



ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DE ACTIVIDAD ANTIINSECTO DE ESPECIES DE LA FLORA LOCAL URUGUAYA (SAPINDACEAE Y MELIACEAE)

Quím. Martina Díaz

Tesis de Doctorado en Química



Orientadora: Prof. Carmen Rossini, Ph.D

Laboratorio de Ecología Química,

Departamento de Química Orgánica-Departamento de Biociencias,

Facultad de Química, UdelaR

Montevideo, noviembre de 2012

Índice

ÍNDICE	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	8
ESTRUCTURA DE LA TESIS	10
RESUMEN	11
<u>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</u>	<u>13</u>
<u>CAPÍTULO I. MELIA AZEDARACH (MELIACEAE)</u>	<u>23</u>
1.1 INTRODUCCIÓN.....	25
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.....	36
MATERIAL VEGETAL	37
EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO	37
COLONIAS DE INSECTOS	40
BIOENSAYOS	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	43
1.3 RESULTADOS	45
1.3.1 ACTIVIDAD ANTIINSECTO DE FRACCIONES	45
1.3.2 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS	47
1.3.3 ACTIVIDAD ANTIINSECTO DE COMPUESTOS AISLADOS Y SUS MEZCLAS	51
1.4 DISCUSIÓN.....	52
1.4.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.....	52
1.4.2 ACTIVIDAD ANTIINSECTO.....	58
1.5 CONCLUSIONES	62
<u>CAPÍTULO II. FAMILIA SAPINDACEAE</u>	<u>63</u>
2.1 INTRODUCCIÓN.....	65
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	80
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.....	80
MATERIAL VEGETAL	81
EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO	81

COLONIAS DE INSECTOS	88
BIOENSAYOS	88
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	88
2.3 RESULTADOS	89
2.3.1 FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO DE COMPUESTOS Y ACTIVIDAD ANTIINSECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO RAMAS DE <i>A. EDULIS</i>	93
2.3.2 FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO DE COMPUESTOS Y ACTIVIDAD ANTIINSECTO DE EXTRACTOS DE <i>D. VISCOSA</i>	103
2.4 DISCUSIÓN.....	110
2.4.1 ACTIVIDAD ANTIINSECTO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES	110
2.4.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS AISLADOS Y SU ACTIVIDAD ANTIINSECTO.....	114
2.5 CONCLUSIONES	132
 <u>CONCLUSIONES GENERALES.....</u>	<u>135</u>
 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>139</u>
 <u>ANEXOS.....</u>	<u>161</u>

Agradecimientos

Agradezco especialmente a todas aquellas personas que tantas veces han hecho un esfuerzo por entender a que me he dedicado estos años, y no solo les agradezco, sino que también les pido disculpas, porque seguro hubo veces en las que no fui capaz de hacerlo. Entre ellos, y más que a nadie, a mis padres y a mis hermanos, les agradezco por haberme brindado siempre su apoyo, transmitido su confianza, seguridad y contención, para seguir adelante con todo lo que me propusiera.

A Carmen, por haberme acompañado en este camino, por haber vencido obstáculos conmigo, por haberme enseñado tantas veces, y por haber compartido tantas otras la satisfacción de resolver juntas asuntos que, en algunos momentos, parecieron irresolubles.

A Andrés, por estar siempre cerca, acompañando, y por haber sido en los comienzos, un pilar fundamental en mi decisión de optar por este camino.

A mis compañeros de laboratorio, a todos y cada uno de ellos, porque todos han sido parte de esto, ayudando, colaborando, apoyando, distraendo cuando lo necesité, pero principalmente acompañando.

A mis amigas; las que están en el laboratorio, las que ya casi no están, las que lo conocen solo por haber ido de visita, y todas aquellas que lo conocen por cuentos. A todas, las que han estado día a día a mi lado, estando aquí o en una ciudad vecina o hasta a decenas de miles de kilómetros. A cada una un gran gracias.

A Lucía, que recorrió este camino junto a mí desde mis primeros días en el laboratorio, compañera de trabajo, crítica fundamental de los trabajos de ambas, compañera de viajes, compañera en las caídas y los éxitos, pero por sobre todo, amiga.

A Gustavo, por aceptar ser miembro del tribunal de tesis, pero mucho más que por eso, por todo el entusiasmo depositado en mi trabajo, por su disposición infinita para ayudarme y por todas las horas que dedicó a enseñarme todo lo que estaba a su alcance.

A todos los vecinos de la Cátedra de Orgánica que han sabido darme una mano, o simplemente sus palabras de aliento, que tantas veces son tan necesarias.

A Ian, que fue quién inspiró en mí por primera vez el entusiasmo por investigar, transmitiéndome su pasión, su ímpetu y sus ganas de hacer ciencia. Quien me apoyó cuando trabajamos juntos y me sigue apoyando a la distancia hasta el día de hoy. Y le agradezco ahora, también, por venir a ser miembro del tribunal de esta tesis.

A muchísimas personas que me he cruzado en el camino, me han ayudado en este trabajo y se han quedado además con mi cariño: Carmen Elisa, Azucena, Ricardo, Rodney, Rubén.

A Eduardo y María Julia, por aquellos paseos tan bonitos que significaron las colectas del material vegetal, fundamentales para este trabajo.

Al Dr. Patrick Moyna por aceptar ser parte de las dos instancias de evaluación de esta tesis.

A Horacio Pesaroglo y Verónica Martínez, por los cientos de espectros de RMN de este trabajo que obtuve gracias a ellos.

A Laura y Gaby por todas las veces que me solucionaron todo lo que pudieron, por su calidez y amabilidad siempre.

A Eduardo Dellacassa y a Cristina Mori, por su colaboración en los análisis de masas isotópica.

A Gonzalo Carrau, por su gran ayuda con los espectros de IR.

A Roberto Zoppolo y Facundo Ibáñez por su colaboración en los inicios con los limonoides del Paraíso.

A Patricia Saenz, por toda su ayuda y paciencia otorgadas con los asuntos de conformaciones moleculares.

A Carolina Fontana, por su colaboración con el uso del programa de procesamiento de espectros de resonancia.

A Eduardo Cassel, por la realización de los extractos con fluídos supercríticos.

A la Facultad de Química y PEDECIBA, por aceptarme como estudiante de Doctorado.

Agradezco mucho también, a todos los organismos que han financiado todo este trabajo haciéndolo posible: otra vez a Facultad de Química y a PEDECIBA (por la beca de posgrado que usufruuté durante los primeros meses de trabajo y por la financiación de una de mis pasantías, en cada caso). Al LATU por otorgarme la beca de Posgrado (Convenio FQ-LATU), a la ANII también por la beca de Doctorado, al PDT (Proyecto de investigación fundamental, 2006, subprograma II – B), a CSIC-UdelaR por el financiamiento de pasantías así como del traslado del miembro extranjero del tribunal, a la OPCW por su financiamiento de mi última pasantía, al convenio CSIC España-UdelaR, al INIA – Las Brujas.

Y por último, mi más profundo agradecimiento a Santiago, que además de ayudarme en esto y darme todo el ánimo cuando lo necesité, ha hecho que la etapa final de este trabajo, la más difícil e intensa, haya sido la más feliz.

Índice de Figuras

Figura 1. Productos naturales de origen vegetal utilizados como bioplaguicidas.....	17
Figura 2. a) Precursores de los limonoides. b) Numeración de un limonoide intacto. c) Ejemplo de limonoide degradado. d) Ejemplo de seco limonoide. e) Ejemplo de limonoide de altas modificaciones oxidativas.	27
Figura 3. Azadiractina (13) y toosendanina (14): triterpenoides comercializados para el control de plagas.	28
Figura 4. Compuestos aislados de especies del género <i>Swietenia</i>	29
Figura 5. Compuestos aislados de especies del género <i>Khaya</i>	31
Figura 6. Imágenes del árbol del Paraíso	33
Figura 7. Algunos compuestos aislados de <i>M. azedarach</i>	35
Figura 8. Esquema de extracción primaria de frutos de Paraíso.	38
Figura 9. Esquema de fraccionamiento de F4, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.	39
Figura 10. Esquema de fraccionamiento de F5-7, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.	39
Figura 11. Esquema de fraccionamiento de F8-12, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.	40
Figura 12. Diseño de bioensayos	43
Figura 13. Compuestos aislados del extracto etanólico de frutos de Paraíso.	48
Figura 14. Señales de NOE confirmatorias de 42.	54
Figura 15. Fotos de <i>A. edulis</i>	70
Figura 16. <i>D. viscosa</i>	73
Figura 17. Esqueletos básicos de los (a) <i>neo</i> -clerodanos; (b) <i>ent</i> -clerodanos y (c) labdanos.	74
Figura 18. Diterpenos de <i>Dodonaea</i> spp.	76
Figura 19. Flavonoides de <i>Dodonaea</i> spp.	78
Figura 20. Otros metabolitos secundarios de <i>Dodonaea</i> spp.	79
Figura 21. Fraccionamiento de 2aC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de <i>A. edulis</i> por cromatografía líquida a vacío).	84
Figura 22. Fraccionamiento de 2bC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de <i>A. edulis</i> por cromatografía líquida a vacío).	85
Figura 23. Fraccionamiento de 3aC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de <i>A. edulis</i> por cromatografía líquida a vacío).	86
Figura 24. Fraccionamiento de 4bC1Dv (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de hojas de <i>D. viscosa</i> por cromatografía líquida a vacío).	87
Figura 25. TLC de los extractos de hojas y ramas de <i>A. edulis</i> , <i>D. viscosa</i> y <i>S. meridionalis</i> realizados con fluidos supercríticos.	92
Figura 26. TLC de las fracciones 1 a 9 C2Ae.	95
Figura 27. TLC de las fracciones obtenidas de la columna flash a la que se sometió 3aC1Ae.	100
Figura 28. TLC de las fracciones obtenidas de C1Dv.	105
Figura 29. TLC de 131 comparando con extracto etanólico bruto de hojas de <i>D. viscosa</i>	108
Figura 30. Ácidos grasos aislados de los extractos etanólicos de ramas de <i>A. edulis</i> y hojas de <i>D. viscosa</i>	115

Figura 31. Desplazamientos de los C e H de la cadena lateral de 131	122
Figura 32. Estructura de 131 y señales de NOESY confirmatorias de la misma.	123

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados de los ensayos de actividad antiinsecto de extractos y fracciones, de frutos de Paraíso, contra las cuatro especies de insectos modelo.....	46
Tabla 2. Resultados de los análisis de abundancia isotópica del carbono para el extracto bruto etanólico de frutos, los solventes etanol y metanol, y los compuestos 42 y 43	47
Tabla 3. Desplazamiento de los ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm, 100-150 MHz) para los compuestos aislados (42-46).	49
Tabla 4. Desplazamiento de los ^1H (δ en ppm, J en Hz) para los compuestos aislados (1-5).	50
Tabla 5. Resultado de los bioensayos evaluando actividad antiinsecto de compuestos puros aislados del extracto etanólico de frutos de Paraíso contra las especies de insectos modelo.	51
Tabla 6. Rendimiento y actividad antiinsecto de los extractos etanólicos de los diferentes órganos de las especies vegetales estudiadas.	90
Tabla 7. Rendimientos de particiones líquido-líquido de los materiales vegetales particionados.	91
Tabla 8. Rendimiento de extracciones realizadas con fluidos supercríticos a las distintas presiones, de los diferentes materiales vegetales extraídos.	91
Tabla 9. Actividad antiinsecto de las fracciones de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de ramas de <i>A. edulis</i>	93
Tabla 10. Masa y actividad antiinsecto de las fracciones obtenidas de C1Ae con los diferentes solventes de elución.	94
Tabla 11. Datos de ^{13}C y ^1H RMN obtenidos para 119	96
Tabla 12. Actividad antiinsecto de fracciones y compuestos aislados del extracto de ramas de <i>A. edulis</i>	102
Tabla 13. Masa y actividad antiinsecto de las fracciones obtenidas de C1Dv con los diferentes solventes de elución.	104
Tabla 14. Actividad antiinsecto de fracciones y compuestos aislados del extracto de hojas de <i>D. viscosa</i>	109
Tabla 15. Resultados de actividad antiinsecto de los triterpenos y esteroides puros aislados de <i>A. edulis</i> y <i>D. viscosa</i>	129

Glosario de Abreviaturas

δ	Desplazamiento
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
EIMS	<i>Electronic impact mass spectroscopy</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Etanol
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HREIMS	<i>High resolution electronic impact mass spectroscopy</i>
HRESIMS	<i>High resolution electrospray mass spectroscopy</i>
IP	Índice de preferencia
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
m	Masa
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect/Enhancement</i>

NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
TLC	Cromatografía en capa fina
<i>uv</i>	Ultravioleta

Estructura de la tesis

Esta tesis consta de una introducción general, dos capítulos y una conclusión general. La **Introducción general** contiene los antecedentes que llevan al por qué de este trabajo, incluyendo información general sobre el uso de bioplaguicidas en el mundo y en particular en nuestro país. El **Capítulo I** comienza introduciendo la familia de las meliáceas y sus propiedades como potencial fuente de bioplaguicidas, para luego centrarse en los estudios fitoquímicos y de actividad antiinsecto realizados en este trabajo sobre el árbol del Paraíso. El **Capítulo II** comienza también introduciendo, en este caso, a la familia de las sapindáceas, focalizándose luego en tres géneros y por último en dos especies vegetales que fueron las escogidas para los estudios dentro de esa familia vegetal: *Allophylus edulis* y *Dodonaea viscosa*. Cada uno de los dos capítulos se encuentra dividido en Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, y Conclusiones. Plasmándose al final de la tesis las **Conclusiones generales** de todo el trabajo descrito, donde se incluyen perspectivas de trabajo futuro.

Resumen

El constante crecimiento de la población mundial que trae de la mano el concomitante aumento de la demanda de productos agrícolas, ha ocasionado que el uso de insecticidas convencionales se haya incrementado en los últimos años. Este tipo de productos, debido a tener mecanismos de acción que involucran blancos comunes a todos los animales, pueden tener toxicidad generalizada, provocando efectos adversos en toda la biota incluyendo consecuencias en los seres humanos. Asimismo, el mal uso que se le da a los mismos ha traído como resultado el desarrollo de mecanismos de resistencia en organismos diana. Por todo esto, a pesar de que el uso de plaguicidas de síntesis es efectivo a corto plazo, no es sostenible a largo plazo. Debido a ello, existe actualmente una tendencia, aún en la producción convencional, a utilizar alternativas al uso de tales plaguicidas. Es así que surge como una de las opciones posibles el desarrollo de bioplaguicidas, y es en ese marco que se desarrolla este trabajo.

Existen varias familias vegetales con reportada actividad antiinsecto que a su vez se encuentran distribuidas en nuestro país. Entre ellas pueden nombrarse las Asteráceas, Lamiáceas, Meliáceas, Mirtáceas, Sapindáceas. Este estudio fue focalizado en el árbol del Paraíso (Meliaceae) y en dos especies pertenecientes a la familia de las Sapindáceas: *Allophylus edulis* y *Dodonaea viscosa*.

El Paraíso (*Melia azedarach*) es una especie vegetal que ha probado poseer actividad antiinsecto en especímenes colectados en diversas regiones geográficas. Es una potencial fuente de bioplaguicidas debido especialmente a su capacidad de producción de triterpenos del tipo limonoides. En nuestro país, es un árbol abundante y fácilmente disponible, y el uso de sus extractos como bioplaguicidas está siendo cada vez más difundido. Es con el objetivo de la descripción de la composición de esos extractos, que en este trabajo se realizó el estudio fitoquímico y de actividad antiinsecto de extractos de frutos de esta especie vegetal colectados localmente, aislándose cinco compuestos del tipo limonoides. Dos de ellos, 21 α -metilmelianodiol y 21 β -etilmelianodiol, fueron aislados por primera vez de esta especie vegetal, resultando el primero ser activo contra *Myzus persicae*. Los otros tres, fueron C-seco limonoides que

ya habían sido reportados previamente en esta especie vegetal en la región, y que mostraron ser activos contra *Epilachna paenulata* y *Spodoptera littoralis*.

A. edulis y *D. viscosa* son dos arbustos nativos también de muy fácil acceso y cuyos extractos sin purificar demostraron poseer gran potencial para el control de insectos. Siendo *A. edulis* una especie vegetal sobre la que prácticamente no existían reportes bibliográficos y *D. viscosa* sin embargo, una especie de la cual sí existían reportes de compuestos aislados bioactivos, fueron estudiados extractos etanólicos de las mismas y realizados los fraccionamientos bio guiados que llevaron al aislamiento de compuestos que, aunque en algunos casos son ubicuos de las plantas en general, presentaron siempre patrones interesantes de actividad antiinsecto selectiva para ciertos herbívoros. Fueron aislados de *A. edulis*, un sesquiterpeno activo contra *M. persicae*, *Rhopalosiphum padi* y *E. paenulata*; dos triterpenos activos contra *M. persicae* y *E. paenulata*; así como mezclas de ácidos grasos activas contra los dos áfidos. En el caso de *D. viscosa*, fueron aislados tres triterpenos también activos contra *M. persicae* y en algún caso contra *R. padi* y *E. paenulata*; así como un diterpeno del tipo labdano que mostró actividad contra *E. paenulata*.

En síntesis, fueron estudiadas fitoquímicamente tres especies vegetales ampliamente distribuidas en nuestro territorio, aislándose compuestos descritos previamente en su química, aunque, en muchos casos, no en su actividad contra las plagas de insectos utilizadas como modelo.

Introducción general

Los bioplaguicidas: generalidades

El constante crecimiento de la población mundial y la concomitante necesidad de aumentar la producción primaria, han provocado el incremento del uso de plaguicidas para defender los cultivos ante el ataque de plagas. Estos productos tuvieron un fuerte desarrollo luego de la segunda guerra mundial, ligado al perfeccionamiento que ocurría a la industria química en ese entonces^[1].

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias utilizada para prevenir, destruir, repeler o atenuar una plaga. Este término refiere tanto a insecticidas, herbicidas y fungicidas. Las plagas son organismos que se encuentran en lugares no deseados o que causan daño a cultivos, alimentos y bienes almacenados, humanos u otros animales. Ejemplos de plagas pueden ser: insectos, malezas, hongos, microorganismos^[2]. Algunos ejemplos de plaguicidas comúnmente utilizados se listan a continuación:

- Organofosforados: actúan sobre el sistema nervioso afectando la enzima reguladora del neurotransmisor acetilcolina de manera irreversible. En su mayoría son insecticidas. Fueron desarrollados a inicios del siglo XIX con fines medicinales, pero su efecto en insectos (análogo al efecto sobre los seres humanos) fue descubierto en 1932^[3]. En general son muy tóxicos, sin embargo, usualmente no son persistentes en el medio ambiente^[2].
- Carbamatos: tienen el mismo mecanismo de acción que los anteriores pero afectan a la enzima de manera reversible debido a que su unión con la enzima es más débil^[4].
- Organoclorados: son insecticidas que fueron comúnmente utilizados en el pasado pero actualmente han sido removidos del mercado debido a los efectos en la salud y la persistencia en el medio ambiente (ejemplos son DDT y clordano).
- Piretroides: son plaguicidas que han sido sintetizados a partir de las piretrinas de origen natural (presentes en los crisantemos), siendo más estables en el medio. Algunos piretroides sintéticos son también tóxicos para el sistema nervioso de vertebrados^[5] e invertebrados^[2, 6].

Es así que este tipo de productos, debido a tener mecanismos de acción que involucran blancos comunes a todos los animales, muchas veces son muy tóxicos, provocando efectos adversos en toda la biota incluyendo consecuencias en los seres

humanos. Asimismo, el mal uso que se le da a los mismos (aplicaciones desmedidas, altas frecuencias de uso de un mismo principio activo, por ejemplo) ha traído como resultado el desarrollo de mecanismos de resistencia en organismos diana. Por todo esto, a pesar de que el uso de plaguicidas de síntesis es efectivo a corto plazo, no es sostenible a largo plazo. Debido a ello, existe actualmente una tendencia, aún en la producción convencional, a utilizar alternativas al uso de tales plaguicidas. También paulatinamente se ha intensificado el uso de prácticas alternativas de producción, tales como la llamada “producción orgánica” en la que se tiende a adoptar medidas de control amigables con el medio ambiente, excluyendo el uso de plaguicidas de síntesis. Es así que surge como opción el desarrollo de bioplaguicidas, que ha tenido un crecimiento espectacular en las últimas décadas, paralelo al experimentado por las técnicas de aislamiento, análisis y elucidación estructural espectroscópica. Los bioplaguicidas son, según definición de EPA, aquellos tipos de plaguicidas que derivan de materiales naturales (animales, plantas, bacterias y algunos minerales)^[2, 6]. Los distintos modos de actuar de estos productos, en distintas dianas, suponen nuevas herramientas que se incorporan a lo que se denomina mundialmente como Manejo Integrado de Plagas -MIP-. Un tipo de bioplaguicida, objeto de estudio para este trabajo, son los insecticidas provenientes de plantas^[2].

Se sabe que en la antigüedad, chinos, griegos y romanos usaban plantas y extractos como plaguicidas^[7, 8]; en el siglo XVIII el agrónomo francés Parmentier notaba la mayor efectividad de los extractos frente al material vegetal crudo para el control de insectos^[9]; en el siglo XIX algunos compuestos de origen vegetal fueron identificados y frecuentemente usados como repelentes o tóxicos. Ejemplos de esto son alcaloides extraídos de la plantas de tabaco [diferentes especies del género *Nicotiana*, (Solanaceae)]; nicotina (1) y anabasina (2) extraídos de *Anabasis aphylla* (Amarantácea, en Rusia y el norte de África); nornicotina (3) aislada de *Duboisia hopwoodi* (Solanácea, en Australia); veratrina (4) extraída de una *Liliacea* de las Balcanes *Veratrum album*; rianodina (5) extraída de especies de *Ryania* en la Amazonia^[1].

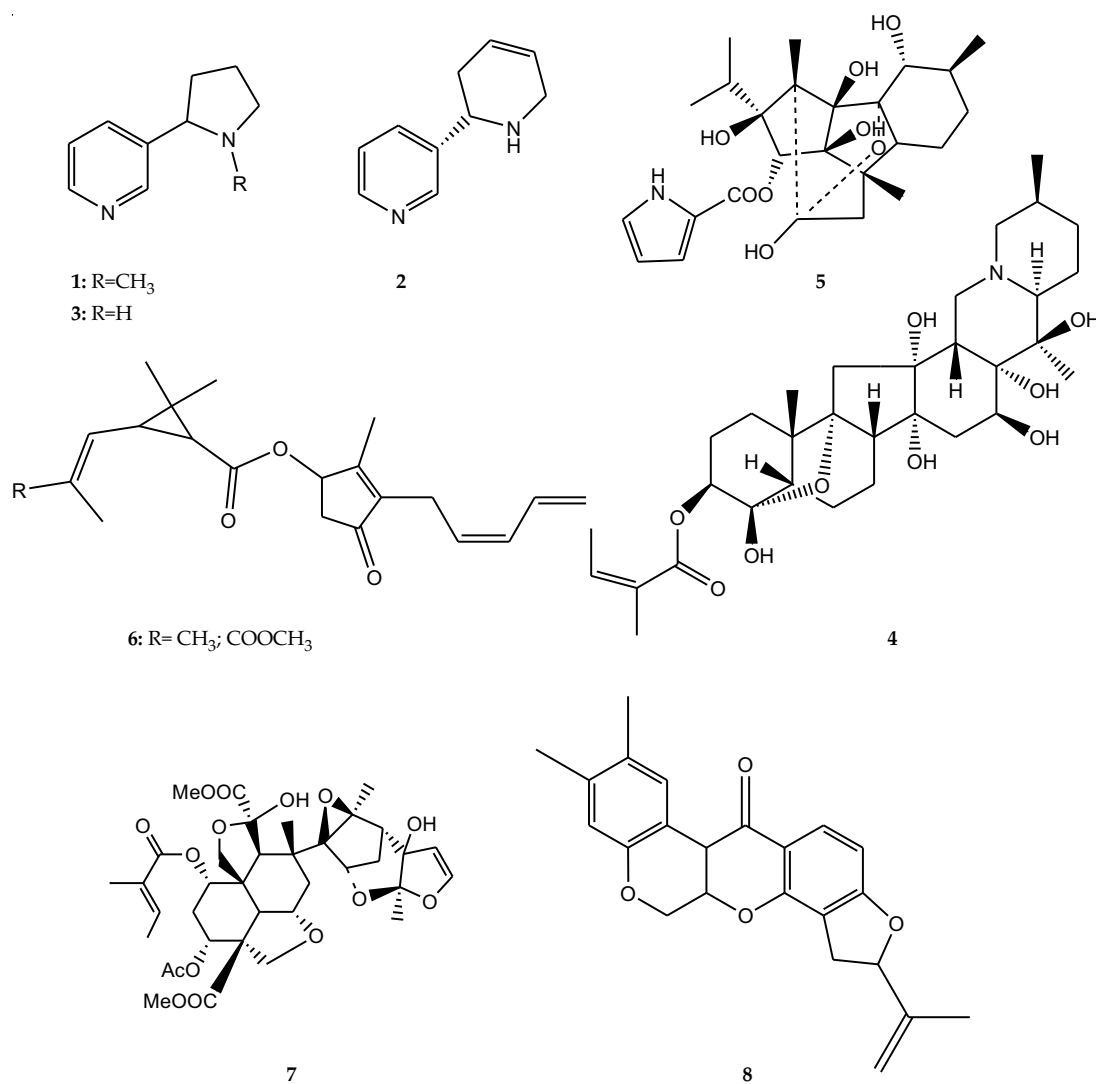


Figura 1. Productos naturales de origen vegetal utilizados como bioplaguicidas

Hoy en día, los productos naturales de origen vegetal que se utilizan como bioplaguicidas incluyen: las piretrinas (6) (ésteres del ácido crisantémico y ésteres del ácido pirétrico) aisladas originalmente del extracto de la oleorresina de las flores secas de *Tenacetum cinerariaefolium* (Asteraceae); la azadiractina (7), triterpenoide aislado de *Azadirachta indica* (Meliaceae); la rotenona (8), flavonoide aislado de raíces o rizomas de especies de legumbres tropicales de los géneros *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosia*; y los alcaloides antes mencionados nicotina (1) y anabasina (2). A su vez, existen casos en los que se utilizan extractos de plantas como agentes biocontroladores. Tal es el caso del uso de extractos de *Cannabis sativa* (Cannabaceae) en forma combinada con insecticidas

sintéticos, que se realiza en Camerún para el control de insectos plaga de cultivos de cacao^[10].

Se puede resaltar tres ventajas principales en cuanto al uso de este tipo de productos:

- Muchas veces los compuestos activos que se extraen de las plantas han sido seleccionados evolutivamente en las mismas como defensa contra ciertas especies de herbívoros, no siendo detrimentales para todos los organismos. El modo de acción de estos compuestos es selectivo. Por ejemplo, existen muchos compuestos cuyos blanco son enzimas que se encuentran solamente en especies de artrópodos, como son los inhibidores de síntesis de quitina e inhibidores de crecimiento. Esta selectividad puede derivarse de la propia bioactividad intrínseca al compuesto, así como de su localización en la planta. Por otro lado, diferentes compuestos no tienen el mismo efecto en distintos estadios en el ciclo de vida de un mismo insecto, lo cual denota una especificidad en su acción.
- Además, por ser estos compuestos metabolitos secundarios de las plantas, los mismos pertenecen a las familias de los polifenoles, terpenos, alcaloides, entre otros; todos ellos fácilmente biodegradables por acción enzimática de distintos microorganismos. Es así entonces, que al degradarse más rápidamente en el ambiente, el tiempo de contacto entre el herbívoro y el compuesto es menor, por lo que la generación de resistencia también se ve retrasada.
- Y por último, otro factor que ayuda a retrasar una posible generación de resistencia es la diversidad estructural encontrada dentro de los metabolitos secundarios, siempre y cuando se limite el número de aplicaciones y se diversifiquen las formulaciones utilizadas.

Algunos de los efectos ocasionados por estos compuestos en los insectos herbívoros son:

- Efectos antialimentarios: como deterrencia de ingesta que es la actividad definida como el rechazo al alimento luego de un primer contacto; reducción del crecimiento que es la actividad definida como la disminución en ganancia de peso en un periodo dado.

- Efectos repelentes: rechazo al alimento sin haber tenido contacto previo, mediado por compuestos volátiles; deterrencia a la oviposición definida como el rechazo a oviponer en las superficies donde estos compuestos estén presentes.
- Efectos tóxicos: ya sea cualquier actividad “-cida” (insecticida, adulticida, pupicida, larvicida, ovicida) o disminución de la sobrevivencia (aumento de la mortalidad)^[11].

Los bioplaguicidas en nuestro país

Uruguay, entre las décadas del 60-70 logra tener las capacidades necesarias para hacer aislamientos y elucidaciones estructurales. A partir de ese momento, los estudios de fitoquímica se centraron en el estudio de ceras epicuticulares, y aceites esenciales mayormente, con el objetivo de realizar la descripción de los metabolitos secundarios presentes en la flora accesible para los científicos locales. Luego de esos estudios iniciales, empezaron a surgir grupos que intentaban describir productos naturales a partir de estudios fitoquímicos, pero ya no con el mero objetivo de la descripción estructural sino también buscando alguna clase de actividad biológica. Surgieron así las capacidades de describir productos naturales de origen vegetal con actividad antimicrobiana, con determinadas actividades neurológicas, con actividad antiparasítica, con potencial actividad antitumoral, etc.^[12]. Este tipo de desarrollo no fue ajeno a la tendencia mundial, ya que hasta hoy los productos naturales siguen siendo una continua fuente de principios activos para la industria farmacéutica y agroalimentaria^[13].

En nuestro país se dedica 1.213.700 hectáreas (ha) de superficie al desarrollo de cultivos agrícolas (incluyendo frutales)^[14]. De estas, solamente unas 50.000 ha son cultivadas en sistemas de agricultura orgánica. En 2009 el 57 % de las exportaciones realizadas correspondían a productos del sector primario y un 8 % del producto bruto interno correspondía a actividades primarias^[15]. A su vez, la resistencia a los insecticidas convencionales adquirida por parte de los insectos plaga de los principales cultivos, ha sido aquí cada vez mayor^[16, 17].

En los sistemas de producción orgánica se excluye el uso de fertilizantes químicos, plaguicidas, transgénicos y aditivos sintéticos, apuntando a mantener la

conservación del suelo y el agua. Se basan en la rotación de cultivos, uso de estiércol animal, abonos verdes y minerales naturales, y enemigos naturales de plagas. Se posibilita así el desarrollo de productos que mantienen sus características originales y sus nutrientes, asegurando la calidad. La producción orgánica está asociada con un cuidado del medio ambiente y con la salud humana y es desde estos aspectos que el consumo valora a estos productos. En Uruguay, solamente el 4 % de la superficie total dedicada a cultivos agrícolas se basa en sistemas de producción orgánica^[14], porcentaje aún pequeño pero en aumento y que es además comparable con los porcentajes manejados en los países de la Unión Europea^[18]. Hoy en día ya existe una nueva situación que se origina a partir del decreto 557/008 del 17 de noviembre de 2008, que crea el Sistema Nacional de Certificación de la Producción Orgánica. El mismo establece reglas para la producción, elaboración, certificación y comercialización de productos orgánicos^[14]. Es así que se prevé que este tipo de sistema de producción irá creciendo en cuanto a su uso, así como lo hará la demanda de los productos que origina.

Dicho todo lo anterior, sumado al potencial de nuestra flora en lo que respecta a actividad antiinsecto^[19], llevar a cabo nuevos estudios para ampliar el espectro de potenciales productos de aquellas características, se ha tornado de gran interés. Es así que una de las líneas de investigación que se desarrolla en el laboratorio donde se lleva a cabo este estudio, es la prospección de especies vegetales de distribución local, con actividad antiinsecto. El criterio de selección de especies involucró varios factores: por un lado eran especies que no habían sido extensamente estudiadas en cuanto a su actividad antiinsecto; especies que estuvieran fácilmente disponibles en la región; que no mostraran daño por herbívoros. Se estudiaron aquellas pertenecientes a las familias Bignoniaceae, Sapindaceae, Lamiaceae, Solanaceae y Phytolaccaceae. Los extractos etanólicos de las mismas fueron testeados contra cuatro especies de insectos modelo diferentes que abarcaban diferentes modos de ingesta (masticadores y suctores), diferentes tipos de especialización (especialistas y generalistas) y diferentes funciones ecológicas (insectos plaga, insectos benéficos). Se encontró que los especímenes vegetales más activos en este cribado, fueron los pertenecientes a las familias

Bignoniaceae y Sapindaceae^[19] siendo la última objeto de estudio de este trabajo. Asimismo, a consecuencia de estudios realizados en el marco de un proyecto PDT (“Desarrollo y estandarización de bioplaguicidas a partir de la optimización de extractos de plantas, tomando como modelo *Melia azedarach* L.”), se incluyó en aquel conjunto al árbol del Paraíso (*Melia azedarach*), Meliácea estudiada en diversas regiones, de la cual se han aislado y elucidado múltiples compuestos responsables de actividades diferentes contra variadas especies de insectos^[20].

En cuanto a los insectos modelo utilizados para evaluar la actividad de las plantas estudiadas, sus extractos y compuestos aislados, cabe destacar que tres de ellos representan plagas de importancia económica en nuestro país. *Myzus persicae* (Homóptera: Aphididae, pulgón generalista) es el principal transmisor del virus Y *potyvirus* de la papa, causante de la enfermedad llamada comúnmente en este cultivo “mosaico severo”^[21]; también este pulgón afecta pero en menor medida a cultivos de tomate^[22]. *Rhopalosiphum padi* (Homóptera: Aphididae) es un pulgón especialista frecuente en gramíneas cultivadas, que aunque suele comportarse como plaga menor, durante los períodos de sequía los cultivos se encuentran más propensos a sufrir las consecuencias de los ataques. Y por último, *Epilachna paenulata* (Coleóptera: Coccinelidae, insecto masticador especialista) es una especie común sobre cucurbitáceas que presenta un problema para los cultivos orgánicos de zapallo. Este insecto se generaliza a todo el cultivo provocando daños de entidad^[23].

