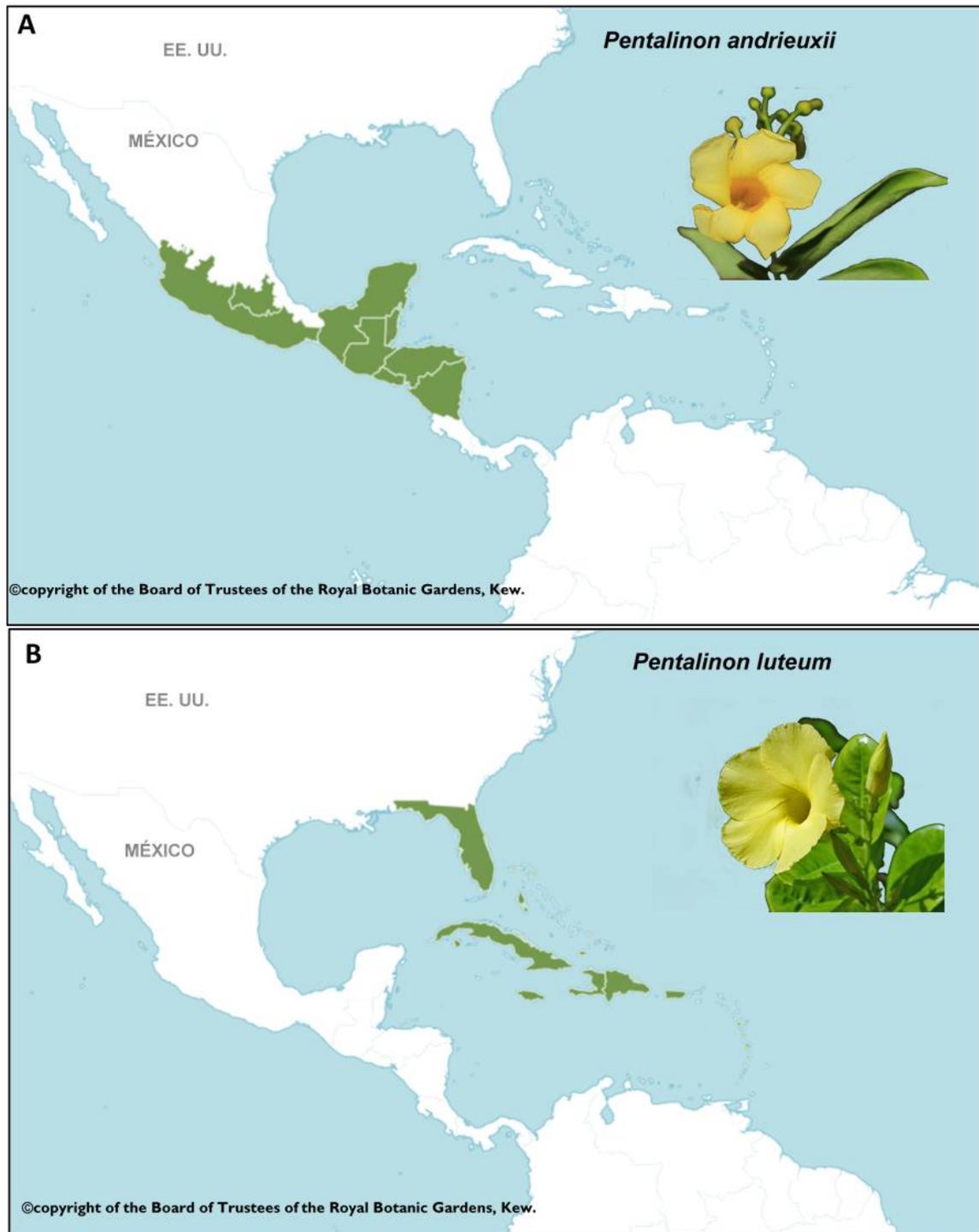
**Figura 1.5** Estructuras químicas de los cardenólidos secuestrados por *Syntomeida epilais* de su planta hospedera no nativa, *Nerium oleander*. Imagen: Natural History Museum, London/science Photo Library.

## 1.4 Modelo de estudio

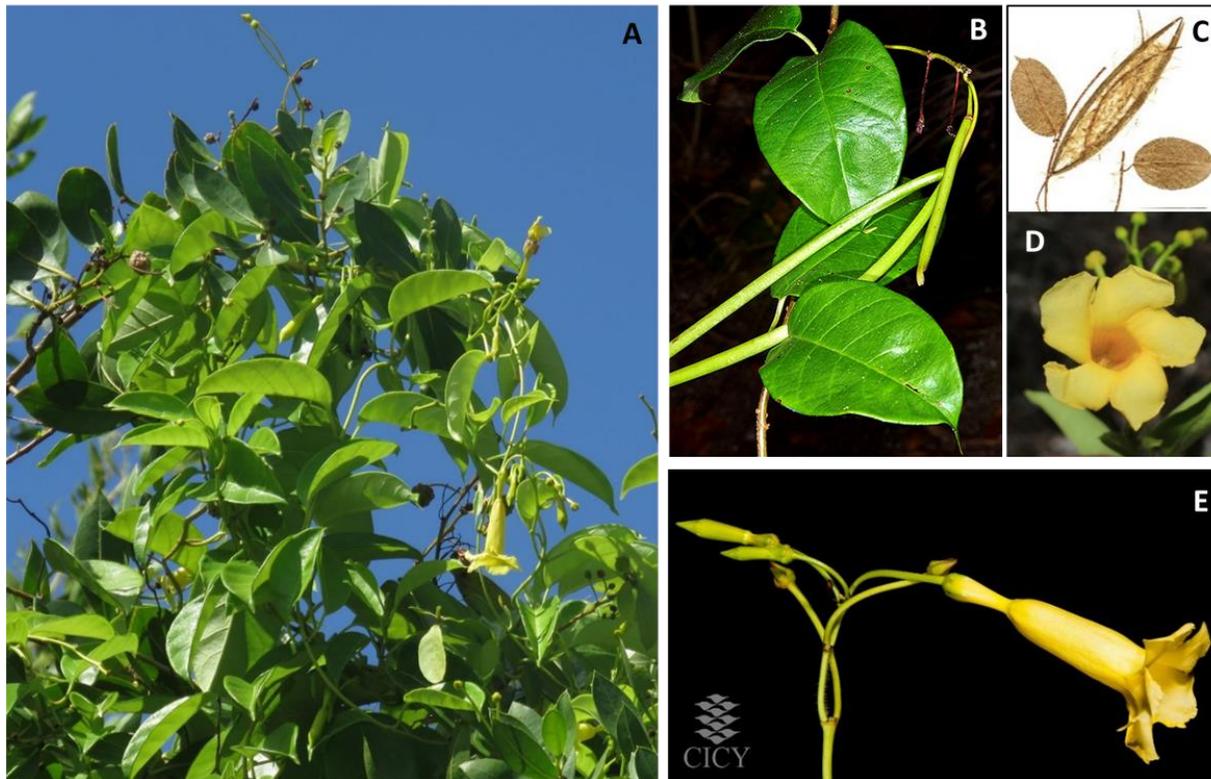
### 1.4.1 *Pentalinon andrieuxii*

Dentro de la familia Apocynaceae se encuentra el género *Pentalinon* Voigt, el cual agrupa solo dos especies: *P. andrieuxii* y *P. luteum* (L.) B.F. Hansen & Wunderlin. De estas dos especies de *Pentalinon*, la primera se encuentra en México y América Central hasta el sur de Nicaragua (Figura 1.6A) y la segunda se centra en las Antillas, Bahamas y Florida (Figura 1.6B). *P. andrieuxii* es una enredadera que se diferencia de su congénere por brácteas florales diminutas, corolas con la parte inferior más larga (9-16 mm vs. 6-8 mm) y semillas más grandes (Figura 1.7). *P. andrieuxii* florece durante todo el año (de Stefano *et al.*, 2021) y en la República Mexicana se encuentra principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Juárez-Jaimes *et al.*, 2007).

*P. andrieuxii*, comúnmente conocida como bejuco de la víbora, bejuco guaco o contrayerba, es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de distintas afecciones, incluyendo el tratamiento de la leishmaniosis cutánea (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2017; Lezama-Dávila, 2013; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001; Chan-Bacab *et al.*, 2003; Argüeta *et al.*, 1994; Pulido y Serralta, 1993). De las raíces de esta planta se han aislado metabolitos secundarios como esteroides, cumarinas y triterpenoides, derivados de pregnano, ácido betulínico y dos terpenos de estructura química inusual denominados urechitol A y urechitol B (Yam-Puc *et al.*, 2012; Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Yam-Puc *et al.*, 2009).



**Figura 1.6** Áreas de distribución. A) *Pentalinon andriouxii*; B) *Pentalinon luteum*.



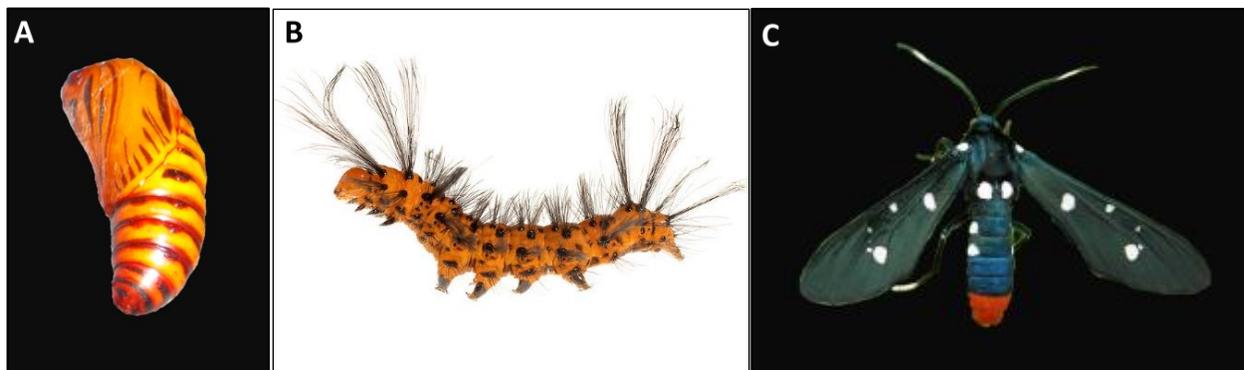
**Figura 1.7** Morfología de *Pentalinon andrieuxii*. A) Habito; B) Frutos inmaduros; C) Semillas; D) Flor vista frontal; E) Flor vista lateral. Fotos: (B) S. Holt; (C) Field Museum of Natural History; (D) Christian TunTun; (E) Herbario CICY.

#### 1.4.2 *Syntomeida epilais*

*Syntomeida epilais* es una polilla holometábola (metamorfosis completa: huevo, larva, pupa y adulto) neotropical que, de acuerdo con la circunscripción más reciente, pertenece a la familia Erebidae (antes Arctiidae), subfamilia Arctiinae (antes Ctenuchidae), subtribu Euchromiina (Tabla 1.4) (Zahiri *et al.*, 2011; Schmidt y Lafontaine, 2010). La coloración en ambos estadios de *S. epilais* se relaciona con los colores aposemáticos (mimetismo mülleriano) (Figura 1.8), por lo que son muy llamativas y activas durante el día.

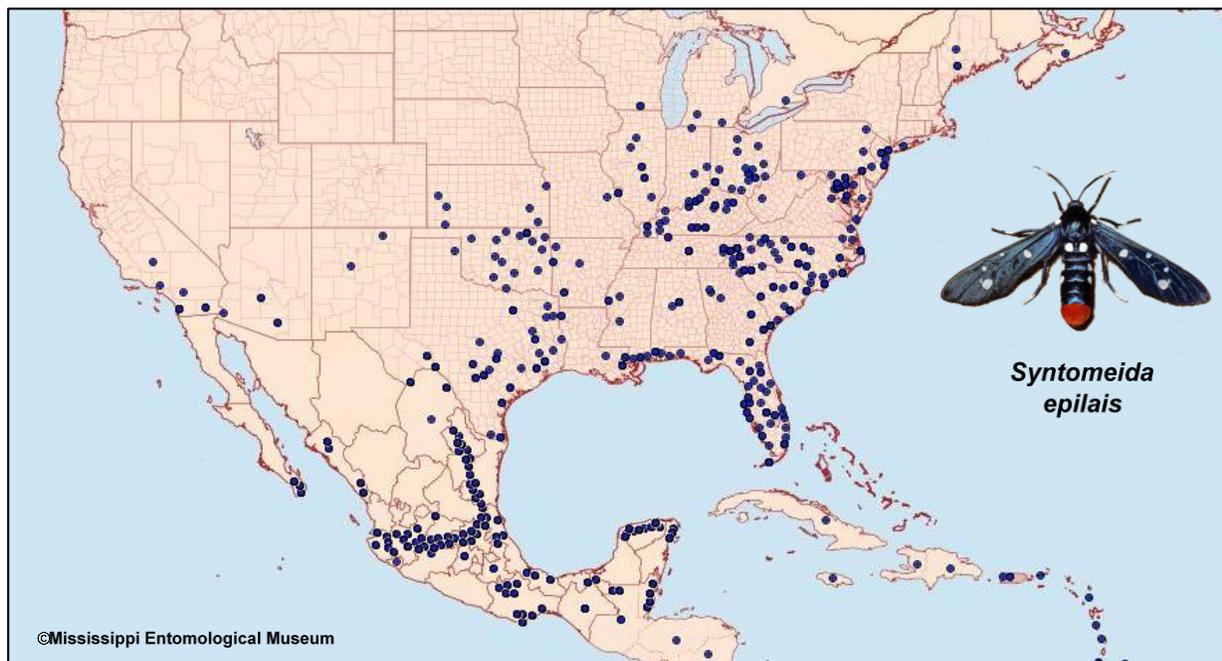
**Tabla 1.4** Categorías taxonómicas de *S. epilais*.