Spodoptera littoralis (Lepidóptera: Noctuidae, masticador generalista) es el cuarto modelo de insecto que completa el grupo (un generalista y un especialista de aparato bucal masticador; y un generalista y un especialista de aparato bucal pico suctor). A pesar de que este lepidóptero no se encuentra naturalizado en nuestro país, sí encontramos varias especies de este género muy relacionadas (por ejemplo *S. frugiperda*, *S. latifascia*) que son plagas de cultivos nacionales^[23].

Objetivos generales

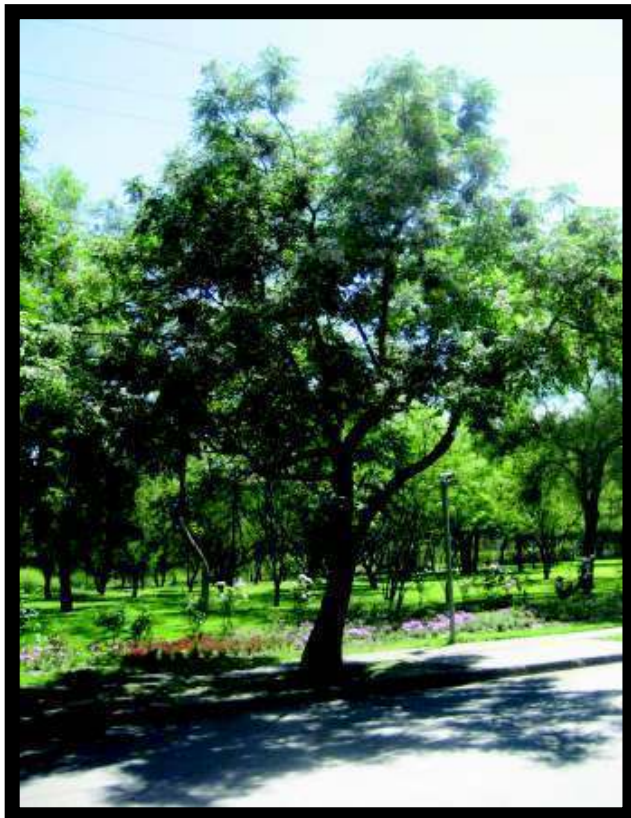
Este trabajo de tesis ha sido focalizado en el estudio de especies vegetales locales en cuanto a su actividad contra insectos. La estrategia general de trabajo implicó el fraccionamiento bioguiado de los extractos vegetales, es decir

fraccionamiento químico de extractos acompañado de la evaluación de actividad antiinsecto de las fracciones obtenidas. Apuntando así a la obtención de las fracciones más activas, así como a la purificación y elucidación de los compuestos responsables de las actividades encontradas. Para ello las actividades generales realizadas fueron:

- Obtención de extractos orgánicos de diferentes estados fenológicos de las especies vegetales a estudiar (hojas, ramas y/o frutos).
- Realización de bioensayos con un grupo de artrópodos que cubre las variables ya mencionadas: *M. persicae*, *R. padi*, *E. paenulata* y *S. littoralis*, testeando actividad deterrente contra los mismos.
- Fraccionamiento de extractos activos y testeo de las fracciones obtenidas intentando aislar los compuestos responsables de la actividad.
- Caracterización química por medio de técnicas clásicas de trabajo en productos naturales (resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas) de los metabolitos secundarios aislados o de las mezclas responsables de las actividades encontradas.

Obteniendo de esta manera una tipificación general de los extractos estudiados, facilitando así el camino hacia la utilización de formulaciones generadas a partir de extractos vegetales activos o sus fracciones.

Capítulo I. *Melia*
azedarach
(Meliaceae)

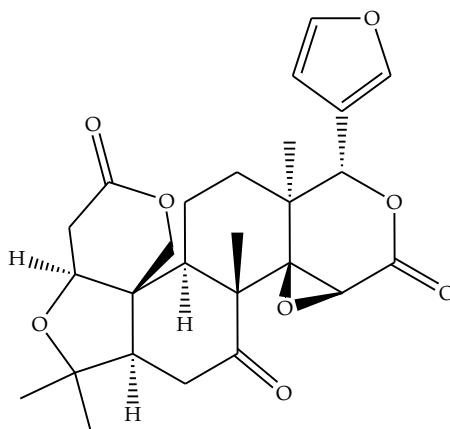


1.1 Introducción

Las Meliáceas

La familia de las Meliáceas, familia de angiospermas que abarca 50 géneros y más de 1400 especies, está distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta familia ha recibido particular atención recientemente por parte de entomólogos, debido a sus excelentes propiedades como agentes de control de insectos. Estos efectos son atribuidos en gran parte a la presencia de compuestos triterpenoides denominados limonoides^[24]. Tales compuestos han demostrado poseer actividad deterrente^[25-27], potencial toxicidad interfiriendo con las funciones básicas bioquímicas y fisiológicas de insectos herbívoros^[28], así como variadas actividades farmacológicas sobre humanos (como antibacterianos, antifúngicos, antimalaria, anticancerígenos, antivirales)^[29].

El término “limonoide” se originó por haber sido estos compuestos aislados inicialmente de los cítricos en búsqueda de los responsables de su amargura, siendo la limonina (9) del limón, caracterizada en 1960, uno de los primeros aislados^[30, 31]. Los limonoides son característicos y abundantes en las familias Rutaceae y Meliaceae, menos frecuentes en Cneoraceae y existen también en *Harrisonia* spp. (Simaroubaceae). Se encuentran tanto en sus formas libres (agliconas), las cuales son insolubles en agua y amargas, así como glicosiladas, siendo de esta manera solubles en agua e insípidas^[29].



9

Se cree que los precursores últimos de estos compuestos son el tirucalano (20 S) (10) y el eufano (20 R) (11) quienes son resultado de la ciclación del escualeno y difieren solamente en la estereoquímica del carbono 20. Luego de la pérdida de cuatro carbonos de la cadena lateral en

C-17, la formación del furano β sustituido, y oxidaciones y rearrreglos variados en uno o más de los cuatro anillos (A, B, C y/o D), estos precursores dan origen a los diferentes grupos de limonoides que se encuentran en la naturaleza^[24, 29]. Se puede decir que todos ellos tienen como estructura tipo o derivan de un esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilesterioide. Son triterpenos, del tipo tetranortriterpenoides, representando, probablemente, los casos más extremos de oxidación de triterpenos en la naturaleza^[29] (Figura 2). Los limonoides que presentan su esqueleto sin modificar suelen denominarse “limonoides intactos” o “protolimonoides”^[30] (Figura 2b). Un ejemplo bien reconocible de limonoide intacto es la azadiradiona (12). Los “limonoides degradados” son moléculas más simples, en general caracterizadas por ser biciclos fusionados con una γ - o δ -lactona^[32] (Figura 2c). Los miembros de este grupo derivan de tetranortriterpenoides y frecuentemente poseen la estructura común a otros terpenoides naturales. Los “seco-limonoides” son triterpenos modificados que han sufrido fisión oxidativa de uno o más de sus anillos (Figura 2d). Los miembros restantes de esta familia de productos naturales se categorizan como “limonoides de altas modificaciones oxidativas” (Figura 2e). No hay una manera general ni sistemática de definirlos estructuralmente, salvo decir que todos son derivados de un precursor furanilesterioide y han sufrido un alto grado de ruptura en sus anillos y/o rearrreglos C-C.

Sus estructuras tridimensionales y las conexiones de los esqueletos son tan diversas, que a menudo es difícil comprender la relación biogénica con sus precursores. El clásico ejemplo de este tipo de limonoides es la azadiractina (13), limonoide del árbol del Neem de la India (*Azadirachta indica*), que junto con la toosendanina (14) aislada del árbol del Paraíso de China^[33], ambos derivados triterpenoides comercializados para el control de plagas^[34], son los responsables mayores de la popularidad de la familia de las Meliáceas.

Hasta tiempos recientes, las Meliáceas neotropicales (América del Sur, Centroamérica y Sur de América del Norte), que forman un grupo diverso compuesto por unos catorce géneros^[35], han recibido menos atención que las especies asiáticas^[36], a pesar de que es de común conocimiento el uso para el control de insectos de varias de ellas. El estudio primario de extractos de corteza, frutos y hojas de especies de los géneros neotropicales *Swietenia*, *Cedrela*, *Trichilia*, *Guarea* y *Aglaia* contra lepidópteros, mostró su potencial insecticida y de reducción de crecimiento^[37, 38].

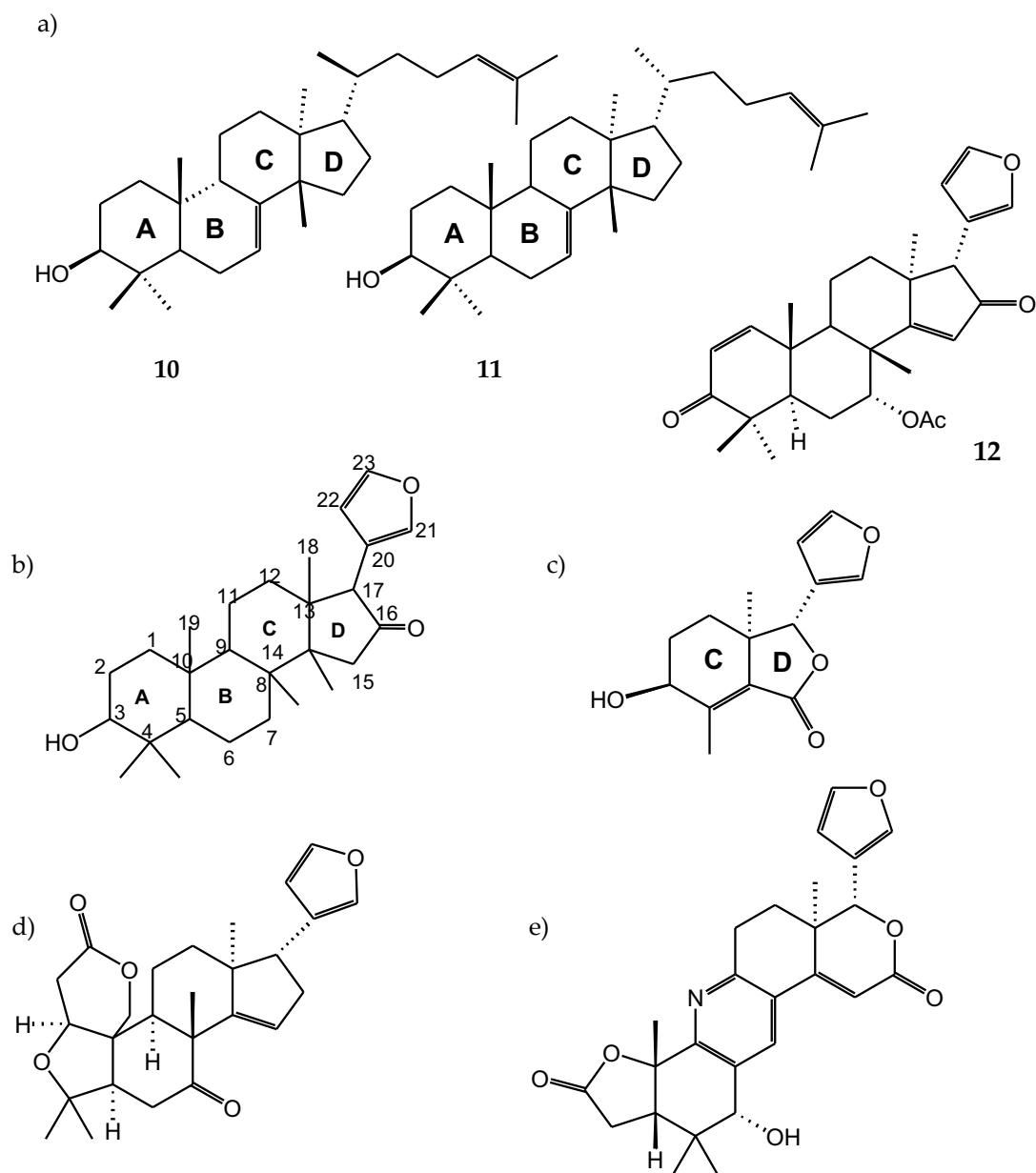


Figura 2. a) Precursores de los limonoides. b) Numeración de un limonoide intacto. c) Ejemplo de limonoide degradado. d) Ejemplo de seco limonoide. e) Ejemplo de limonoide de altas modificaciones oxidativas.

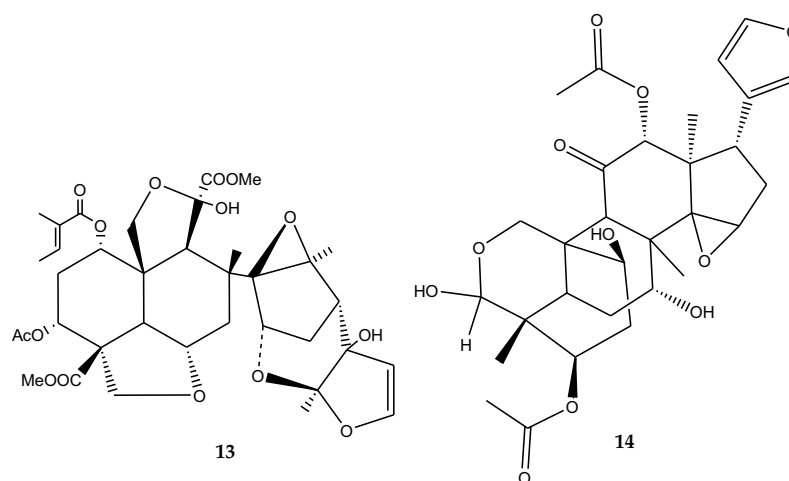


Figura 3. Azadiractina (13) y toosendanina (14): triterpenoides comercializados para el control de plagas.

De los frutos de *Swietenia humulis* fueron aislados diversos limonoides denominados humilinólidos^[39] (15-18) con actividad reductora de crecimiento sobre *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). De especies de este género fueron aislados otros compuestos deterrentes, 19 - 20 de *S. macrophylla* y 21 de *S. aubrevilleana* para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae)^[40] (Figura 4).

Especies del género *Cedrela* han sido reportadas como poseedoras de significativas cantidades de limonoides en sus maderas^[41]. Extractos de madera del cedro tropical *C. odorata*, mostraron ser reductores de crecimiento de larvas de *O. nubilalis*^[42]. En estudios sobre extractos de *C. salvadorensis* y *C. dugessi* se ha revelado la presencia de compuestos que mostraron ser activos contra *S. frugiperda*^[43].

Guarea, a pesar de ser un género con menos compuestos activos, incluye la especie *G. grandifolia* productora de diversos limonoides que mostraron ser activos contra larvas de *O. nubilalis*^[44].

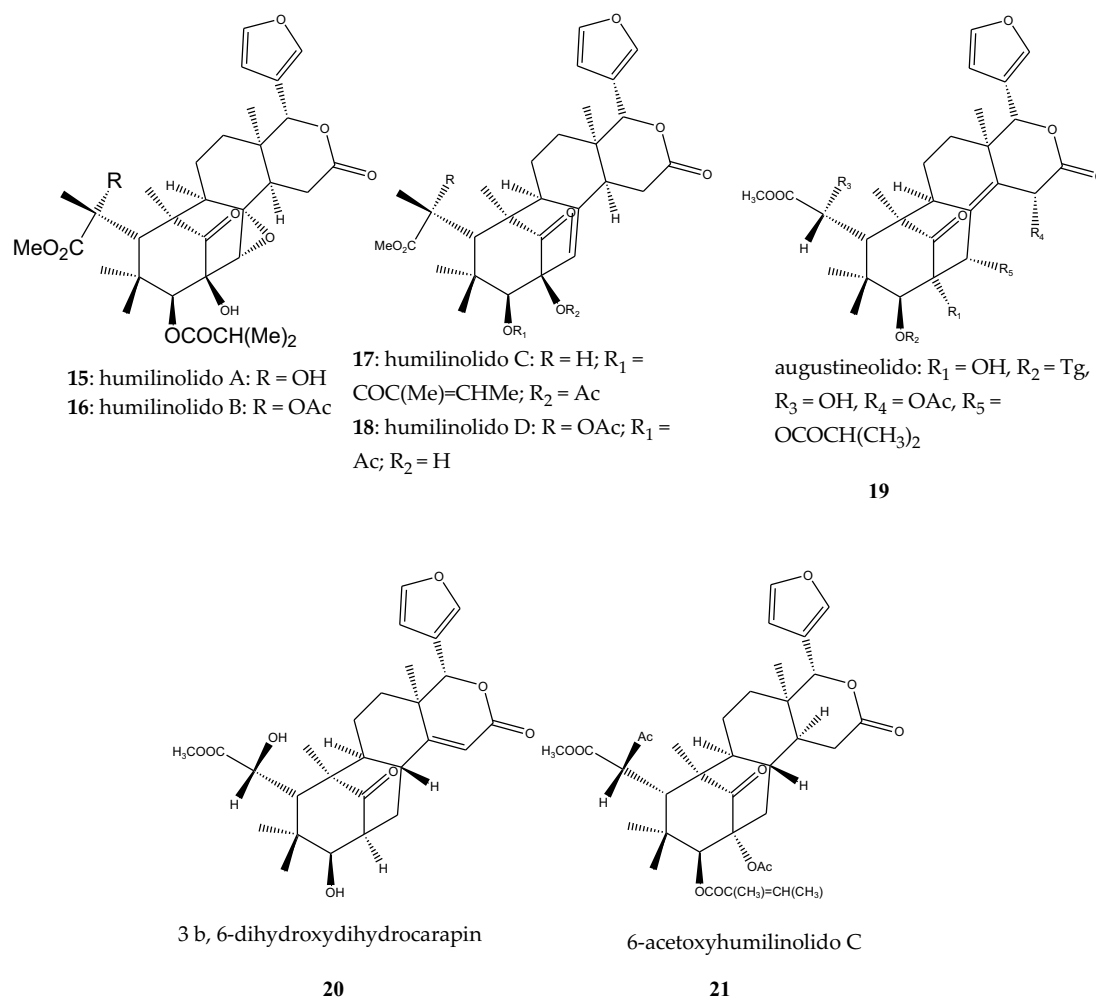
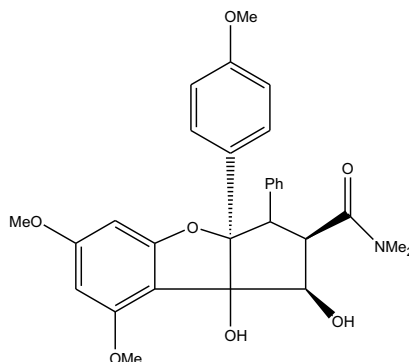


Figura 4. Compuestos aislados de especies del género *Swietenia*.

El género *Trichilia* posee otros tipos de metabolitos secundarios activos además de limonoides^[45, 46]. Fue reportada la actividad larvica de los extractos de hojas y tallos de *T. pallida* y *T. catiguæ* contra *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Asimismo, los extractos orgánicos de la primera mostraron actividad larvica contra *S. frugiperda*^[47]. Contra este lepidóptero también fue reportada la actividad insecticida del extracto metanólico de frutos de *T. clausenii*^[48]. Los extractos acuosos de ramas y hojas de *T. pallida*, *T. pallens*, *T. catigua*, *T. casaretti*, *T. elegans* y *T. clauseni* afectaron la sobrevivencia de las larvas o el desarrollo general de estos insectos^[49]. Y extractos de frutos de *T. elegans* y *T. catigua* revelaron también tener propiedades insecticidas contra las larvas de este lepidóptero^[50]. Además, extractos metanólicos de ramas de *T. americana* mostraron actividad contra otra especie de este género [deterrenza de ingesta y toxicidad contra *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)]^[51, 52] y una mezcla de

limonoides aislados de *T. havanensis* resultaron ser deterrentes de ingesta de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)^[53]. También fue reportada la deterrencia a la oviposición de adultos de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae)^[54] y el aumento del tiempo de duración del desarrollo así como disminución de la sobrevivencia de larvas de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)^[55] en hojas de plantas de tomate a las que se aplicó extractos de *T. pallida*.

Miembros del género *Aglaia* han recibido considerable atención recientemente, más allá de los limonoides, debido a la presencia de derivados del benzofurano rocaglamida (**22**) que aparecen exclusivamente en dicho género^[56-62]. El compuesto padre rocaglamida y muchos de sus congéneres tienen actividad comparable a la azadiractina, como insecticidas naturales y además son reductores del crecimiento y desarrollo de lepidópteros a concentraciones de tan solo 0,1 ppm^[42, 59, 60, 63] (los lepidópteros han mostrado sensibilidad a azadiractina a dosis de 1-50 ppm dependiendo de la especie^[64]). Se ha reportado actividad de especies de este género, tanto en extractos brutos como en compuestos puros, contra especies de lepidópteros tales como *O. nubilalis*, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) y *S. litura*^[42, 65].



22

Hasta aquí se ha descrito Meliáceas neotropicales, sin embargo es en Asia, África y Europa donde se han estudiado desde más antiguamente, géneros de esta familia. Trabajos sobre la capacidad insecticida de las Meliáceas asiáticas llevaron también al aislamiento de rocaglamida (**22**). Nathan *et al* 2007^[66] estudiaron varias especies del género *Dysoxylum*, compuesto por grandes árboles con hojas ricas en limonoides, reportando la actividad larvicida, pupicida, adulticida y de deterrencia de oviposición de especies del género, sobre el mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae), vector de malaria. El género africano *Khaya*,

relacionado con el *Swietenia* sudamericano, ha sido reportado junto con el anterior ser la mayor fuente de limonoides de anillo B y D abiertos (23) – (27) (Figura 5); quienes son responsables, por ejemplo, de actividad deterrente de alimentación de estadios larvales de *S. littoralis*^[67].

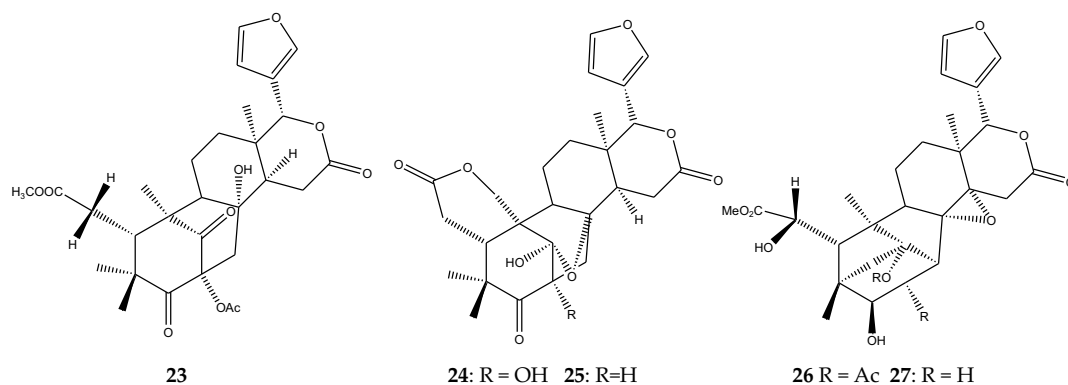


Figura 5. Compuestos aislados de especies del género *Khaya*.

Azadirachta indica, tan conocida actualmente como árbol del Neem, fue denominada inicialmente *Melia azadirachta*. Dicha especie es considerada una de las plantas con mayor actividad insecticida ya estudiadas^[68-70]. En el estudio de Akhtar *et al* (2008)^[71] esta especie mostró ser más tóxica que insecticidas botánicos de uso comercial [ej.: extractos de *Ryania* que contienen rianodina (5); rotenona (8)] contra *Trichoplusia ni* (Lepidóptera: Noctuidae) y también con mayor actividad deterrente de alimentación contra *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). También fue revelada la deterrencia a la oviposición, la deterrencia de ingesta de larvas y la toxicidad para huevos de *S. exigua* por parte de los extractos de esta especie^[72], así como la mortalidad de larvas de *B. tabaci* a causa de la ingesta de los mismos cuando son aplicados por vía sistémica a plantas hospederas^[54]. De *A. indica* ha sido aislado y comprobada su actividad, el limonoide que lleva el nombre en honor a su fuente, azadiractina (13), producto natural cuyos efectos sobre la fisiología y comportamiento de insectos han sido detalladamente estudiados^[73]. De este producto natural ha sido comprobada su eficacia frente a al menos 200 especies de insectos diferentes^[29]. Nathan *et al* (2006)^[74] investigaron los efectos de los limonoides de esta especie contra *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae), confirmando que la azadiractina fue el más potente en todos los experimentos y mostró 100 % de mortalidad larval cuando era ingerido a una concentración de 1 ppm. Koul *et al*^[75]

comprobaron que la azadiractina no es sinergizada o influenciada por otros limonoides en bioensayos de reducción del crecimiento de *H. armigera* y *S. litura*, sin embargo existen otros compuestos de este grupo que sí presentan sinergismo, lo cual puede deberse a sus diferentes modos de acción^[76]. De hecho, la azadiractina tiene la particularidad de ser un compuesto que produce efectos muy diversos en las diferentes especies de insectos a las que afecta, lo cual es consecuencia de actuar con distintos modos de acción en sus dianas. Los efectos que genera van desde deterrencia de ingesta, reducción del crecimiento, hasta esterilidad, disrupción de procesos celulares, actividad insecticida^[64]. El éxito que ha tenido hasta ahora este producto natural (como agente de control de plagas) es debido a sus propiedades insecticidas, originadas a dosis mucho menores que los efectos deterrentes^[77].

Los géneros de Meliáceas mencionados arriba, estudiados por sus propiedades antiinsecto, han demostrado poseer especies con derivados que afectan la fisiología de los individuos (tóxicos, reguladores de crecimiento) así como derivados que son solamente deterrentes contra diversas especies plaga, principalmente del orden Lepidóptera. Las especies acerca de las cuales existe mayor cantidad de reportes en lo que respecta a actividad antiinsecto en general, son *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* (el árbol del Paraíso). Mientras que en la primera es el limonoide azadiractina el reportado como principal responsable de la actividad antiinsecto, en la segunda, existen varios compuestos responsables de tal actividad^[78].

El árbol del Paraíso

El árbol del Paraíso *Melia azedarach* L. (Figura 6), es nativo de Persia, India y China pero exótico en gran número de regiones, incluyendo África, Australia y las Américas. En varias de estas regiones ha sido usado con fines medicinales para el tratamiento de enfermedades humanas (algunos ejemplos son: como antihelmíntico, tónico, antipirético, para tratamiento de lepra, eczema y la recuperación de ataques de asma). Existen reportes de toxicidad de esta especie en humanos y animales, pero hay discrepancias en lo que respecta a la naturaleza de los principios activos. Sin embargo, ha sido anteriormente evidenciado que los compuestos responsables de tal toxicidad son del tipo limonoide^[79].



Figura 6. Imágenes del árbol del Paraíso

Asimismo, se ha estudiado ampliamente su actividad antiinsecto, aislándose y elucidándose múltiples compuestos responsables de actividades diferentes contra variadas especies de insectos. Estos compuestos, que incluyen triquilina (28), salanina (29), fraccinelona (30), oquinolido (31), meliacarpina (32), meliartenina (33), azedaralida (34), azedaracol (35), azedaraquina (36), nimbolinina (37), nimbolidina (38), toosendanina (14) y derivados de ellos, han mostrado potencial deterrente contra diversas especies del género *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) así como *Epilachna* (Coleoptera: Coccinellidae)^[20]. Fue reportada la actividad como reductor de crecimiento para *S. litura* de una meliatoxina (39) aislada de frutos^[80] y la actividad como regulador de crecimiento de *E. varivestis* de un derivado hidroxilado de meliacarpina (32)^[81, 82]. Compuestos del tipo de este último fueron reportados como poseedores de actividad insecticida contra *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)^[83, 84]. Por otra parte fueron aislados de esta especie y comprobada su actividad antifúngica compuestos no limonoides: el 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehído (40) y el pinoresinol (41)^[85].

Además de compuestos aislados, la actividad de extractos de hojas, ramas y frutos de *M. azedarach*, fue testeada contra insectos de diversos órdenes. Por ejemplo, en ensayos evaluando actividad contra el homóptero *B. tabaci*, se observó deterrencia de oviposición y repelencia de adultos en plantas de tomate a las que se les aplicaba previamente una mezcla de extractos de hojas y ramas^[54]. También fue reportada la actividad larvicida, reguladora del crecimiento y deterrente de oviposición de extractos de hojas contra *A. aegypti* (Diptera: Culicidae)^[86]. Fue estudiada la actividad de extractos de frutos contra el vector de la enfermedad de Chagas, la

vinchuca, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), encontrándose repelencia contra las ninfas de primer y cuarto estadio^[87]. Los extractos acuosos de frutos y hojas fueron testeados contra ninfas de *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera: Acrididae) obteniéndose en ambos casos actividad insecticida de los mismos sobre ellas^[88]. Fueron también testeados extractos hexánicos, clorofórmicos y etanólicos de frutos contra larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)^[89].

En Uruguay, la expansión natural de la agricultura y el concomitante aumento del uso de agrotóxicos, trae aparejado un incremento en las consecuencias negativas que estos originan^[90]. Es por ello que los procedimientos alternativos al uso de plaguicidas convencionales han ido cobrando cada vez mayor importancia. El árbol del Paraíso, especie abundante y fácilmente disponible en nuestro país, es un ejemplo de bioplaguicida cuyo uso está siendo cada vez más difundido. Sin embargo, hasta el momento, no existían estudios de la composición química de los extractos aplicados. Tales estudios abren el camino hacia la posibilidad de realizar una formulación comercial, y acompañados de la evaluación de la actividad contra insectos modelo, permiten optimizar los procesos de extracción apuntando a la concentración de los extractos en los compuestos más activos.

Este trabajo tuvo entonces como objetivo, determinar la actividad antiinsecto de extractos orgánicos de frutos de *Melia azedarach* de especímenes uruguayos y elucidar las estructuras de los compuestos activos, comparando los resultados de composición química con los provenientes de otros orígenes geográficos. En este caso particular del árbol del Paraíso, fueron utilizados además de los cuatro insectos modelo ya mencionados en la introducción general de este trabajo, chinches de la especie *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), que representan una plaga secundaria de soja en nuestro país^[23].

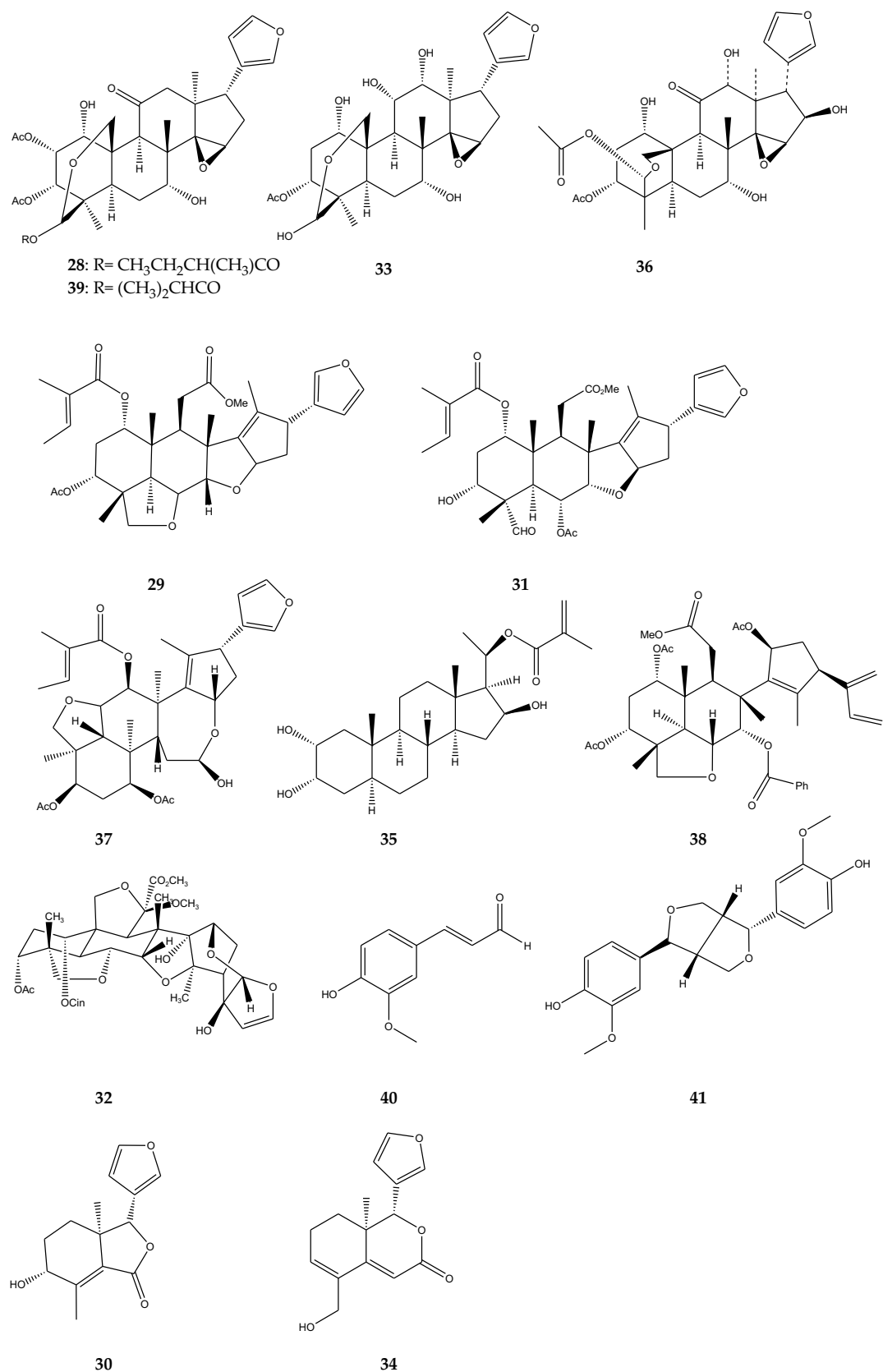


Figura 7. Algunos compuestos aislados de *M. azedarach*.

1.2 Materiales y Métodos

Procedimientos experimentales generales

Las medidas de rotación óptica fueron determinadas en un polarímetro digital Krüss P8000-P8100-T.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron obtenidos en un Espectrómetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C) en CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para el caso del análisis de **42** y **43**. Para el caso del análisis de **44**, **45** y **46** fueron obtenidos en un Espectrómetro AMX-500 (400 y 500 MHz para ^1H ; 100 y 125 MHz para ^{13}C), también en CDCl_3 .

Los espectros de masas fueron obtenidos en un Espectrómetro de Masas Bruker micrOTOF-Q II con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo y fuente de ionización atmosférica por Electrospray (ESI) para **42** y **43** y en un Espectrómetro Micromass Autospec, con introducción directa de las muestras mediante una sonda de sólidos, con fuente de ionización por Impacto Electrónico (70 eV) para **44**. La abundancia relativa de ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) de las muestras se determinó por espectrometría de masa, utilizando un analizador elemental Flash EA 112 acoplado a un espectrómetro de masa DeltaPlus (Finnigan MAT, Bremen, Alemania). Cada muestra fue introducida dentro de cápsulas de estaño dispuestas en el analizador elemental Flash EA 112. La precisión de la determinación de estos índices, basada en el valor del estándar de laboratorio (leucina) fue de 0,1‰ para ^{13}C . La abundancia natural de ^{13}C se expresó en notación delta (Δ) en partes por mil (‰), que indica la relación isotópica de la muestra relativa a la del Standard internacional Pee Dee Belemnite (PDB)^[91]. La concentración promedio de ^{13}C de este material es de 0,112372‰. La misma está determinada por la siguiente ecuación: $\Delta^{13}\text{C} = (\text{R}_{\text{muestra}}/\text{R}_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$ donde $\Delta^{13}\text{C}$ es la composición isotópica de la muestra y R es la relación molar del isótopo pesado sobre el liviano ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para la muestra y el estándar (PDB).

Las Cromatografías Líquidas de Alta Performance (HPLC) analíticas y preparativas fueron desarrolladas en un equipo Shimadzu LC-20AT Prominence, equipado con un detector de arreglo de diodos SPD-M20A Prominence y columnas de fase normal. Para fines analíticos una columna Macherey Nagel Nucleosil-100 (5 μm , 250 x 4,6 mm) fue utilizada, usando como fase móvil un sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, a un flujo de 1 mL/min. Para fines

preparativos una columna Macherey Nagel Nucleosil-100 (7 μm , 250 x 16 mm) fue utilizada, usando como fase móvil un sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, a un flujo de 8 mL/min, en el caso de la purificación de **42** y **43**; y una columna Beckman ultrasphere Si-100 (5 μm , 250 x 10 mm), usando como fase móvil un sistema de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ y hexano/ AcOEt , a un flujo de 8 mL/min, en los casos de la purificación de **44**, **45** y **46**.

Las cromatografías flash y cromatografías líquidas fueron desarrolladas en sílica gel MN Kieselgel 60 M (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh). Las fracciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (TLC) desarrolladas en placas de aluminio recubiertas con Silica gel 60 G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), y las manchas fueron visualizadas mediante calentamiento de las placas empapadas en Oleum [(H₂O/ácido acético /ácido sulfúrico) 16:80:4] o Vainillina [1 g de vainillina en (ácido sulfúrico/etanol) 1:9]^[92]. Fue utilizada limonina extraída de semillas de pomelo (*Citrus maxima*), como estándar para el seguimiento de los compuestos del tipo limonoides por TLC durante el proceso de extracción (provista por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria).

Material vegetal

Los frutos maduros de *M. azedarach* fueron colectados en Montevideo, Uruguay (Latitud: -34.897274°, Longitud: -56.139654°), en Julio de 2008. Fueron secados durante 48 – 72 h a 40° C antes de la molienda y extracción.

Extracción y aislamiento

Los frutos secos (716 g) fueron molidos y extraídos con hexano en caliente (1300 mL, x 3) antes de una maceración etanólica (1300 mL EtOH, temperatura ambiente, 24h, x3). El extracto etanólico de frutos (86,1g) fue concentrado y disuelto en metanol/agua (95:5), para ser particionado con hexano y luego acetato de etilo (AcOEt). El extracto AcOEt (8,8 g) fue fraccionado por cromatografía flash (7 cm altura x 7,5 cm diámetro), eluyendo con AcOEt , obteniéndose 8 fracciones. Las fracciones 2 y 3 (4,3 g) fueron sometidas a otra cromatografía flash eluída con CHCl_3/ACN desde 6:1 a 6:2, para obtener 14 fracciones (**F1** - **F14**) (Figura 7)^[93].

Las fracciones F4 y F5-7 contenían compuestos de igual R_f por TLC e igual color al ser revelados con vainillina, que el estándar de limonina. Es así que se utilizó una mezcla de las mismas para testear contra los insectos, denominándola “extracto rico en limonoides” (E lim).

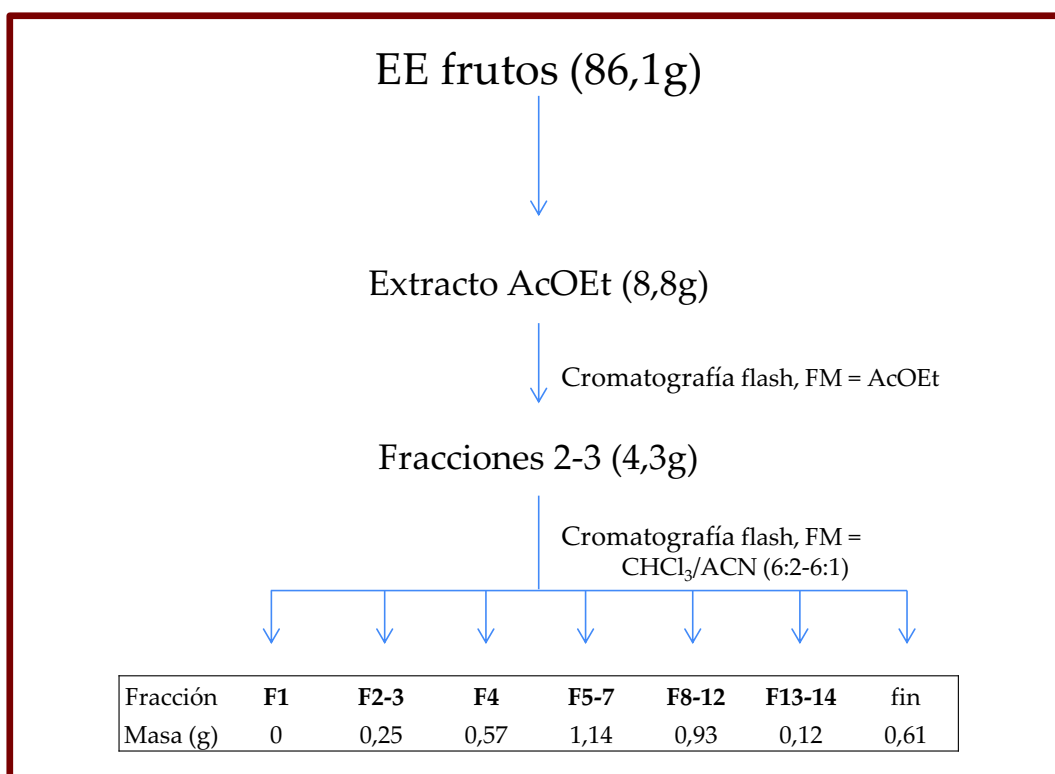


Figura 8. Esquema de extracción primaria de frutos de Paraíso.

La fracción 4 [F4 (0,57 g)] fue separada mediante cromatografía flash (11 cm altura x 5 cm diámetro) eluída con Hex/AcOEt 95:5 - 20:80, obteniéndose 14 subfracciones. Las subfracciones 9-10 (130 mg) fueron reunidas y separadas en HPLC preparativa de fase normal (condiciones detalladas en ítem previo), de donde se obtuvo: **44** (1 mg), **45** (< 1 mg) y **46** (< 1 mg) (Figura 9). La subfracción 11 (50 mg) y las subfracciones 12-14 (95 mg) fueron separadas de la misma forma (HPLC 6 y HPLC 7 respectivamente) obteniéndose solamente mezclas de compuestos.

Las fracciones 5-7 [F5-7 (1,14 g)] reunidas fueron sometidas a una cromatografía flash (11 cm altura x 7,5 cm diámetro) eluída con Hex/AcOEt 95:5 hasta AcOEt 100% obteniéndose 16 subfracciones. Las subfracciones 8 (59 mg), 9 (150mg) y 10 (240mg) fueron separadas en HPLC preparativa de fase normal (columna Macherey Nagel), obteniéndose: **42** (27 mg), **43** (3,7 mg) y también **46** (5 mg) y otras fracciones que mostraron ser mezclas de aquellos compuestos así como los mismos en bajo grado de pureza [ej.: una mezcla equimolecular de **46** y **44** (6 mg. Las cantidades relativas de esta muestra fueron determinadas por las intensidades relativas de la señal del H del aldehído en C-28 en estos compuestos)] (Figura 10).

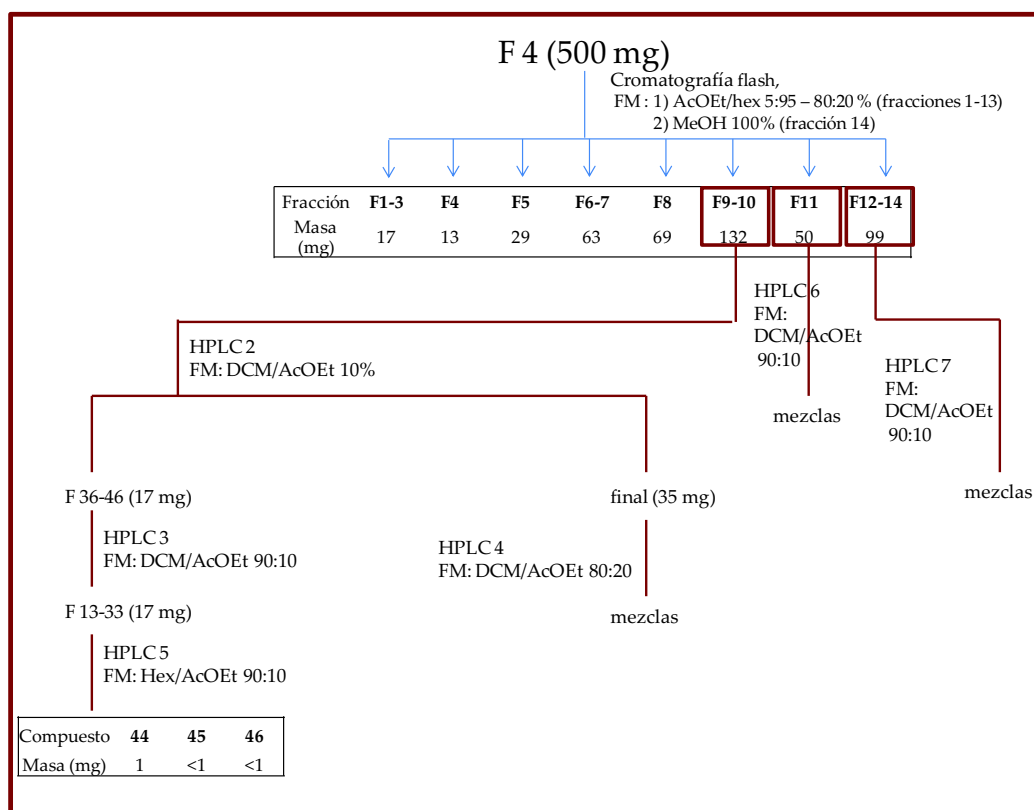


Figura 9. Esquema de fraccionamiento de F4, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.

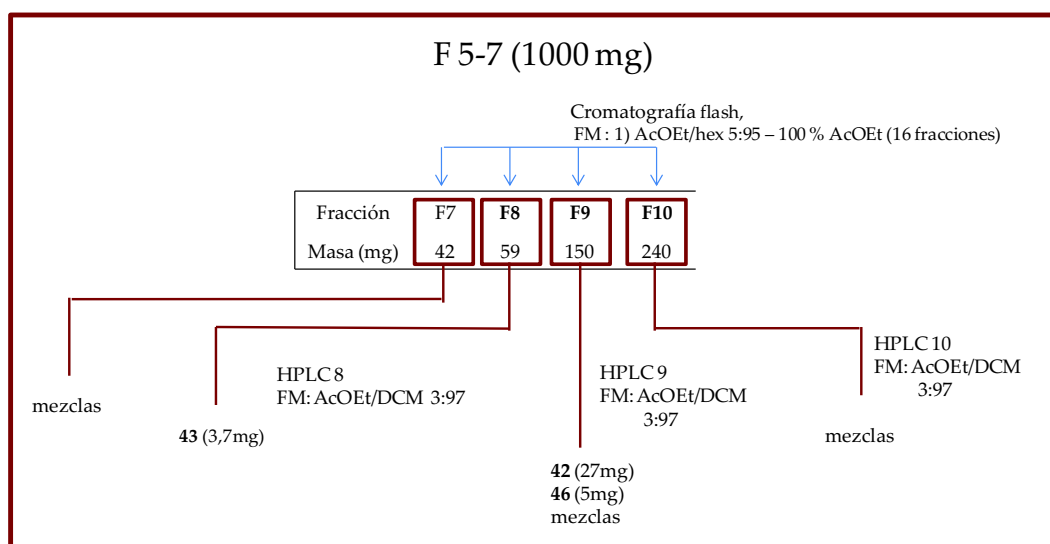


Figura 10. Esquema de fraccionamiento de F5-7, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.

Las fracciones 8-12 [F8-12 (0,9g)] reunidas fueron sometidas a una cromatografía flash (13 cm altura x 5 cm diámetro) eluída con Hex/AcOEt 90:10 hasta AcOEt 100% obteniéndose 22 subfracciones (F8-12_x) (Figura 11).

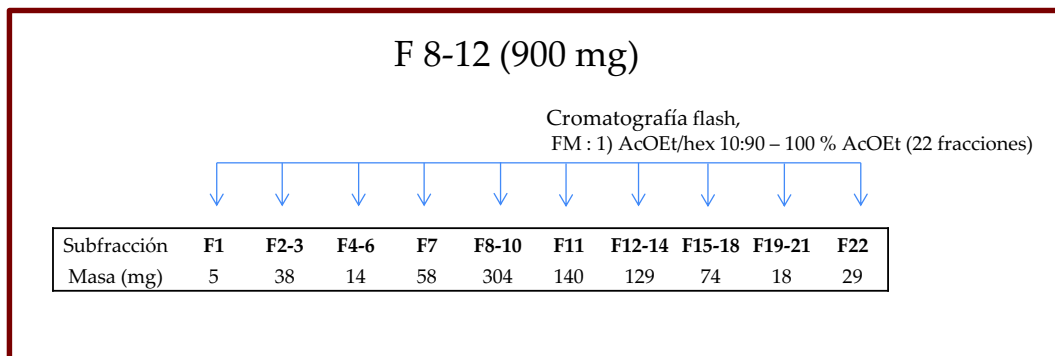


Figura 11. Esquema de fraccionamiento de F8-12, obtenida de la extracción primaria de frutos de Paraíso.

Sobre los compuestos aislados se realizaron análisis de RMN mono y bidimensionales, espectrometría de masas de baja y alta resolución, se analizó la rotación óptica en los casos que las cantidades obtenidas lo hicieron posible, y en el caso de **42** y **43** fueron realizados estudios de abundancia isotópica de carbono mediante espectrometría de masas comparándolos con los solventes etanol y metanol, y el extracto bruto etanólico de frutos.

Colonias de insectos

Los insectos utilizados para los bioensayos fueron: *Epilachna paenulata* (Coleoptera: Coccinellidae) especialista en cucurbitáceas; larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (generalista); *Rhopalosiphum padi* (especialista de gramíneas) y *Myzus persicae* (generalista) (Homoptera: Aphididae).

E. paenulata: La colonia de laboratorio de este especialista de cucurbitáceas fue mantenida sobre plantas de zapallito (*Cucurbita pepo*) bajo condiciones controladas de temperatura (20 ± 2 °C) y luz/oscuridad (16:8 h). Para el establecimiento inicial de la colonia los individuos, fueron colectados en huertas orgánicas de las cercanías de Montevideo; a su vez nuevos individuos colectados en el campo son introducidos en la misma cada año.

Las larvas de *S. littoralis* (generalista) fueron mantenidas sobre dieta artificial^[94], a 25 ± 1 °C, humedad relativa ambiente mayor a 70% y con un fotoperíodo 16:8 h (luz/oscuridad).

R. padi (especialista de gramíneas) y *M. persicae* (generalista) fueron mantenidos sobre hojas de cebada (*Hordeum vulgare*, Poaceae) a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y morrón (*Capsicum annuum*, Solanaceae) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, humedad relativa ambiente mayor a 70% y con un fotoperíodo 16:8 h (luz/oscuridad).

Tanto la colonia de *S. littoralis* como las de los áfidos se encontraban en el Instituto de Ciencias Agrarias de Madrid, España, lugar donde fueron desarrollados los bioensayos.

Asimismo, se utilizó *N. viridula* manteniendo ninfas y adultos por separado alimentándolos con chauchas y germinadores de lentejas, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa ambiente mayor a 70% y con un fotoperíodo 16:8 h (luz/oscuridad).

Bioensayos

Bioensayos de deterrencia de ingesta utilizando *S. littoralis* y *E. paenulata*:

Los bioensayos fueron realizados en placas de Petri cubiertas con agar (2,5 %). Sobre cuatro hoyos equidistantes de 1 cm de diámetro se colocaron discos de hojas de especies vegetales consumidas normalmente por los insectos (hojas de zapallito para *E. paenulata* y de morrón para *S. littoralis*). Sobre dos de los discos (opuestos) se aplicaron 100 μg de extracto a testear (10 μL de solución 10 mg/mL en metanol) y sobre los dos restantes -controles-, 10 μL de metanol. Luego de evaporado el disolvente se introdujo los insectos en las placas (Figura 12a y b). Se registró el porcentaje de hoja consumido por placa y se calculó el Índice de preferencia (IP) para cada placa definido como: $\text{IP} = [(\text{consumo de control} - \text{consumo de tratamiento}) / (\text{consumo de control} + \text{consumo de tratamiento})]^{[95]}$.

Bioensayos de inhibición de asentamiento de pulgones con *M. persicae* y *R. padi*.

Los bioensayos fueron realizados en placas prismáticas de 3 x 3 x 1,5 cm cubiertas con agar (2,5 %). Se colocaron sobre ellas hojas cortadas a la mitad (rectángulos de hojas de cebada de 2 x 1 cm para *R. padi* y dos discos de hojas de morrón de 2 cm de diámetro para *M. persicae*). Sobre una de las mitades se aplicó 100 μg de extracto a testear (10 μL de solución 10 mg/mL en metanol) y sobre la otra -control-, 10 μL de metanol. Luego de evaporado el disolvente se introdujeron 10 pulgones ápteros en cada placa (Figura 12c). Se registró el número de pulgones asentados sobre cada uno de los trozos de hojas, calculándose el Índice de preferencia (IP)

definido como $IP = [(\% \text{ de pulgones sobre superficie control} - \% \text{ de pulgones sobre superficie tratada}) / (\% \text{ de pulgones sobre superficie control} + \% \text{ de pulgones sobre superficie tratada})]^{[95]}$.

Bioensayo de toxicidad contra chinches.

Los bioensayos fueron realizados en viales cilíndricos de vidrio cuyas paredes eran empapadas con las soluciones etanólicas a testear. Luego de evaporado el disolvente se introdujo un adulto dentro de cada vial (Figura 12d) y se registró la sobrevivencia de los mismos. Se utilizó viales cubiertos con etanol como control negativo y viales tratados con solución de Engéo $6,3 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2$ [Tiametoxam (141g/L)/Lambda-cihalotrina (106 g/L)] como control positivo. Fueron testeadas varias concentraciones del extracto bruto de frutos de *M. azedarach* y del extracto rico en limonoides, siendo 25 mg/cm^2 y $0,6 \text{ mg/cm}^2$ las mayores cantidades testeadas en uno y otro caso respectivamente.

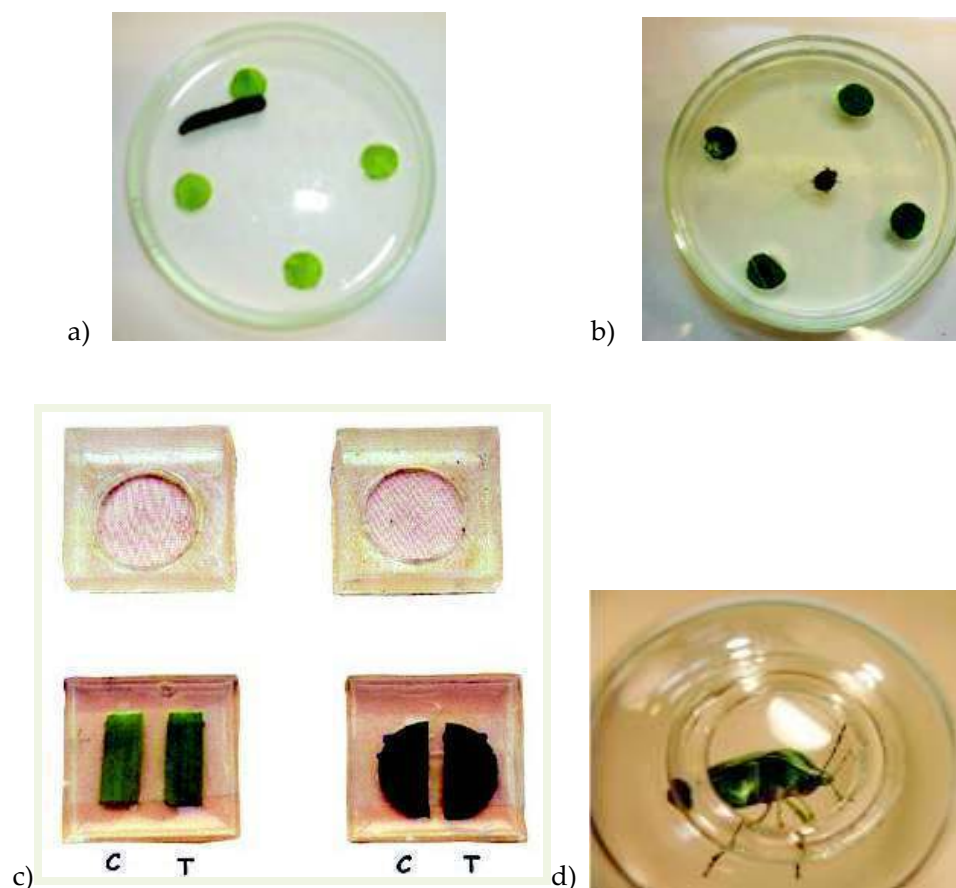


Figura 12. Diseño de bioensayos

Deterrenencia de ingesta de a) *S. littoralis*, y b) *E. paenulata*; c) Inhibición de asentamiento de *R. padi* (izquierda) y *M. persicae* (derecha); d) Adulto de *N. viridula* en vial donde se testea la toxicidad por contacto.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en los bioensayos de opción fueron analizados mediante el Test de Rangos de Wilcoxon^[96]. La determinación de la inhibición del asentamiento de los áfidos fue basada en la comparación del número de áfidos asentados en las hojas tratadas con control con el número de áfidos asentados en las hojas tratadas con los productos a testear (tratamientos). En este bioensayo, las réplicas que tenían menos de cinco áfidos asentados en total en ambas hojas, no fueron consideradas como unidades experimentales. La determinación de la deterrenencia de ingesta fue basada en la comparación de las proporciones de consumo de hojas

tratadas con control o con productos a testear. Las comparaciones entre resultados de diferentes bioensayos fueron analizadas mediante Tests de Mann Withney o Kruskal Wallis^[96].

En el caso de los bioensayos testando toxicidad contra chinches fueron realizados análisis de varianzas (ANOVA) entre el control positivo y el tratamiento, utilizando el paquete estadístico Minitab.

1.3 Resultados

1.3.1 Actividad antiinsecto de fracciones

El extracto etanólico de frutos de Paraíso mostró diferentes resultados en cuanto a actividad antiinsecto contra las cinco especies de insecto utilizadas. No presentó toxicidad alguna en el bioensayo de toxicidad por contacto contra los adultos de la chinche verde *N. viridula*. Debido a que tampoco lo hizo el extracto enriquecido en limonoides (Elim), es que no se continuó con ensayos de actividad contra esta especie de insectos.

El extracto bruto sí presentó actividad deterrente contra los dos generalistas (*M. persicae* y *S. littoralis*) mientras que no fue así para el caso de los especialistas.

Fue en las fracciones denominadas F4 y F5-7 (Figura 8) donde, debido a lo que se revelaba en las TLC, se esperaba encontrar la mayor cantidad de compuestos del tipo limonoides. A su vez, esta idea se vio fortalecida por el hecho de que la mezcla de esas fracciones (Elim) fue la única activa contra las cuatro especies de insectos modelo con las cuales se continuó el trabajo (Tabla 1). Las fracciones F2-3, la fracción F4 y alguna de sus subfracciones, la fracción F5-7 y las subfracciones de F8-12 fueron testeadas contra las cuatro especies de insectos modelo. En la (Tabla 1) se muestran los resultados de los diferentes bioensayos de actividad antiinsecto de las fracciones testeadas así como del extracto etanólico de frutos (EE frutos). Dado que las fracciones F4 y F5-7 eran las que tenían las características de, poseer según las TLC, probablemente, compuestos del tipo limonoides, ser las de mayor masa, y ser activas contra diferentes especies de insectos, es que fueron estas las que se sometieron a sucesivos fraccionamientos en HPLC, con el fin de aislar compuestos puros.

Extracto/fracción ^a	Índice de Preferencia (IP ± ES)			
	Especies de Insectos			
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
EE frutos	0,3 ± 0,1*	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1*	0,3 ± 0,3
Elim	0,5 ± 0,1*	0,19 ± 0,07*	1,00 ± 0,00*	0,98 ± 0,02*
F 2-3	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	-	-
F 4	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1*	0,5 ± 0,2*
F4 ₄	-0,5 ± 0,2*	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	-
F4 ₆₋₇	-0,2 ± 0,1	-0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,3	-
F4 ₈	-0,0 ± 0,1	0,04 ± 0,09	0,4 ± 0,2	-
49-51 HPLC 7	0,2 ± 0,1	0,07 ± 0,06	-	-
42-48 HPLC7 + 60-72 HPLC6	0,54 ± 0,08*	0,27 ± 0,06	-	-
53-56 HPLC 7	0,3 ± 0,1 *	0,06 ± 0,05	-	-
F 5-7	0,4 ± 0,1*	0,3 ± 0,1[#]	-	0,7 ± 0,2[#]
F 8-12	-	-	-	-
F 8-12 ₄₋₆	0,56 ± 0,07*	0,1 ± 0,1	-	0,5 ± 0,3[#]
F 8-12 ₇	0,5 ± 0,1*	0,16 ± 0,08*	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,2*
F 8-12 ₈₋₁₀	0,68 ± 0,07*	0,02 ± 0,08	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,3*
F 8-12 ₁₁	0,47 ± 0,08*	0,13 ± 0,07[#]	1,00 ± 0,00*	1,00 ± 0,00*
F 8-12 ₁₂₋₁₄	0,78 ± 0,08*	0,3 ± 0,2	1,00 ± 0,00*	0,7 ± 0,2*
F 8-12 ₁₅₋₁₈	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1*	1,00 ± 0,00*	1,00 ± 0,00*
F 8-12 ₁₉₋₂₁	0,43 ± 0,08*	-0,1 ± 0,1	0,95 ± 0,05*	0,6 ± 0,3
F 8-12 ₂₂	0,56 ± 0,09*	0,16 ± 0,09	0,8 ± 0,1*	0,2 ± 0,3

Tabla 1. Resultados de los ensayos de actividad antiinsecto de extractos y fracciones, de frutos de Paraíso, contra las cuatro especies de insectos modelo.

Los resultados en negritas corresponden a diferencias significativas entre C y T. ^a Las fracciones y extractos fueron testeados a una concentración de 100 µg/cm². * Implica diferencia significativa entre C y T (% consumido o % de áfidos asentados según corresponda; p < 0,05, Test de Rangos de Wilcoxon de dos colas). #Implica diferencia significativa entre C y T (% consumido o % de áfidos asentados según corresponda; p < 0,05, Test de Rangos de Wilcoxon de una cola).

1.3.2 Aislamiento de compuestos

Luego de la purificación por sucesivas HPLC preparativas de las fracciones F4 y F5-7, fueron aislados del extracto en estudio, dos limonoides del tipo tirucalano nunca antes descritos en esta especie vegetal (**42** y **43**)^[97, 98], así como tres *C-seco* limonoides previamente reportados en este árbol (**44** - **46**) (Figura 12)^[99]. A continuación se detallan los datos físicos y espectroscópicos de los cinco compuestos aislados de las fracciones F4 y F5-7 del extracto etanólico de frutos de *M. azedarach* (Figura 12). Dado que el compuesto **43** podría ser un artefacto de la extracción (debido a poseer un sustituyente etilo en lugar de un metilo y haberse utilizado EtOH y AcOEt en el proceso de extracción) se estudió la abundancia isotópica del carbono comparando la abundancia de ^{13}C en el extracto bruto, en **42** y en **43**, contra la abundancia en los solventes metanol y etanol, resultado que se muestra en la Tabla 2.

	$\Delta^{13}\text{C}^*$
extracto	-28,671
etanol	-12,067
metanol	-36,684
42	-29,654
43	-29,589

Tabla 2. Resultados de los análisis de abundancia isotópica del carbono para el extracto bruto etanólico de frutos, los solventes etanol y metanol, y los compuestos **42** y **43**.

* Los valores se expresan por comparación con el valor del estándar internacional PDB, de acuerdo a lo explicado en la sección 1.2.

21 α -metilmelianodiol (42**):** $[\alpha]^{21}_{\text{D}} -97,5^\circ$ (c 0,3800; CHCl_3); datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H : Tabla 3 y Tabla 4; HRESIMS m/z 525,35925 $[\text{M} + \text{Na}^+]$ (calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{Na}$: 525,35505; $\Delta m = 8,0$ ppm).

21 β -etilmelianodiol (43**):** $[\alpha]^{21}_{\text{D}} - 39,1^\circ$ (c 0,1735; CHCl_3); datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H : Tabla 3 y Tabla 4; HRESIMS m/z 539,37013 $[\text{M} + \text{Na}^+]$ (calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{Na}$: 539,37122; $\Delta m = 2,0$ ppm).

1-O-Destigloil-1-O-cinamoilohchinolal (44**):** $[\alpha]^{21}_{\text{D}} +61,5^\circ$ (c 0,4735; CHCl_3); datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H : Tabla 3 y Tabla 4; HRESIMS m/z 683,28435 $[\text{M} + \text{Na}^+]$ (calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{Na}$: 683,28267; $\Delta m = 2,5$ ppm).

1-O-Destigloil-1-O-benzoilohchinolal (45): datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H : Tabla 3 y Tabla 4..

Ohchinolal (46): datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H : Tabla 3 y Tabla 4.

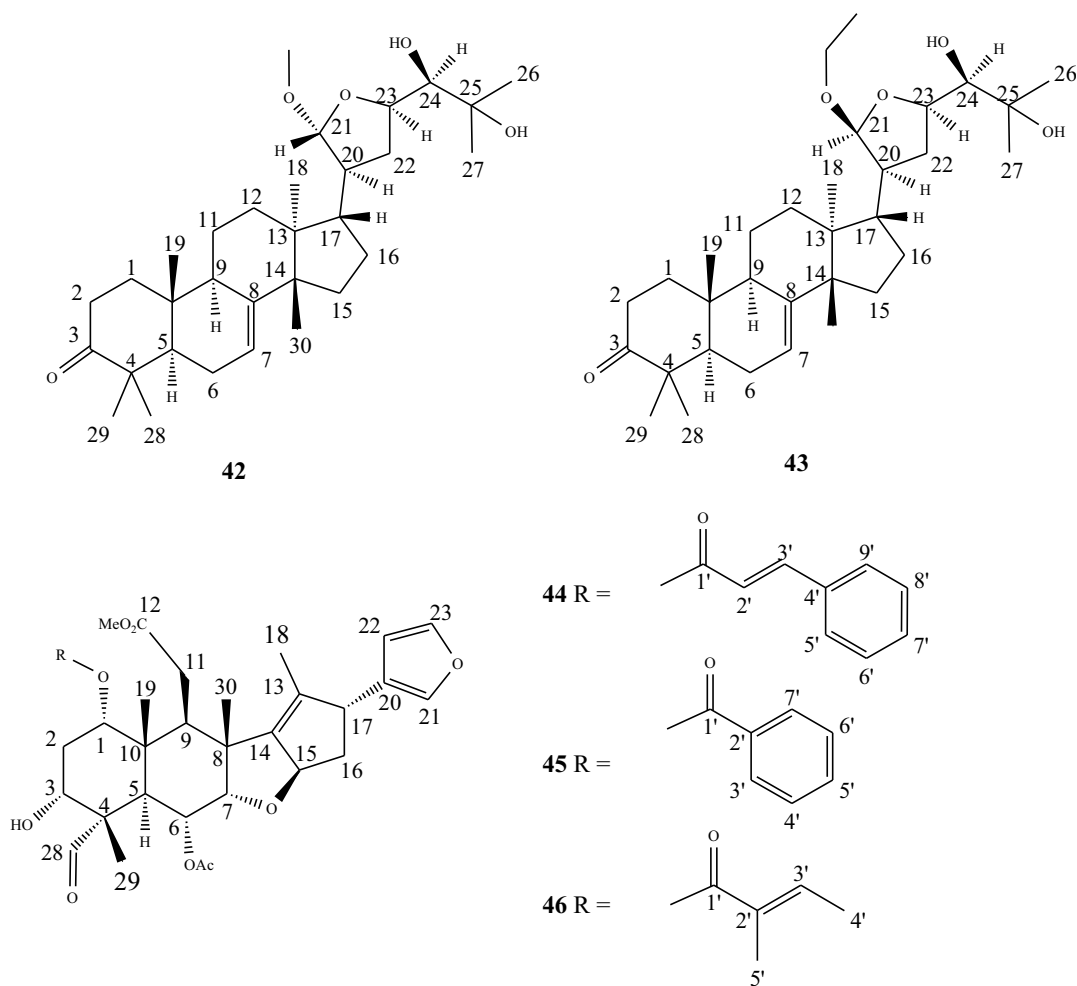


Figura 13. Compuestos aislados del extracto etanólico de frutos de Paraíso.