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Filo</b>	<b>Arthropoda</b>
<b>Clase</b>	<b>Insecta</b>
<b>Orden</b>	<b>Lepidoptera</b>
<b>Familia</b>	<b>Erebidae</b>
<b>Subfamilia</b>	<b>Arctiinae</b>
<b>Subtribu</b>	<b>Euchromiina</b>
<b>Género</b>	<b><i>Syntomeida</i></b>



**Figura 1.8** Fases de *Syntomeida epilais*. A) Pupa; B) Larva; C) Adulto. Fotos: (B); (C)

Su rango de distribución se extiende desde el norte de América del Sur, a través de América Central hasta México, y desde las islas del Caribe hasta Florida y las regiones costeras de los estados del sureste de los EUA (Figura 1.9). Las poblaciones de *S. epilais* viven todo el año en el sur de la Florida y los Cayos, pero generalmente mueren por las temperaturas del invierno en el norte y centro-norte de la Florida, solo para recolonizar estas áreas en la siguiente primavera.

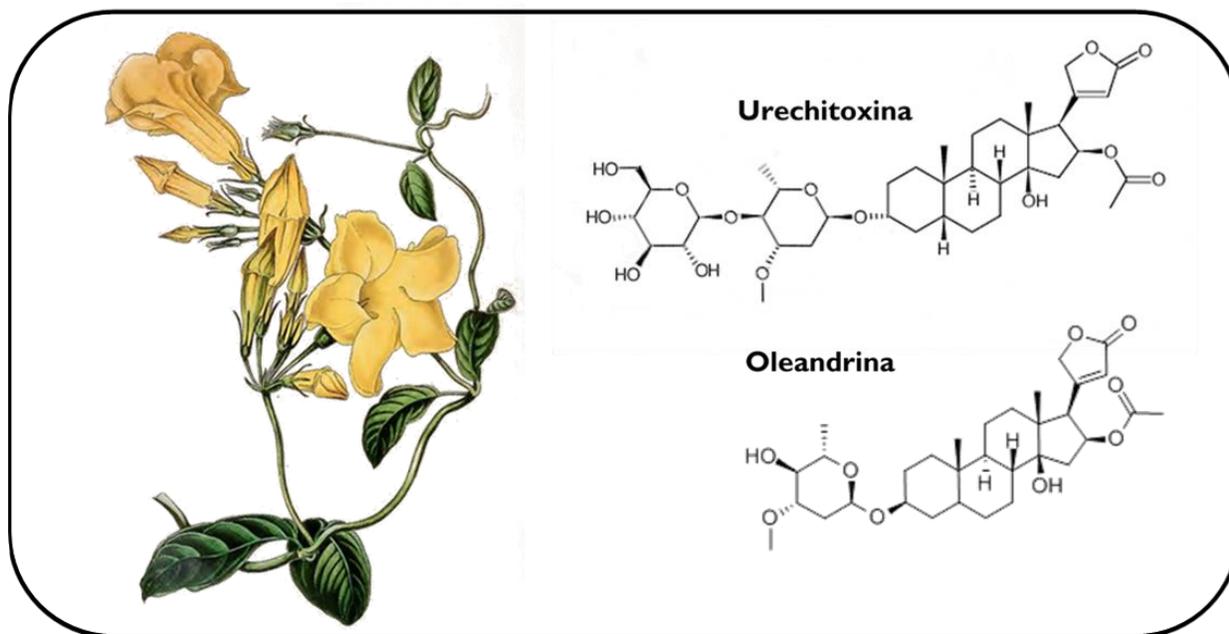


**Figura 1.9** Área de distribución de *Syntomeida epilais*. Imagen: modificada de Mississippi Entomological Museum.

Rothschild y Reichstein (1973) fueron los primeros en reportar que las larvas de *S. epilais* secuestran cardenólidos a partir de ejemplares adultos colectados por Charles P. Kimball en Florida, presuntamente hospedados en *N. oleander*. Estudios posteriores realizados por von Nicksch-Roseneck y colaboradores (1990), y Wink y Schneider (1990) que criaron larvas de *S. epilais* colectadas de arbustos de *N. oleander* confirmaron el secuestro de los cardenólidos oleandrina y nerigosida. Además de *N. oleander*, otra especie introducida, reconocida como hospedera de *S. epilais* y productora de cardenólidos, es *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult., una planta cultivada ampliamente como ornamental en regiones de América (Varella *et al.*, 2015).

Adicionalmente se ha reportado que otras plantas hospederas naturales de *S. epilais* en Estados Unidos incluyen varias especies del género *Echites* P. Browne, entre ellas *E. umbellata* Jacq. registrada por Quinn (2008) y Covell (1984); y *Pentalinon luteum* (sin: *Urechites lutea*, *Urechites suberecta*) y *Angadenia berteroi* (A. DC.) Miers (Black, 1976). De éstas, únicamente se ha reportado la producción de cardenólidos en *P. luteum* (Hassall, 1951); la urechitoxina, presente

en las hojas de *P. luteum*, posee el mismo núcleo esteroidal (oleandrigenina) que el cardenólido oleandrina, pero difiere en los glicósidos (L-oleandrosa y D-glucosa) unidos en C3 (Figura 1.10).



**Figura 1.10** Cardenólidos aislados de *Pentstemon luteum*. Imagen: J. Paxton ©plantillustrations.org

Sin embargo, hasta ahora, y con excepción de *N. oleander*, no se han identificado los cardenólidos secuestrados selectivamente por las larvas de *S. epialis* al alimentarse de sus hospederos. Las observaciones en campo de plantas de *P. andrieuxii* como hospederas de *S. epialis* (Hiebert-Giesbrecht y Peña-Rodríguez, comunicación personal) han llenado el vacío de conocimiento de hospederos naturales en territorio continental (a excepción de EU). Esto abre la oportunidad de conocer la fitoquímica de *P. andrieuxii* y las características estructurales de los cardenólidos que secuestra *S. epialis*

**HIPÓTESIS**

Dada la presencia de cardenólidos como la urechitoxina en las hojas de *P. luteum*, la proximidad filogenética entre *P. luteum* y *P. andrieuxii*, y el hecho de que ambas especies son hospederos naturales de *S. epilais*, es posible que *P. andrieuxii* también produzca cardenólidos de tipo urechitoxina y que éstos sean secuestrados por *S. epilais*.

## JUSTIFICACIÓN

Al elegir su planta huésped, el herbívoro secuestrante de un metabolito bioactivo debe navegar en una línea delgada entre la autoextinción y la protección contra los depredadores. La interacción bioquímica entre la planta hospedera y el insecto secuestrante es compleja y puede verse influenciada por pequeñas diferencias en la estructura química del metabolito. Por lo tanto, la variación en las toxinas de las plantas es de importancia central para las interacciones evolutivas entre plantas e insectos. Para comprender la interacción entre las plantas que contienen cardenólidos y los insectos herbívoros, es indispensable la identificación de los productos de defensa en las plantas. A pesar de la producción de diferentes cardenólidos en las especies hospederas de *Syntomeida epilais*, aún no se han establecido las características químicas que busca la polilla para seleccionar su planta huésped. Por lo tanto, el estudio químico de las plantas hospederas y el insecto secuestrante permitirá dilucidar la naturaleza estructural, composicional y ecológica de los cardenólidos en esta interacción.

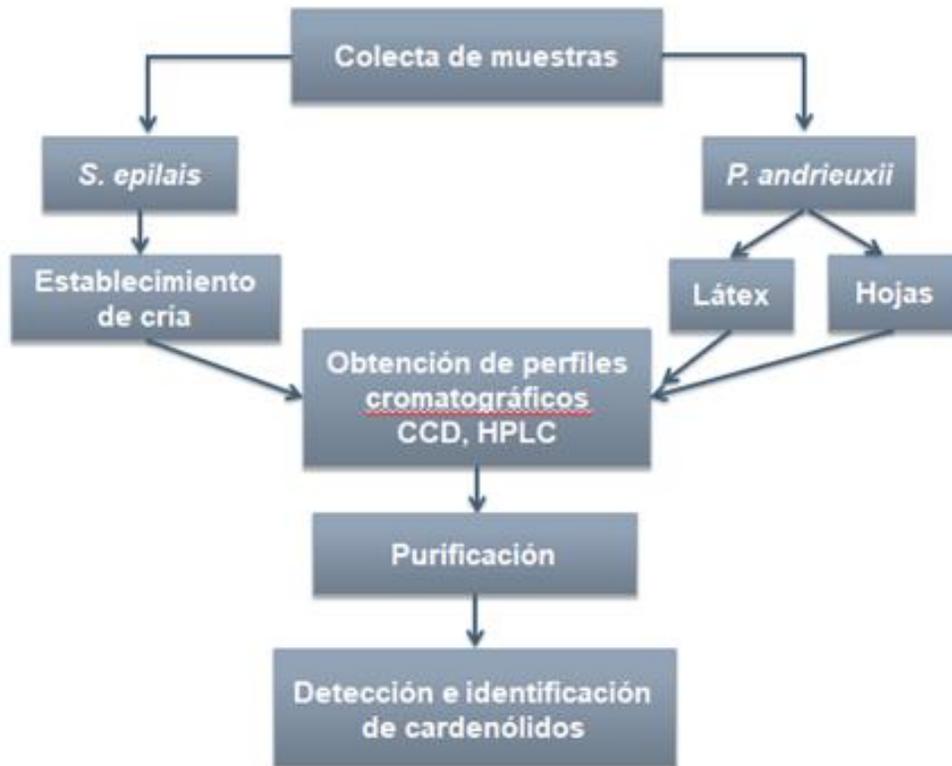
## OBJETIVO GENERAL

Identificar el o los cardenólidos en *Pentalinon andrieuxii* y determinar su presencia en *Syntomeida epilais*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar e identificar el o los cardenólidos en las hojas y el látex de *P. andrieuxii* utilizando técnicas cromatográficas de separación y técnicas espectroscópicas de diagnóstico.
2. Establecer la(s) identidad(es) de los cardenólidos secuestrados de *P. andrieuxii* en la fase adulta de *S. epilais*.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Colecta de material vegetal

La colecta del material vegetal de *P. andrieuxii* se realizó de plantas adultas en las distintas localidades que se muestran en la tabla 2.1. A partir de los cuales se depositaron ejemplares de herbarios en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.(CICY).

**Tabla 2.1** Números de registro y ubicación de plantas colectadas de *P. andrieuxii*.

No. de ejemplar de herbario	Fecha de colecta	Sitio de colecta	Clave
En proceso	6/04/19	Tankuche, Campeche	KP-1A
68850	9/03/19	Vivero CICY	KP-1B
334	2/03/19	Casa particular	KP-1C

##### 2.1.1 Extracción de metabolitos

El material vegetal se secó en una estufa a 40°, se molió, se pesó, posteriormente se extrajo por maceración (tres veces, 24 h, ca Xgr/Y mL) con metanol (MeOH). El disolvente se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniéndose el extracto crudo correspondiente: KP-1A, 9.6%; KP-1B, 13.7%; KP-1C, 28%.

##### 2.1.2 Fraccionamiento de extractos crudos y purificación de la fracción de polaridad media-baja de *P. andrieuxii*

El extracto metanólico de las hojas de KP-1B de *P. andrieuxii* se suspendió en una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (2:3) y la suspensión acuosa resultante se particiono sucesivamente con hexano (Hx 1:1), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) y acetato de etilo (AcOEt 1:1), obteniéndose las fracciones de polaridad baja (KP-10A, 9.7%), media-baja (KP-10B, 8.1%), media-alta (KP-10C, 4.7%),

respectivamente, además de la fracción acuosa residual (KP-10D, 1.7%) (fracción de alta polaridad).

La fracción de mediana polaridad de (KP-10B, 5.7g/mg) se purificó por cromatografía líquida al vacío (CLV). una solución de la muestra en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se adsorbió en gel de sílice (Sigma-Aldrich, 0.0063-0.200 mm) y una vez evaporado el disolvente, se colocó en la parte superior de una columna de 10 cm  $\varnothing$  por 6 cm de altura empacada con gel de sílice de grado CCD. La elución se realizó utilizando una mezcla inicial de Hx:AcOEt 8:2, seguida de una elución con gradiente de polaridad. Las fracciones colectadas (20 ml) se monitorearon por CCD, obteniéndose 24 fracciones (KP-13A - KP-13M).

## **2.2 Colecta y extracción de látex**

Se realizó la colecta del látex (21.8 g) a partir de una planta ubicada en el vivero del CICY. La colecta se realizó en tubos de microcentrifuga previamente pesados después de cortar en la punta, la unión del tallo con la hoja y/o la unión de la vaina con el tallo, presionando y apretando entre los dedos para liberar la mayor cantidad posible de látex en los recipientes. Los tubos se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta que fueron requeridos para su uso. Para su extracción, la muestra del látex se extrajo tres veces con una mezcla de MeOH y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) (20 ml) en un baño ultrasónico por 20 min. La suspensión se dejó reposar por 24 h y posteriormente se colectó el sobrenadante (color amarillo claro). Después de evaporar el disolvente se obtuvieron 808 mg (3.70%) del extracto de látex.

### **2.2.1 Fraccionamiento del extracto metanólico del látex (KP-9) y purificación de la fracción de polaridad media-baja (KP-33A)**

El extracto metanólico del látex de *P. andrieuxii* (KP-9, 590 mg) se suspendió en una mezcla MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:3). La suspensión acuosa resultante se particionó sucesivamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) y AcOEt (1:1), obteniéndose las fracciones de polaridad media-baja (KP-33A, 38%) y media-alta (KP-33B, 54%), respectivamente. La fracción residual (acuosa) (KP-33C, 5.8%) se tomó como la fracción de alta polaridad.

La fracción de polaridad media-baja (KP-33A, 200 mg) se purificó por cromatografía en columna de gravedad, utilizando una columna de 2 cm  $\varnothing$  y 40 cm de altura empacada en gel de sílice (Sigma-Aldrich, tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm). La muestra se adsorbió en gel de sílice y se colocó en la parte superior de la columna y la elución se llevó a cabo utilizando mezclas de

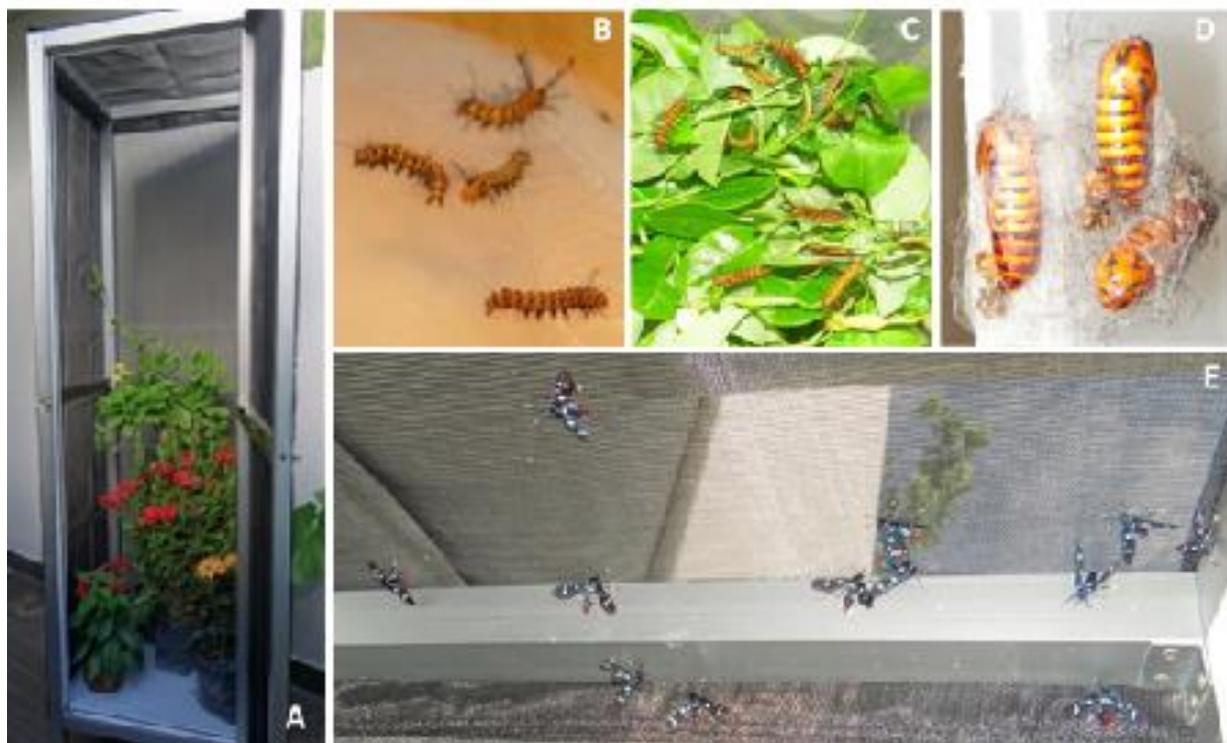
Hx:Acetona (An) con gradiente de polaridad, a partir de una proporción inicial de 98:2. Las fracciones colectadas (12 ml) se monitorearon por CCD, obteniéndose 22 fracciones (KP-34A - KP-34V).

### **2.3 Cría en cautiverio de *Syntomeida epilais***

Las larvas de *S. epilais* se recolectaron en plantas de *Pentalinon luteum* y *Adenium obesum* cultivadas en domicilios particulares de Mérida, Yucatán o proporcionada por el Biol. Julián Parra Escamilla a partir de infestaciones en plantas de *A. obesum* cultivadas. Las larvas se seleccionaron de acuerdo a su tamaño (máximo 6mm) (Figura 2.1B), se alimentaron con hojas de *P. andrieuxii* colectadas de plantas ubicadas en el vivero del CICY y se criaron en una jaula de 180x50x50cm (Figura 2.1A) o en contenedores de plástico de 66x41x36cm (Figura 2.1C), dependiendo la cantidad de individuos. Al eclosionar de las pupas (2.1D), los adultos se trasladaron a la jaula que contenía plantas nectaríferas (*Pentas* sp.) y un hospedero de oviposición (*P. luteum*) (Figura 2.1E). Las polillas en estado adulto se almacenaron a -70°C hasta su extracción.

#### **2.3.1 Extracción de metabolitos de *S. epilais* en estado adulto**

Las 90 polillas adultas (5.3 g), alimentadas con *P. andrieuxii*, se liofilizaron y el material seco se extrajo tres veces con MeOH (250 ml ea) en un baño ultrasónico por 40 min. El solvente se dejó reposar y después de 24 horas se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose 408 mg (7.60%) del extracto (KP-15).



**Figura 2.1** Cría en cautiverio de *Syntomeida epilais*. A) Jaula para adultos.; B) Tamaño de larvas seleccionadas para crianza; C) Alimentación de larvas con *P. andrieuxii*; D) Pupas dentro del capullo de seda; E) Adultos en jaula de apareamiento.

#### 2.4 Hidrólisis ácida de extractos y fracciones de hojas y látex de *P. andrieuxii* y adultos de *S. epilais*

La hidrólisis ácida se lleva a cabo generalmente por calentamiento con una solución diluida de ácido, a temperaturas que van desde 90-200°C por un cierto periodo que puede ser de unos cuantos minutos a horas. Esta reacción se utiliza para catalizar la escisión de un enlace químico a través de una reacción de sustitución nucleófila. Con este tratamiento, el o los azúcares unidos al C3 de los cardenólidos pueden ser hidrolizados, obteniéndose la genina como producto.

Cada muestra (7-10 mg) se disolvió en 6 ml de una mezcla 95:5 de etanol (EtOH) y ácido clorhídrico (HCl). La mezcla de reacción se calentó a reflujo (70°), con agitación, por una hora. La mezcla se diluyó con 6 ml de agua y se extrajo dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1, v/v). La fase

orgánica se neutralizó con una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  al 5% (1:1, v/v) y después de eliminar el disolvente, se obtuvo el producto de hidrólisis. Los rendimientos se enlistan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Rendimiento de los extractos crudos y fracciones sometidas a hidrólisis ácida.

Materia prima	Extracto/Fracción	Producto de hidrólisis (mg)	Rendimiento (%)
KP-1B (Hojas)	KP-4 (MeOH)	3.4	28.0
	KP-10A (Hx)	12.7	87.0
	KP-10B ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	8.5	56.4
	KP-10C (AcOEt)	5.1	42.5
	KP-10 (acuosa)	3.0	30.0
KP-5 (Látex)	KP-9 (MeOH)	3.2	31.8
	KP-33A ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	5.7	50.0
	KP-33B (AcOEt)	10	80.6
	KP-33C (acuosa)	4.2	85.0
KP-15 ( <i>S. epilais</i> )	KP-15 (MeOH)	2.4	21.8

## 2.5 Análisis por CLAR de los productos de hidrólisis ácida

La cromatografía líquida en alta resolución (CLAR) permite separar los componentes de una muestra (analitos), para ello, la muestra es arrastrada por una corriente líquida llamada fase móvil (generalmente polar) que interactúa con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria (columna). La separación se logra por las diferencias en solubilidad (en fase móvil) y de retención por adsorción (en fase estacionaria) de la mezcla de solutos. Una vez separados los diferentes analitos en el sistema cromatográfico (eluat), y en función de sus propiedades físico-químicas, estos pueden ser identificados o cuantificados empleando alguno de los múltiples sistemas de detección existentes (Bonnin *et al.*, 2017)

Los análisis por CLAR se realizaron en un equipo Waters con bomba binaria Waters 600 y automuestreador 717. Se utilizó un método de gradiente con una mezcla de acetonitrilo (ACN) y agua (H<sub>2</sub>O) (45% ACN de 0-10 min y 58% ACN de 10-15 min), con un tiempo de corrida de 15 min, un flujo de 0.5 ml/min y con el detector a 220 nm. Se inyectaron 20 µl por muestra y la separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa C-18 X-Select HSS 250 x 4.6 mm 5µm. Para la identificación del analito, se utilizaron como estándares muestras de oleandrigenina y gitoxigenina, previamente aisladas e identificadas en el laboratorio por Villegas (2019).

---

## CAPITULO III

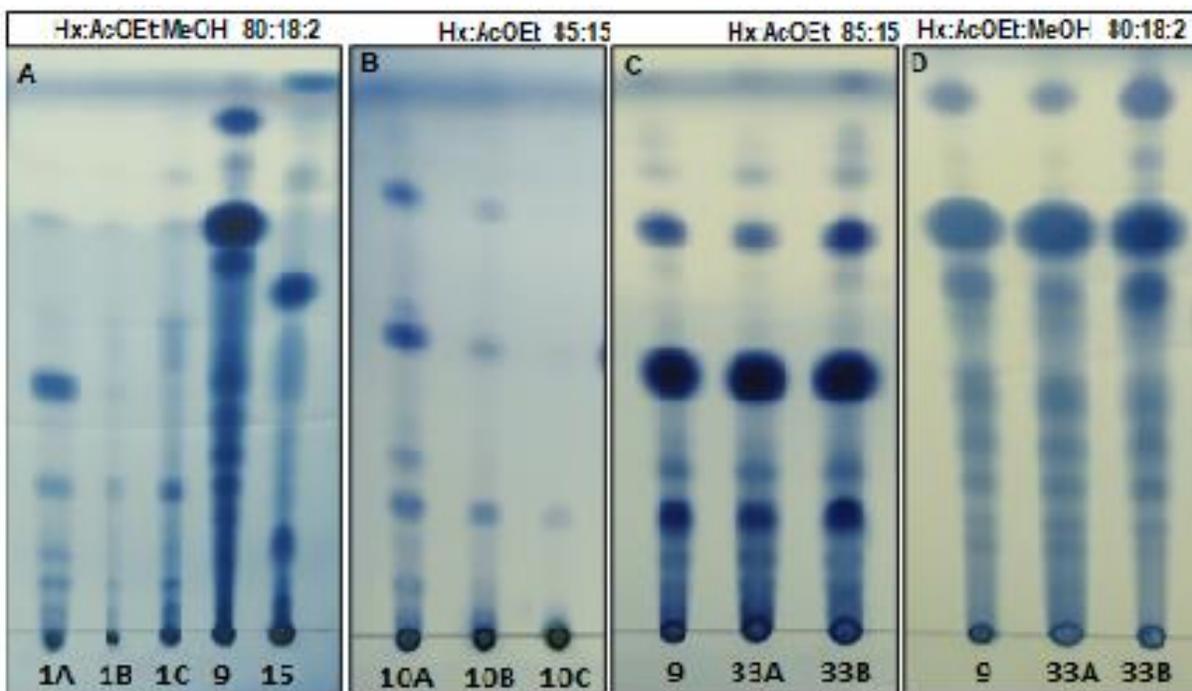
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Extractos y fracciones de *Pentalinon andrieuxii* y *Syntomeida epilais*

En los perfiles cromatográficos por cromatografía en capa delgada (CCD) de los extractos metanólicos de *P. andrieuxii* se observó que las plantas colectadas en los tres sitios presentan una producción similar de metabolitos secundarios (Figura 3.1A). Por otra parte, el perfil cromatográfico del extracto metanólico del látex de *P. andrieuxii* mostró un menor contenido de productos polares (Figura 3.1A), en tanto que el perfil cromatográfico del extracto metanólico de los adultos de *S. epilais*, mostró una composición menos compleja, así como compuestos mayoritarios no polares y medianamente polar, observándose varios componentes en común con los extractos de hoja y del látex de *P. andrieuxii* (Fig. 3.1A).