Número de Carbono*	42	43	44	45	46
1	38,65	38,7	73,12	73,3	72,73
2	35,25	35,25	28,76	28,92	30,51
3	217,05	217	75,31	75,12	75,3
4	48,03	48,04	49,31	49,27	49,28
5	52,5	52,5	35,28	35,07	35,24
6	24,5	24,51	69,16	69,11	68,98
7	118,31	118	86,26	86,29	86,15
8	145,7	145	47,32	47,2	47,26
9	48,45	48,45	39,86	39,99	39,79
10	35,07	35,08	42,28	42,54	42,38
11	17,93	17,9	30,48	30,88	28,57
12	31,67	31,2	172,63	172,46	172,66
13	43,75	43,6	135,94	136,25	135,95
14	51,12	50,9	146,21	145,9	146,25
15	33,9	34,34	87,8	87,89	87,84
16	27,56	27,48	41,29	41,29	41,4
17	50,45	45,1	49,81	49,75	49,82
18	22,7	23,4	13,26	13,34	13,25
19	12,9	12,89	17,24	16,99	17,17
20	47,86	46,38	127,03	127,07	127,18
21	109,14	103,54	139,02	138,81	139,13
22	34,48	31,8	110,82	110,72	110,86
23	76,91	78	143,21	143,1	143,21
24	75,53	76,8	-	-	-
25	73,24	73,1	-	-	-
26	26,53	26,53	-	-	-
27	26,62	26,41	-	-	-
28	24,65	24,64	207,1	207,02	207,07
29	21,73	21,7	14,09	14,19	13,25
30	27,44	27,53	17,29	17,99	17,23
-O-CH ₃	55,8	-	-	-	-
-O-CH ₂ -CH ₃	-	63,9	-	-	-
-O-CH ₂ -CH ₃	-	15,35	-	-	-
-CO ₂ CH ₃	-	-	51,87	51,48	51,78
-OCOCH ₃	-	-	21,14	21,12	21,11
-O ₂ CCH ₃	-	-	170,62	170,54	170
1'	-	-	165,66	165,32	166,4
2'	-	-	117,75	130,2	128,8
3'	-	-	146,27	129,8	138,8
4'	-	-	134,4	128,87	14,86
5'	-	-	128,56	133,7	12,41
6'	-	-	129,24	128,87	-
7'	-	-	130,93	129,8	-
8'	-	-	129,24	-	-
9'	-	-	128,56	-	-

Tabla 3. Desplazamiento de los ¹³C (CDCl₃, δ en ppm, 100-150 MHz) para los compuestos aislados (42–46).

* Ver numeración Figura 13.

Número de Carbono*	42 ^b	43 ^b	44 ^a	45 ^a	46 ^a
1	1,45 (m) 1,98 (m)	1,47 (m) 1,97 (m)	5,14 (t; 2,6)	5,26 (t, 3)	5,08 (t; 3,0)
2	2,24 (dt; 14,2; 3,7) 2,76 (td; 14,6; 5,6)	2,24 (dt; 14,0; 3,4) 2,74 (td; 14,5; 5,6)	2,31 (m)	2,10-2,30 (m)	2,10-2,30 (m)
3	-	-	3,78 (dt; 3,0)	3,81 (m)	3,75 (dt; 9,5; 2,5)
5	1,72 (m)	1,70 (m)	3,71 (d; 12,1)	3,81 (m)	3,65 (d; 12,5)
6	2,06-2,13 (m)	2,06-2,13 (m)	5,28 (dd; 2,7; 12,2)	5,30 (dd; 2,7; 12,2)	5,26 (dd; 2,7; 12,1)
7	5,32 (q; 3,2)	5,3 (q; 2,8)	4,05 (d; 2,7)	4,07 (d; 2,7)	4,03 (d; 2,7)
8	-	-	-	-	-
9	2,30 (m)	2,30 (m)	2,90 (dd; 2,7; 8,8)	2,93 (dd; 4,7; 7,1)	2,84 (dd; 3,2; 8,5)
10	-	-	-	-	-
11	1,57 (m)	1,58 (m)	2,31 (m)	2,30 (m)	2,30 (m)
12	1,55 (m) 1,74 (m)	1,33 (m) -	-	-	-
15	1,50 (m)	1,51 (m)	5,56 (td, 2,6, 8,2)	5,51 (m)	5,48 (m)
16	1,94 (m) 1,31 (m)	1,88 (m)	2,10 (m) 2,30 (m)	2,10 (m) 2,30 (m)	2,10 (m) 2,30 (m)
17	1,78 (m)	2,05 (m)	3,63 (dd; 8,5; 1,5)	3,61 (d; 8,7)	3,65 (d; 8,5)
18	0,85 (s)	0,83 (s)	1,65 (d; 2,0)	1,64 (d; 1,5)	1,65 (d; 1,5)
19	1,01 (s)	1,01 (s)	1,10 (s)	1,13 (s)	1,08 (s)
20	2,16 (m)	1,96 (m)	-	-	-
21	4,78 (d, 3,6)	4,80 (d; 3,2)	7,19 (s)	7,12 (s)	7,25 (s)
22	1,94 (m) 1,74 (m)	1,90 (m) -	6,24 (dd; 1,0; 0,5)	6,11 (d; 1,0)	6,29 (d; 1,3)
23	4,22 (ddd; 10,5; 4,8; 1,7)	4,43 (m)	7,30 (m)	7,18 (t; 1,5)	7,33 (t; 1,6)
24	3,25 (dd; 9,9; 1,5)	3,17 (dd; 8,2; 2,0)	-	-	-
26	1,26 (s)	1,25 (s)	-	-	-
27	1,30 (s)	1,25 (s)	-	-	-
28	1,12 (s)	1,11 (s)	9,76 (s)	9,80 (s)	9,74 (s)
29	1,04 (s)	1,04 (s)	1,01 (s)	1,04 (s)	1,00 (s)
30	1,01 (s) 3,34 (s) O-Me	1,01 (s) 1,22 (t) -O-CH ₂ -Me 3,7 (m); 3,4 (m) -O-CH ₂ -Me	1,43 (s) 3,18 (s) OMe 1,99 (s) OCOMe 6,51 (d; 15,9) 2' 7,74 (d; 16,0) 3' 7,58 (m) 5' 7,43 (m) 6' 7,43 (m) 7' 7,43 (m) 8' 7,58 (m) 9'	1,43 (s) 2,85 (s) OMe 2,0 (s) OCOMe 7,49 (m) 3' 7' 8,09 (m) 4' 6' 7,63 (t; 7,4) 5'	1,41 (s) 6,94 (dd; 7,1; 1,4) 3' 1,86 (d; 7,1) 4' 1,94 (s) 5'

Tabla 4. Desplazamiento de los ¹H (δ en ppm, J en Hz) para los compuestos aislados (42–46).

^a En CDCl₃, 500 MHz. ^b En CDCl₃, 400 MHz.

* Ver numeración Figura 13.

1.3.3 Actividad antiinsecto de compuestos aislados y sus mezclas

En la Tabla 5 se muestran los resultados de los bioensayos realizados con los compuestos aislados de la especie vegetal en estudio. Dado que el compuesto **45** fue aislado en muy pequeña cantidad, no fue posible realizar los bioensayos de actividad antiinsecto.

Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)				
Especies de Insectos				
Compuesto	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
42	-0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	-0,1 $\pm$ 0,4
43	0,3 $\pm$ 0,1*	-	-0,3 $\pm$ 0,2	-
44	0,2 $\pm$ 0,1	-0,06 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1*
46	-0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,93 $\pm$ 0,07*	0,7 $\pm$ 0,2*
46+44	-0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,92 $\pm$ 0,04*	1,00 $\pm$ 0,00*

Tabla 5. Resultado de los bioensayos evaluando actividad antiinsecto de compuestos puros aislados del extracto etanólico de frutos de Paraíso contra las especies de insectos modelo.

Los compuestos puros y la mezcla (**46 + 44**) fueron testeados a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

* Implica diferencia significativa entre C y T (% consumido o % de áfidos asentados según corresponda; $p < 0,05$, Test de Rangos de Wilcoxon de dos colas).

1.4 Discusión

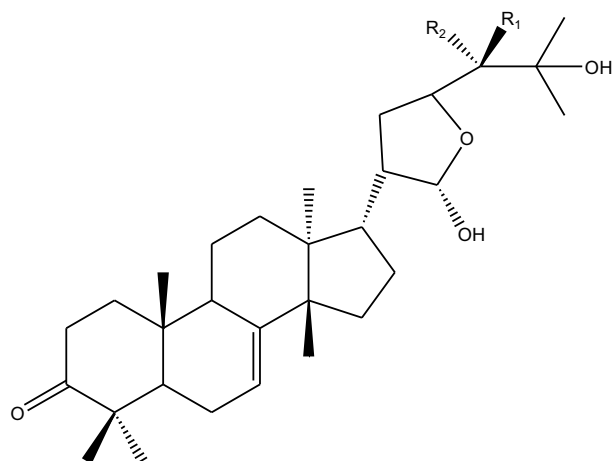
1.4.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

El compuesto **42** muestra un pico $[M + Na^+]$ en m/z 525,35925 en HRESIMS, correspondiente a la fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_5Na$.

Las señales de 1H RMN revelan la presencia de siete metilos singuletes δ 0,85 (H-18), δ 1,01 (H-19), δ 1,26 (H-26), δ 1,30 (H-27), δ 1,12 (H-28), δ 1,04 (-29), δ 1,01 (H-30), [dos de ellos (H-26 y H-27) geminales sobre un carbono unido a oxígeno δ 73,24 (C-25) y otros dos (H-28 y H-29) geminales sobre un carbono cuaternario δ 48,03 (C-4), según análisis HSQC]. También se observa un singulete a δ 3,34 correspondiente a un metoxilo. A campos bajos se observa además tres señales de protones metínicos: δ 3,25 (H-24), δ 4,22 (H-23) y δ 4,78 (H-21), y una señal de protón sobre un carbono sp^2 δ 5,32 (H-7).

En el espectro de ^{13}C RMN se encuentran todas las señales confirmatorias de las anteriores y se destaca la presencia de un carbonilo δ 217,05 (C-3), un carbono cuaternario correspondiente a doble enlace δ 145,7 (C-8) y dos metinos C-23 y C-21 a δ 76,91 y δ 109,14 respectivamente.

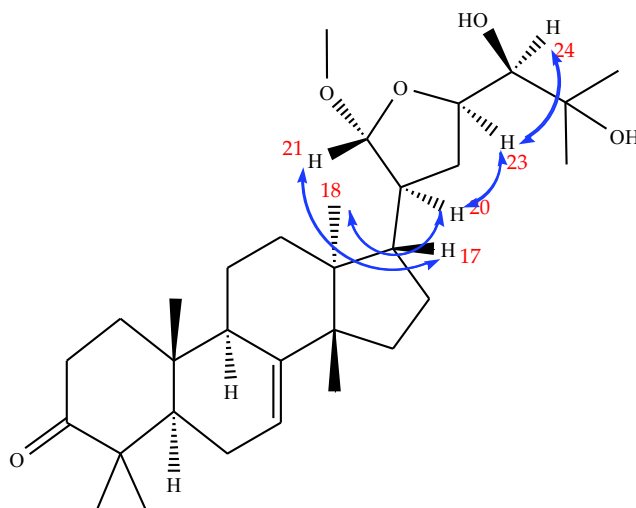
Es así, que luego de analizados los sistemas de spin, los estudios de RMN bidimensionales y comparando con datos de bibliografía, todos los datos de RMN mostraron que **42** corresponde a 21 α -metilmelianodiol (Tabla 3 y Tabla 4). Este limonoide y su isómero 21 β fueron inicialmente aislados de la corteza de *Cedrela sinensis*^[97], sin haber sido reportada la estereoquímica del C-24. La estereoquímica de este carbono en **42** y en su isómero β fue determinada más tarde, cuando estos compuestos fueron aislados de los frutos de *Poncirus trifoliata* (Rutaceae)^[98], por comparación con la estereoquímica de melianodiol (**47**) y 24-epi-melianodiol (**48**)^[100].



47: R₁ = OH; R₂ = H

48: R₁ = H; R₂ = OH

En experimentos NOE sobre el compuesto **42**, la irradiación del H-18 (δ 0,85 ppm) provocó un aumento de la señal del H-20 (δ 2,16 ppm), indicando que la cadena lateral en C-17 y el metil C-18 (α) se encuentran orientados para el mismo lado en el esqueleto principal, y por ende C-20 podría presentar configuración *S*. Asimismo, la irradiación del H-21 (δ 4,78 ppm) ocasionó un incremento en la señal de H-17 (δ 1,78 ppm) y no así en la señal de H-23 (δ 4,22 ppm), sugiriendo esto que en **42** el metoxilo en C-21 se encuentra orientado α . Además de ello, los valores de desplazamientos químicos de C-17 (δ 50,45 ppm), C-21 (δ 109,14 ppm) y C-22 (δ 34,48 ppm) se asemejan a aquellos del epímero de melianodiol que presenta el grupo metoxilo orientado α . Por último, la irradiación de H-23 provocó un aumento de la señal de H-20 y de H-24 (δ 3,25 ppm) sugiriendo que el C-24 presenta configuración *S* (Figura 14). En síntesis, el compuesto **42**, fue elucidado como 21 α -metilmelianodiol.



42

Figura 14. Señales de NOE confirmatorias de 42.

El compuesto **43** presenta un pico $[M + Na^+]$ en m/z 539,3707 en HRESIMS correspondiente a la fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_5Na$. Los datos de RMN de **42** y **43** mostraron gran similitud (Tablas 2 y 3), siendo las mayores diferencias la presencia de un etoxilo en vez de un metoxilo en C-21, así como los desplazamientos químicos de C-17 (δ 45,10 ppm), C-21 (δ 103,54 ppm) y C-22 (δ 31,80 ppm) que se asemejan a aquellos que presenta el epímero de melianodiol (**48**) con el grupo metoxilo de C-21 orientado β ^[98]. Por lo anterior, la estructura de **43** se determinó como 21 β -etilmelianodiol.

En vistas del uso de etanol y acetato de etilo en el proceso de extracción de estos compuestos, la diferencia en la configuración de C-21, y el hecho de que la configuración espacial de **43** parecería ser más estable que la de **42**; no se puede excluir la posibilidad de que **43** sea un artefacto de la etoxilación de **42**. Sin embargo, ambas configuraciones de C-21 fueron antes reportadas en productos naturales, como es el caso de 21 α -metilmelianodiol y 21 β -metilmelianodiol aislados de los frutos de *P. trifoliata*^[98]. En miras de confirmar si **43** era un artefacto o un producto natural biosintetizado por la planta, fue realizado mediante espectroscopía de masas, un estudio de abundancia isotópica de carbono, comparando el extracto vegetal bruto de donde fueron aislados ambos compuestos, los compuestos por separado y los solventes etanol y metanol (Tabla 2). En dicho estudio se observó que los compuestos tuvieron diferencias entre ^{12}C y ^{13}C similares a las del extracto y diferentes a

las de los solventes. Es así que de acuerdo a este estudio se podría inferir que ambos compuestos son de origen vegetal.

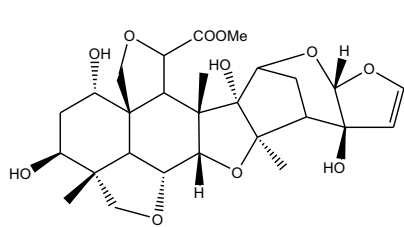
El compuesto **44** presenta en su espectro de masas un pico $[M + Na^+]$ en m/z 683,28435 en HRESIMS correspondiente a la fórmula molecular $C_{38}H_{44}O_{10}Na$. Luego de analizar los espectros de RMN mono y bidimensionales, se observa la presencia de tres grupos de señales bien diferenciados: los correspondientes a dos cadenas laterales y los correspondientes a un esqueleto principal compuesto por varios ciclos hidrocarbonados. Una de las cadenas laterales, incluye solamente cuatro carbonos correspondientes a doble enlace. Dos de ellos a su vez, aparecen a campos más bajos, δ 139,02 (C-21) y δ 143,21 (C-23), así como lo hacen los protones que les corresponden δ 7,19 (H-21) y δ 7,30 (H-23). Es así que los datos espectroscópicos conllevan a concluir que tal cadena lateral es un anillo furánico. La otra cadena lateral contiene un resto bencénico, un doble enlace y un carbonilo, según lo que se observa en los espectros de RMN. Siendo la misma un resto cinamoilo. En el esqueleto principal del compuesto, es destacable la presencia de un doble enlace sustituido, un resto $-OCOMe$, otro $-CH_2CO_2Me$, un aldehído y tres metinos unidos a heteroátomos. Todo lo anterior, junto con el análisis de los sistemas de spin llevó a concluir que **44** corresponde a 1-O-Destigloil-1-O-cinamoilohchinolal, lo cual es confirmado con datos de bibliografía^[99].

45 y **46** muestran señales que indican esqueletos principales iguales a **44**, sustituidos también con el resto furánico en C-17 pero con sustituyentes diferentes en C-1. Los datos espectroscópicos de las cadenas laterales de **45** y **46** muestran que las mismas corresponden a un grupo benzoilo y un grupo tigloilo respectivamente. Confirmando así la estructura de estos compuestos como: 1-O-Destigloil-1-O-benzoilohchinolal^[99] y ohchinolal^[101] respectivamente. Habiendo sido los mismos aislados ya previamente de los frutos de *M. azedarach* colectados en Curitiba, Brasil, reporte en el cual no se encontraba el desplazamiento químico de los carbonos C-8, C-10 y C-16 para el compuesto **44**.

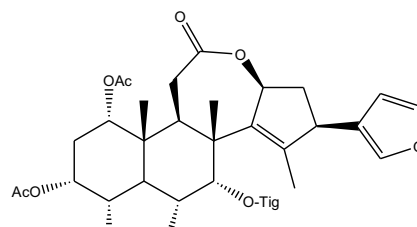
Como fue mencionado en la introducción de este capítulo, una gran cantidad de compuestos aislados ha sido reportada para esta especie vegetal. Sin embargo, la mayor parte de los reportes corresponden a especímenes asiáticos. De árboles de ese origen han sido aislados limonoides de muy diferentes tipos, siendo los principales ejemplos,

toosendanina (14)^[33], triquilina (28)^[102, 103], salanina (29)^[104, 105], fraccinelona (30)^[106], meliacarpina (32)^[83], amoorastatona [isómero de meliartenina (33)], azedaraquina (36)^[107], nimbolina (37)^[108], meliatoxina (39)^[79], derivados de meliacarpina (49)^[109]. Mientras que de árboles provenientes de Sudamérica la cantidad de reportes es menor, siendo los principales correspondientes a aislamientos de derivados de ohchinólido (50), ohchinolal (46)^[99] (ambos C-*seco* limonoides), cinamodiol (51)^[110] (protolimonoides proveniente del eufol) de especímenes brasileños; y meliartenina (33) (protolimonoides), pinoresinol (41) y escopoletina (52) (no limonoides)^[111], 3- α -tigloilmelianol (53), melianona (54) y un derivado, y metil kulonato (55)^[112] (protolimonoides provenientes de tirucalano) de especímenes argentinos.

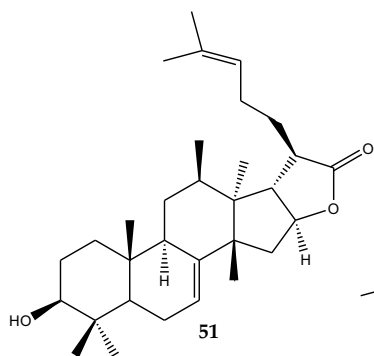
Es así que el aislamiento de dos protolimonoides del tipo tirucalano (42 y 43) y tres C-*seco* limonoides (44-46) de especímenes de Uruguay es un indicio de la similitud en composición química de los árboles estudiados provenientes de regiones vecinas.



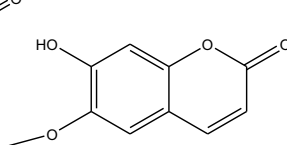
49



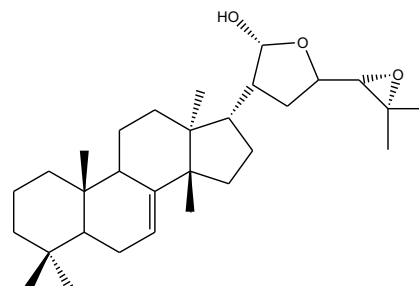
50



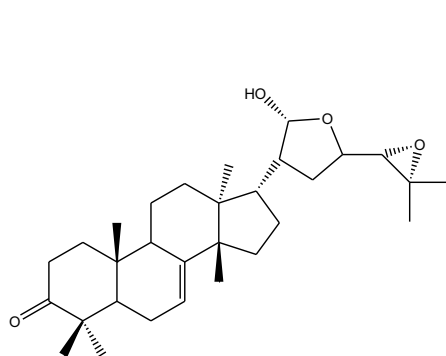
51



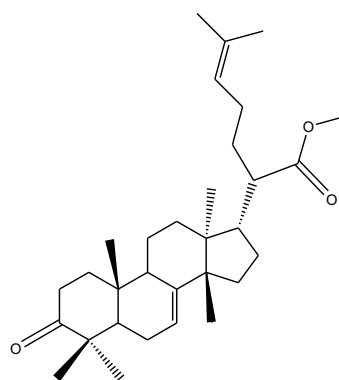
52



53



54



55

1.4.2 Actividad antiinsecto

El extracto etanólico crudo de frutos de *M. azedarach* (EE frutos) presentó actividad deterrente contra los dos insectos generalistas utilizados (*M. persicae* y *S. littoralis*) pero fue inactivo contra los dos especialistas (*R. padi* y *E. paenulata*) (Tabla 1). Este patrón es opuesto a lo que se ha reportado en otros estudios donde los generalistas son menos susceptibles que los especialistas a los productos con actividad antiinsecto^[19]. En general se tiende a pensar que los generalistas, al encontrarse habituados a ingerir una gran diversidad de metabolitos secundarios, serán tolerantes a una mayor variedad de estos compuestos; mientras que los especialistas, al haber evolucionado específicamente para tolerar únicamente aquellos metabolitos secundarios que se encuentran en sus plantas hospederas, serán más susceptibles a los mismos. Sin embargo, el patrón observado en este estudio se ha encontrado ya en otros casos^[113, 114].

Existen reportes anteriores de testeo de la actividad de extractos de frutos de la especie en estudio contra los generalistas testeados en este caso. Por ejemplo, fue reportada la actividad insecticida de extractos brutos de frutos contra larvas de *S. littoralis*^[115, 116]. En este caso el extracto metanólico exhibió efectos larvicidas cuando aplicado a concentraciones menores que las usadas en el presente estudio^[115]. Además cuando las larvas eran sometidas a dietas enriquecidas en estos extractos, efectos subletales tales como desbalance neuroendócrino (concentración de hormona juvenil así como el tamaño del *corpus allatum* afectados), y consecuencias fisiológicas (variación en el contenido proteico de la hemolinfa) fueron también reportados^[116]. Los resultados de este trabajo complementan aquellos estudios, dado que un fuerte efecto deterrente de ingesta fue encontrado –a dosis mayores– en las larvas de *S. littoralis*. En el caso de *M. persicae*, por el contrario, había sido reportada previamente la inactividad de extractos de frutos contra estos áfidos^[117, 118]. Esta disimilitud aparente puede deberse, ya sea a los diferentes métodos de extracción desarrollados o a las diferencias en el diseño de los bioensayos y dosis aplicadas, así como a que la composición química de los especímenes de este árbol en Uruguay, difiera a la de los de otras regiones geográficas.

En lo que respecta a los especialistas testeados, en trabajos anteriores, a diferencia de este, el extracto etanólico de frutos mostró actividad deterrente contra adultos y larvas de *E.*

paenulata^[111]. En ese caso el extracto fue testeado a dosis mayores (400 y 2000 µg/cm² para adultos y larvas respectivamente) que las utilizadas en el presente trabajo (100 µg/cm² para adultos) lo cual puede ser el causante de las diferencias encontradas. En este trabajo se eligió testear los extractos a 100 µg/cm² dado que esta es la concentración a la que otros productos de origen botánico son activos, resultado obtenido de la estandarización del bioensayo (rotenona y nicotina)^[19]. En el caso de *R. padi*, un organismo contra el cual no habían sido testeados los extractos de esta especie vegetal, no se encontró actividad en el extracto bruto de frutos.

A diferencia del extracto bruto de frutos, que fue activo solamente contra dos de las especies de insectos testeados, el extracto rico en limonoides (Elim) demostró poseer actividad contra los cuatro modelos de insectos testeados (Tabla 1). Es en el caso de los especialistas que el extracto bruto no fue activo mientras que si lo fue el extracto rico en limonoides, mostrando para *E. paenulata* deterrencia total. Este incremento en la actividad luego del fraccionamiento, es también visualizada en el caso de los generalistas, para los cuales se notó una tendencia de actividad más fuerte por parte de Elim aunque las diferencias con el extracto bruto no fueron significativas ($p = 0,07$ para *S. littoralis* y $p = 0,20$ para *M. persicae*; Test de Mann Whitney, Tabla 1).

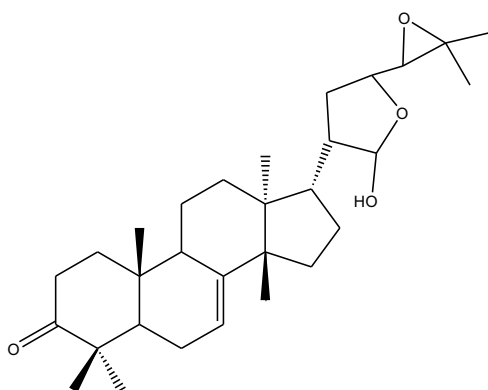
De la fracción más apolar del extracto rico en limonoides (F4), fueron aislados **44**, **45** y **46**; y de F5-7 fueron aislados **42**, **43** y **46**, además de una mezcla equimolecular de **46** y **44** (**46+44**). Mientras que F4 mostró deterrencia contra los dos insectos de aparato bucal masticador, los dos áfidos no fueron susceptibles a la misma. Los bioensayos con los compuestos puros **42**, **44** y **46**, revelaron también pérdida de la actividad de estos compuestos cuando fueron testeados separadamente (comparado con Elim) contra los áfidos. El compuesto **43** fue sin embargo, activo contra *M. persicae*. A su vez, alguno de estos productos mantuvo el efecto deterrente contra los insectos masticadores, como es el caso de **46** y de la mezcla de **46** y **44**. En el caso de **44**, solamente el especialista, *E. paenulata*, se vio afectado por este compuesto puro, recuperándose la actividad cuando este compuesto fue testeado en su mezcla con **46**. Dicha mezcla mostró deterrencia total contra este insecto (Tabla 5), sugiriendo que estos compuestos (**46** y **44**) podrían presentar sinergia en su efecto contra *E. paenulata*. Además el extracto rico en limonoides mostró mayor actividad contra las cuatro especies de insectos que los productos aislados de ese extracto (Tabla 1 y Tabla 5). Es

así que el efecto sinérgico entre **42-46** parece ser un patrón general en cuanto a la actividad deterrente de estos compuestos.

Los compuestos **42-43** pertenecen a la clase de protolimonoides, a la que pertenecen la melianona (**56**) y el melianodiol (**47**) que revelaron de acuerdo a estudios previos, actividad contra un Lepidóptero^[44].

Otros limonoides aislados de los frutos de este árbol [meliartenina (**33**) y toosendanina (**14**)] fueron testeados en cuanto a su actividad deterrente contra larvas del tercer estadio de *E. paenulata*^[119]. Estos compuestos mostraron tener actividad contra esos organismos a iguales concentraciones que la azadiractina (4 µg/cm²).

Muchos limonoides aislados, conteniendo el resto tigloil como cadena lateral, han mostrado ser citotóxicos^[109, 112, 120] así como deterrentes contra algunas especies plaga^[121]. Esto coincide con este estudio donde se observó que **46** fue el único limonoide que mostró actividad contra más de una especie de insectos cuando testeado por sí solo. Asimismo, también existen reportes de limonoides conteniendo el resto cinamoil como cadena lateral de sus estructuras, activos contra insectos^[83, 103], lo cual podría estar indicando que este resto en **44**, fuera en parte, el responsable de la actividad de este limonoide contra *E. paenulata*. Los compuestos **44-46** corresponden a limonoides del tipo C-*seco*, quienes son considerados el grupo más activo de limonoides y se han encontrado solamente en miembros de la familia de las Meliáceas, pertenecientes a la tribu Melieae (solamente en los géneros *Azadirachta* y *Melia*)^[31].



56

La actividad deterrente de los limonoides ha sido extensamente estudiada, en particular focalizada en la azadiractina (**13**)^[122, 123]. Aunque este compuesto alcanzó el mercado principalmente debido a sus propiedades insecticidas^[122], hoy en día, es el único producto comercial disponible que tiene propiedades deterrentes contra muchos insectos^[123]. Los productos comerciales cuyo principio activo es azadiractina son obtenidos de las semillas de árboles de Neem. De esta manera, el árbol del Paraíso podría ser en el futuro fuente de productos con propiedades antiinsecto, más aún considerando la excelente producción de biomasa de este árbol^[124]. Es por ello que en este punto, evaluaciones agronómicas sobre el crecimiento de estos árboles, serían de gran importancia, como ya ha sido sugerido previamente^[20].

1.5 Conclusiones

En síntesis, durante este trabajo se aisló por primera vez de los frutos de *M. azedarach* 21 α -metilmelianodiol (**42**) y 21 β -etilmelianodiol (**43**), dos limonoides del tipo tirucalano^[125]. Asimismo, fueron aislados otros tres C-*seco* limonoides (**44**, **45** y **46**) que ya habían sido reportados previamente en esta especie vegetal^[99] en la región.

Tres compuestos (**42**, **44** y **46**) fueron testeados por primera vez contra cuatro especies de insectos diferentes usados como modelo, exhibiendo aquellos diferentes patrones de actividad, lo cual puede depender de los sustituyentes de los esqueletos principales de los compuestos. Mas estudios se necesitarían para confirmar esta dependencia, como se ha hecho en el caso de otros limonoides^[126-131]. Los productos testeados en este estudio fueron más activos contra *S. littoralis*, quien, como lepidóptero se esperaba que fuera más susceptible que los otros insectos utilizados en este caso^[122]. Finalmente, cuando activas, las mezclas mostraron mejor actividad deterrente que los compuestos aislados^[125], probablemente debido a efectos sinérgicos entre los limonoides, como ha sido demostrado en otros estudios^[75].

Capítulo II. Familia Sapindaceae



2.1 Introducción

Las Sapindáceas

La familia de las Sapindáceas, es una familia de angiospermas con aproximadamente 2000 especies distribuidas mundialmente en regiones templadas y tropicales. Lleva su nombre en honor al “árbol del jabón” *Sapindus saponaria*, conocido por ser muy rico en saponinas^[132]. Estos compuestos le dan a los extractos de estas plantas propiedades tensoactivas, habiendo sido usados por ende, no solamente como fuente de jabón, sino también en aplicaciones médicas así como en control de plagas (siendo los jabones, probablemente, los productos más antiguamente utilizados con el fin de eliminar insectos de los cultivos)^[133].

Esta familia incluye especies tropicales con frutos de gran valor económico^[134], como los son el “ackee”, “rambután”, “longan” y “lichi” (frutos de *Blighia sapida*, *Nephelium lappaceum*, *Dimocarpus longan* y *Litchi chinensis* respectivamente) que son consumidos principalmente en Asia y Australia^[135-137].

Algunos miembros de esta familia han sido extensamente estudiados por su actividad farmacológica, siendo *Paullinia* y *Dodonaea* ejemplos de géneros que poseen especies con propiedades de ese tipo. Las propiedades farmacológicas que se han observado comúnmente incluyen: propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas^[138-141]. Estas actividades han sido en algunos casos correlacionadas con la presencia de compuestos fenólicos así como de flavonoides prenilados^[142], pero en muchos otros aún no se conoce cuáles son los principios activos responsables de las actividades. Es así que existen variados estudios de mezclas complejas (extractos acuosos o etanólicos del material vegetal) de diferentes especies de Sapindáceas, donde muchas otras actividades farmacológicas han sido descritas sin la caracterización de los compuestos activos (por ejemplo: actividad antimigraña^[143], antiulcerogénica^[144], antimalaria^[145], antimicrobiana^[146]).

También muchas especies en esta familia producen, en sus diferentes órganos, compuestos bioactivos con excelentes propiedades antiinsecto^[147].