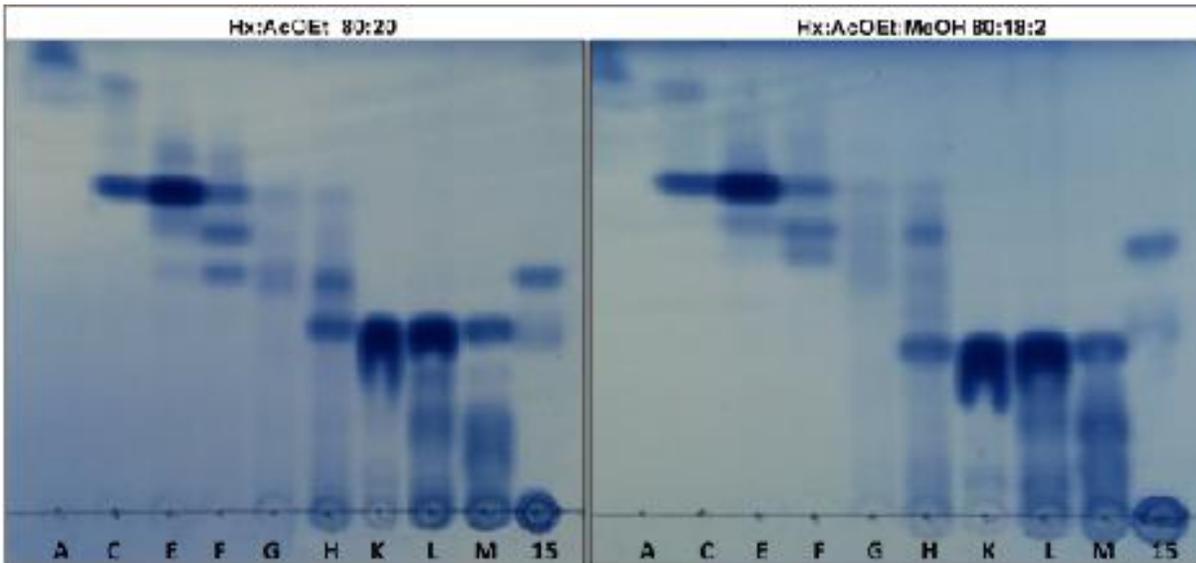
El fraccionamiento del extracto crudo de *P. andrieuxii* (KP-1B), utilizando un proceso de partición líquido-líquido con hexano, diclorometano y acetato de etilo, resultó en la obtención de las correspondientes fracciones de polaridad baja (KP-10A), media-baja (KP-10B) y media-alta (KP-10C), respectivamente, además de una fracción acuosa residual (KP-10D) (Figura 3.1B). De la misma forma, el fraccionamiento del extracto crudo del látex de *P. andrieuxii* (KP-9) utilizando un proceso de partición líquido-líquido con diclorometano y acetato de etilo, permitió obtener las fracciones semipurificadas de polaridad media-baja (KP-33A) y media-alta (KP-33B), respectivamente, además de la fase acuosa residual (KP-33C). Los perfiles por CCD de la partición de las hojas muestran que las fracciones de polaridad baja (KP-10A) y polaridad media-baja (KP-10B) mostraron la presencia de varios componentes en común (Figura 3.1B). En tanto que las fracciones semipurificadas KP-33A y KP-33B obtenidas de el caso de las particiones obtenidas del extracto metanólico látex, mostraron perfiles cromatográficos muy similares (Figura 3.1C-D).

Tomando en cuenta que en la literatura se reporta la presencia de cardenólidos en las fracciones de polaridad media-baja (Jacinto *et al.*, 2011; Ankli *et al.*, 2010; Lhinhatrakool y Sutthivaiyakit, 2006; Harnisch *et al.*, 1984), la fracción KP-10B se purificó por CLV, obteniéndose 24 fracciones (KP13A - KP13M; Figura 3.2), Sin embargo, el análisis de las fracciones KP-13F, KP-13J y KP-13K por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ) no mostró las



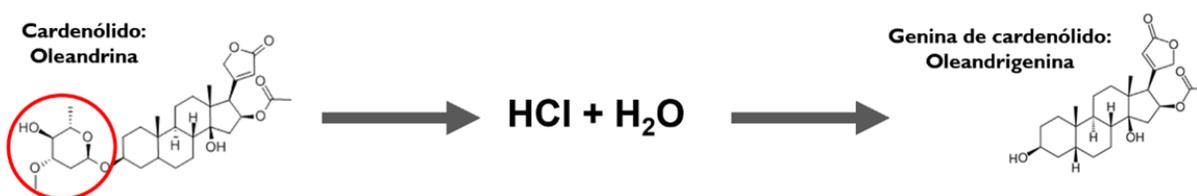
**Figura 3.1** Perfiles cromatográficos por CCD. A) Extractos metanólicos de *P. andrieuxii* colectada en Tankunche (KP-1A); CICY (KP-1B); Caucel (KP-1C); látex (KP-9) y extracto metanólico de *S. epilais* (KP-15). B) Fracciones semipurificadas del extracto de hojas de *P. andrieuxii*: hexánica (KP-10A); diclorometano (KP-10B); acetato de etilo (KP-10C). C-D) Extracto y fracciones semipurificadas del látex de *P. andrieuxii*; extracto metanólico (KP-9); diclorometano (KP-33A); acetato de etilo (KP-33B).

señales características de los protones o carbonos característicos de la lactona o el núcleo esteroidal de los cardenólidos. Ante estos resultados, y con el fin de detectar la posible presencia de geninas de cardenólidos, tanto el extracto orgánico crudo de las hojas de *P. andrieuxii* (KP-1B) como las fracciones KP-10A-D obtenidas del proceso de partición, fueron sometidas a un proceso de hidrólisis ácida mediante un tratamiento con ácido clorhídrico diluido (Figura 3.3). Los resultados de los análisis por CLAR del producto de hidrólisis ácida confirmaron la ausencia de geninas del tipo oleandrigenina y gitoxigenina en la fracción KP-10B.



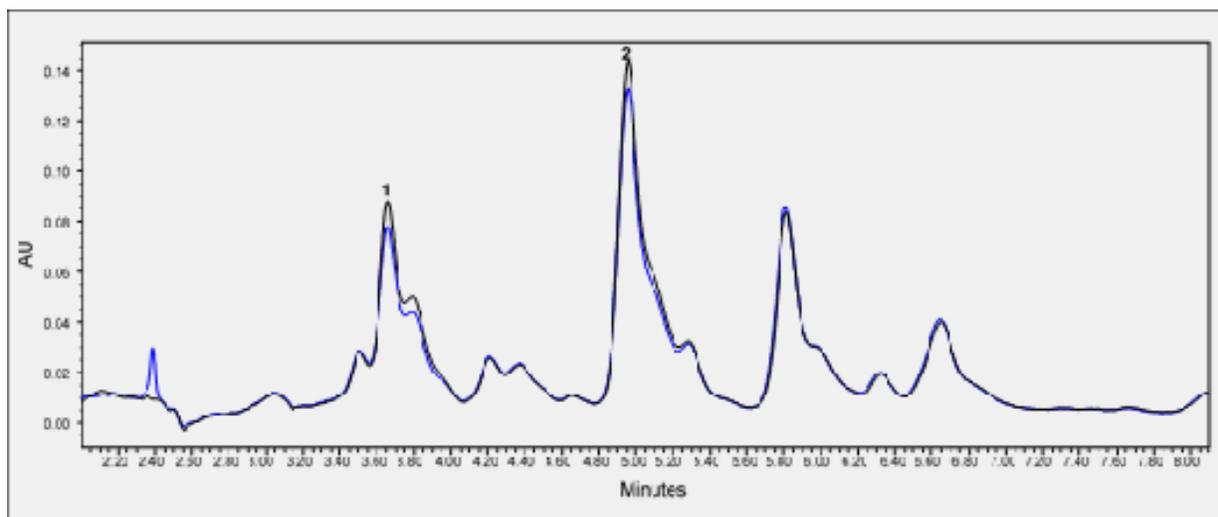
**Figura 3.2** Perfiles cromatográficos por CCD de fracciones obtenidas en la purificación de KP-10B. A-M) Fraccionamiento de KP-10B; KP-15) Adultos de *S. epilaís* alimentados con *P. andrieuxii*.

Sin embargo, el análisis por CLAR del producto de hidrólisis ácida de la fracción KP-10C y KP-10D se detectó la presencia de la genina oleandrigenina y gitoxigenina, respectivamente, las geninas en los diferentes productos de hidrólisis se identificaron por comparación con muestras auténticas de oleandrigenina y gitoxigenina aisladas e identificadas previamente en el laboratorio. Estos últimos resultados confirman la presencia de cardenólidos en las hojas de *P. andrieuxii*, y sugieren la posible presencia de urechitoxina, un cardenólido con dos unidades de azúcar unidas al C3 del esqueleto esteroidal y una genina de oleandrigenina, que se ha reportado anteriormente de *P. luteum*.



**Figura 3.3** Esquema simplificado de la reacción de hidrólisis ácida para la escisión de azúcares de cardenólidos.

De la misma forma, el extracto crudo del látex (KP-9) y sus correspondientes fracciones (KP-33A, KP-33B y KP-33C) fueron sometidas a un proceso de hidrólisis ácida. El análisis por CLAR de los diferentes productos hidrolizados mostró la presencia de geninas, oleandrigenina y gitoxigenina en la fracción KP-33A, identificadas por comparación con muestras auténticas de oleandrigenina y gitoxigenina (Figura 3.4). Estos resultados confirman la presencia de cardenólidos en el látex de *P. andrieuxii* y sugieren que estos productos actúan como una barrera química contra los herbívoros.

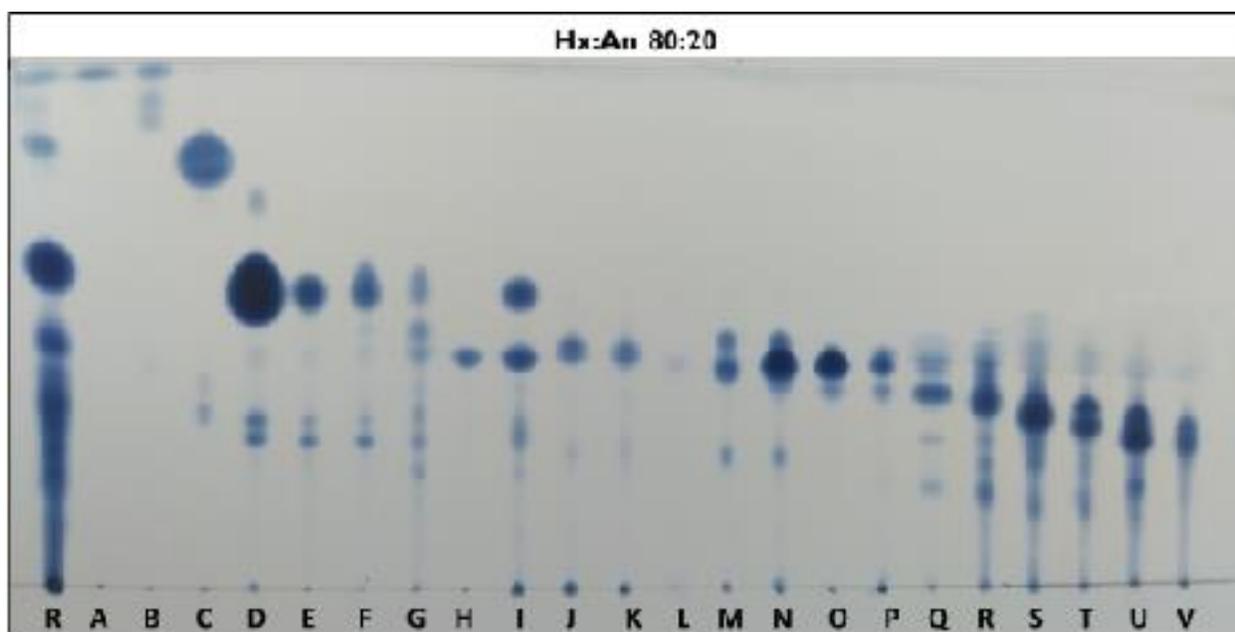


**Figura 3.4** Perfiles cromatográficos por CLAR del producto de hidrólisis ácida de la fracción de polaridad media-baja del látex de *P. andrieuxii* (KP-33A) (perfil azul) con el perfil del mismo producto enriquecido con 1) gitoxigenina y 2) oleandrigenina (perfil negro).

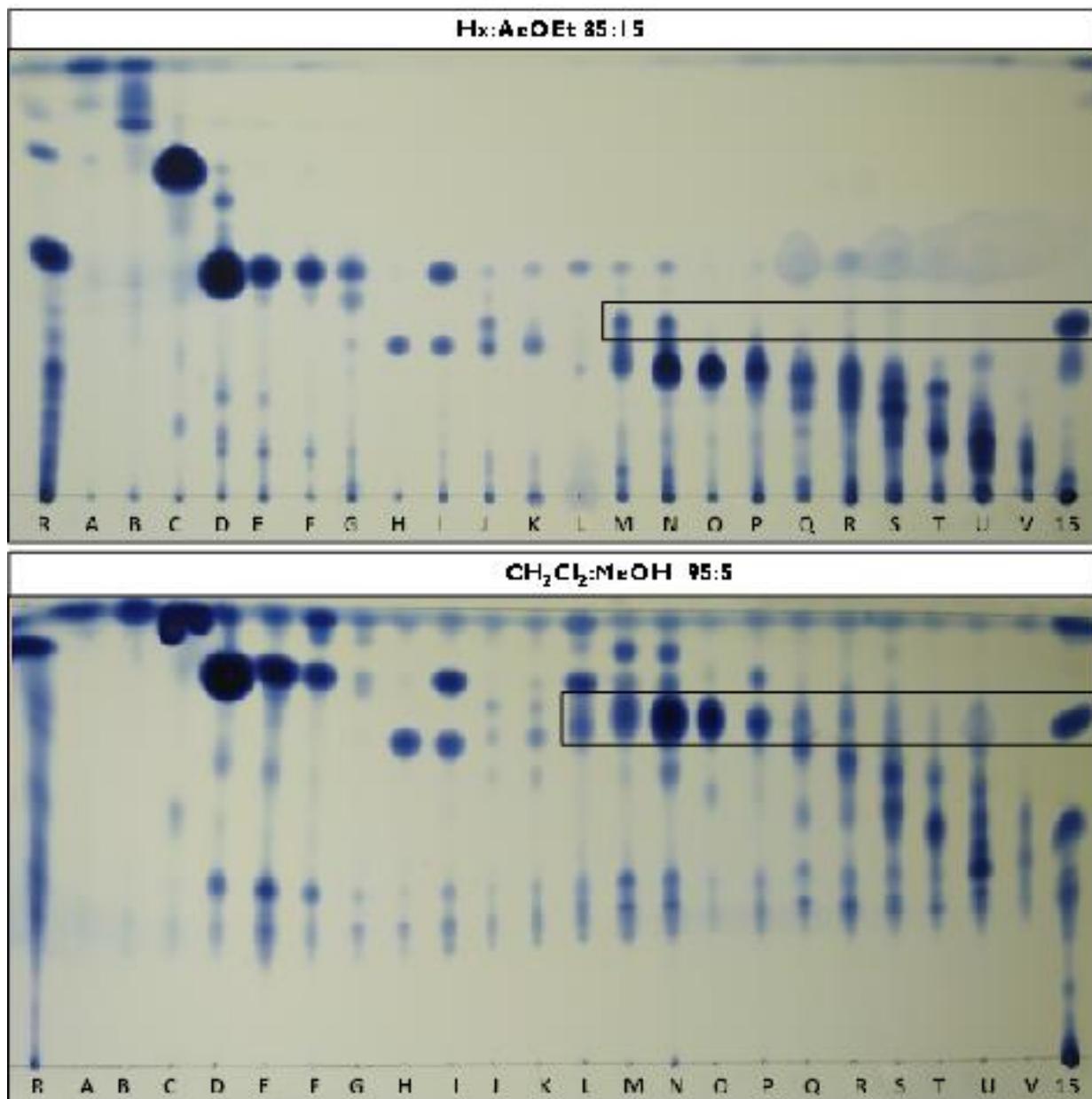
Es interesante señalar que, mientras que ambas geninas de cardenólidos se encontraron en la fracción de polaridad media-baja (KP-33A) del extracto del látex de *P. andrieuxii*, estos mismos productos se detectaron en las fracciones de polaridad media-alta (KP-33B) y alta (KP-33C) del extracto de hojas de la planta. Esto podría deberse a las diferencias en la composición de los extractos de hojas y látex de *P. andrieuxii* y a las interacciones entre los cardenólidos y los componentes presentes en cada uno de los extractos.

Una vez detectada la presencia de las geninas de cardenólidos en la fracción KP-33A del extracto de látex, esta se purificó mediante cromatografía en columna por gravedad obteniéndose un total de 22 fracciones (KP-34A-V; Figura 3.5). Como resultado de la comparación por CCD de los

perfiles cromatográficos de las diferentes fracciones (KP-34A- V) con el extracto metanólico de *S. epilaís* (KP-15; Figura 3.6). De la purificación del látex (KP-34A-V), se seleccionaron las fracciones KP-34M, KP-34O y KP-34S para ser analizadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ). Sin embargo, ninguno de los espectros de las tres fracciones mostró la presencia de las señales características de los protones o carbonos correspondientes a la lactona o el núcleo esteroidal de los cardenólidos.

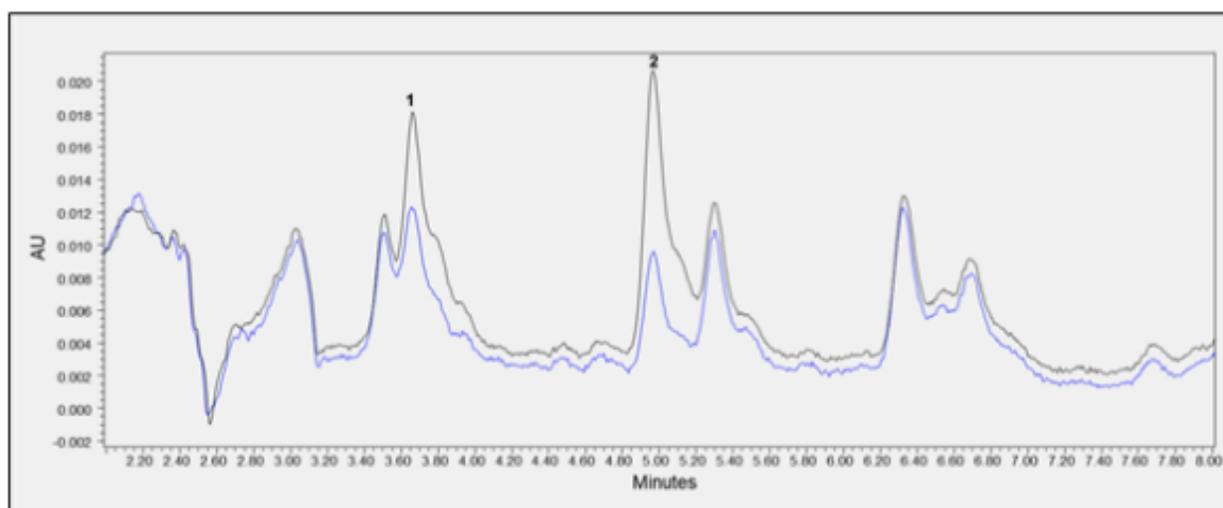


**Figura 3.5** Perfil cromatográfico por CCD de la purificación de la fracción de polaridad media-baja del látex (KP-33A).



**Figura 3.6** Perfiles cromatográficos por CCD de la purificación parcial de la fracción de polaridad media-baja del látex (KP-33A) y el extracto metanólico de *S. epilais* (KP-15) en dos diferentes sistemas de elución.

Finalmente, el análisis por CLAR del producto de hidrólisis ácida del extracto metanólico de *S. epilais* también mostró la presencia de oleandrogenina y gitoxigenina, las cuales se identificaron por comparación con muestras auténticas de oleandrogenina y gitoxigenina (Figura 3.7). Estos resultados confirmaron el secuestro de cardenólidos por parte de *S. epilais* al alimentarse de las hojas de *P. andrieuxii*. Aun cuando no fue posible identificar plenamente el o los cardenólidos presentes en las hojas de *P. andrieuxii* y secuestrados por *S. epilais*, los resultados obtenidos demuestran que el o los cardenólidos están constituidos por geninas glicosiladas de oleandrogenina y gitoxigenina.



**Figura 3.7** Perfil cromatográfico por CLAR de la hidrólisis ácida del extracto metanólico de *S. epilais* alimentado con *P. andrieuxii* (KP-15) (perfil azul) con el perfil del mismo producto enriquecido con 1) gitoxigenina y 2) oleandrogenina (perfil negro).

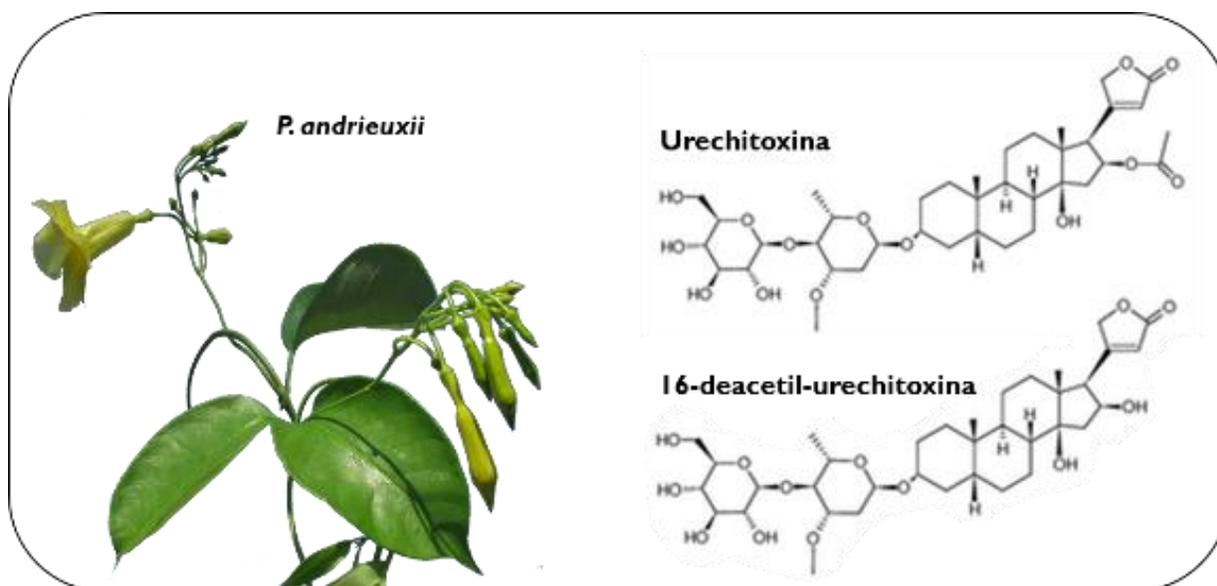
**CAPITULO IV**

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que no fue posible establecer completamente la estructura química de el o los cardenólidos en *S. epilais*, en el látex y en las hojas de *P. andrieuxii*, la identificación de la o las geninas representa un paso importante en el conocimiento para abordar el escenario complejo y evolutivamente relevante al que *S. epilais* y otros herbívoros de las apocináceas están expuestos de forma natural. En 1973 Rothschild y Reichstein mencionaron la posibilidad de que las plantas que contenían oleandrina pudieran tener un atractivo especial para *S. epilais*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que, para *S. epilais*, la genina es el elemento estructural más importante de los cardenólidos que secuestra *S. epilais*, específicamente aquellos con genina de tipo oleandrogenina. La presencia de oleandrogenina en el producto de hidrólisis del extracto metanólico de adultos de *S. epilais* que se alimentaron con hojas de *P. andrieuxii* y los cardenólidos mayoritarios con genina de oleandrogenina (oleandrina y nerigósida) secuestrados por *S. epilais* al alimentarse de *N. oleander* (Rothschild y Reichstein, 1973), son indicadores plausibles de una selectividad en el secuestro basada en la naturaleza de la genina. Esta selectividad, podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la actividad de los cardenólidos está relacionada principalmente con el anillo de lactona y los azúcares no cuentan con receptores específicos en el sitio de interacción con la bomba sodio-potasio. Sin embargo, se ha reportado que los residuos de azúcar son determinantes para la toxicocinética y toxicodinámica de los cardenólidos (Kanji y Mac Lean, 2012; Brown *et al.*, 1986), permitiendo una unión más fuerte y una mayor estabilidad (Botelho *et al.*, 2018; Cornelius *et al.*, 2013). Dada su importancia, las características inusuales de los azúcares presentes en los cardenólidos sugieren un posible significado adaptativo entre las plantas y los insectos; sin embargo, hasta la fecha, no se han revelado los mecanismos de la selección natural. El secuestro de los estereoisómeros oleandrina y nerigósida por parte de *S. epilais* al alimentarse de *N. oleander* confirma lo anteriormente expuesto. i.e. la naturaleza del azúcar unido al C3 del núcleo esteroide no es esencial para la actividad biológica del cardenólido, o para su ajuste del metabolito al receptor y, por lo que los estereoisómeros secuestrados podrían asegurar la especificidad con el objetivo (Beckett y Casy, 1995). Un caso similar ocurre con la mariposa monarca (*D. plexippus*), que secuestra los cardenólidos isoméricos, calotropina y calactina (Seiber *et al.*, 1980), que comparten la misma genina (calotropagenina), secuestrados cuando las larvas de la monarca se alimentan de *A. curassavica* o *A. fruticosa* (Agrawal *et al.*, 2011; Groeneveld *et al.*, 1990; Seiber *et al.*, 1983). Otro caso relacionado con el secuestro de la calotropina y la calactina con fines

defensivos esta dado por la presencia de ambos cardenólidos en las secreciones defensivas del saltamontes pirgomórfido *Poecilocerus bufonis* (Agrawal *et al.*, 2011; von Euw *et al.*, 1967).

La detección de las geninas oleandrigenina y gitoxigenina en los productos de hidrólisis ácida de las fracciones de polaridad media y polaridad alta, respectivamente, obtenidas a partir del extracto de hojas de *P. andrieuxii* sugiere que los cardenólidos producidos por la planta cuentan con estructuras de tipo urechitoxina y 16-deacetil-urechitoxina (Figura 4.1). Lo anterior se confirma por la presencia de ambas geninas en el extracto crudo de *S. epilais*. Sin embargo, es importante comentar que la gitoxigenina podría constituir un artefacto originado como consecuencia de la hidrólisis ácida del grupo acetato presente en la estructura de oleandrigenina, dado que la inestabilidad de los cardenólidos a altas temperaturas, en condiciones ácidas o alcalinas, es bien conocida (El-Seedi *et al.*, 2018; Morsy, 2017; Hunger, 1951).



**Figura 4.1** Cardenólidos probablemente producidos por *P. andrieuxii* con estructuras de tipo urechitoxina y 16-deacetil-urechitoxina.

Se ha reportado que el cardenólido desacetil-delta16-anhidro-oleandrina, aislado de las hojas de *P. luteum* (Hunger, 1951), podría constituir un artefacto puesto que se forma fácilmente a partir de oleandrina, tanto a altas temperaturas (Hesse, 1937), como a temperatura ambiente en contacto con  $Al_2O_3$  (Hunger, 1951). De la misma manera, Jager *et al.*, (1959), reportaron la

obtención del artefacto anhidro-desacetil-nerigósida, a partir del cardenólido nerigósida (Rothschild y Reichsten, 1973) y Villegas (2019) obtuvo las geninas oleandrogenina y gitoxigenina a partir de la hidrólisis ácida de oleandrina. Aunque, la oleandrina y la nerigósida son los principales cardenólidos encontrados en adultos de *S. epilais* que se alimentaron de *N. oleander* en estado larval, éstas también secuestran menores cantidades de otros cardenólidos con distintas geninas como la adinerina (adinerigenina) y el estrospesido (gitoxigenina), así como una serie de otros cardenólidos no identificados (Rothschild y Reichsten, 1973). Con base a los resultados de este trabajo, no es posible establecer inequívocamente si la gitoxigenina detectada en las diferentes fracciones y extractos tiene un origen natural o constituye un artefacto.