Existen abundantes estudios fitoquímicos en especies de Sapindáceas, en los cuales diferentes tipos de productos naturales han sido aislados y elucidados. Ejemplo de esto son flavonoides aislados de especies de *Dodonaea*^[148-150] y *Koeleria*^[151], triterpenos lineales de

especies del género *Cupaniopsis*^[152], y cafeína, otras xantinas y catequinas de especies del género *Paullinia*^[153, 154]. Todos estos compuestos ocurren naturalmente en muchas familias de vegetales. Sin embargo, la familia Sapindaceae es productora de un grupo de metabolitos secundarios inusuales en el resto de las familias: los cianolípidos^[155]. La presencia de este grupo de metabolitos secundarios parece estar restringida a esta familia. A pesar de que estos compuestos presentan un peligro potencial para humanos y animales, para las plantas, los cianolípidos pueden cumplir un rol de protección fisiológica. Sin embargo, no han sido muchas las investigaciones realizadas en cuanto al estudio de las interacciones ecológicas entre las plantas que los producen y otros organismos simpátricos. La toxicidad de estos ciano compuestos implica que ellos puedan ser una fuente potencial de bioplaguicidas.

Una gran variedad de especies de Sapindáceas han sido testeadas en cuanto a su actividad antiinsecto. Muchos extractos, fracciones y compuestos puros extraídos de diferentes estados fenológicos de especies de esta familia han sido testeados contra especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros de gran importancia en la agricultura, así como en aplicaciones veterinarias y médicas. Ejemplos de esto son la actividad larvicida de *Magonia pubescens* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)^[156]; la toxicidad de especies de *Sapindus* contra *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)^[157, 158]; y la toxicidad de especies de *Dodonaea* contra especies de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae)^[159-162]. Hasta el momento los estudios en especies de esta familia, han revelado principalmente actividad contra insectos de los órdenes Lepidoptera y Diptera. Sin embargo, estos resultados pueden ser un artefacto de la biodetección en sí misma, dado que la mayor parte de los estudios se han focalizado en gusanos masticadores e insectos barrenadores de importancia económica y en mosquitos que son vectores de enfermedades para los seres humanos. No obstante ello, existen productos de especies de Sapindáceas que han demostrado actividad diferencial sobre especies de insectos de diferentes órdenes e inclusive en especies pertenecientes al mismo orden^[19, 163, 164], y algunos han mostrado también selectividad cuando testeados frente a insectos benéficos^[19].

Muchos compuestos bioactivos han sido identificados de miembros de esta familia. Por ejemplo, de especies estudiadas en cuanto a su actividad antiinsecto, ha sido reportada la presencia de diterpenos clerodanos y flavonoides prenilados (*Dodonaea* spp)^[142]; flavonoles, fenoles y triterpenos (*Paulinia* spp)^[165]; taninos (*Magonia pubescens*)^[166]; lectinas

(*Talisia esculenta*)^[167]; ácido gálico, galatos y derivados (*Acer rubrum*)^[168]; habiéndose confirmado en algunos casos que los mismos eran los responsables de las actividades descritas. De todos estos metabolitos secundarios, probablemente los de mayor potencial como agentes biocontroladores son los clerodanos. Han sido reportadas las propiedades antialimentarias de clerodanos contra varios insectos, incluyendo especies de Lepidópteros, Coleópteros y Ortópteros^[150, 169, 170]. A pesar de que las fuentes mayoritarias de estos diterpenos son especies pertenecientes a las familias Asteraceae y Lamiaceae, las Sapindáceas han mostrado, en estudios recientes, ser buenas productoras de los mismos ^[139, 171, 172].

Fueron tres las Sapindáceas incluidas en la bioprospección de especies nativas realizada en el laboratorio: *Serjania meridionalis*, *Allophylus edulis* y *Dodonaea viscosa*. Habiéndose profundizado el estudio en las dos últimas (objetos de este capítulo), la primera también mostró ser una especie promisoría en cuanto al aislamiento de metabolitos bioactivos.

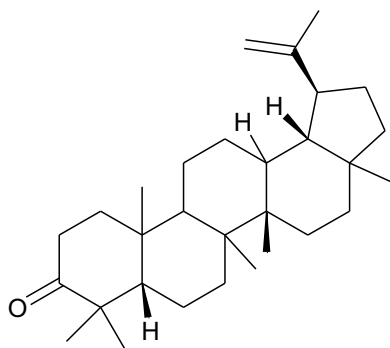
Serjania

El género *Serjania*, perteneciente a la tribu Paulinieae, es un género que ha sido poco estudiado en comparación con otros de esta familia. Sin embargo, presenta varias especies que han revelado poseer actividad biológica, ya sea contra insectos así como actividad farmacológica. *S. erecta* por ejemplo, es una especie que ha sido estudiada en su capacidad antiinflamatoria tópica, encontrándose potencial en dicha actividad en los extractos hidroalcohólicos, diclorometano, acetato de etilo y hexánicos de hojas y ramas^[173]. También fue reportado el potencial de esta especie en el tratamiento de disfunciones cognitivas (fue estudiada la actividad sobre factores relacionados con el síndrome de Alzheimer), obteniéndose, además de la actividad deseada sobre ciertos neurotransmisores, baja toxicidad, buena actividad antioxidante y actividad hipoglicémica^[174] y también mostró tener buen potencial como gastroprotectiva^[175]. Además, los extractos de hojas de esta especie mostraron tener efectos nematocidas contra el nemátodo *Pratylenchus zeae* (Tylenchida: Pratylenchidae), plaga ampliamente distribuida en la agricultura brasilera^[176].

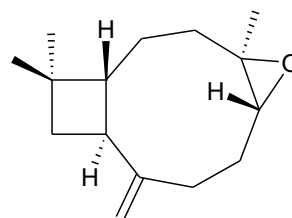
S. lethalis es otra especie sobre la cual se han realizado estudios de actividad biológica. El extracto etanólico de corteza de tallos mostró actividad larvicida contra *A.*

aegypti^[177]. Asimismo, el extracto etanólico de corteza de raíces presentó actividad antileishmania^[178] y los extractos etanólicos de tallos y hojas mostraron poseer actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*^[179].

De la especie *S. salzamanniana* fueron aisladas cuatro saponinas con actividad molusquicida contra *Biomphalaria alexandrina*, transmisor de *Schistosoma mansoni*, el parásito causante en África, Asia y América del Sur, de la esquistosomiasis (enfermedad que a pesar de tener muy baja tasa de mortalidad, es causante de fiebres muy altas)^[180]. La especie *S. glabrata* mostró poseer actividad antioxidante en su extracto metanólico de las partes aéreas^[181]. *S. yucatensis*, especie reportada como endémica de la península del Yucatán, presentó actividad tripanocida contra *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae), causante de la enfermedad de Chagas^[182, 183]. En ese estudio fue identificada una mezcla de un triterpeno [lup-20(29)-en-3-ona] (**57**) y un sesquiterpeno oxigenado [óxido de β cariofileno (**58**)] como la responsable de la actividad reportada (tales compuestos eran inactivos cuando testeados por separado).



57



58

Serjania meridionalis es una especie nativa de Uruguay, distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur^[184], sobre la cual no existen casi reportes en literatura. Carrere (2011)^[185] estudió y publicó en un trabajo descriptivo, el potencial apícola de esta especie en Uruguay. Ya fue reportado asimismo por el grupo de laboratorio donde se enmarca este trabajo de tesis, el potencial antiinsecto de esta planta, aunque el extracto testeado en ese caso mostró cierta toxicidad contra abejas^[19].

Allophylus

El género *Allophylus*, perteneciente a la tribu Paullinieae está compuesto por arbustos o árboles, y en menor medida por arbustos trepadores. Muchos de sus especímenes son plantas ornamentales^[186]. Engloba varias especies que han sido estudiadas por su actividad biológica. Por ejemplo, la actividad antioxidante es una propiedad que ha sido descrita para al menos dos especies de este género: *A. rubifolius*^[187] y *A. africanus*. Esta última, de la cual fue reportado el contenido de polifenoles, flavonoides y proantocianidinas, mostró también poseer buena actividad antibacterial, confirmándose entonces, el potencial de esta especie en su uso contra infecciones bacterianas y en enfermedades cuya etiología está relacionada al metabolismo de radicales libres^[188]. La citotoxicidad es otra propiedad que ha sido encontrada en especies de este género. El extracto en diclorometano de *A. timoriensis* mostró citotoxicidad selectiva en células cancerígenas de colon y el extracto acetato de etilo redujo la viabilidad de células cancerígenas pulmonares^[189].

Asimismo, existen estudios fitoquímicos de varias especies de *Allophylus*. Ejemplos de esto son el estudio realizado recientemente sobre *A. longipes* en el que se identificaron veinticinco compuestos diferentes, incluyendo triterpenos, esteroides, aldehídos fenólicos^[190]; el estudio sobre *A. cominia*, en el que se determinó la concentración proteica del extracto acuoso de hojas, la composición de ácidos grasos, y se detectó también compuestos con grupos amino libres, fenólicos, taninos, leucoantocianidinas, saponinas, triterpenos y esteroides^[191]. De *A. caudatus* fueron aislados por primera vez un nuevo tipo de poliprenoles, los aloprenoles. Estos son cadenas de alcoholes poliisoprenoides conteniendo entre 5 a 100 unidades de isoprenos. Los poliprenoles comunes poseen α -*cis*-poliprenoles conteniendo los aloprenoles una unidad α -*trans*-isopreno^[192]. *A. laevigatus* es otro ejemplo de especie sobre la cual ha sido realizado el estudio fitoquímico y aislados sesquiterpenos, una flavona, fitoesteroides, así como mezclas de ácidos grasos^[193].

La presencia de ciano compuestos no es ajena a este género. Los aceites de semillas de *A. natalensis* y *A. dregeanus* presentaron cantidades parecidas de triacilgliceridos y cianolípidos en el estudio realizado por Avato *et al*^[155].

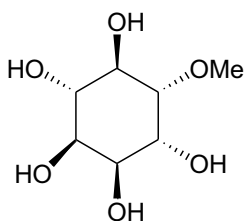
Allophylus edulis (Sapindaceae) (Figura 15), vulgarmente llamada “Chal chal”, es miembro de la flora nativa uruguaya y brasilera así como de la de Bolivia, Argentina y

Guayanas. Es un arbusto o árbol bajo, de 4 a 7 m de altura. Posee tronco castaño rojizo y corteza escamosa. Su follaje es persistente a semipersistente de color verde claro. Las hojas son compuestas, trifoliadas, alternas, con folíolos glabros, dentados y con pedicelos cortos hasta sésiles. Las flores son pequeñas, blancas, de 2 mm de diámetro, dispuestas en racimillos. El fruto es una drupa globosa de 8 mm de diámetro, en una primera etapa amarilla virando luego al rojo^[194].



Figura 15. Fotos de *A. edulis*

Esta especie ha sido muy poco estudiada, sin embargo existen reportes sobre sus actividades antihepatotóxica^[195], inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina^[196], antiulcerogénicas^[144] y genotóxicas^[197]. Asimismo, es usada comúnmente para obtención de taninos y aceites esenciales^[198]. El té de hojas se utiliza popularmente para tratar inflamaciones de garganta, problemas intestinales y digestivos^[199] además de ser considerado antidiabético^[200]. Respecto a los compuestos aislados de esta especie, se ha reportado presencia de cianolípidos en semillas^[201, 202], metil inositol, quebrachitol (**59**), en ramas^[203] así como de los compuestos fenólicos responsables de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina^[196]. También fue reportado el aislamiento de C-glicosil flavonas con destacada actividad antihepatotóxica^[195].



59

Dodonaea

Son dos las especies de este género sobre las cuales se han desarrollado la mayor parte de las investigaciones: *Dodonaea angustifolia* y *D. viscosa*. Mientras que algunos taxónomos las consideran sinónimos, otros reconocen a *D. angustifolia* como una sub especie de *D. viscosa*^[171]. *D. angustifolia* está ampliamente distribuida en Australia, África y América del Sur, y ha sido empleada hasta el día de hoy en medicina tradicional en todo el mundo. Algunos de sus usos comunes son como analgésico, laxante, antipirético, antireumático, en el tratamiento del eczema y de enfermedades de la piel^[204, 205]. *D. viscosa* es un arbusto, raramente árbol bajo, ampliamente distribuida en áreas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios (Figura 16). Es usada en medicina tradicional como antifebril, diaforético, y también para el tratamiento del reumatismo, inflamaciones y dolores^[206, 207].

Han sido realizados en los últimos años variados estudios sobre la actividad farmacológica de *D. viscosa*, que en general, ratifican sus usos en medicina tradicional. Por ejemplo, se evaluó la actividad antimalárica de extractos acuosos de semillas, en ratones infectados con *Plasmodium berghei* (del mismo género son los parásitos unicelulares que transmiten la malaria en humanos), obteniéndose resultados positivos^[208]. Asimismo, la actividad antioxidante de los extractos de órganos de esta especie ha sido estudiada^[209-211]. Las propiedades antidiabéticas de esta planta fueron confirmadas en al menos dos estudios realizados en India^[138, 212]; en uno de ellos se testeó dicha actividad en ratas normales y en ratas con diabetes inducida, obteniéndose actividad significativa por parte de extractos hidroetanólicos de hojas^[138]. Mientras que en el otro, extractos etanólicos y acuosos de plantas enteras, presentaron también buena actividad en ratas, y se concluyó que un buen biomarcador de dicha actividad podía ser la quercetina [(60), Figura 19], a pesar de que la misma podía resultar también, de la acción sinérgica de una combinación de componentes que interactúan con diferentes blanco de la diabetes^[212]. A su vez, esta enfermedad muchas veces está asociada con hiperlipidemia (altos niveles de lípidos) y muchos fármacos antidiabéticos producen hepatotoxicidad; es así que Ahmad *et al* (2011)^[213] estudiaron la capacidad antihiperlipidémica y hepatoprotectiva de extractos de hojas de *D. viscosa*, observando efectos significativos y consistentes en conejos con diabetes inducida. La capacidad gastroprotectiva de esta planta fue confirmada en el estudio de Arun y Asha (2008)^[214], donde el extracto hexánico de las partes aéreas de la planta inhibió las secreciones ácidas, previniendo la irritación gástrica. También se estudió la capacidad antiulcerogénica de extractos de raíces, confirmándose el potencial de los mismos^[215]. Además la actividad antidiarreica de los extractos de raíces fue también descrita^[216]. Ha sido demostrada la capacidad antibacteriana de extractos de hojas de esta planta contra *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, así como la actividad antiviral contra el virus Coxsackie B3 y el virus de la influenza A^[146]. La actividad antifúngica contra *Candida albicans*, causante de la candidiasis oral en individuos infectados con VIH, fue asimismo evaluada y comprobada la efectividad de los extractos testeados^[217, 218]. También, en otro estudio, se determinó la actividad antifúngica contra especies causantes de enfermedades de la piel (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces varioti*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton rubrum*), siendo los extractos clorofórmicos los más activos en comparación con los etanólicos, metanólicos y

acetato de etilo^[219]. Al ser esta planta un producto botánico muy usado en dichas enfermedades, Teshome *et al.* (2010)^[220] realizaron un estudio sistemático de su dermatotoxicidad. Se observó en el mismo, que el extracto metanólico mostró ser muy poco irritante (en piel de conejo) y no mostró ningún signo de irritación en ratas. En ningún caso se observó tampoco toxicidad dérmica aguda ni toxicidad por aplicaciones repetidas.



Figura 16. *D. viscosa*.

La actividad antiinsecto de los extractos de *D. viscosa* y *D. angustifolia* ha sido descrita principalmente contra lepidópteros^[221-224]. Por ejemplo, los extractos de hojas de *D. angustifolia* (obtenidos con hexano, éter de petróleo, cloroformo, acetona y agua) fueron testeados en ensayos de campo, mostrando ser efectivos agentes de biocontrol de larvas de *Earias vitella* (Lepidoptera: Noctuidae)^[223]. Además esos extractos también mostraron actividad ovicida contra *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)^[221]. El extracto de hojas de *D. viscosa* mostró actividad contra *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) reduciendo la deposición de huevos y el número de crías emergentes^[224]. También existen reportes de actividad de estas especies vegetales contra otros órdenes de insectos. Un ejemplo es la fuerte actividad de extractos de semillas de *D. viscosa* contra el coleóptero *S. oryzae*^[225] y el potencial larvicida de *D. angustifolia*, en sinergia con otras especies, contra *Culex quinquefasciatus*.

Han sido realizados estudios fitoquímicos en los que se ha confirmado la presencia de aceites esenciales, flavonoides, terpenos, fenoles, cumarinas, esteroides y alcoholes, en *D. angustifolia*^[222].

Asimismo en *D. viscosa* han sido aislados diversos flavonoides, ácidos diterpénicos, saponinas^[142]. En cuanto a diterpenos, es de esta planta que se aisló por primera vez, como productos naturales, tres clerodanos modificados (**61-63**)^[226]. La estructura de estos metabolitos secundarios se basa en el esqueleto carbonado y la estereoquímica absoluta, del primer miembro aislado de la serie: la clerodina (**64**)^[169], aislada por primera vez de *Clerodendron infortunatum* (Lamiaceae)^[227]. Los compuestos con la misma estereoquímica absoluta que la clerodina, han sido denominados *neo*-clerodanos, y aquellos con configuración espacial enantiomérica a la clerodina se han denominados *ent*-*neo*-clerodanos (o *ent*-clerodanos). A su vez estos diterpenos están biosintéticamente relacionados a los labdanos, quienes derivan directamente del geranilgeranilpirofosfato (Figura 17).

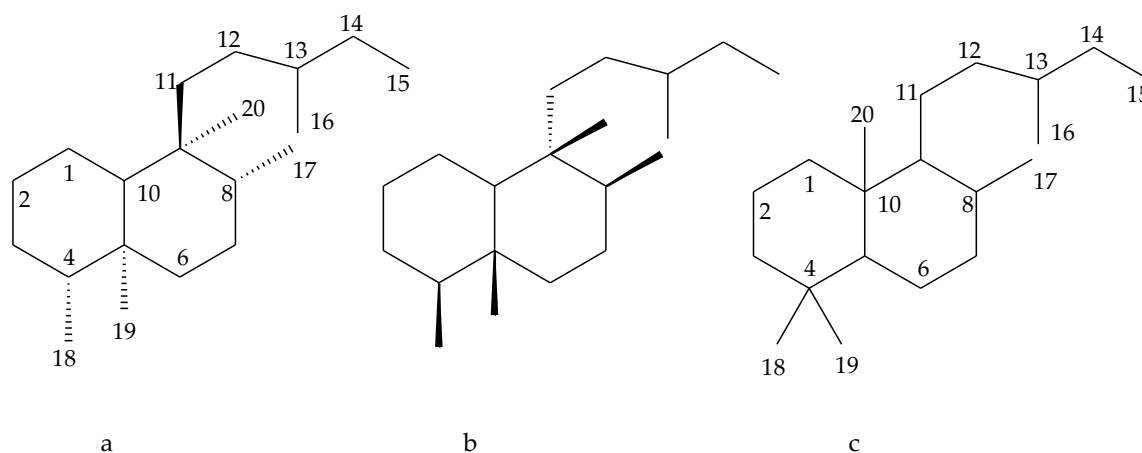


Figura 17. Esqueletos básicos de los (a) *neo*-clerodanos; (b) *ent*-clerodanos y (c) labdanos.

Además otros nueve diterpenos clerodanos (**65-73**) fueron aislados de los órganos aéreos de *D. viscosa* originaria de China, no mostrando los mismos, actividad contra las dos especies de mosquitos testeadas^[142]. Sin embargo, los autores declararon que en estudios previos estos clerodanos mostraron ser activos contra dos lepidópteros -*P. xylostella* y *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae)- y contra el coleóptero *S. oryzae*. Del mismo modo, una

investigación sobre esta familia de compuestos en *D. angustifolia* proveniente de Kenia, mostró que los extractos de las superficies de las hojas de esta planta están compuestos mayormente por clerodanos (74-75) y también por flavonoides, cumarinas y otros diterpenos^[171]. Huang *et al*^[228] en su trabajo en 2010 también aislaron otros tres diterpenos clerodanos (76-78), un *neo*-clerodano (79), ácido stictico (70) y ácido hautriwaico (73) de los órganos aéreos de *D. viscosa* también proveniente de China. Este último compuesto fue recientemente reportado como componente antiinflamatorio de las hojas de *D. viscosa*^[229]. Asimismo, Wabo *et al* (2012)^[172] aislaron 3 diterpenos del tipo labdanos (80-82) (Figura 18) y cuatro flavonas (99, 100, 103, 105; Figura 19) que presentaron también actividad antiinflamatoria. De *D. polyandra* fueron también aislados derivados benzo esterificados de diterpenoides clerodanos con actividad antiinflamatoria (83-86, Figura 18)^[230]. Asimismo, un trabajo previo reportó la presencia de varios diterpenos, en otra especie de este género, *D. boroniaefolia*, los cuales presentaron configuración opuesta del esqueleto principal: *ent*-clerodanos (87-89, Figura 18)^[231].

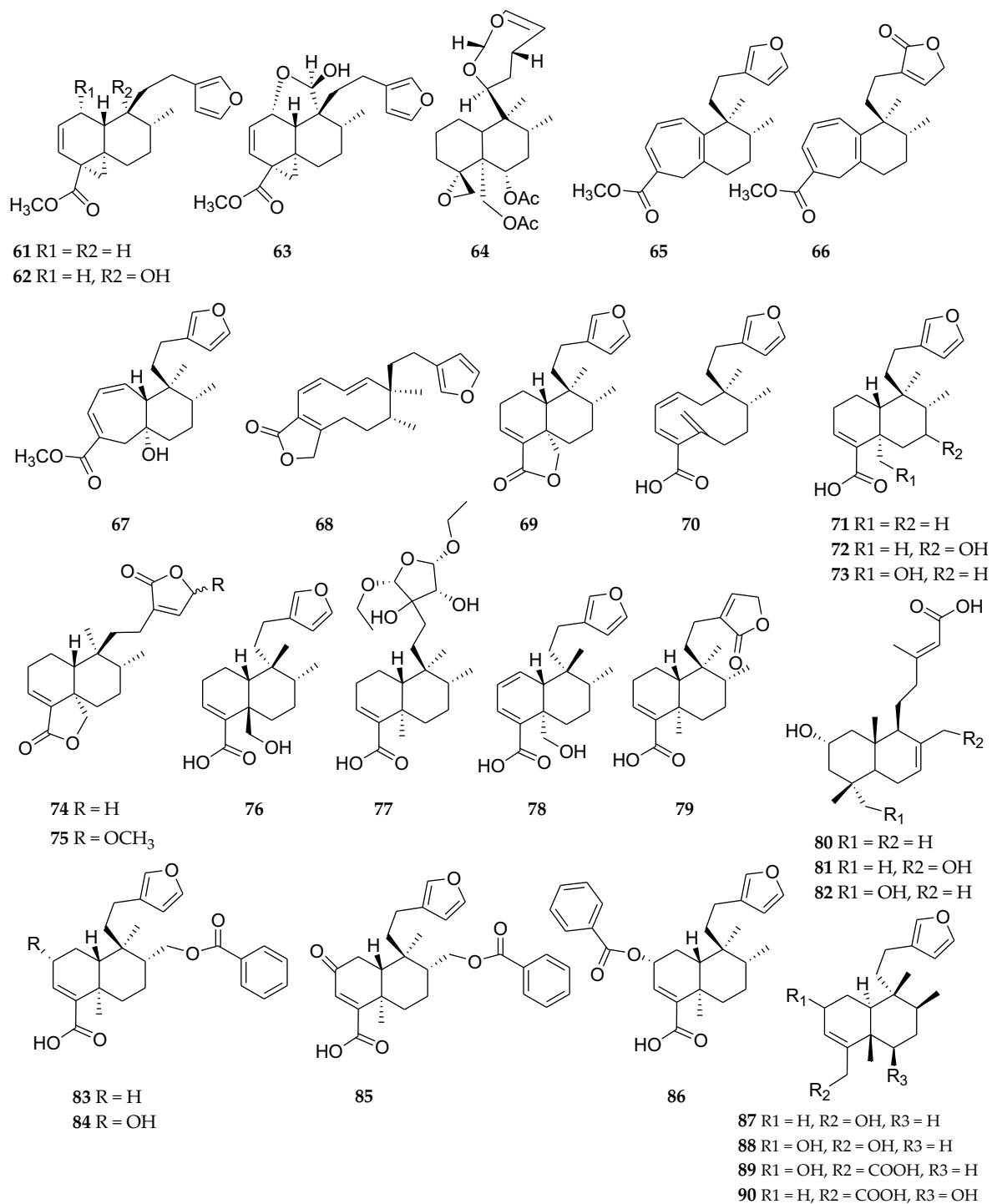


Figura 18. Diterpenos de *Dodonaea* spp.

En cuanto a flavonoides, Niu *et al.* (2010) aislaron flavonoides prenilados (**91-93**, Figura 19) de los órganos aéreos de *D. viscosa* originaria de China, inactivos contra dos

especies de mosquitos^[142]. Asimismo, fueron luego reportados flavonoides isoprenilados de esta planta (**94-98**, Figura 19) que mostraron en muchos casos tener actividad adipogénica, aumentando el contenido de triglicéridos por incremento de la expresión génica en adipocitos^[232]. También fue estudiada la capacidad antioxidante y antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) de metil éteres de kaempferol (**99-103**, Figura 19) aislados de esta especie vegetal, trabajo en el cual se concluyó que aquellos son los responsables de tales actividades mostradas por sus extractos^[233]. Muhammad *et al* (2012)^[234] estudiaron la actividad inhibidora sobre una enzima de *Plasmodium falciparum*, responsable de la mayor parte de las muertes por malaria en humanos, encontrando que de diez compuestos aislados solamente un bisflavonoide (**113**) fue activo. En este trabajo fueron aislados flavonoides (**101, 105, 107, 108**; Figura 19), diterpenos (**69, 90**; Figura 18) y derivados fenólicos (**114-116**, Figura 20). También fueron encontrados flavonoides (**91, 109, 106, 110-112**; Figura 19) en *D. polyandra*, especie utilizada en la medicina tradicional australiana^[235].

Fue reportada también la actividad antiproliferativa de células cancerígenas de ovario humano, de saponinas (**117, 118**; Figura 20) aisladas de las raíces de *D. viscosa*^[236].

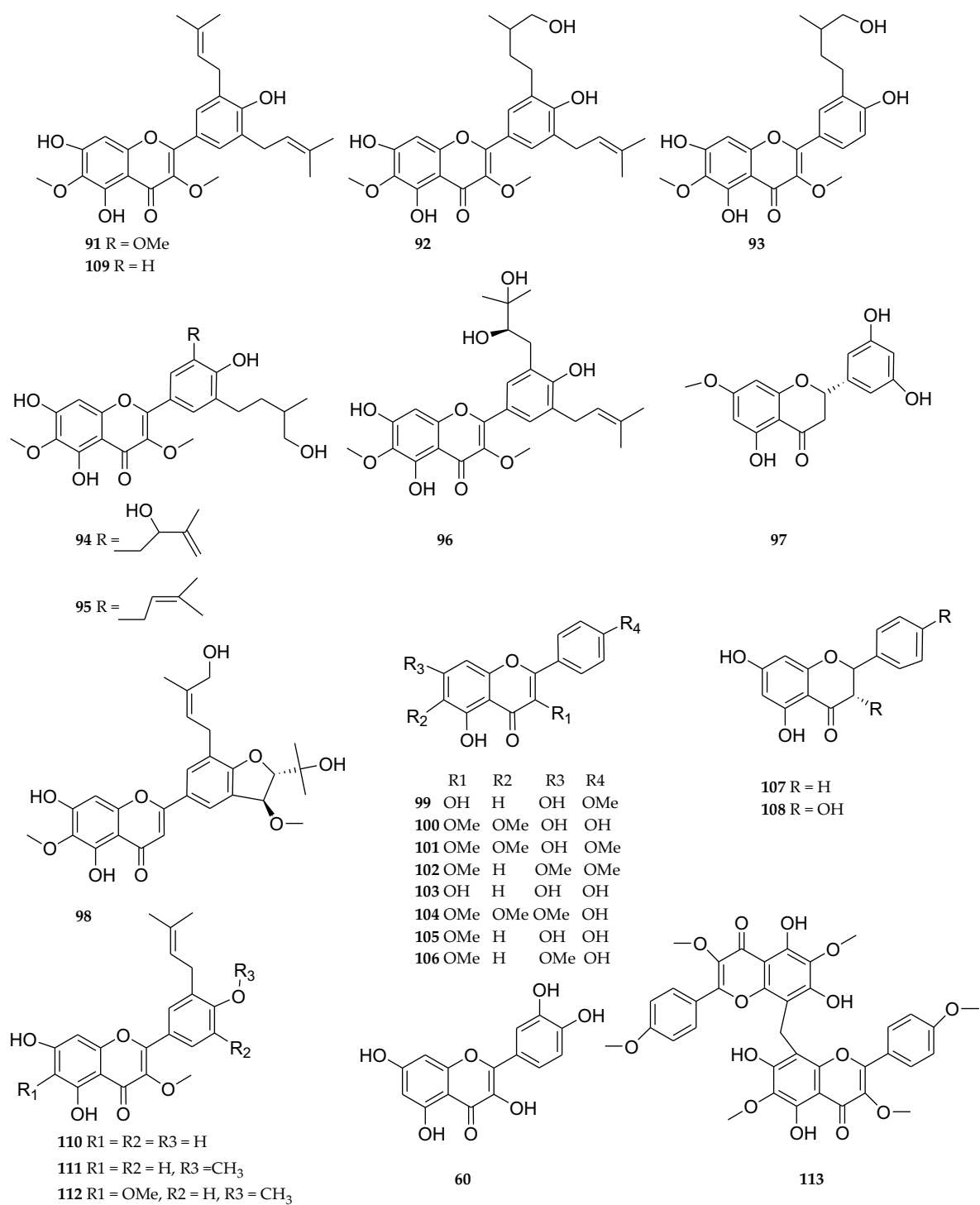


Figura 19. Flavonoides de *Dodonaea* spp.

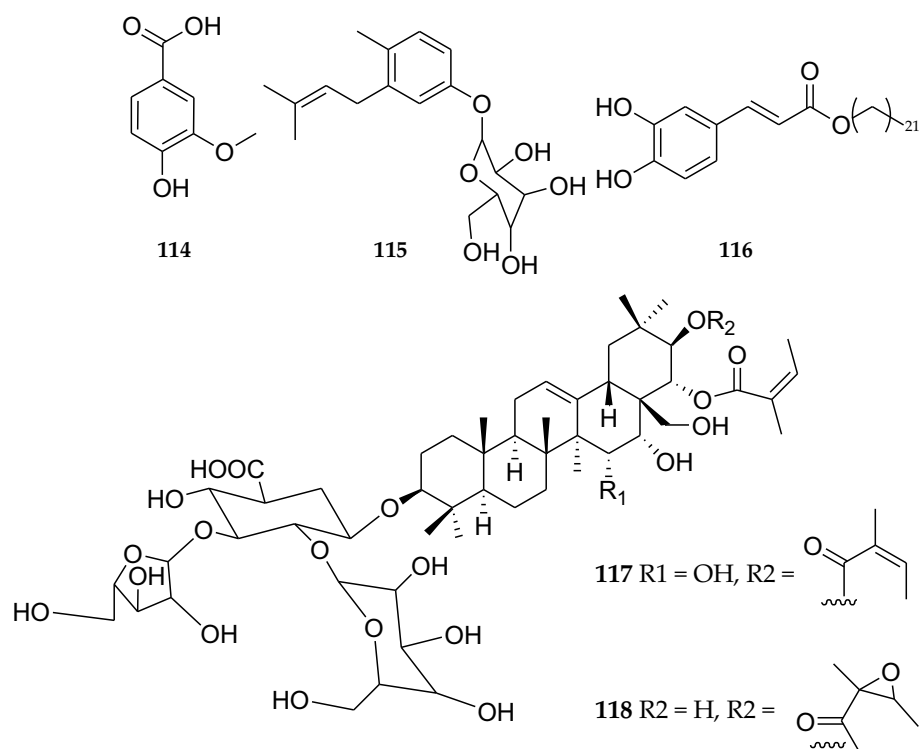


Figura 20. Otros metabolitos secundarios de *Dodonaea* spp.

Tanto *A. edulis* como *D. viscosa* y *S. meridionalis* son especies nativas de Uruguay que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio^[237]. Dado el potencial como agentes biocontroladores de plagas, que han mostrado poseer estas especies provenientes de otras regiones geográficas, sumado al gran potencial de la familia, es que el objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antiinsecto, determinar el perfil fitoquímico, y elucidar los componentes, de las fracciones más activas de los extractos de estas especies. Habiéndose profundizado en el estudio del extracto de ramas de *A. edulis* y el extracto de hojas de *D. viscosa*.

2.2 Materiales y Métodos

Procedimientos experimentales generales

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron obtenidos en un Espectrómetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C) en CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) para los casos de **124 -132**. Para los casos de **58, 119 - 123** fueron obtenidos en un Espectrómetro AMX-500 (400 y 500 MHz para ^1H ; 100, 125 y 150 MHz para ^{13}C), también en CDCl_3 . Fue utilizado en el caso de **132** el complejo de desplazamiento para RMN tris (dipivalometanoato)-europio ($\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{EuO}_6$) (Merck). Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos en un Espectrómetro Micromass Autospec, con introducción directa de las muestras mediante una sonda de sólidos con fuente de ionización por Impacto Electrónico (70 eV) en los casos de **58, 119, 121 y 122**; y para los casos de **123, 128 y 132** en un Espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo y fuente de ionización atmosférica por Electrospray (ESI). En los casos de los espectros de masas de baja resolución (**129 – 131**) estos fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases Shimadzu 2010 Plus acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP2010 (GC-MS), con fuente de ionización por Impacto electrónico, mediante inyección directa de la muestra [(40°/min, hasta 350° (5 min))]. Los análisis de infrarrojo fueron obtenidos en un Espectrómetro IR Prestige-21 Shimadzu, utilizando pastillas de NaCl. Las medidas de rotación óptica fueron obtenidas en un polarímetro A. Kruss Optronic P8000-P8100-T, a temperatura ambiente, en AcOEt, utilizando una celda de 5 cm largo. Las Cromatografías Líquidas de Alta Performance (HPLC) analíticas y preparativas fueron desarrolladas en un equipo Shimadzu LC-20AT Prominence, equipado con un detector de arreglo de diodos SPD-M20A Prominence y columnas de fase normal. Para fines analíticos una columna Macherey Nagel Nucleosil-100 (5 μm , 250 x 4,6 mm) fue utilizada, usando como fase móvil sistemas de solventes DCM/MeOH o hexano/AcOEt, a un flujo de 1 mL/min, en el caso de las fracciones de la partición líquido-líquido del extracto de *A. edulis*. Para fines preparativos una columna Macherey Nagel Nucleosil-100 (7 μm , 250 x 16 mm) fue utilizada, usando como fase móvil un sistema de solventes DCM/MeOH, a un flujo de 8 mL/min, en el caso de **125 -130**; y una columna Beckman Ultrasphere Si-100 (5 μm , 250 x 10

mm), usando como fase móvil mezclas de hex/AcOEt, a un flujo de 8 mL/min, en los casos de 58 y 119 - 123. Las cromatografías flash y cromatografías líquidas fueron desarrolladas en sílica gel MN Kieselgel 60 M (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh). Para las columnas flash fue utilizada una bomba FMI Lab Pump, modelo RP-SY y una IWAKI Air Pump, modelo AP-115S. Las fracciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (TLC) desarrolladas en placas de aluminio recubiertas con Sílica gel 60 G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), y la visualización se realizó mediante calentamiento de las placas pretratadas con Oleum [(H₂O/ácido acético/ácido sulfúrico) 16:80:4] o Anisaldehído/H₂SO₄ (95 mL EtOH, 4 mL H₂SO₄ 1 mL anisaldehído)^[92]. Los análisis por GC-MS fueron realizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu 2010 acoplado a un Espectrómetro de Masas Shimadzu QP2010, equipado con una columna OPTIMA-5-MS (Macherey-Nagel, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm), con un flujo de gas carrier (He) constante de 1mL/min. El programa de temperatura del horno fue de 40°C (2 min) hasta 240°C (1 min) a 5 °C/min, y de 240°C hasta 320 °C (1 min) a 10 °C/min; la temperatura del inyector fue 250°C y la de la interfase 320°C. La inyección (1µL) se realizó en modo Split (30:1) y se utilizó una fuente de ionización de impacto electrónico (70 eV).

Material vegetal

A. edulis, *D. viscosa* y *S. meridionalis* fueron colectadas en Punta Gorda (Montevideo, Latitud: -34,893783°, Longitud: -56,090125°) y Los Pinos (Colonia, Latitud: -34,435536°, Longitud: -57,249008°) en agosto del 2007. Fue realizada una segunda colecta de *A. edulis* para obtener más material vegetal en Canelón Chico (Latitud: -34,4836111°, Longitud: -56,3238889°), en marzo de 2009. Fueron separadas las hojas de las ramas y los frutos, y luego el material vegetal fue secado durante 48 – 72 h a 40° C antes de la molienda y extracción.

Extracción y aislamiento

Los fraccionamientos descritos a continuación fueron realizados en forma consecutiva sobre las fracciones que presentaban buena actividad contra por lo menos uno de los insectos modelo utilizados, y de las que a su vez se contaba con masa suficiente para lograr purificar de ellas compuestos en cantidades adecuadas para obtener datos

espectroscópicos útiles para su elucidación estructural; en una estrategia de aislamiento guiado por los resultados de actividad (“bioguiado”).

En todos los casos fueron realizados extractos etanólicos por maceración con agitación, del material vegetal molido extrayendo tres veces durante 24 h. Los extractos etanólicos brutos de ramas de *S. meridionalis*, hojas y ramas de *A. edulis*, y hojas de *D. viscosa* fueron inicialmente particionados con solventes de polaridad creciente (agua-hexano, agua-diclorometano, agua- acetato de etilo).

Asimismo se realizaron extracciones de las muestras molidas mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono a diferentes presiones, servicio provisto por el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ingeniería de la Pontificia Universidad de Río Grande del Sur. Tales extracciones fueron realizadas presurizando el dióxido de carbono líquido con una bomba de alta presión. Luego ese fluido presurizado recorría un sistema de pre calentamiento, elevando su temperatura y promoviendo así su pasaje del estado líquido al supercrítico, antes de pasar por la muestra a extraer. Después de la extracción, a través de una rápida expansión ocurrida en una válvula micrométrica, los solutos se precipitaron en un vaso separador y el solvente se eliminó al medio ambiente. El equipo experimental de extracción supercrítica, se encuentra en proceso de patente^[238]. Los extractos obtenidos a las diferentes presiones de extracción, fueron analizados por TLC [fase móvil hexano/AcOEt (1:1), revelando con UV_{254} y Oleum)]. En este caso no se siguió la estrategia de fraccionamiento bioguiado.

Fraccionamientos sobre el extracto etanólico de ramas de *A. edulis*:

Las fracciones de la partición líquido-líquido del extracto bruto de ramas de *A. edulis* fueron ensayadas en cuanto a su actividad antiinsecto. Fueron también estudiados los perfiles cromatográficos de las mismas en HPLC analítica de fase normal utilizando como fase móvil diferentes mezclas de hex/AcOEt y DCM/MeOH, y fueron también realizados los análisis de 1H RMN de cada una de ellas.

Fue realizado un nuevo fraccionamiento del extracto etanólico bruto de ramas de *A. edulis*, partiendo de 36 g que fueron inicialmente sometidos a cromatografía líquida a vacío (procedimiento C1Ae). El extracto fue sembrado adsorbido en sílica, en una columna de sílica de 13 cm de altura y 6 cm de diámetro. Fueron eluidas fracciones con mezclas de

hex/AcOEt y AcOEt/MeOH, aumentando la polaridad a medida que iban eluyendo, llevando a sequedad entre fracción y fracción. Cada fracción colectada correspondía a 2 o 3 volúmenes muertos (200 mL). Fueron obtenidas 14 fracciones diferentes (Tabla 10), identificadas de aquí en más con el sufijo “C1Ae”. Todas ellas fueron analizadas por ^1H RMN 500 MHz.

La fracción 2aC1Ae (800mg) fue sometida a cromatografía flash (30 cm de altura x 2,5 cm de diámetro; procedimiento denominado C2Ae), sembrando la muestra adsorbida en sílica. Esta fue eluída con mezclas de hex/AcOEt obteniéndose fracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser nueve [TLC Figura 26, identificadas con el sufijo “C2Ae” (Figura 21)]. La fracción 1C2Ae (370 mg) fue sometida a otra cromatografía flash eluída también con mezclas de hex/AcOEt obteniéndose subfracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser siete. De esas siete, la subfracción 2 (79 mg) fue separada por HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (98,5:1,5)] de donde se obtuvo **58** (6mg). La unión de las fracciones (2-3)C2Ae (75 mg) fue sometida a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (98:2)] obteniéndose en ese caso **119** y una mezcla de compuestos [mezcla (2-3)C2Ae] que fueron ensayados en cuanto a su actividad antiinsecto. La fracción 4C2Ae (52 mg) fue separada en HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (92:8)] obteniéndose un compuesto puro, **120** pero en cantidad insuficiente para elucidar su estructura química. La fracción 5C2Ae (130 mg) fue sometida a cromatografía flash eluída con mezclas de hexano/AcOEt obteniéndose subfracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser seis. De esas seis, la subfracción 2 (59 mg) fue separada en HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (97:3)] obteniéndose **121** (2 mg), **122** (4 mg), **123** (4 mg). Las subfracciones 4 (10 mg) y 5 (17 mg) de esta separación resultaron ser mezclas de compuestos que según los revelados por TLC, podrían coincidir con los de la fracción 6C2Ae (78 mg), por lo cual, ambas se reunieron con esa última y fueron separadas en columna flash, eluída con mezclas de hex/AcOEt (Figura 21).

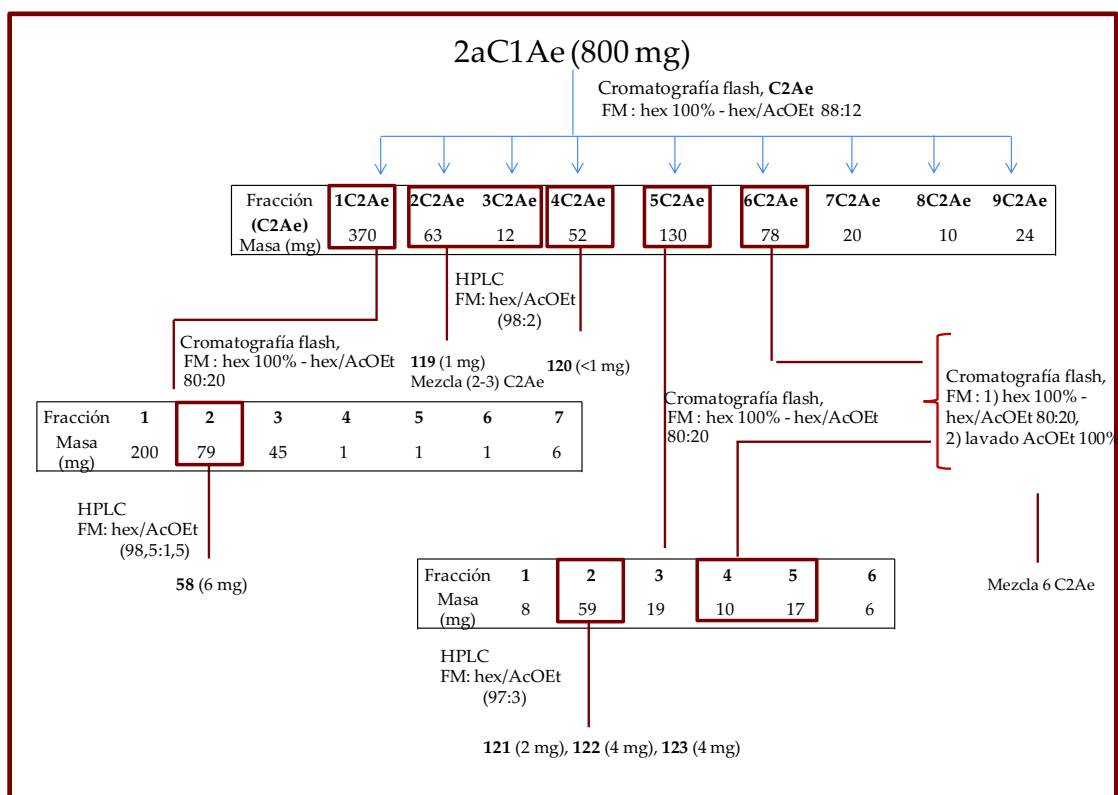


Figura 21. Fraccionamiento de 2aC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de *A. edulis* por cromatografía líquida a vacío).

La fracción 2bC1Ae (1000 mg) fue sometida a columna cromatográfica flash (30 cm de altura x 2,5 cm de diámetro, procedimiento denominado C3Ae), sembrando la muestra adsorbida en sílica. Esta fue eluída con mezclas de hex/AcOEt obteniéndose fracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser nueve (denominadas 1-9 C3Ae. En la subfracción 6C3Ae se obtuvo como sólido blanco **124** (26 mg) (Figura 22).

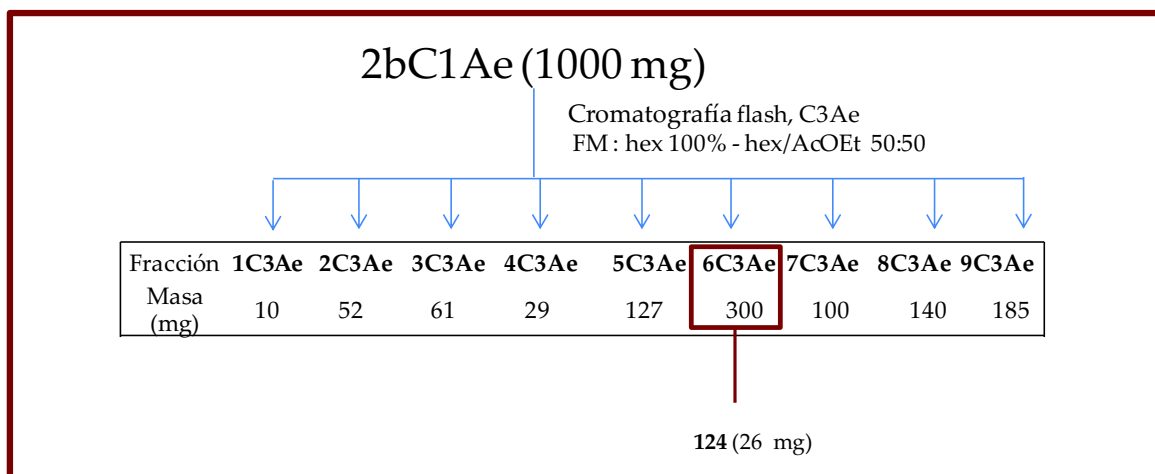


Figura 22. Fraccionamiento de 2bC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de *A. edulis* por cromatografía líquida a vacío).

La fracción 3aC1Ae (820 mg) fue sometida a columna cromatográfica flash (16 cm de altura x 2,8 cm de diámetro), sembrando la muestra adsorbida en sílica. Esta fue eluída con mezclas de hex/AcOEt obteniéndose fracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser trece. La subfracción 5 (50 mg) fue separada en HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (83:17)] obteniéndose las mezclas AG1 (2,4 mg), AG2 (11 mg) y AG3 (5 mg). Estas 3 últimas mezclas, luego de analizados por técnicas de RMN mono y bidimensionales, mostraron ser ácidos grasos, que fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, con fines de identificación, obteniéndose **125**, **126** y **127**. Las subfracciones 6-8 fueron reunidas (54 mg) y separadas en HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (68:32)] obteniéndose **128** (1,5 mg) (Figura 23).

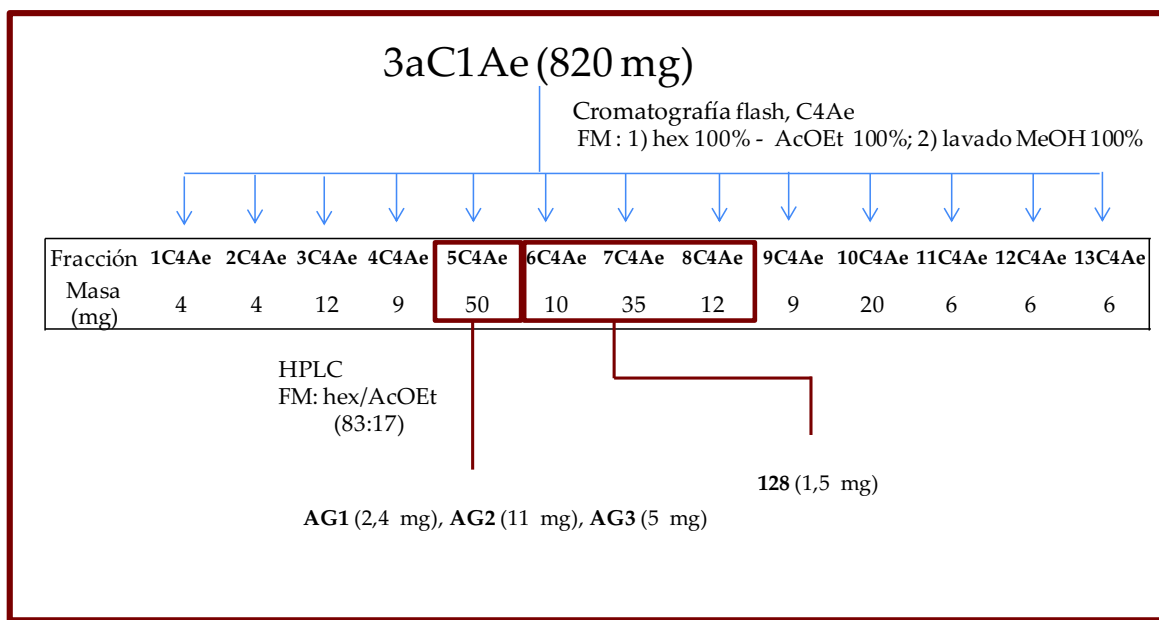


Figura 23. Fraccionamiento de 3aC1Ae (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de ramas de *A. edulis* por cromatografía líquida a vacío).

Fraccionamientos sobre el extracto etanólico de hojas de *D. viscosa*:

Fue realizado el fraccionamiento partiendo de 36 g de extracto etanólico bruto de hojas de *D. viscosa*, que fueron inicialmente sometidos a cromatografía líquida a vacío (C1Dv). El extracto fue sembrado adsorbido en sílica, en una columna de 13 cm de altura (de sílica) y 6 cm de diámetro. Fueron eluidas fracciones con mezclas de hex/AcOEt y AcOEt/MeOH, aumentando la polaridad a medida que iban eluyendo, llevando a sequedad entre fracción y fracción. Cada fracción colectada correspondía a 2 o 3 volúmenes muertos (200 mL). Fueron obtenidas 16 fracciones diferentes (Tabla 13), identificadas de aquí en mas con el sufijo “C1Dv”. Todas ellas fueron analizadas por ¹H RMN 500 MHz.

La fracción 4bC1Dv (450mg) fue sometida a columna cromatográfica flash (17,5 cm de altura x 3 cm de diámetro; denominada C2Dv), sembrando la muestra adsorbida en sílica. Esta fue eluida con mezclas de hex/AcOEt obteniéndose fracciones que luego de estudiadas por TLC, resultaron ser doce (identificadas con el sufijo “C2Dv”). La fracción 5C2Dv (50 mg) fue sometida a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (92:8)] obteniéndose **123** (15 mg). La fracción 6C2Dv (51 mg) fue sometida a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (82:18)] obteniéndose **129** (6 mg). La fracción 7C2Dv (49 mg) fue sometida a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (8:2)] obteniéndose **130** (3,5 mg). La fracción 8C2Dv (76 mg) fue sometida

a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (78:22)]. La fracción 9-10C2Dv (59 mg) fue sometida a HPLC preparativa [fase móvil: hex/AcOEt (75:25)] obteniéndose **125** (6,6 mg) (Figura 24).

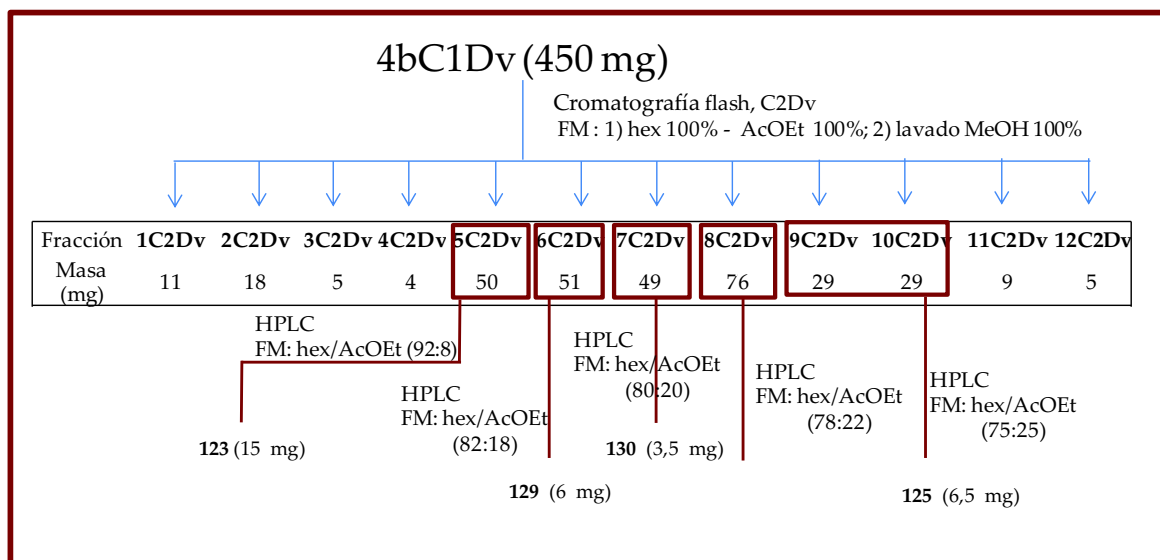


Figura 24. Fraccionamiento de 4bC1Dv (fracción obtenida de la separación del extracto bruto de hojas de *D.viscosa* por cromatografía líquida a vacío).

Fraccionamientos sobre extractos supercríticos de *D. viscosa*:

Algunos de los extractos obtenidos con fluidos supercríticos de hojas y ramas de *D. viscosa* presentaron en los estudios por TLC (Figura 25), perfiles que mostraban ser promisorios en lo que respecta al aislamiento de compuestos puros. Es así que con tal fin, los mismos fueron sometidos a separación en HPLC preparativa. El extracto de ramas de *D. viscosa* realizado a 120 bar, fue fraccionado utilizando como fase móvil hex/AcOEt (60:40) obteniéndose **131** (13 mg), compuesto que en la TLC mostraba estar en cantidades superiores al resto. El extracto de hojas de *D. viscosa* realizado a 250 bar, fue fraccionado utilizando como fase móvil hex/AcOEt (7:3). Los extractos de hojas de *D. viscosa* realizados a 200 y 150 bar reunidos fueron fraccionados utilizando como fase móvil hex/AcOEt (6:4). De estos últimos fraccionamientos se obtuvo muy pequeñas cantidades de potenciales compuestos puros, por lo cual no se continuó con su estudio.

Colonias de insectos

Los insectos utilizados para los bioensayos fueron: adultos de *E. paenulata*, larvas de *S. littoralis*, adultos de *R. padi* y *M. persicae*. El mantenimiento de los mismos se encuentra detallado en el Capítulo 1 (sección 1.2). También fueron utilizadas abejas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), las que fueron colectadas de colmenas (Canelones, Uruguay) el mismo día en que se realizaría el bioensayo. Fueron mantenidas bajo condiciones controladas y alimentadas con caramelos realizados según datos bibliográficos^[239] durante los experimentos.

Bioensayos

Los Bioensayos de deterrencia de ingesta utilizando *S. littoralis* y *E. paenulata* y los bioensayos de inhibición de asentamiento de pulgones con *M. persicae* y *R. padi* fueron realizados siguiendo los protocolos descritos en Capítulo 1 (sección 1.2).

Bioensayos de toxicidad contra abejas:

La toxicidad contra abejas *A. mellifera* fue testeada en bioensayos de actividad por contacto de los extractos aplicados en placas de Petri (9 x 1 cm)^[239]. Las placas eran empapadas con las soluciones etanólicas de los extractos de manera de obtener 100 µg/cm² de extracto (igual concentración que en los bioensayos de deterrencia). Luego de evaporado el solvente, cinco abejas obreras eran colocadas en cada placa (realizando 6 réplicas por extracto) junto con un caramelo de azúcar impalpable y miel para su alimentación^[19]. El número de abejas vivas y abejas volteadas (muertas o que no respondieran a estímulos) se registraba a las 24 hs. Fueron realizados controles negativos y positivos con etanol y cipermetrina (40 µg/cm²) respectivamente.

Análisis estadísticos

Fueron realizados los mismos procedimientos que se describieron en el Capítulo 1 (sección 1.2). Para el caso del bioensayo de toxicidad contra abejas el análisis de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y el Test de Tukey (post-ANOVA) para comparaciones pareadas.

2.3 Resultados

En la Tabla 6 se muestran los rendimientos de la extracción etanólica de los diferentes órganos de las Sapindáceas estudiadas, así como los resultados de los bioensayos realizados inicialmente testeando la actividad antiinsecto de dichos extractos. Los extractos de ramas y hojas de *A. edulis*, hojas de *D. viscosa* y ramas de *S. meridionalis* fueron sometidos a partición líquido-líquido, obteniéndose los rendimientos para las fracciones extraídas con diferentes solventes, que se muestran en la Tabla 7.

En la tabla que le sigue (Tabla 8) se encuentran detallados los rendimientos de las extracciones realizadas con fluidos supercríticos de los diferentes órganos de las plantas, y en la Figura 25 se encuentran las imágenes de las TLC realizadas de estos extractos.

Especie	Órgano (m)	Rendimiento extracción (%)	Especies de Insectos				
			<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>	<i>A. mellifera</i>
			Índice de Preferencia (IP ± ES)				Knock-down
<i>Allophylus edulis</i>	hojas (105 g)	19,2	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,04	-0,2 ± 0,2	0,9 ± 0,1*	0,5 ± 0,3 ^{a,b} †
	ramas (764 g)	5,1	0,7 ± 0,2*	0,02 ± 0,01	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2*	0,2 ± 0,2 ^a
	frutos (7 g)	20,5	0,16 ± 0,04*	0,26 ± 0,06*	-0,12 ± 0,05	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2 ^a
<i>Dodonaea viscosa</i>	hojas (902 g)	22,7	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,05*	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,2*	0,5 ± 0,3 ^{a,b}
	ramas (16 g)	3,4	0,24 ± 0,05*	0,07 ± 0,02	0,00 ± 0,09	0,8 ± 0,2*	0,0 ± 0,0 ^a
<i>Serjania meridionalis</i>	frutos (44 g)	8,8	0,4 ± 0,1*	0,58 ± 0,06*	0,5 ± 0,2	0,94 ± 0,06*	NT
	hojas (437 g)	9,9	0,5 ± 0,1*	0,17 ± 0,04	-0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2*	2,3 ± 0,6 ^{b,c}
	ramas (900 g)	8,2	0,14 ± 0,08	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2*	NT

Tabla 6. Rendimiento y actividad antiinsecto de los extractos etanólicos de los diferentes órganos de las especies vegetales estudiadas.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$). † Diferentes letras indican diferencia significativa entre controles y tratados en comparaciones entre medias post-ANOVA ($p < 0,05$; Test de Tukey). Control negativo = ($0,2 \pm 0,2^a$); control positivo = ($4,8 \pm 0,2^d$). NT: no testeado.

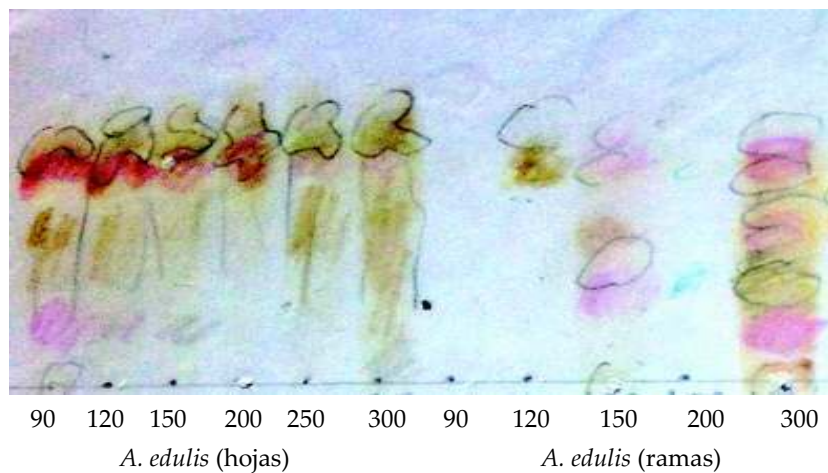
Especie, material vegetal [m de extracto (g)]	Fracción			
	hex	DCM	AcOEt	acuosa
	Rendimiento (%)			
<i>A. edulis</i> , hojas (20 g)	11,5	0,5	1,9	33,2
<i>A. edulis</i> , ramas (25 g)	6,3	0,9	3,0	-
<i>D. viscosa</i> , hojas (19 g)	0,7	2,2	3,8	39,67
<i>S. meridionalis</i> , ramas (73 g)	10,0	0,8	2,0	51,2

Tabla 7. Rendimientos de particiones líquido-líquido de los extractos etanólicos particionados.

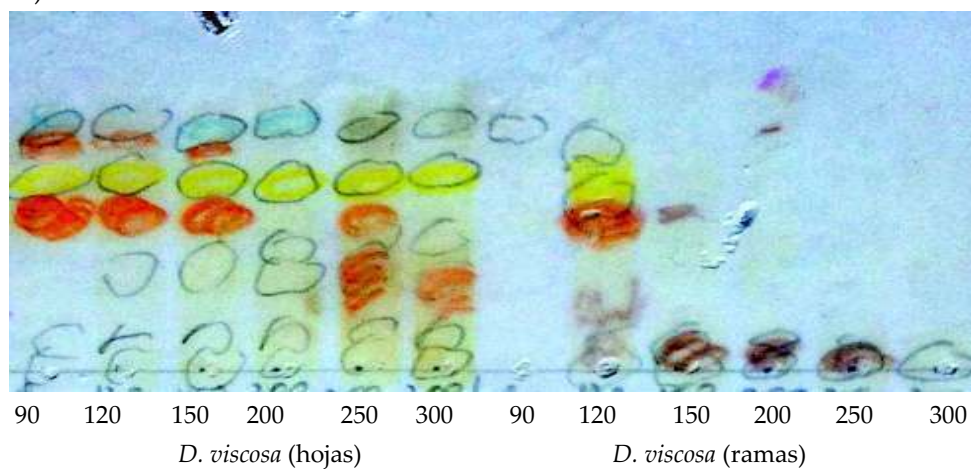
Material vegetal	m (g)	Presión de extracción (bar)						
		90	120	150	200	250	300	
		Rendimiento extracción (%)						
<i>A. edulis</i> , hojas	40	0,4	0,5	1,3	0,8	0,2	-	
<i>A. edulis</i> , ramas	57	0,2	0,5	0,3	0,5	-	-	
<i>D. viscosa</i> , hojas	30	0,3	0,2	0,3	0,4	0,8	0,5	
<i>D. viscosa</i> , ramas	-							
<i>S. meridionalis</i> , hojas	52	0,8	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	
<i>S. meridionalis</i> , ramas	45	0,1	0,6	0,3	0,4	0,5	0,3	

Tabla 8. Rendimiento de extracciones realizadas con fluidos supercríticos a las distintas presiones, de los diferentes materiales vegetales extraídos.

a)



b)



c)

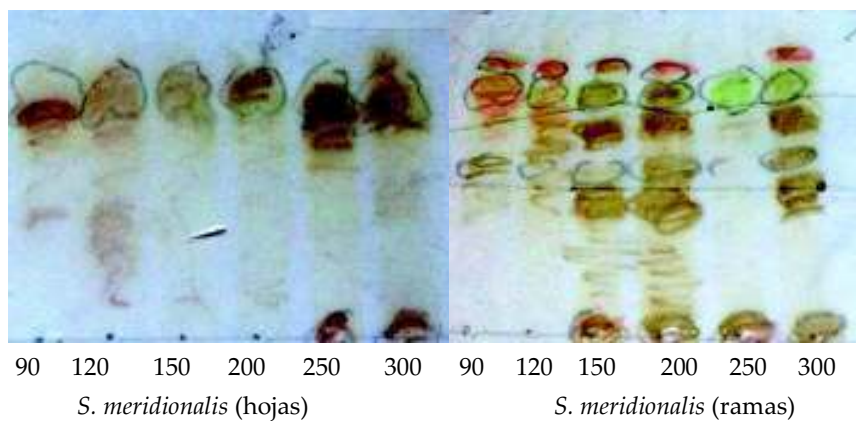


Figura 25. TLC de los extractos de hojas y ramas de *A. edulis*, *D. viscosa* y *S. meridionalis* realizados con fluidos supercríticos.

Los números indican las presiones de extracción en cada caso (bar). Fase móvil: hex/AcOEt (1:1).

Revelado: luz *uv* (marcado con lápiz) y Oleum.

2.3.1 Fraccionamiento, aislamiento de compuestos y actividad antiinsecto del extracto etanólico ramas de *A. edulis*

En la Tabla 9 se pueden observar los resultados de los bioensayos de deterrencia contra los cuatro modelos de insectos, de las diferentes fracciones de la partición líquido-líquido del extracto etanólico bruto de ramas de *A. edulis*. Los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de las mismas y los espectros de ^1H RMN se encuentran en el Anexo II.

Extr/fracción	Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)			
	Especies de Insectos			
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
E EtOH ramas	0,7 $\pm$ 0,2*	0,02 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
f hex	0,80 $\pm$ 0,09*	0,41 $\pm$ 0,07*	-0,2 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2*
f DCM	0,53 $\pm$ 0,08*	0,27 $\pm$ 0,08*	-0,2 $\pm$ 0,2	0,94 $\pm$ 0,04*
f AcOEt	0,4 $\pm$ 0,1*	0,05 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1*
f ac	0,3 $\pm$ 0,1*	0,01 $\pm$ 0,07	-0,1 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,3

Tabla 9. Actividad antiinsecto de las fracciones de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$).

En el fraccionamiento independiente a la anterior partición, comenzado con una separación del extracto bruto por cromatografía líquida a vacío (C1Ae), se obtuvieron las fracciones de masas detalladas en la Tabla 10 donde también se encuentran los resultados de los bioensayos de deterrencia realizados sobre las mismas. En el Anexo III se encuentran los resultados de los análisis de ^1H RMN (500 MHz) realizados sobre tales fracciones.