Finalmente, durante la crianza de *S. epilais* como parte de las actividades de este trabajo, se observó que las larvas realizaban una serie de mordeduras en la vena central de las hojas de plantas vivas de *P. andrieuxii* (Figura 4.2), induciendo la liberación de látex; posteriormente se movían distalmente a los cortes y se alimentaban comenzando en el borde de la hoja, donde no se observaba una presencia significativa de látex en el tejido. Esta conducta de corte de venas por parte de las larvas de *S. epilais* ya había sido reportada por Dussourd y Denno (1991) en *N. oleander*; esto sugiere que, a pesar de que *S. epilais* es un insecto especializado que secuestra y emplea los cardenólidos para protegerse de los depredadores, sus larvas evaden el látex rico en cardenólidos de plantas como *N. oleander* y *P. andrieuxii*. La neutralización de los canales con látex mediante manipulaciones conductuales por parte de insectos, probablemente se debe a que las plantas utilizan el látex como una defensa química y/o mecánica contra insectos herbívoros. El látex puede contener metabolitos y proteínas especializadas en concentraciones que, a menudo, son más altas que las encontradas en las hojas (Mithofer y Boland, 2012) y los insectos, a pesar de ser especialistas y haber desarrollado una resistencia considerable a metabolitos tóxicos como los cardenólidos, no son completamente inmunes al efecto de estas defensas químicas. Se ha reportado que, en el caso de la mariposa monarca, el consumo de altas concentraciones de cardenólidos reduce el crecimiento larvario y la despresurización de los canales laticíferos de *Asclepias* spp. mejora la aptitud biológica de las orugas de *D. plexippus* (Tao *et al.*, 2016; Zalucki *et al.*, 2001b; Malcolm, 1994; Zalucki y Brower, 1992; Zalucki *et al.*, 1990); adicionalmente, se ha encontrado también que los cardenólidos presentes en el látex de *Asclepias* spp. provocan una inhibición enzimática mayor (27%) que cantidades equimolares de cardenólidos en las hojas (Zust *et al.*, 2019). Con base a lo anterior, es posible que los cardenólidos en el látex de *P. andrieuxii* representen una barrera química que *S. epilais* evade mediante el corte de la vena principal de las hojas de la planta.



**Figura 4.2** Larvas de *S. epilais* desactivando laticíferos de plantas vivas de *P. andrieuxii*.

## V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1. CONCLUSIONES

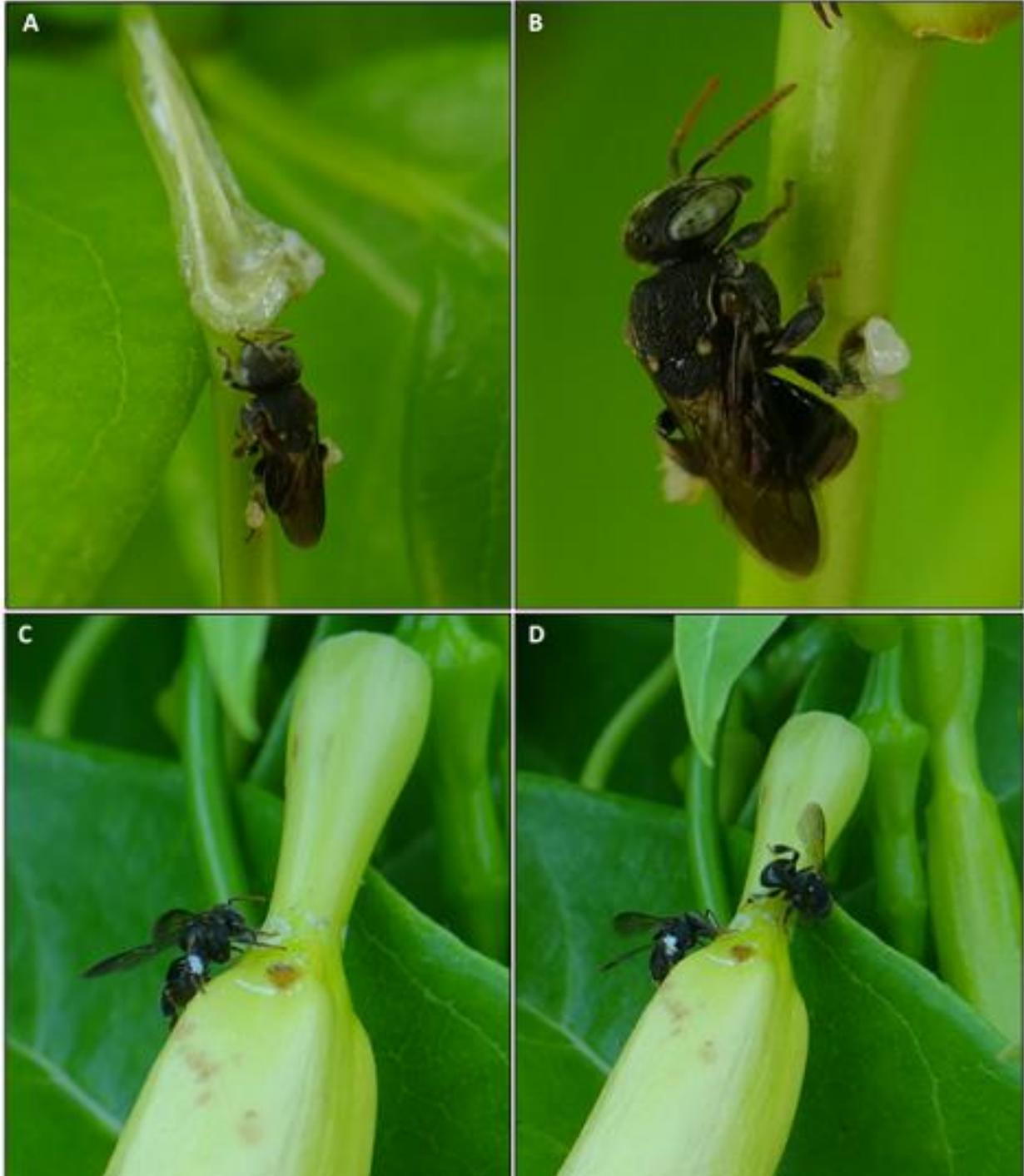
En el presente estudio se determinó la presencia de geninas de cardenólidos en las hojas y el látex de *P. andrieuxii*, lo cual constituye una evidencia de que *P. andrieuxii* posee cardenólidos en su forma glicosilada en las hojas y el látex. Adicionalmente, la presencia de geninas similares en adultos de *S. epiais* demuestra el secuestro de este tipo de cardenólidos por parte del insecto. Finalmente, se observó que las larvas de *S. epiais* presentan un comportamiento especializado de corte de venas en plantas vivas de *P. andrieuxii* y al alimentarse de éstas, secuestran cardenólidos diferencialmente según su tipo de genina.

## 5.2. PERSPECTIVAS

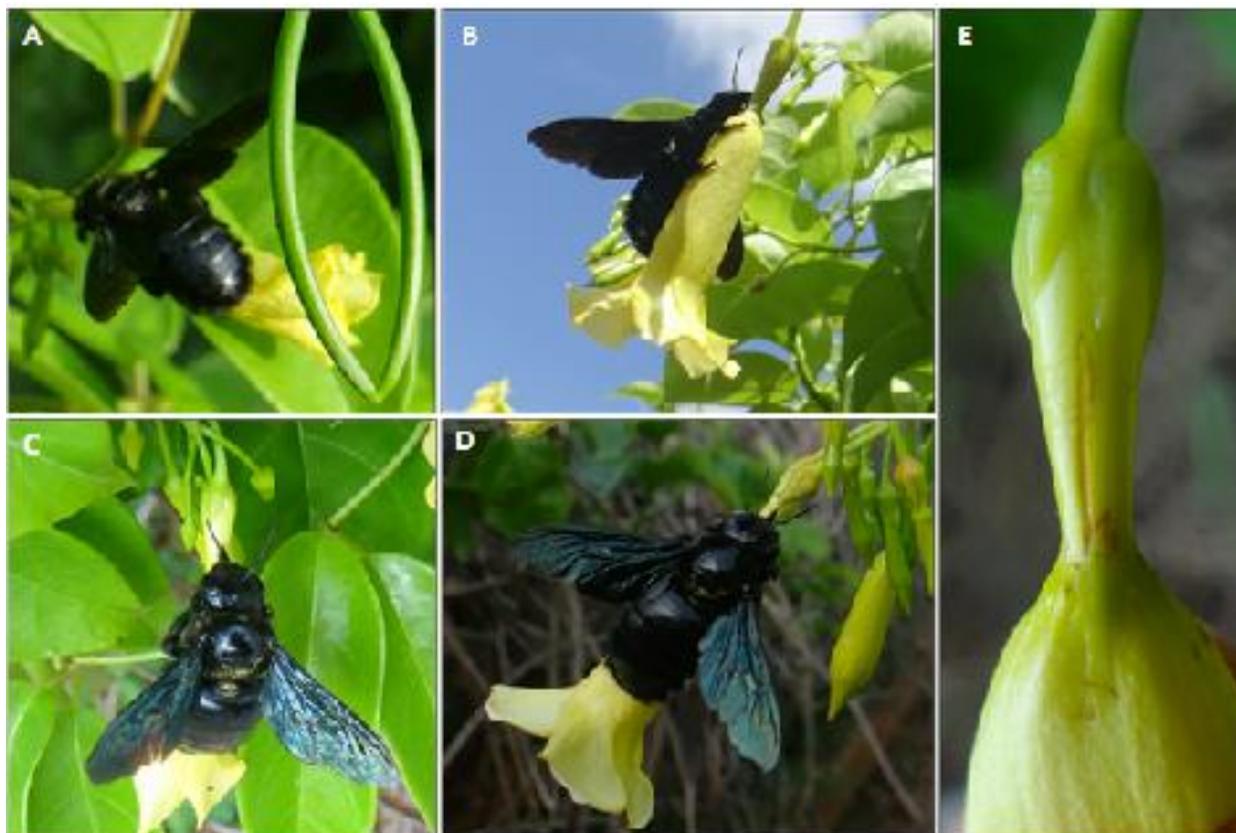
Es interesante mencionar que el perfil cromatográfico del extracto metanólico del látex de *P. andrieuxii* muestra un perfil menos complejo que el correspondiente al extracto de hojas de la planta o sus fracciones semipurificadas. La menor complejidad del extracto de látex podría agilizar la purificación de los cardenólidos de interés en trabajos futuros.

Durante la colecta de látex de plantas de *P. andrieuxii* ubicadas en el vivero del CICY, se observaron a abejas sin aguijón del género *Trigona* Jurine, 1807 forrajeando látex de las heridas ocasionadas en los tallos (Figura 5.1 A) y colocándolo en la tibia de las patas traseras (Figura 5.1 B). Por otro lado, se observó también a las abejas *Trigona* coleccionar el látex secretado en heridas causadas por un abejorro carpintero que robaba néctar en las flores de *P. andrieuxii* (Figuras 5.1 C-D y 5.2 A-D). Los abejorros carpinteros del género *Xylocopa* Latreille, 1802 forrajean flores de varias familias de plantas con néctar de difícil acceso; éstos extraen el néctar a través de un agujero, corte o desgarro en el tejido del pétalo, en lugar de entrar por las aberturas naturales de las flores (Figura 5.2 E) (Irwin *et al.*, 2010), por esta razón, son llamados ladrones de néctar. A menudo, los ladrones de néctar evitan el contacto con las estructuras reproductivas florales y, por lo tanto, no contribuyen a la reproducción de las plantas mediante la polinización. Casi todas las plantas cuyas flores son tubulares, como es el caso de *P. andrieuxii*, experimentan el robo de néctar (Irwin y Maloof, 2002; Barrows, 1980).

Se sabe que las abejas recolectan una amplia gama de recursos extraflorales, entre los que se encuentran las resinas y látex de una variedad de plantas (Leonhardt y Blüthgen 2009; Michener, 2007; Roubik, 2006; Biesmeijer y Slaa, 2004; Noll *et al.*, 1996), los cuales utilizan como material de construcción de nidos que suelen ubicarse en troncos huecos, ramas o bajo tierra. (Roubik, 1989). Las secreciones obtenidas de las plantas a menudo son mezcladas con cera, lo que es conocido como "propóleo" por los apicultores. Aun cuando las resinas y el látex de muchas especies están asociados a la protección de la planta contra herbivoría, se ha documentado que también pueden inhibir la proliferación de microorganismos (Wahler *et al.* 2009; Lewinsohn 1991; Armbruster, 1984). Ciertas especies de abejas que recolectan látex y resinas lo hacen para, aprovechando sus propiedades insecticidas y/o antimicrobianas, proteger el nido de posibles depredadores y enfermedades.



**Figura 5.1** Individuos de *Trigona* sp. colectando látex de los cortes ocasionados en *P. andriouxii* para la extracción del látex y de las heridas en las flores causadas por *Xylocopa* sp. al robar néctar.



**Figura 5.2** *Xylocopa* sp. robando néctar de las flores de *P. andrieuxii*.

La colecta de látex por parte de las *Trigona* spp. ya ha sido reportada previamente por Pereira *et al.*, (2008), quienes observaron individuos de *T. williana* Friese, 1900 y *T. recursa* Smith, 1863 colectando látex del interior de la corteza de *Mammea americana* L. (Clusiaceae). Varios estudios han registrado la actividad antimicrobiana de especies de la familia Clusiaceae Lindl. (Guttiferae Juss 1789, nom.cons.), incluyendo extractos de la corteza de *Mammea africana* Sabine contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach (Ouahouo *et al.*, 2004) y de los extractos florales de *Mammea siamensis* Kolsterm contra *Bacillus subtilis* Cohn y *S. aureus* Rosenbach, 1884 (Antia *et al.*, 2006). Hasta ahora, los estudios de extractos de *M. americana* son limitados, habiéndose descrito solo propiedades insecticidas y ectoparásitas en sus semillas (Alvarado-Panameno *et al.*, 1994).