Fracción (C1Ae)	Solvente de elución	Masa (g)	Índice de Preferencia (IP ± ES)			
			Especies de insectos			
			<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
E EtOH ramas	-	-	0,7 ± 0,2*	0,02 ± 0,01	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2*
1	hex 100%	0,034	0,7 ± 0,1*	-	0,4 ± 0,2	-
2a	hex/AcOEt	0,830	0,36 ± 0,09*	-0,4 ± 0,1*	-0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3*
2b	(80:20)	1,020	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,8 ± 0,3*
3a	hex/AcOEt (1:1)	0,828	0,5 ± 0,1*	0,30 ± 0,07*	0,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1*
3b		0,375	0,51 ± 0,07*	0,26 ± 0,09*	-0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,4
4a	AcOEt 100%	0,788	0,34 ± 0,09*	0,15 ± 0,09*	0,0 ± 0,3	0,6 ± 0,3
4b		0,304	0,48 ± 0,09*	0,4 ± 0,1*	0,3 ± 0,1	0,91 ± 0,09*
5	AcOEt/MeOH (98:2)	0,077	0,3 ± 0,2*	0,32 ± 0,08*	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,0*
6a	AcOEt/MeOH	2,600	0,4 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2*
6b	(80:20)	2,340	0,1 ± 0,1	0,20 ± 0,08*	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,3
7a	AcOEt/MeOH	11,400	0,47 ± 0,09	0,17 ± 0,07*	0,30 ± 0,07*	0,3 ± 0,3
7b	(1:1)	8,860	0,3 ± 0,1*	0,02 ± 0,07	0,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2*
8a	MeOH 100%	2,240	0,42 ± 0,09*	-0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3*
8b		1,390	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1*	-0,06 ± 0,07	0,2 ± 0,2

Tabla 10. Masa y actividad antiinsecto de las fracciones obtenidas de C1Ae con los diferentes solventes de elución.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$). #Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de una cola, para muestras pareadas, $p < 0,05$).

Fraccionamiento de 2aC1Ae

La fracción 2aC1Ae fue sometida a separación cromatográfica en columna flash. El resultado de la TLC obtenida para las fracciones eluidas de dicha columna se encuentran en la Figura 26.

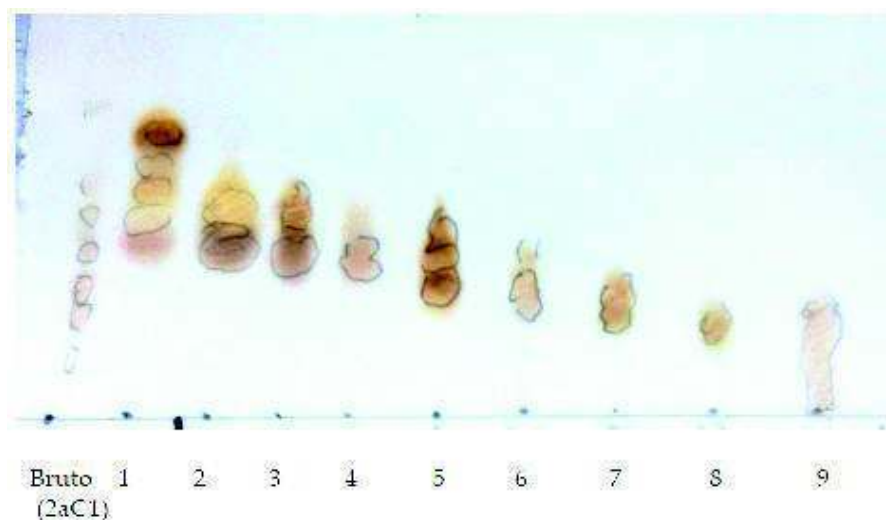


Figura 26. TLC de las fracciones 1 a 9 C2Ae.

Fase móvil: hex/AcOEt (84:16). Revelado: luz *uv* (marcado con lápiz) y Oleum.

De la primera fracción eluída de la anterior columna flash (1C2Ae), fueron aislados 6 mg de **58** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (96:4) = 0,77], compuesto sobre el cual se realizaron todos los análisis de RMN mono y bidimensionales para elucidar su estructura (Anexo IV); datos que se encuentran detallados a continuación:

6,7-epoxi cariofileno (58) $C_{15}H_{24}O$ HREIMS m/z 220,1794 $[M]^+$ (calculada para $C_{15}H_{24}O$: 220,18271; $\Delta m = 15,0$ ppm). 1H RMN (δ ppm) 0,96 (m, 1H, H-8); 0,98 (s, 3H, H-12); 1,01 (s, 3H, H-13); 1,20 (s, 3H, H-14); 1,32 (m, 1H, H-5); 1,42 (m, 1H, H-9); 1,65 (m, 3H, H-1, H-9); 1,76 (t $J = 10$ Hz, 1H, H-10); 2,09 (m, 2H, H-8, H-4); 2,25 (m, 1H, H-5); 2,34 (m, 1H, H-4); 2,60 (dd $J = 10$ Hz 18,5 Hz, 1H, H-2); 2,88 (dd, $J = 10,6$ Hz 4,3 Hz, 1H, H-6); 4,86 (m, 1H, H-15); 4,97 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, H-15). ^{13}C RMN (δ ppm): 17,2 C-14; 21,7 C-13; 27,4 C-9; 30,0 C-5; 30,1 C-12; 30,4 C-4; 34,2 C-11; 39,3 C-8; 39,9 C-1; 40,98 (x, 3H, H-12); 8,9 C-2; 51,0 C-10; 60,0 C-7; 63,9 C-6; 112,9 C-15; 152,0 C-3.

De las fracciones 2-3 de la misma columna [(2-3)C2Ae] se obtuvo **119** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (9:1) = 0,5]. El resultado del análisis por espectrometría de masas de alta resolución fue: HREIMS m/z $[M]^+$ 430,2887; calculada para $C_{30}H_{54}O$ 430,41744; para $C_{29}H_{50}O_2$ 430,38106. Los datos de RMN obtenidos para este compuesto se detallan en la

Tabla 11, en la que se observa que no fue posible confirmar si **119** se trata de un compuesto de fórmula molecular $C_{30}H_{54}O$ o $C_{29}H_{50}O_2$. Asimismo, fue obtenida una mezcla de compuestos (mezcla 2-3 C2Ae) cuyo espectro de 1H RMN se encuentra en el Anexo IV.

δ C (ppm)	δ H (ppm)	Descripción*
19,83 (CH ₃)	0,85	d, J=6,5 Hz, 3H
19,91 (CH ₃)	0,85	d, J=6,5 Hz, 3H
22,78 (CH ₃)	0,86	d, J=7,0 Hz, 3H
22,87 (CH ₃)	0,87	d, J=7,0 Hz, 3H
37,49 37,62 37,65 37,69 (CH ₂)	1,07	m 4H
39,58 40,08 (CH ₂)	1,13	m 4H
23,99 (CH ₃)	1,23	s, 3H
37,49 37,62 37,65 37,69 24,63 24,97 (CH ₂)	1,26	m 6H
24,63 24,97 (CH ₂)	1,3	m 2H
32,90 32,99 (CH) y 20,95 21,23 (CH ₂)	1,38	m 3H
20,95 21,23 (CH ₂)	1,43	m 2H
28,16 CH 39,58 40,08 (CH ₂)	1,52	m 2H
31,79 (CH ₂)	1,78	m 2H
11,92 11,41 (CH ₃)	2,11	s, 6H
12,34 (CH ₃)	2,16	s, 3H
20,95 21,23 (CH ₂)	2,6	t, 2H
OH	4,16	s, 1H
Carbonos cuaternarios		
74,71		
77,36 (posible)		
117,54		
118,53		
121,19		
122,80		
144,74		
145,78		

Tabla 11. Datos de ^{13}C y 1H RMN obtenidos para **119**.

En cada fila se encuentra el desplazamiento de el/los carbonos y los protones a los que podrían estar enlazados (según espectro HSQC). *Multiplicidad de la señal del espectro 1H RMN e integración.

De la fracción 4 (4C2Ae) fue aislado **120** [Rf en TLC eluída con hex/AcOEt (90:10) = 0,38] pero en cantidad insuficiente para elucidar su estructura. En el Anexo IV se muestra el ^1H RMN de este compuesto.

De la fracción 5 (5C2Ae) fueron aislados **121** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (88:12) = 0,55], **122** [Rf en TLC eluída 2 veces con AcOEt/hex (12:88) = 0,45] y **123** [Rf en TLC eluída con hex/AcOEt (88:12) = 0,3], compuestos sobre los cuales se realizaron todos los análisis de RMN mono y bidimensionales para elucidar su estructura (Anexo IV); datos que se encuentran detallados a continuación:

Espatulenol (121) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ HREIMS m/z 220,2002 $[\text{M}]^+$ (calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$: 220,18271; $\Delta m = 79$ ppm). ^1H RMN (δ ppm) 0,47 (dd, $J = 11,3; 9,5$ Hz, 1H, H-1); 0,71 (ddd, $J = 11,3; 9,5; 6,1$ Hz, 1H, H-2); 1,01 (m, 1H, H-3); 1,04 (s, 3H, H-13); 1,06 (s, 3H, H-12); 1,28 (s, 3H, H-15); 1,32 (m, 1H, H-10); 1,57 (m, 1H, H-8); 1,63 (m, 1H, H-7); 1,77 (m, 1H, H-8); 1,91 (m, 1H, H-7); 1,98 (m, 1H, H-3); 2,04 (m, 1H, H-4); 2,20 (m, 1H, H-6); 2,42 (dd, $J = 13,5$ Hz 7,0 Hz, 1H, H-4); 4,66 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H-14); 4,69 (bs, 1H, H-14). ^{13}C RMN (δ ppm): 16,5 C-13; 20,4 C-11; 24,9 C-3; 26,2 C-15; 26,9 C-7; 27,6 C-2; 28,8 C-12; 30,1 C-1; 39,0 C-4; 41,9 C-8; 53,5 C-6; 54,5 C-10; 81,1 C-9; 106,4 C-14; 153,6 C-5.

Sitosterona (122) $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ HREIMS m/z 412,3970 $[\text{M}]^+$ (calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ 412,3705; $\Delta m = 64$ ppm). ^1H RMN (δ ppm) 0,71 (s, 3H, H-18); 0,83 (m, 6H, H-26, H-27); 0,85 (m, 3H, H-29); 0,92 (m, 5H, H-21, H-9, H-24); 1,02 (m, 2H, H-14, H-7); 1,12 (m, 2H, H-15, H-17); 1,17 (m, 4H, H-23, H-22, H-12); 1,18 (s, 3H, H-19); 1,25 (m, 2H, H-28); 1,33 (m, 2H, H-2, H-22); 1,36 (m, 1H, H-20); 1,43 (m, 1H, H-11); 1,51 (m, 2H, H-11, H-8); 1,61 (m, 1H, H-15); 1,67 (m, 1H, H-25); 1,70 (m, 1H, H-1); 1,84 (m, 1H, H-6); 1,86 (m, 2H, H-16); 2,02 (m, 2H, H-1, H-12); 2,28 (m, 1H, H-6); 2,39 (m, 2H, H-2, H-7); 5,72 (s, 1H, H-4). ^{13}C RMN (δ ppm): 12,13 C-18; 12,15 C-29; 17,6 C-19; 18,8 C-21; 19,2 C-26; 20,0 C-27; 21,2 C-11; 23,3 C-28; 24,4 C-15; 26,3 C-23; 28,4 C-16; 29,4 C-25; 32,3 C-6; 33,1 C-7; 34,1 C-22; 34,2 C-2; 35,8 C-8; 35,9 C-1; 36,3 C-20; 38,8 C-10; 39,8 C-12; 42,6 C-13; 46,1 C-24; 54,1 C-9; 56,1 C-14; 56,2 C-17; 123,9 C-4; 171,8 C-5; 199,8 C-3.

Lupeol (123) (sólido amorfo blanco) $C_{30}H_{50}O$ HRESIMS m/z 426,3821 $[M]^+$ (calculada para $C_{30}H_{50}O$: 426,38615 $\Delta m = -9,5$ ppm). 1H RMN (δ ppm) 0,68 (d, $J = 9,2$ Hz; 1H, H-5); 0,76 (s, 3H, H-24); 0,79 (s, 3H, H-28); 0,83 (s, 3H, H-25); 0,94 (s, 3H, H-27); 0,97 (s, 3H, H-23); 1,03 (s, 3H, H-26); 1,07 (m, 2H, H-12); 1,28 (m, 1H, H-9); 1,32 (m, 1H, H-21); 1,36 (m, 1H, H-18); 1,38 (m, 1H, H-22); 1,39 (m, 3H, H-6, H-7); 1,42 (m, 2H, H-11); 1,48 (m, 2H, H-16); 1,52 (m, 1H, H-6); 1,57 (m, 2H, H-2); 1,59 (m, 2H, H-15); 1,66 (m, 2H, H-1); 1,68 (bs, 4H, H-13, H-30); 1,92 (m, 1H, H-21); 2,01 (m, 1H, H-22); 2,38 (td, $J = 11,1$ Hz 5,8 Hz, 1H, H-19); 3,19 (dd, $J = 11,4$ Hz 4,9 Hz, 1H, H-3); 4,57 (dd, $J = 2,5$ Hz 1,3 Hz, 1H, H-29); 4,68 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-29). ^{13}C RMN (δ ppm): 14,7 C-27; 15,6 C-24; 16,1 C-25; 16,3 C-26; 18,2 C-28; 18,5 C-6; 19,5 C-30; 21,1 C-11; 25,2 C-12; 27,58 C-2; 27,6 C-15; 28,2 C-23; 29,9 C-21; 34,5 C-7; 35,8 C-16; 37,3 C-10; 38,7 C-1; 38,2 C-13; 39,0 C-4; 40,2 C-22; 41,0 C-8; 43,0 C-14; 43,2 C-17; 48,2 C-19; 48,5 C-18; 50,6 C-9; 55,5 C-5; 79,2 C-3; 109,5 C-29; 151,1 C-20.

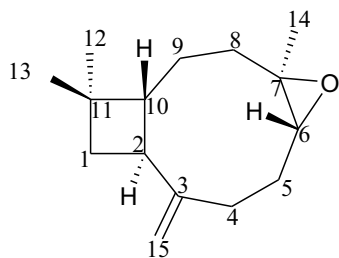
De la fracción 6 (6C2Ae) (unida a la subfracción 4 del fraccionamiento de 5C2Ae) no fue posible aislar compuestos con la pureza suficiente para su elucidación estructural. Sin embargo, fue ensayada la actividad de una de las mezclas, cuyo análisis de 1H RMN se encuentra en el Anexo IV (mezcla de 6C2Ae) [R_f en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (88:12) = 0,37 – 0,50].

Fraccionamiento de 2bC1Ae

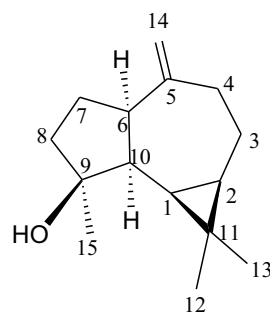
La fracción 2b de la columna cromatográfica inicial del extracto etanólico bruto de ramas (2bC1Ae) fue sometida a cromatografía flash. De la subfracción 6 de esta separación fue aislado como sólido amorfo, el compuesto **124** [R_f en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (88:12) = 0,32], sobre el cual se realizaron todos los análisis de RMN mono y bidimensionales para elucidar su estructura (Anexo IV); datos que se encuentran detallados a continuación:

Sitosterol (124) (sólido amorfo blanco) $C_{29}H_{50}O$ EIMS m/z $[M]^+$ 414, 399, 381, 354, 329, 303, 273, 255, 231, 213. 1H RMN (δ ppm) 0,69 (s, 3H, H-18); 0,80-0,85 (m, 9H, H-27, H-29, H-26); 0,92 (m, 5H, H-21, H-24, H-9); 1,01 (s, 3H, H-19); 1,02 -1,04 (m, 2H, H-17, H-22); 1,09 (m, 1H, H-1); 1,12 (m, 1H, H-14); 1,17 (m, 3H, H-23, H-12); 1,25 (m, 2H, H-28); 1,31 (m, 1H, H-22); 1,36 (m, 1H, H-20); 1,50 (m, 5H, H-2, H-7, H-8, H-11); 1,59 (m, 2H, H-15); 1,68 (m, 1H, H-25);

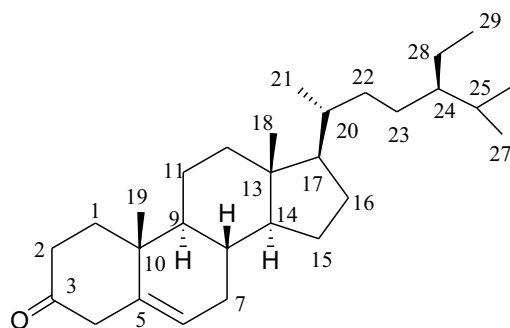
1,85 (m, 3H, H-1, H-2, H-16); 1,96 (m, 1H, H-7); 2,02 (m, 1H, H-12); 2,28 (m, 2H, H-4); 3,51 (m, 1H, H-3); 5,3 (m, 1H, H-6). ^{13}C RMN (δ ppm): 12,0 C-29; 12,1 C-18; 18,9 C-21; 19,2 C-26; 19,6 C-27; 20,0 C-19; 21,2 C-11; 23,2 C-28; 24,5 C-15; 26,2 C-23; 28,4 C-16; 29,3 C-25; 31,8 C-2; 32,0 C-8; 32,1 C-7; 34,1 C-22; 36,3 C-20; 36,6 C-10; 37,4 C-1; 39,9 C-4; 42,4 C-4; 42,5 C-13; 46,0 C-24; 50,3 C-9; 56,2 C-17; 56,9 C-14; 72,0 C-3; 121,9 C-6; 140,9 C-5..



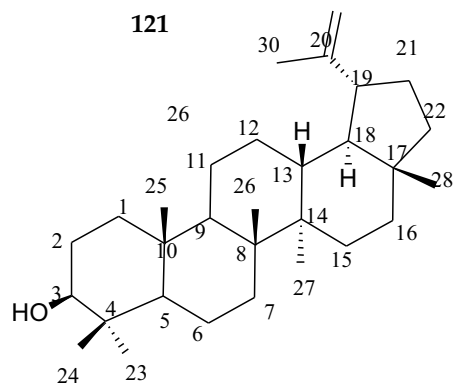
58



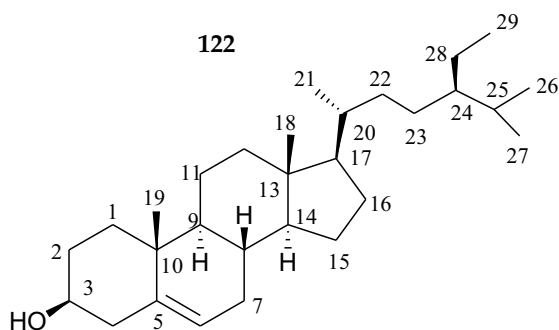
121



122



123



124

Fraccionamiento de 3aC1Ae

La fracción 3a de la columna cromatográfica inicial del extracto etanólico bruto de ramas (3aC1Ae) fue fraccionada por cromatografía flash, obteniéndose subfracciones cuyo perfil de TLC se encuentra en la Figura 27.

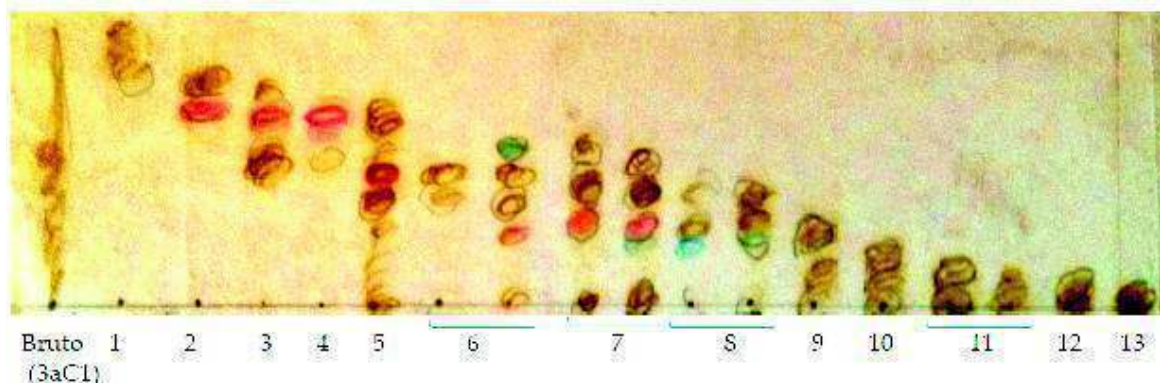


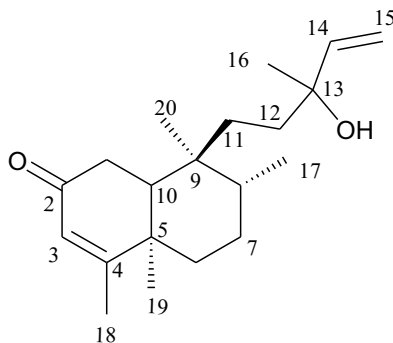
Figura 27. TLC de las fracciones obtenidas de la columna flash a la que se sometió 3aC1Ae.

Fase móvil: hexano/AcOEt (60:40). Revelado: luz uv (marcado con lápiz) y Oleum.

De la subfracción 5 de esta columna fueron aisladas tres mezclas de compuestos (AG1, AG2 y AG3). Los análisis de RMN realizados sobre ellas (Anexo IV) mostraron que se trataba probablemente de ácidos grasos, por lo cual estos se analizaron por GC-MS obteniéndose: en los casos de AG1 y AG2 un pico mayoritario correspondiente a ácido palmítico **125** (por comparación con el estándar); y en el caso de AG3 una mezcla de ácido palmítico **125**, ácido oleico **126** y ácido linoleico **127**{cromatogramas mostrados en Anexo IV, [Rf's en TLC eluída 2 veces con AcOEt/hex (35:65) = 0,75; para los tres casos]}. En los tres casos se encontró que los patrones de fragmentación de los picos de las muestras eran idénticos a los de los patrones de ácidos grasos inyectados para comparar. Los espectros de masas de los picos de las muestras se encuentran en el anexo de este trabajo, acompañados de las estructuras de los mismos.

De la subfracción 6-8 de la anterior columna, fue aislado **128** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (65:35) = 0,5] sobre el cual se realizaron todos los análisis de RMN mono y bidimensionales para elucidar su estructura (Anexo IV); datos que se encuentran detallados a continuación:

(128) $C_{20}H_{32}O_2$ IR (en NaCl, cm^{-1}) 3441, 2934, 2850, 1730, 1660, 1454, 1381, 1261, 1022, 902, 848, 802. HRESIMS m/z 305,24777 $[M+H]^+$; 304,23995 $[M]^+$ (calculada para $C_{20}H_{32}O_2$: 304,24022 $\Delta m = -0,9$ ppm). 1H RMN (δ ppm) 0,8 (s, 3H, H-20); 0,82 (d, 3H, H-17); 1,10 (s, 3H, H-19); 1,25 (s, 3H, H-16); 1,29 (m, 2H, H-11); 1,32 (m, 2H, H-6); 1,48 (m, 5H, H-7, H-12, H-8); 1,83 (m, 1H, H-10); 1,87 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H, H-18); 2,33 (m, 2H, H-1); 5,06 (dd, $J = 10,7$ 1,2 Hz, 1H, H-15); 5,20 (dd, $J = 17,3$ 1,2 Hz, 1H, H-15); 5,70 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-3); 5,80 (dd, $J = 10,8$ 17,6 Hz, 1H, H-14). ^{13}C RMN (δ ppm): 15,9 C-17; 18,2 C-20; 18,5 C-19; 19,1 C-18; 27,0 C-7; 27,9 C-16; 31,3 C-11; 35,0 C-6; 35,01 C1; 35,7 C-12; 36,0 C-8; 38,5 C9; 40,0 C-5; 45,8 C-10; 73,3 C-13; 112,2 C-15; 125,7 C-3; 145,1 C-14; 172,0 C-4; 200,0 C-2.



128

En la tabla que sigue (Tabla 12) se muestran los resultados de actividad de las fracciones 2aC1, 2bC1, 3aC1, sus subfracciones y compuestos aislados de las mismas.

	Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)			
	Especies de Insectos			
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
2aC1Ae	0,36 $\pm$ 0,09*	-0,4 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3*
58 (epoxicariofileno)	0,68 $\pm$ 0,08*	0,5 $\pm$ 0,1*	-0,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2*
119	0,3 $\pm$ 0,1*	-	0,4 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,3
122 (sitosterona)	0,3 $\pm$ 0,1	-	0,0 $\pm$ 0,3	-
123 (lupeol)	0,6 $\pm$ 0,1*	-0,03 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
mezcla de 6C2Ae	0,2 $\pm$ 0,2	-	0,09 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,3
2bC1Ae	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3*
1C3Ae	-	-	-	0,6 $\pm$ 0,2[#]
2C3Ae	0,0 $\pm$ 0,2	-	-	0,4 $\pm$ 0,3
3C3Ae	0,3 $\pm$ 0,1*	-	-	1,0 $\pm$ 0,0*
4C3Ae	-	-	-	0,6 $\pm$ 0,3[#]
5C3Ae	0,4 $\pm$ 0,2*	-	-	0,2 $\pm$ 0,3
6C3Ae	-	-	-	0,0 $\pm$ 0,3
124 (sitosterol)	0,3 $\pm$ 0,1*	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
7C3Ae	-	-	-	0,5 $\pm$ 0,3[#]
8C3Ae	0,6 $\pm$ 0,2*	-	-	0,4 $\pm$ 0,2
9C3Ae	-	-	-	0,5 $\pm$ 0,3
3aC1Ae	0,5 $\pm$ 0,1*	0,30 $\pm$ 0,07*	0,1 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1*
AG2	0,70 $\pm$ 0,08*	0,0 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,1	-0,2 $\pm$ 0,3
AG3	0,5 $\pm$ 0,1*	0,48 $\pm$ 0,07*	-0,07 $\pm$ 0,08	-0,2 $\pm$ 0,3

Tabla 12. Actividad antiinsecto de fracciones y compuestos aislados del extracto de ramas de *A. edulis*.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$). #Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de una cola, para muestras pareadas, $p < 0,05$). – No testeados.

2.3.2 Fraccionamiento, aislamiento de compuestos y actividad antiinsecto de extractos de *D. viscosa*

El extracto etanólico bruto de hojas de esta especie, fue sometido a fraccionamiento cromatográfico a vacío (C1Dv). En la Tabla 13 se encuentran detalladas las masas de las fracciones obtenidas de este fraccionamiento con las mezclas de fase móvil utilizadas para cada caso, así como los resultados de los bioensayos de deterrencia realizados sobre tales fracciones. En el Anexo V se encuentran los resultados de los análisis de ^1H RMN (500 MHz) realizados sobre esas fracciones. En la Figura 28 se muestra el resultado de la TLC obtenida para las fracciones eluidas de C1Dv.

Extr/fracción (C1Dv)	Solvente de elución	Masa (g)	Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)			
			Especies de Insectos			
			<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
E EtOH hojas	-	-	0,19 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,05*	0,3 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2*
1	hex 100%	0,013	-	0,2 $\pm$ 0,1[#]	0,4 $\pm$ 0,2	-
2	hex/AcOEt (95:5)	0,107	-	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
3a	hex/AcOEt (9:1)	0,053	-	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,3
3b		0,119	0,3 $\pm$ 0,1*	-0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2*
4a	hex/AcOEt (8:2)	0,252	0,5 $\pm$ 0,1*	-0,3 $\pm$ 0,1*	-0,1 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,3
4b		0,450	0,5 $\pm$ 0,1*	0,1 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,07*	0,4 $\pm$ 0,3*
5a	hex/AcOEt (1:1)	3,180	-	0,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,3
5b		2,800	0,4 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,90 $\pm$ 0,09*
5c		1,160	0,5 $\pm$ 0,1*	0,31 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,3
6a	AcOEt 100%	2,060	0,1 $\pm$ 0,1	0,01 $\pm$ 0,09	0,1 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1*
6b		1,660	0,4 $\pm$ 0,1*	0,3 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,3*	0,6 $\pm$ 0,3*
7	AcOEt/MeOH (98:2)	0,530	0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,4
8a	AcOEt/MeOH (8:2)	3,550	0,7 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3	-0,4 $\pm$ 0,4
8b		4,530	0,71 $\pm$ 0,07*	0,2 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,09	0,0 $\pm$ 0,4
9a	MeOH 100%	-	0,5 $\pm$ 0,1*	0,04 $\pm$ 0,09	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,3
9b		-	-	-	-	0,7 $\pm$ 0,3

Tabla 13. Masa y actividad antiinsecto de las fracciones obtenidas de C1Dv con los diferentes solventes de elución.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$). #Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de una cola, para muestras pareadas, $p < 0,05$).

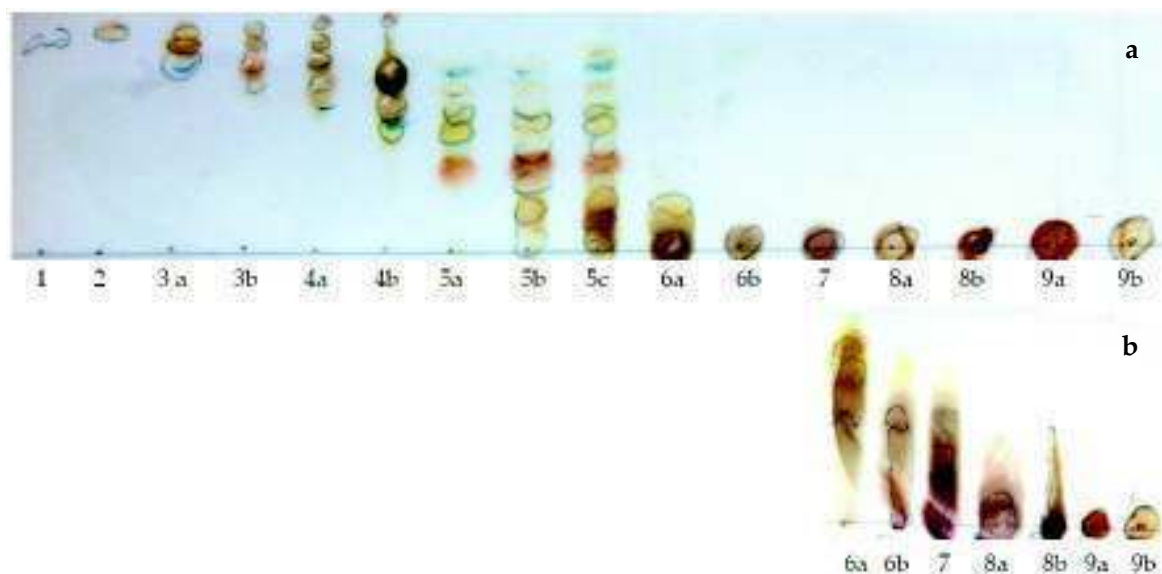


Figura 28. TLC de las fracciones obtenidas de C1Dv.

Fase móvil: a) hex/AcOEt (7:3); b) AcOEt 100%. Revelado: luz *uv* (marcado con lápiz) y Oleum.

Fraccionamiento de 4bC1Dv

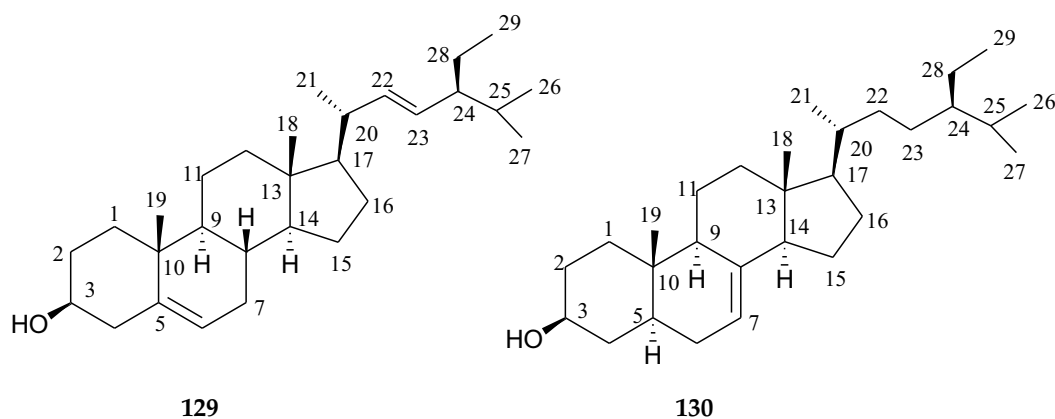
La fracción 4b de la anterior columna (4bC1Dv) fue sometida a cromatografía flash, de donde fue obtenido un compuesto cuyos análisis de RMN y EM revelaron que se trataba de **123**, aislado previamente de *A. edulis*.

Asimismo, fueron aislados **129** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (75:25) = 0,53] y **130** [Rf en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (75:25) = 0,31] que luego de sus análisis de RMN mono y bidimensionales y EM (Anexo IV), mostraron ser esteroides cuyos datos de RMN y masas de alta resolución se detallan a continuación:

Estigmasterol (129) $C_{29}H_{48}O$ EIMS m/z $[M]^+$ 412, 397, 300, 271, 255, 229, 213. 1H RMN (δ ppm) 0,70 (s, 3H, H-18); 0,81-0,83 (m, 9H, H-27, H-29, H-26); 0,92 (m, 1H, H-9); 1,00 (s, 3H, H-19); 1,00-1,02 (m, 4H, H-14, H-21); 1,04 (m, 1H, H-15); 1,06 (m, 1H, H-1); 1,12 (m, 1H, H-17); 1,16 (m, 4H, H-12, H-28); 1,25 (m, 1H, H-2); 1,48 (m, 3H, H-8, H-11); 1,52 (m, 1H, H-24); 1,55 (m, 1H, H-15); 1,68 (m, 1H, H-2); 1,82 (m, 1H, H-7); 1,85 (m, 1H, H-1); 1,94 (m, 1H, H-7); 1,98 (m, 1H, H-25); 2,01 (m, 1H, H-20); 2,27 (m, 2H, H-4); 3,51 (m, 1H, H-3); 5,02 (dd, $J = 14,8$ Hz 8,8 Hz; 1H, H-23); 5,15 (dd, $J = 14,8$ Hz 8,8 Hz; 1H, H-22); 5,35 (d, $J = 5,0$ Hz, H-6). ^{13}C RMN (δ ppm): 12,2 C-18; 12,4 C-29; 19,1 C-27; 19,6 C-19; 21,2 C-26; 21,2 C-11; 21,4 C-21; 24,5

C-15; 25,5 C-28; 28,4 C-16; 29,1 C-2; 31,8 C-7; 32,0 C-25; 32,0 C-8; 36,7 C-10; 37,4 C-1; 39,8 C-12; 40,7 C-20; 42,4 C-13; 42,5 C-4; 50,3 C-9; 51,4 C-24; 56,1 C-17; 57,0 C-14; 72,0 C-3; 121,9 C-6; 129,3 C-23; 138,5 C-22; 140,9 C-5.