Por otra parte, los cardenólidos se han reportado con actividad contra bacterias (Akhtar *et al.*, 1992), hongos (Jacobsohn y Jacobsohn, 1985), virus (Bertol *et al.*, 2011) y protozoos (De Roode y Lefèvre, 2012). En un estudio realizado por Akhtar *et al.* (1992) se aisló el cardenólido proceragenina de *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton (Apocynaceae) y durante su evaluación farmacológica se encontró que era activo contra 11 especies de bacterias, pero no poseía actividad antiagregante (Akhtar *et al.*, 1991). Actualmente se reconoce a la oleandrina como uno de los productos fitoquímicos más potentes y farmacológicamente activos de *N. oleander* y su notable potencial farmacoterapéutico se ha interpretado como anticancerígeno, antiinflamatorio, anti-VIH, neuroprotector, antimicrobiano y antioxidante (Kanwal *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2016).

La presencia de cardenólidos u otros metabolitos con actividad antimicrobiana presentes en el látex de *P. andrieuxii* podría ser importante para que el nido de abejas esté protegido contra la infección por microorganismos. Estudios futuros dirigidos hacia la identificación de los componentes químicos del látex de *P. andrieuxii* y el probable papel de su actividad biológica, permitirán establecer su posible función en la protección de las colonias de abejas sin aguijón.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aardema, M. L., Y. Zhen y P. Andolfatto (2012). The evolution of cardenolide-resistant forms of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> - ATPase in Danainae butterflies. *Mol Ecol* 21:340–349.
- Abe, F., y T. Yamauchi (1992). Cardenolide triosides of oleander leaves. *Phytochemistry*, 31(7), 2459–2463.
- Acosta, I. F. V. (2019). *El papel de los cardenólidos en la interacción *Pentalinon andrieuxii* Mull - *Syntomeida epilais* Walker y su efecto en la metilación del ADN del insecto como estrategia ecológica de conservación*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Agrawal, A. (2017). *Monarchs and milkweed: A migrating butterfly, a poisonous plant, and their remarkable story of coevolution*. Princeton University Press.
- Agrawal, A., G. Petschenka, R. A. Bingham, M. G. Weber y S. Rasmann. (2012). Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions. *New Phytologist*, 194(1), 28-45.
- Akhtar, N., A. Malik, S. N. Ali, S. U. Kazmit (1992). Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 31(8), 2821-2824.
- Alvarado-Cárdenas, L. O. (2004). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Apocynaceae. *UNAM*, 38: 1-57
- Alvarado-Panameno, J. F., F. E. Lopez Caceres y N. A. Escolan Jovel (1994). Evaluation of aqueous and ethanol extracts of mammey seed (*Mammea americana*) for tick control in bovines.
- Anaya, A. L. L. y F. J.G Espinosa (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*, (083).
- Antia, B. S., J. E. Okokon, L. L. Nwidi y C. L. Jackson (2006). Effect of subchronic administration of ethanolic stem bark extract of *Mammea africana* Sabine on haematological and biochemical parameters of rats. *African Journal of Biomedical Research*, 9(2).
- Argüeta, A., L. Cano, y M. E. Rodarte (1994). Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Armbruster, W. S. (1984). The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. *American Journal of Botany*, 71(8), 1149-1160.

- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy y J. M. Vivanco (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Paschold, C. C. Von Dahl y C. A. Preston (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science*, 311(5762), 812-815.
- Barrows, E. M. (1980). Robbing of exotic plants by introduced carpenter and honey bees in Hawaii, with comparative notes. *Biotropica*, 23-29.
- Becerra, J. X. (2015). Macroevolutionary and geographical intensification of chemical defense in plants driven by insect herbivore selection pressure. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 15–21.
- Bennett, R. N., y R. M. Wallsgrave (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.
- Bertol, J. W., C. Rigotto, R. M. de Pádua, W. Kreis, C. R. M. Barardi, F. C. Braga y C. M. O. Simões (2011). Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antiviral Research*, 92(1), 73-80.
- Biesmeijer, J. C., y E. J. Slaa (2004). Information flow and organization of stingless bee foraging. *Apidologie*, 35(2), 143-157.
- Birnbaum, S. S. L., y P. Abbot (2018). Insect adaptations toward plant toxins in milkweed–herbivores systems—a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(5), 357-366.
- Bisset, N. G. (1961). The occurrence of alkaloids in the Apocynaceae, *Ann. bogor.* 3,105-236,
- Bisset, N. G. (1989). *Tabernanthe*: Uses, phytochemistry, and pharmacology, en: Series of revisions of Apocynaceae XXIX, Leeuwenberg, A. J.M. (ed.), Wageningen Agric. Univ. pp. 19–26.
- Black, D. W. (1976). *Studies on Cardiac Glycoside Storage in Moths*. Tesis de Doctorado. University of Miami, Miami, FL.
- Blum, M. S. (1992). Ingested allelochemicals in insect wonderland: a menu of remarkable functions. *American Entomologist*, 38(4), 222-234.

- Bowers, M. D. (1992). Aposematic caterpillars: Lifestyles of the warningly colored and unpalatable, en: Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging. Stamp N. E. y Casey T. M. (eds). Chapman and Hall, New York.
- Bowers, M. D. (2008). Chemical defenses in wooly bears: sequestration and efficacy against predators and parasitoids, en: Tiger Moths and Wooly Bears. W. E. Conner (ed). Oxford Univ. Press. pp. 328
- Bowers, M. D. (2009). Immunological cost of chemical defence and the evolution of herbivore diet breadth. *Ecol Lett.* 12:612-621.
- Bramer, C., S. Dobler, J. Deckert, M. Stemmer, G. Petschenka (2015). Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20142346.
- Brower, L. P., y J. V. Z. Brower (1964). *Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological chemistry*. New York Zoological Society.
- Brower, L. P., V. Z. Brower, F. G. Stiles, H. J. Croze y A. S. Hower (1964). Mimicry: Differential advantage of color patterns in the natural environment. *Science*, 144(3615), 183–185.
- Brown, K. S., y J. R. Trigo (1995). The ecological activity of alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 47(C), 227–354.
- Burns E. L., E. M. Price (1993). Random mutagenesis of the sheep Na,K-ATPase alpha-1 subunit generates a novel T797N mutation that results in a ouabain-resistant enzyme. *J Biol Chem* 268:25632–25635.
- Burzynski, E. A., K. P. C. Minbirole, T. Livshultz (2015). New sources of lycopsamine-704 type pyrrolizidine alkaloids and their distribution in Apocynaceae. *Biochem. 705 Syst. Ecol.* 59, 331–339.
- Carfora, A., R. Petrella, R. Borriello, L. Aventaggiato, R. Gagliano-Candela y C. P. Campobasso (2021). Fatal poisoning by ingestion of a self-prepared oleander leaf infusion. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 17(1), 120-125.

- Chambers, J. L., M. R. Berenbaum, y A. R. Zangerl (2007). Benefits of trenching behavior in the context of an inducible defense. *Chemoecology*, 17(3), 125-130.
- Chan-Bacab, M. J., E. Balanza, E. Deharo, V. Muñoz, R. D. García y L. M. Peña-Rodríguez (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 243-247.
- Chan-Bacab, M. J., y L. M. Peña-Rodríguez (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural product reports*, 18(6), 674-688.
- Cohen, J. A., y L. P. Brower (1983). Cardenolide sequestration by the dogbane tiger moth (*Cycnia tenera*; Arctiidae). *Journal of Chemical Ecology*, 9(4), 521-532.
- Colegate S. M., D. R. Gardner, J. M. Betz, O. W. Fischer, S. Liede-Schumann, M. Boppré (2016). Pro-toxic 1, 2-dehydropyrrolizidine alkaloid esters, including unprecedented 10-membered macrocyclic diesters, in the medicinally-used *Alafia* cf. *caudata* and *Amphineurion marginatum* (Apocynaceae: Apocynoideae: Nerieae and Apocyneae). *Phytochemical Analysis* 27: 257-276.
- Conner, W. E. (2008). *Tiger moths and woolly bears: behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae*. Oxford University Press.
- Covell Jr, C. V. (2005). Moths of Eastern North America. *Virginia Museum of Natural History Special Publication*, (12).
- Dager, M. A. (2016). Chemistry, spectroscopic characteristics and biological activity of natural occurring cardiac glycosides. *IOSR J. Biotechnol. Biochem*, 2, 20-35.
- Dawkins, R., y J. R. Krebs (1979). Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161), 489-511.
- Delgoda, R., y J. E. Murray (2016). Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*
- De Pont, J. J. H., H. G. Swarts, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, P. H. Willems y J. B. Koenderink (2009). The non-gastric H, K-ATPase as a tool to study the ouabain-binding site in Na, K-ATPase. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 457(3), 623-634.

- De Roode, J. C. y T. Lefèvre (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3), 789-820.
- Després, L., J. P. David y C. Gallet (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(6), 298–307.
- Dobler, S. (2004). The evolution of adaptations to plant secondary compounds in Chrysochus leaf beetles (Chrysomelidae, Eumolpinae). en: *New Developments in the Biology of Chrysomelidae*. Jolivet P, Santiago-Blay JA and Schmitt M (eds). SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands. pp. 117–123
- Dobler, S., G. Petschenka, H. C. Pankoke (2011). Coping with toxic plant compounds—the insect’s perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry* 72: 1593–1604.
- Dobler, S., G. Petschenka, V. Wagschal y L. Flacht (2015). Convergent adaptive evolution — how insects master the challenge of cardiac glycoside-containing host plants. *Entomol Exp*, 157(1), 30-39.
- Domínguez-Carmona, D. B., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, G. Ruiz-Pinell, D. Gutierrez-Yapu, M. J. Chan-Bacab, L. M. Peña-Rodríguez (2010). Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*, 17(5), 379-382
- Duno de Stefano, R., Carnevali Fernández-Concha, G., Ramírez Morillo, I. M., Tapia Muñoz, J. L., Can Itzá, L. L., Hernández-Aguilar, S. y Embray, T. (2010 en adelante). Flora de la Península de Yucatán. [cicy.mx/sitios/flora%20digital/](http://cicy.mx/sitios/flora%20digital/)
- Dussourd, D. E. (2009). Do canal-cutting behaviours facilitate host-range expansion by insect herbivores?. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(4), 715-731.
- Dussourd, D. E., y R. F. Denno (1991). Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. *Ecology*, 72(4), 1383-1396.
- Dussourd, D. E. y T. Eisner (1987). Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defense of plants. *Science*, 237(4817), 898-901.
- Endress, M. (2004). Apocynaceae : Brown and now. *Telopea*, 10(2), 525–541.
- Endress, M. E., y P. V. Bruyns (2000). A revised classification of the Apocynaceae sl. *The Botanical Review*, 66(1), 1-56.

- Endress, M. E., M. Hesse, S. Nilsson, A. Guggisberg y J. P. Zhu (1990). The systematic position of the Holarrheninae (Apocynaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 171(1), 157-185.
- Endress, M. E., S. Liede-Schumann y U. Meve (2014). An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa*, 159(3), 175-194
- Farkhondeh, T., M. Kianmehr, T. Kazemi, S. Samarghandian y M. R. Khazdair (2020). Toxicity effects of *Nerium oleander*, basic and clinical evidence: A comprehensive review. *Human & experimental toxicology*, 39(6), 773-784.
- Feng, J. y J. B. Lingrel (1994). Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of Na,K-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. *Biochemistry* 33:4218–4224.
- Fishbein, M., T. Livshultz, S. C Straub, A. O. Simões, J. Boutte, A. McDonnell y A. Foote (2018). Evolution on the backbone: Apocynaceae phylogenomics and new perspectives on growth forms, flowers, and fruits. *American Journal of Botany*, 105(3), 495-513.
- Fitzgerald, T. D., M. A., Stevens, S., Miller y P. Jeffers (2008). Aposematism in *Archips cerasivoranus* not linked to the sequestration of host-derived cyanide. *Journal of chemical ecology*, 34(10), 1283-1289.
- Gentry, G. L., y L. A. Dyer (2002). On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, 83(11), 3108-3119.
- González-Rocha, E., y R. Cerros-Tlatilpa (2015). La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. *Acta Botánica Mexicana*, 70(110), 21–70.
- Guilford, T. (1990) The evolution of aposematism. In: Evans DL, Schmidt JO (eds) *Insect defenses*. State University of New York Press, Albany, N.Y., pp 23–61
- Gutiérrez-Rebolledo, G. A., S. Drier-Jonas y M. A. Jiménez-Arellanes (2017). Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1105-1110.
- Hagel, J. M., Yeung, E. C., & Facchini, P. J. (2008). Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in plant science*, 13(12), 631-639.

- Hassall, C. H. (1951). The cardiac glycosides of *Urechites suberecta*. *Journal of the Chemical Society (d)*, 3193-3195.
- Harborne, J. B. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Imperial College Press.
- Heckel, D. G. (2014) Insect Detoxification and Sequestration Strategies: In Annual plant reviews: insect-plant interaction John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Hegnauer, V. R. (1989). Apocynaceae. In *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhäuser, Basel. pp. 48-60.
- Hegnauer, V. R. (1970). Cardenolide und Bufadienolide (= Cardadienolide). *Planta medica*, 19(06), 138-153.
- Holzinger, F. y M. Wink (1996). Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Chemical Ecology*, 22(10), 1921-1937.
- Hutchings, A. (1989) A survey and analysis of traditional medicinal plants as used by the Zulu, Xhosa and Sotho. *Bothalia* 19 (I), 111-123.
- Irwin, R. E., J. L. Bronstein, J. S. Manson y L. Richardson (2010). Nectar robbing: ecological and evolutionary perspectives. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 41, 271-292.
- Irwin, R. E. y J. E. Maloof (2002). Variation in nectar robbing over time, space, and species. *Oecologia*, 133(4), 525-533.
- Jacobsohn, M. K. y G. M. Jacobsohn (1985). Production of a fungistat and the role of fungi during germination of *Digitalis purpurea* L. cv. *Gloxiniaflora* seeds. *Annals of botany*, 56(4), 543-552.
- Juárez Jaimes, V., L. O. Alvarado Cárdenas y J. L. Villaseñor (2007). La familia Apocynaceae sensu lato en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 459-482.
- Kanwal, N., A. Rasul, G. Hussain, H. Anwar, M. A. Shah, I. Sarfraz y Z. Selamoglu (2020). Oleandrin: A bioactive phytochemical and potential cancer killer via multiple cellular signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 143, 111570.

- Kappers, I.F., A. Aharoni, T.W.J.M. van Herpen, L.L.P. Luckerhoff, M. Dicke y H.J. Bouwmeester (2005). Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* 309,2070–2072.
- Karban, R., I. T. Baldwin, K. J. Baxter, G. Laue y G. W. Felton (2000). Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia*, 125(1), 66-71.
- Kariñho-Betancourt, E. (2018). Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: Ecological and evolutionary perspectives. *Botanical Sciences*, 96(1), 35–5
- Kessler, A., y I. T. Baldwin (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), 2141-2144.
- Kessler, D., K. Gase e I. T. Baldwin (2008). Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents. *Science*, 321(5893), 1200-1202.
- Kessler, A. y A. Kalske (2018). Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. . *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 49:115–38
- Kisakürek, M.V., Leeuwenberg, A.J.M., Hesse, M., 1983. A chemotaxonomic investigation of the plant families of Apocynaceae, Loganiaceae, and Rubiaceae by their indole alkaloid content. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, vol. 1. Pelletier, S.W. (Ed.). Wiley, New York, pp. 211–376.
- Klitzke, C. F., y K. S. Brown Jr (2000). The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). *Chemoecology*, 10(2), 99-102.
- Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, 72(13), 1510-1530.
- Labeyrie, E., y S. Dobler (2004). Molecular adaptation of *Chrysochus* leaf beetles to toxic compounds in their food plants. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 218-221.
- Leitner, M., W. Boland y A. Mithofer (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 167:597–606.

- Leonhardt, S. D. y N. Blüthgen (2009). A sticky affair: resin collection by Bornean stingless bees. *Biotropica*, 41(6), 730-736.
- Lewinsohn, E., M. Gijzen y R. Croteau (1991). Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant physiology*, 96(1), 44-49.
- Lezama-Dávila, C. M., L. Pan, A. P. Isaac-Márquez, C. Terrazas, S. Oghumu, R. Isaac-Márquez, y A. D. Kinghorn (2014). *Pentalinon andrieuxii* root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy Research*, 28(6), 909-916.
- Lingrel, J. B. (2010). The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase. *Annual review of physiology*, 72, 395-412.
- Lu, K., Y. Song y R. Zeng (2020). The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Current Opinion in Insect Science*. 43:103–107
- Malcolm, S. B. (1991). Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores. In: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, 2nd edition. Volume I. G. A. Rosenthal y M. R. Berenbaum (eds). The Chemical Participants. Academic Press, San Diego: 251–296.
- Mandal, S. M., D. Chakraborty y S. Dey (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling and behavior*, 5(4), 359-368.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Mithöfer, A., y M. E. Maffei (2016). General mechanisms of plant defense and plant toxins. *Plant Toxins; Springer AG: Switzerland*, 1-22.
- Mithöfer, A., y W. Boland (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, 63, 431-450.
- Morales, J. F., M. E. Endress y S. Liede-Schumann (2017). Sex, drugs and pupusas: Disentangling relationships in Echiteae (Apocynaceae). *Taxon*, 66(3), 623-644.

- Nealis, V. G. y J. R. Nault (2005) Seasonal changes in foliar terpenes indicate suitability of Douglas-fir buds for western spruce budworm. *J. Chem. Ecol.* 31, 683–696
- Niklas, K. J., B. H. Tiffney y A. H. Knoll (1983). Patterns in vascular land plant diversification. *Nature*, 303(5918), 614.
- Noll, F. B., R. Zucchi, J. A. Jorge y S. Mateus (1996). Food collection and maturation in the necrophagous stingless bee, *Trigona hypogea* (Hymenoptera: Meliponinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 287-293.
- Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 13742–13747.
- Opitz, S. E. W., y C. Müller (2009). Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology*, 19(3), 117–154.
- Ouahouo, B. M. W., A. G. B. Azebaze, M. Meyer, B. Bodo, Z. T. Fomum y A. E. Nkengfack (2004). Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea africana*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98(7), 733-739.
- Pan, L., C. M. Lezama-Davila, A. P. Isaac-Marquez, E. P. Calomeni, J. R. Fuchs, A. R. Satoskar, y A. D. Kinghorn (2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*, 82, 128-135.
- Pasteels, J. M., J. C. Braekman y D. Daloze (1988). Chemical defense in the Chrysomelidae. In *Biology of chrysomelidae* Springer, Dordrecht. pp. 233-252.
- Paula, S., M. R. Tabet y W. J. Ball (2005). Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure– activity relationship models for ligand binding to the E2-pi form of the enzyme versus activity inhibition. *Biochemistry*, 44(2), 498-510.
- Pereira, C. D., y Tannús-Neto, J. (2009). Observações sobre abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) coletoras de látex em Abricó do Pará *Mammea americana* (L.) Jacq.(Clusiaceae) Manaus, estado do Amazonas, Brasil. *Bioscience Journal*, 25(6).

- Petschenka, G., y A. A. Agrawal (2016). How herbivores coopt plant defenses: natural selection, specialization, and sequestration. *Current Opinion in Insect Science*, 14, 17–24.
- Petschenka, G., J. K. Offe y S. Dobler (2012). Physiological screening for target site insensitivity and localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in cardenolide-adapted Lepidoptera. *J Insect Physiol* 58:607–612.
- Petschenka, G. y S. Dobler (2009). Target-site sensitivity in a specialized herbivore towards major toxic compounds of its host plant: The Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase of the oleander hawk moth (*Daphnis nerii*) is highly susceptible to cardenolides. *Chemoecology* 19: 235–239
- Petschenka, G, S. Fandrich, N. Sander, V. Wagschal, M. Boppre y S. Dobler (2013a). Stepwise Evolution of resistance to toxic cardenolides via genetic substitution in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of milkweed butterflies (Lepidoptera: Danaini). *Evolution*, 67:2753-2761. 23.
- Petschenka, G, J. K. Offe, S. Dobler (2012). Physiological screening for target site insensitivity and localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in cardenolide-adapted Lepidoptera. *J Insect Physiol*, 58:607-612. 24.
- Petschenka, G, C. Pick, V. Wagschal y S. Dobler (2013b). Functional evidence for physiological mechanisms to circumvent neurotoxicity of cardenolides in an adapted and a non-adapted hawk-moth species. *Proc Biol Sci*, 280:20123089.
- Petschenka, G., V.Wagschal, M. von Tschirnhaus, A. Donath, S. Dobler. (2017). Convergently evolved toxic secondary metabolites in plants drive the parallel molecular evolution of insect resistance. *The American Naturalist*, 190(S1), S29-S43.
- Platt, A. P., R. P. Coppinger, y L. P. Brower (1971). Demonstration of the selective advantage of mimetic *Limnitis* butterflies presented to caged avian predators. *Evolution*, 25(4), 692-701.
- Prado, E., y D. Demarco (2018). Laticifers and secretory ducts: similarities and differences. In *Ecosystem services and global ecology*. IntechOpen.
- Price, P. W. (2002). Species interactions and the evolution of biodiversity. In: *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach*. Herrera CM, Pellmyr O (eds). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 3-25.

- Pulido, M. y L. Serralta (1993). Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el estado de Quintana Roo. *CIQRO, Chetumal, Quintana Roo, Mexico*.
- Quattrocchi, U. (1999). CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. CRC Press. ISBN 978-0-8493-2673-8. pp. 211.
- Quinn, M. (2008). Polka-dot wasp moth *Syntomeida epilais* (Walker, 1854) [Online]. Texas Lepo information. Available: <http://texasento.net/epilais.htm> [Accessed [16/04/2019]
- Ramakrishna, A. y G. A. Ravishankar (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 6: 1720–1731.
- Rothschild, M., J., Von Euw y T. Reichstein (1973). Cardiac glycosides (heart poisons) in the polka dot moth *Syntomeida epilais* Walk. (Ctenuchidae: Lep.) with some observations on the toxic qualities of *Amata* (=Syntomis) *phegea* (L.). *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 183(1072), 227–247.
- Roubik, D. W. (1989). Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press. Cambridge. Pp. 514.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37(2), 124-143.
- Schmidt, B. C., y J. D. Lafontaine, J. D. (2010). *Annotated check list of the Noctuoidea (Insecta, Lepidoptera) of North America north of Mexico* (Vol. 40). PenSoft Publishers LTD.
- Schnee, C., T. G. Köllner, M. Held, T. C. J. Turlings, J. Gershenzon y J. Degenhardt (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*103, 1129–1134.
- Scudder, G. G. E., y J. Meredith (1982). Morphological basis of cardiac glycoside sequestration by *Oncopeltus fasciatus* (Dallas)(Hemiptera: Lygaeidae). *Zoomorphology*, 99(2), 87-101.
- Schultes, R. E. (1979). De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(2), 165-192.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. Online. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Acceso marzo 2019].

- Thompson, J. N. (1994). *The coevolutionary process*. University of Chicago Press.
- Torrie, L. S., Radford, J. C., Southall, T. D., Kean, L., Dinsmore, A. J., Davies, S. A., & Dow, J. A. (2004). Resolution of the insect ouabain paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13689-13693.
- van Beck, T. A., R. Verpoorte, A. B. Svendsen, A. J. M. Leeuwenberg, y N. G. Bisset (1984). *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(1), 1-156.
- Varella T.L., G. M. Silva, K. Z. C. M. da la Cruz, A.I Mikovski, J. R. da Silva, I. F. Carvalho y M. L. Silva (2015). In vitro germination of desert rose varieties. *Ornamental Horticulture* 21: 227-234.
- Vickers, C. E., J. Gershenzon, M. T. Lerdau y F. Loreto (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature chemical biology*, 5(5), 283-291.
- von Nickisch-Rosenegk, E., A. Detzel, M. Wink y D. Schneider (1990). Carrier-mediated uptake of digoxin by larvae of the cardenolide sequestering moth, *Syntomeida epilais*. *Naturwissenschaften*, 77(7), 336–338.
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., & Mohiuddin, U. (2003). *Article : Fragments of the earliest land plants*. *Nature* 425:282–85.
- Wahler, D., C. S. Gronover, C. Richter, F. Foucu, R. M. Twyman, B. M. Moerschbacher y D. Pruber (2009). Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. *Plant physiology*, 151(1), 334-346.
- Wen, S., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., Ding, L., & Jiang, M. (2016). Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. *Fitoterapia*, 112, 74-84.
- Wink, M., & Schneider, D. (1990). Fate of plant-derived secondary metabolites in three moth species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *Journal of Comparative Physiology B*, 160(4), 389-400.
- Wittstock. U. y J. Gershenzon (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:300–7.

- Wong, S. K., Y. Y. Lim y E. W. Chan (2013). Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review. *Pharmacognosy Communications*, 3(3).
- Yam-Puc, A., L. Chee-González, F. Escalante-Erosa, A. Arunachalampillai, O. F. Wendt, O. Sterner y L. M. Peña-Rodríguez (2012). Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*, 5(1), 45-48.
- Yam-Puc, F. Escalante-Erosa, M. Pech-Lopez, M. J. Chan-Bacab, A. Arunachalampillai, O. F. Wendt y L. M. Peña-Rodríguez (2009). Trinorsesquiterpenoids from the Root Extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of natural products*, 72(4), 745-748.
- Yang, L., N. Ravikanthachari, R. Mariño-Pérez, R. Deshmukh, M. Wu, A. Rosenstein y P. Andolfatto (2019). Predictability in the evolution of Orthopteran cardenolide insensitivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1777), 20180246.
- Yatime, L., M., Laursen, J. P. Morth, M. Esmann, P. Nissen y N. U. Fedosova (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of structural biology*, 174(2), 296-306.
- Zagrobelyny, M., S. Bak, A. V. Rasmussen, B. Jorgensen, C. M. Naumann y B. L. Moller (2004). Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293-306.
- Zahiri, R., I. J. Kitching, J. D. Lafontaine, M. Mutanen, L. Kaila, J. D. Holloway y N. Wahlberg (2011). A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). *Zoologica Scripta*, 40(2), 158–173.
- Zalucki, M. P. y L. P. Brower (1992). Survival of first instar larvae of *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Danainae) in relation to cardiac glycoside and latex content of *Asclepias humistrata* (Asclepiadaceae). *Chemoecology*, 3(2), 81-93.
- Zalucki, M. P., L. P. Brower y M. A. Alonso (2001b). Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology*, 26(2), 212-224.
- Zalucki, M. P., S. B. Malcolm, T. D. Paine, C. C. Hanlon, L. P. Brower y A. R. Clarke (2001a). It's the first bites that count: Survival of first-instar monarchs on milkweeds. *Austral Ecology*, 26(5), 547-555.