Estigmast-7-en-3-ol (130) (sólido blanco, agujas) $C_{29}H_{50}O$ EIMS m/z $[M]^+$ 414, 399, 273, 255, 231, 229, 213. 1H RMN (δ ppm) 0,55 (s, 3H, H-18); 0,79 (s, 3H, H-19); 0,81-0,84 (m, 9H, H-27, H-29, H-26); 0,92 (d, 3H, H-21); 0,93 (m, 1H, H-24); 1,03 (m, 3H, H-11, H-22); 1,09 (m, 1H, H-1); 1,15 (m, 2H, H-23); 1,21 (m, 1H, H-5); 1,23 (m, 2H, H-12); 1,26 (m, 5H, H-28, H-6, H-25, H-17); 1,28 (m, 1H, H-4); 1,34 (m, 1H, H-20); 1,37 (m, 1H, H-2); 1,47 (m, 2H, H-15); 1,58 (m, 1H, H-11); 1,63 (m, 1H, H-9); 1,72 (m, 1H, H-4); 1,76 (m, 1H, H-6); 1,79 (m, 1H, H-2); 1,8 (m, 1H, H-14); 1,84 (m, 1H, H-1); 1,9 (m, 2H, H-16); 3,6 (m, 1H, H-3); 5,15 (m, 1H, H-7). ^{13}C RMN (δ ppm): 12,0 C-18; 12,2 C-29; 13,2 C-19; 19,1 C-27; 19,2 C-21; 20,0 C-26; 21,7 C-11; 23,1 C-15; 23,2 C-28; 26,3 C-23; 28,1 C-16; 29,3 C-25; 29,8 C-6; 31,6 C-2; 34,0 C-10; 34,4 C-22; 36,7 C-20; 37,3 C-1; 38,1 C-4; 39,5 C-12; 40,4 C-5; 43,5 C-13; 46,0 C-24; 49,6 C-9; 55,2 C-14; 56,2 C-17; 71,2 C-3; 117,6 C-7; 139,8 C-8.

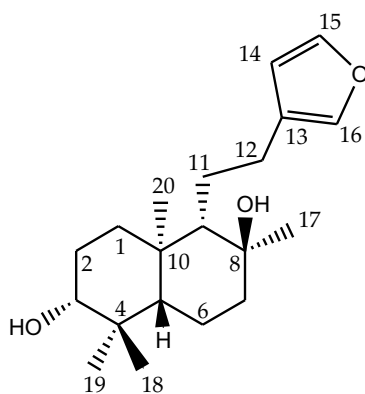


También fue obtenido un compuesto [R_f en TLC eluída 2 veces con hex/AcOEt (80:20) = 0,62] que mostró ser un ácido graso en sus estudios de RMN por lo que fue

analizado por GC-MS, encontrándose que correspondía a ácido palmítico puro (**125**) (Anexo IV).

Del extracto de ramas de *D. viscosa* obtenido con fluidos supercríticos, realizado a 120 bar, fue aislado **131** [Rf en TLC eluída con hex/AcOEt (7:3) = 0,60], compuesto que ya en la TLC de este extracto mostraba estar presente en gran cantidad (Figura 29). Dado que este compuesto fue aislado del extracto de ramas de la especie en estudio, y este trabajo se enfocó en el estudio del extracto de hojas de la misma, fue realizada una TLC comparativa de tal extracto contra **131**, con el fin de verificar la posibilidad de su existencia en el mismo (Figura 29. TLC de **131** **comparando** con extracto etanólico bruto de hojas de *D. viscosa*.. Los datos espectroscópicos de **131** se encuentran detallados a continuación:

131 (aceite incoloro) $C_{20}H_{32}O_3$ $[\alpha]^{20}_D = 31,05$ (c 5,9 mg/mL, AcOEt); IR (en NaCl, cm^{-1}) 3394, 2939, 2870, 1462, 1389, 1265, 1161, 1122, 1053, 1026, 995, 930, 871, 787. HRESIMS m/z 343,22518 [M+Na]; 320,23541 [M]⁺ (calculada para $C_{20}H_{32}O_3$: 320,23513 $\Delta m = 0,9$ ppm). EIMS m/z [M]⁺ 320, 302, 287, 207, 208, 190, 175, 147, 135, 95, 94, 81. ¹H RMN (δ ppm) 0,77 (s, 3H, H-19); 0,81 (s, 3H, H-20); 0,91 (dd, $J = 11,4$ 2,4 Hz, 1H, H-5); 0,99 (s, 3H, H-18); 1,09 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-8); 1,13 (m, 1H, H-3); 1,15 (s, 3H, H-17); 1,35 (m, 2H, H-6_a H-7); 1,52 (m, 1H, H-11); 1,58 (m, 1H, H-2_a); 1,63-1,70 (m, 3H, H-2_b H-6_b H-11); 1,72 (m, 1H, H-3); 1,88 (m, 1H, H-7); 2,55 (m, 2H, H-12); 3,22 (dd, $J = 11,4$ 4,8 Hz, 1H, H-1); 6,30 (m, 1H, H-14); 7,24 (m, 1H, H-16); 7,35 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-15). ¹³C RMN (δ ppm): 15,5 C-19; 15,7 C-20; 20,4 C-6; 24,0 C-17; 26,2 C-11; 27,2 C-2; 28,1 C-12; 28,3 C-18; 38,1 C-3; 38,9 C-4 C-10; 44,6 C-7; 55,1 C-5; 61,2 C-8; 74,1 C-9; 78,9 C-1; 111,2 C-14; 125,6 C-13; 138,9 C-16; 142,9 C15.



131



Figura 29. TLC de **131** comparando con extracto etanólico bruto de hojas de *D. viscosa*. Fase móvil: AcOEt/hex (7:3).

En la tabla que sigue (Tabla 14) se muestran los resultados de actividad de la fracción 4bC1Dv, y de todos los compuestos aislados de esta especie vegetal.

	Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)			
	Especies de Insectos			
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
4bC1Dv	0,5 $\pm$ 0,1*	0,1 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,07*	0,4 $\pm$ 0,3*
123 (lupeol)	0,6 $\pm$ 0,1*	-0,03 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
129 (stigmasterol)	0,3 $\pm$ 0,1*	0,29 $\pm$ 0,05*	0,09 $\pm$ 0,06	-0,2 $\pm$ 0,2
130 (stigmast-7-en-3-ol)	0,61 $\pm$ 0,09*	0,0 $\pm$ 0,1	-	-
131 (labdano)	0,2 $\pm$ 0,1	-0,01 $\pm$ 0,09	0,2 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3[#]

Tabla 14. Actividad antiinsecto de fracciones y compuestos aislados del extracto de hojas de *D.viscosa*.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$). #Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de una cola, para muestras pareadas, $p < 0,05$).

2.4 Discusión

2.4.1 Actividad antiinsecto de extractos y fracciones

En la Tabla 6 puede observarse que los extractos etanólicos de todos los órganos de las tres especies de Sapindáceas estudiadas mostraron actividad deterrente significativa contra al menos una especie de insecto testada. Asimismo, en todos los casos en que se evaluó la toxicidad contra abejas se obtuvo resultados negativos, salvo para el extracto de hojas de *S. meridionalis*^[19]. Tomando en cuenta estos resultados preliminares de actividad antiinsecto, así como la cantidad de extracto disponible para realizar fraccionamientos químicos, fueron escogidos el extracto etanólico de ramas de *A. edulis* y el extracto etanólico de hojas de *D. viscosa* para continuar el estudio fitoquímico y de actividad antiinsecto. Es interesante notar que estos extractos no fueron activos contra todos los insectos testados, lo cual implica un gran potencial en lo que a actividad selectiva respecta^[19].

El procedimiento de estudio se realizó mediante un criterio guiado por la actividad obtenida en los bioensayos, lo que llevó a aislar compuestos descritos previamente en su química, aunque, en muchos casos, no en su actividad contra estas plagas.

Extracto etanólico de ramas de *A. edulis*

Este extracto mostró actividad deterrente significativa contra *M. persicae* así como contra *E. paenulata*^[19]. Sin embargo, ya en el primer fraccionamiento bruto del mismo (partición líquido-líquido, Tabla 9) las fracciones hexano y diclorometano mostraron que la actividad se extendió también a *R. padi*. Lo mismo ocurrió luego del fraccionamiento realizado por cromatografía líquida a vacío (C1Ae), donde muchas de las fracciones obtenidas mostraron también actividad contra ese áfido (Tabla 10). Para el aislamiento de compuestos, debido a las cantidades obtenidas de fracciones, se optó por comenzar con las fracciones resultado de aquella separación cromatográfica, eluidas con mezclas de solvente más apolares, que mostraban actividad antiinsecto. Se eligieron además, las fracciones donde se observaban, a grandes rasgos, los mismos grupos de señales en el espectro de ¹H RMN (Anexos II y III) que en las fracciones activas de la partición líquido-líquido (las fracciones hex y DCM), siendo las mismas: señales de -CH₂ entre 1 y 3 ppm, muy

abundantes, y señales de menor abundancia en las regiones de protones aromáticos y protones unidos a carbonos con heteroátomos.

Es así que se comenzó con el fraccionamiento de 2aC1Ae (primera fracción eluída con la segunda mezcla de solventes en la cromatografía a vacío), fracción que mostró actividad deterrente contra *M. persicae* y *E. paenulata*, pero a su vez mostró actuar como estimulante de asentamiento de *R. padi* (Tabla 10). De esta, fueron aislados, los sesquiterpenos 6,7-epoxicariofileno (**58**) y espatulenol (**121**); **119** y **120**, dos compuestos sin elucidar; y los triterpenos sitosterona (**122**) y lupeol (**123**); así como una mezcla de compuestos (mezcla de 6C2Ae, Figura 21 en sección 2.2), que mostraron luego de ensayos contra las cuatro especies de insectos modelo, diferentes patrones de actividad (Tabla 12). Solamente **58** mostró ser activo frente a las tres especies de insectos contra las que había mostrado actividad la fracción bruta (siendo en este caso, deterrente contra *R. padi*, en vez de estimulante). El compuesto **123** mostró actividad deterrente contra *M. persicae* y *E. paenulata* y el compuesto **119** lo hizo solamente contra *M. persicae*. Tanto el compuesto **122** como la mezcla de 6C2Ae no presentaron actividad en los bioensayos realizados.

La fracción 2bC1Ae (segunda fracción eluída con la segunda mezcla de solventes en la cromatografía a vacío), mostró actividad significativa solamente contra *E. paenulata*, siendo entonces promisoría en cuanto a selectividad. Ésta fue sometida a separación mediante cromatografía flash, de la que se obtuvo las seis subfracciones -C3Ae con diferentes perfiles de actividad antiinsecto, en algunos casos activas contra otro de los modelos de insecto utilizados (Tabla 12). De una de esas subfracciones (6C3Ae) fue aislado como precipitado, sitosterol (**124**) quien reveló actividad contra *M. persicae* y *E. paenulata*, a pesar de que la subfracción de la que fue aislado 6C3Ae no fue activa contra *E. paenulata* (contra el áfido no fue realizado el bioensayo).

La fracción 3aC1Ae (primer fracción eluída con la tercer mezcla de solventes en la cromatografía a vacío) fue activa también contra *E. paenulata*, y además contra *M. persicae*. De la misma se aisló tres mezclas de ácidos grasos (**AG1**, **AG2** y **AG3**), habiendo mostrado las mismas actividad solamente contra *M. persicae*, y en el caso de **AG3**, también contra *R. padi*.

Siendo así que las mismas podrían ser los responsables de la actividad antiinsecto de esta fracción.

Extracto etanólico de hojas y extracto supercrítico de ramas de *D. viscosa*.

El extracto etanólico de hojas de esta especie vegetal mostró actividad deterrente significativa contra *R. padi* así como contra *E. paenulata*. Sin embargo, ya en el primer fraccionamiento bruto del mismo, realizado por cromatografía líquida a vacío (C1Dv), muchas de las fracciones obtenidas mostraron también actividad contra *M. persicae*, y en algunos casos contra *S. littoralis* (Tabla 13).

La fracción 4bC1Dv, por ejemplo, ya no mostró actividad contra *R. padi* pero si contra los otros tres insectos modelo utilizados. A su vez, de esta fueron aislados los esteroides **129** y **130** y el triterpeno **123** mostrando todos ellos ser activos contra *M. persicae*, y solamente **129** y **123** ser activos además contra *R. padi* y *E. paenulata* respectivamente (Tabla 14).

Las TLC de los extractos de ramas y hojas de *D. viscosa* obtenidos con fluidos supercríticos muestran con buena resolución la presencia de varios compuestos, que se repiten en los extractos obtenidos a diferentes presiones tanto de ramas como de hojas. Fue posible aislar un compuesto puro de uno de los extractos de ramas: el clerodano **131** que se demostró mediante análisis en TLC que se encontraba también presente en el extracto etanólico de hojas, además de encontrarse en varios de los extractos supercríticos de hojas. Este compuesto, mostró tener actividad significativa solamente contra *E. paenulata* en los bioensayos realizados.

Puede observarse que tanto en el caso del extracto de ramas de *A. edulis* como en el de hojas de *D. viscosa*, de las fracciones que presentaban actividad contra ciertos insectos, se aislaron compuestos que luego, al ser testeados puros contra los mismos, presentaron patrones de actividad en muchos casos diferentes al de las fracciones brutas. Podría inferirse

entonces, que estos eran en parte, los responsables de las actividades reveladas por las fracciones, sin embargo es importante tener en cuenta ciertas consideraciones.

Por ejemplo, en los casos de compuestos o subfracciones que mostraron actividad frente a insectos contra los que no había sido activa la fracción madre (**124** contra *E. paenulata* por ejemplo), debe ser considerada la concentración de ese compuesto puro o subfracción en la misma, concentración que el insecto detecta a la hora del ensayo. Asimismo, en esos casos puede haber ocurrido enmascaramiento de los compuestos cuando testeados en la matriz compleja que significa la fracción, lo cual no ocurre al ser testado puro.

Asimismo, en los casos en que se aislaron compuestos inactivos de fracciones activas (como fue el caso de **129** con *E. paenulata* y *S. littoralis*) debe tenerse presente la posibilidad de la acción sinérgica de los mismos.

2.4.2 Elucidación estructural de compuestos aislados y su actividad antiinsecto

Ácidos grasos

Los ácidos grasos de cadenas pares, en especial de C-20 a C-24 son productos naturales ubicuos en las ceras epicuticulares de muchas plantas^[240]. Sin embargo es común encontrar en los diferentes estadios fenológicos, ácidos grasos de C-16 a C-24. Existen varios reportes de aislamientos de ácidos grasos en la familia de las Sapindáceas, principalmente de los frutos y semillas de distintos especímenes^[141, 197, 241-243]. En el caso de *A. edulis*, existe un reporte en el que se describe la composición de ácidos grasos de diferentes especies de Sapindáceas, revelando que la misma contiene en sus semillas mayoritariamente ácidos grasos del tipo (20:1) y (18:1)^[244]. Asimismo, es destacable la presencia de reportes de cianolípidos y triacilglicerolos en semillas, compuestos por cadenas acílicas principalmente de 16, 18 y 20 carbonos con cero o una insaturación^[201]. En el caso de *D. viscosa* fue reportada la composición de ácidos grasos de sus semillas, las que contenían: ácido palmítico (11,29%); esteárico (9,86%); araquídico (3,75%); oleico (16,44%), linoleico (57,09%) y linolénico (1,57%)^[245]. Sin embargo, en ninguna de las dos especies vegetales había sido descrita la caracterización de ácidos grasos en otros órganos.

De 3aC1Ae (del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*) fueron aisladas las mezclas AG1, AG2 y AG3, cuyos análisis de ¹H RMN muestran señales comunes a ácidos grasos. Estos presentan gran cantidad de protones metilénicos indiferenciados, en desplazamiento $\delta H = 1,2 - 1,4$ ppm ($\delta C = 29 - 30$ ppm), protones metílicos en $\delta = 0,9$ ppm ($\delta C = 14$ ppm), y protones olefínicos $\delta H = 5,3$ ppm ($\delta C = 130$ ppm). Asimismo, puede observarse en el espectro de ¹H RMN una señal en $\delta = 2,34$ ppm (perteneciente a un metileno de $\delta C = 34,1$ ppm) que presenta un acoplamiento en COSY con otro metileno ($\delta H = 1,65$ ppm; $\delta C = 24,8$ ppm). Estos dos metilenos se encuentran en desplazamientos diferentes al resto dado que corresponden a los metilenos α y β al grupo carbonilo de los ácidos grasos, lo cual se ve confirmado con el acoplamiento que presentan tales hidrógenos con el carbonilo en el espectro de HMBC. Los estudios de los mismos en GC-MS confirmaron que tanto **AG1** como **AG2** corresponden a ácido palmítico (16:0, **125**), impurificado, en el caso de **AG1** con otros dos ácidos grasos en

proporción 85: 7: 8 calculada por las integraciones del cromatograma de GC, y en el caso de **AG2** con un ácido graso más en proporción (96: 4), (estos ácidos grasos minoritarios son los responsables de las señales correspondientes a carbonos alílicos). En ambos casos el pico mayoritario (86% y 96% para **AG1** y **AG2** respectivamente) tuvo un tiempo de retención igual al de un estándar de ácido palmítico (**125**), además de presentar un patrón de fragmentación en sus espectros de masas, idénticos al de tal ácido graso (Anexo IV). **AG3** mostró ser una mezcla de ácido linoleico (18: 2, **127**), oleico (18: 1, **126**) y palmítico (**125**) en proporción 45: 33: 22, dado el tiempo de retención de los esos tres picos y los espectros de masas de los mismos, comparados con los de tales estándares. En el anexo se presentan los análisis de RMN mono y bidimensionales para **AG2**, que fue de la que se obtuvieron los espectros mejores resueltos.

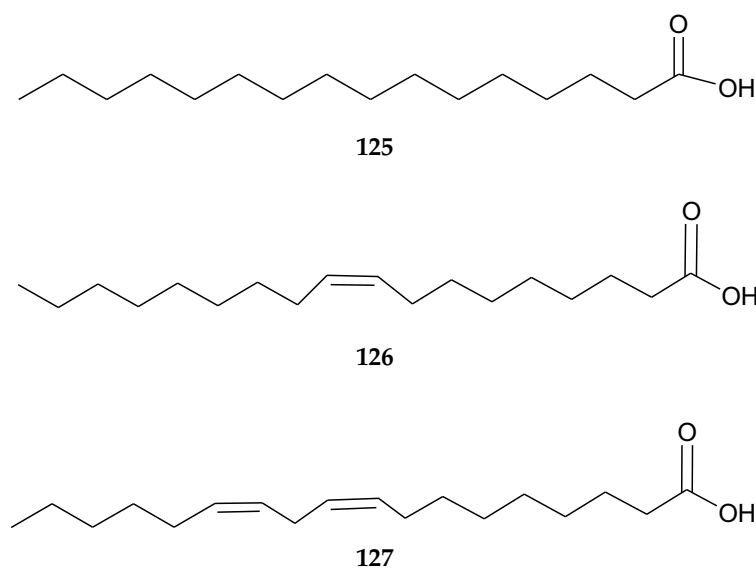


Figura 30. Ácidos grasos aislados de los extractos etanólicos de ramas de *A. edulis* y hojas de *D. viscosa*.

También fue aislado de la fracción 4bC1Dv (del extracto etanólico de hojas de *D. viscosa*), un compuesto cuyos espectros de RMN mostraron las mismas señales detalladas para los casos de **AG1-AG3**, razón por la cual fue sometido a análisis en GC-MS, con lo que se confirmó que se trataba de ácido palmítico puro **125**.

Fue observada en este estudio actividad deterrente de **AG2** (ácido palmítico impurificado) contra *M. persicae* así como de la mezcla (**AG3**) de ácido palmítico, oleico y linoleico, (45:33:22) contra las dos especies de áfidos testeadas. En reportes anteriores, ácidos grasos libres han mostrado ser activos contra diferentes especies de insectos herbívoros; tal es el caso de deterrencia contra áfidos^[246-251], termitas^[252, 253], escarabajos^[254-257] y larvas de lepidópteros^[258]. Existen además reportes donde se describió que ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) mostraron estimulación en el asentamiento de *M. persicae*, mientras que insaturados tuvieron el efecto opuesto^[246, 259]. A su vez, en el caso de *R. padi*, el ácido palmítico no mostró actividad, mientras que si lo hicieron los otros ácidos grasos testeados^[259]. Tomando en cuenta esos resultados, se podría concluir que la actividad deterrente que presenta **AG2** contra *M. persicae*, podría deberse a las impurezas de ácidos grasos que esta mezcla presenta, en lugar de al compuesto mayoritario (ácido palmítico), ya que en los citados reportes^[246, 259], fue testado el compuesto puro. Aunque es destacable que en uno de los trabajos^[246] el diseño de los bioensayos tuvo la diferencia de realizarse con pulgones alados mientras que en este estudio se realizó con pulgones ápteros.

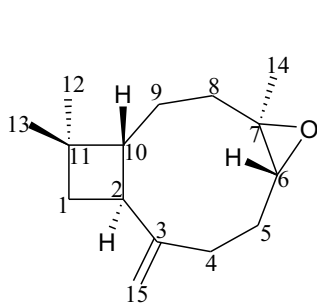
En síntesis, en este trabajo se ha descrito la presencia de ácido palmítico en las ramas de *A. edulis* así como en las hojas de *D. viscosa*. Habiéndose aislado como compuesto mayoritario de mezclas (**AG1**, **AG2** y **AG3**) fue revelada la actividad deterrente de las mismas, al asentamiento de *M. persicae*. Siendo activa también la mezcla de ácido palmítico, oleico y linoleico (**AG3**) contra *R. padi*, donde de acuerdo a reportes anteriores, la actividad en este caso puede deberse a los ácidos grasos insaturados^[259].

Sesquiterpenos

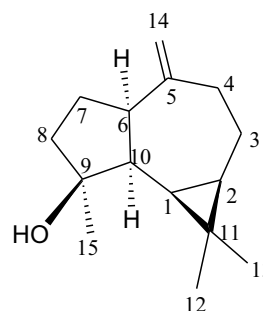
Los sesquiterpenos son compuestos con 15 átomos de carbono, formados a partir de tres unidades de isopreno. Existen más de 200 esqueletos de sesquiterpenos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran principalmente en plantas superiores, constituyendo por lo general, junto con monoterpenos, los aceites esenciales de las mismas (fracciones volátiles). Este grupo de compuestos comprende hidrocarburos insaturados, conteniendo alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos como sustituyentes. Además pueden tener anillos éter y furanos en sus estructuras químicas^[260, 261].

De la fracción 2aC1Ae (del extracto etanólico bruto de ramas de *A. edulis*) fueron aislados entre otros compuestos, los sesquiterpenos **58** y **121**.

Ambos revelaron, luego de su estudio mediante HREIMS, RMN de ^{13}C y ^1H , ser compuestos de fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$. A pesar de ambos poseer la misma fórmula molecular, mostrar un doble enlace terminal, tres metilos de los cuales dos son geminales, y una estructura de biciclo (debido a la presencia de dos carbonos cabeza de puente – C6 y C10 en **121** y C2 y C10 en **58**-), los análisis de RMN revelaron que se trataba de compuestos diferentes. Esto se vio evidenciado por ejemplo, con la presencia de los protones metínicos H1 y H2 en **121** que se encuentran en desplazamientos menores a 1 ppm, lo cual no sucede en **58**. Así como también por la presencia de dos carbonos unidos a oxígeno en **58** y solamente uno en **121**, cuando ambos compuestos presentaban, según su fórmula molecular, solamente un oxígeno en su estructura. Es así que luego de analizados los datos de todos los espectros mono y bidimensionales de ambos compuestos, y de comparar con datos de bibliografía, se concluyó que **58** corresponde a 1,6 epoxi cariofileno^[262] y **121** a espatulenol^[263]; ambos sesquiterpenos encontrados a menudo en especies vegetales de diferentes familias^[263-265] pero reportados por primera vez en esta especie vegetal.



58



121

Estos dos compuestos han mostrado actividad antiinsecto contra diferentes especies, según reportes anteriores. El espatulenol (**121**), compuesto que en este estudio no fue posible testear contra las especies de insecto modelo debido a la poca cantidad que se aisló, ya ha sido reportado como componente de aceites esenciales activos contra larvas del mosquito *A. aegyptii*^[265, 266]; adultos de *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) ^[264, 267, 268]. En todos esos casos no fue testeada su actividad individual, sin embargo, fue realizado un estudio de repelencia contra *A. aegypti* y *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) en que el compuesto puro mostró actividad significativa^[269].

En cuanto al epoxi cariofileno (**58**), que mostró en este estudio ser activo contra los dos áfidos testeados así como contra *E. paenulata*, existen muchos reportes de aceites esenciales de plantas que lo contienen y que han mostrado actividad contra diferentes especies de insectos herbívoros. Ejemplos de esto son la actividad larvicida de aceites contra diferentes especies de mosquitos (*A. aegypti*,^[270, 271] *Culex pipiens*^[272], *A. stephensi*, *Anopheles culicifacies*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*^[273, 274], *Anopheles anthropophagus*^[275]); la toxicidad contra polillas de *Ephestia kuehniella* y *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae)^[276]; deterrenia de ingesta de larvas y de oviposición de adultos de *S. frugiperda*^[277]; toxicidad por contacto contra *Drosophila melanogaster* L. (Diptera: Drosophilidae) y *S. zeamais*^[278, 279]; y toxicidad contra *Sitophilus granarius*^[280]. Asimismo, existen reportes de la actividad de este compuesto testado por sí solo. Ejemplo de esto son su actividad contra termitas^[281, 282], contra *S. oryzae*^[283] y contra los áfidos *Aphis gossypii*^[284] *Acyrtosiphon pisum*, *M. persicae* y *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae)^[285]. En el caso de los áfidos testeados en el presente trabajo, se obtuvo actividad de este compuesto tanto

contra *R. padi* como contra *M. persicae*. En el caso del primero, existe un reporte de inactividad frente a la inhibición de asentamiento de este compuesto contra el mismo^[262]. Sin embargo, en el caso del segundo, existe un reporte en que se describe la actividad de β cariofileno contra *M. persicae*, testeando el efecto en la reproducción de los áfidos por exposición al compuesto volatilizado^[285]; así como otro reporte en que se había descrito inhibición de asentamiento, aunque baja, de los áfidos frente a este compuesto^[286].

Diterpenos

Los diterpenos son compuestos con 20 átomos de carbono que se han aislado principalmente de especies vegetales, aunque también existen reportes de aislamientos de otras fuentes^[261, 287]. Existen variados tipos de diterpenos en la naturaleza: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, policíclicos y macrocíclicos^[261].

De 2bC1Ae (del extracto etanólico bruto de ramas de *A. edulis*) fue aislado **128** aunque en muy pequeña cantidad. A pesar de ello fue posible observar en su espectro de ¹³C RMN todas las señales que dan cuenta de su estructura y descartar aquellas correspondientes a impurezas. El espectro IR de este compuesto muestra bandas a 3441 cm⁻¹ que indica presencia de al menos un grupo hidroxilo, a 1713 cm⁻¹ típica de cetonas, y a 1651 cm⁻¹ banda característica de dobles enlaces. En el espectro de masas se observa un ion molecular a *m/z* 304, siendo C₂₀H₃₂O₂ una de las posibles fórmulas moleculares que pueden dar cuenta de este *m/z*.

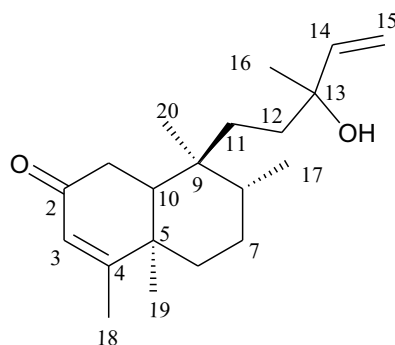
Su espectro de ¹³C RMN confirma la presencia de 20 átomos de carbono. Entre las señales más significativas se encuentran un carbono modificado como grupo carbonilo a δ 200,0 (C-2), cuatro carbonos olefínicos a δ 112,2 (C-15), δ 125,7 (C-3), δ 145,1 (C-14) y δ 172,0 (C-4); además de un carbono unido a oxígeno a δ 73,3 (C-13).

En su espectro de ¹H RMN se observan tres señales singuletes que integran para tres protones cada una, correspondientes a tres grupos metilo a: δ 0,80 (H-20); δ 1,1 (H-19); δ 1,25 (H-16). Siendo la última correspondiente a metilo sobre un carbono unido a oxígeno. Asimismo, se observan dos metilos doblete, a δ 0,82 (H-17) y a δ 1,87 (H-18), siendo este último un metilo sobre un carbono olefínico. La localización de las señales y la multiplicidad de las mismas corresponden a las de un esqueleto de diterpeno de la serie del clerodano^[288].

En la zona de los protones olefínicos se observan dos protones geminales δ 5,06 y 5,20 (H-15) acoplados (COSY) a otro protón olefínico δ 5,80 (H-14); así como un protón olefínico δ 5,70 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, H-3) en el que se observa acoplamiento alílico con el metilo 18: δ 1,87 (d, *J* = 1,3 Hz, 3H, H-18). En el experimento COSY se observa además el acoplamiento de los protones δ 2,33 (m, 2H, H-1) con el protón δ 1,83 (m, 1H, H-10).

Todos estos datos permiten proponer para este compuesto la estructura **128**. A su vez, sus datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía para el 2-oxo-

13-hidroxi-*neo*-cleroda-3,14-dieno; aislado por primera vez de *Stachys rosea* (Labiatae)^[289], aislándose en el presente trabajo por primera vez de un miembro de la familia Sapindaceae.



128

128 fue aislado de una fracción activa del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*, contra *M. persicae* y *E. paenulata*. La actividad de este compuesto no fue ensayada en este estudio debido a no contar con la cantidad suficiente para tal fin, sin embargo, existe un reporte de bioactividad del mismo contra *E. paenulata*^[290], en el cual se testeó varios diterpenos clerodanos de este tipo aislados de *Viguiera tucumanensis* (Asteraceae), resultando haber sido el más activo el clerod-14-ene-3 α ,4 β ,13 ξ -triol. Dado que de 2bC1Ae fueron aislados también solamente AG2 y AG3, quienes presentaron actividad solo contra los áfidos, podría suponerse que uno de los responsables de la actividad de tal fracción contra el coleóptero sea entonces **128**.

De uno de los extractos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos de las ramas de *D. viscosa* (ver secciones 2.2 y 2.3.2), fue obtenido el compuesto **131**. A pesar de que este compuesto fue aislado de un extracto de ramas de la especie en estudio, fue confirmada la posibilidad de su presencia en el extracto etanólico bruto de hojas, a través de una TLC comparativa del mismo contra este compuesto puro (Figura 29, Sección 2.3.2). Debido a esta evidencia, sumado a que fue aislado con un alto grado de pureza y en cantidad suficiente para obtener análisis espectroscópicos de muy buena resolución, es que se procedió a elucidar la estructura de **131**.

El espectro IR de este compuesto muestra bandas a 3395 cm^{-1} indicativa de la presencia de al menos un grupo hidroxilo, 871 y 1462 cm^{-1} típicas de furanos β sustituidos^[226]. En el espectro de masas de baja resolución se observa un ion molecular $m/z = 320$, que puede corresponder a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$. Los análisis de RMN revelaron asimismo que se trata de una estructura compuesta por cuatro carbonos cuaternarios, seis carbonos metínicos, seis carbonos metilénicos y cuatro sustituyentes metílicos; indicando la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ que fue confirmado luego en HRESIMS.

Se observa un grupo de señales con sistemas de spin aislados del resto del compuesto, correspondientes a la cadena lateral. Una señal en el espectro de ^1H RMN a δ 7,35 ppm presenta acoplamiento en COSY con el H en δ 6,3 ppm; ambos protones unidos a carbonos de hibridación sp^2 dado sus corrimientos (δ 142,9 y 111,2 ppm respectivamente). Asimismo, existen dos carbonos más de ese tipo en esta estructura: uno cuaternario en δ 125,6 ppm y uno metínico en δ 138,9 ppm; ambos a su vez presentando acoplamientos en HMBC con los dos anteriores. Todo esto, sumado al desblindaje presentado por los metinos a (δ C / δ H) 142,9/7,35 ppm y 138,9/7,24 ppm, llevaron a obtener una estructura del tipo furano. Además, el protón δ 7,24 ppm presenta un acoplamiento débil en COSY con los protones de un metileno (28,1/2,55 ppm), quienes a su vez presentan acoplamiento HMBC con los carbonos de δ 138,9; 111,2 y 125,6 ppm; sugiriendo entonces que el furano se encuentra unido por su carbono cuaternario a tal metileno. Este último está unido, según sus acoplamientos en COSY, con un metileno 26,2/1,69; 1,52 ppm que a su vez no sigue acoplado. Es así que todo esto llevó a la elucidación de un sustituyente del tipo (-CH₂-CH₂-furano) como se muestra a continuación:

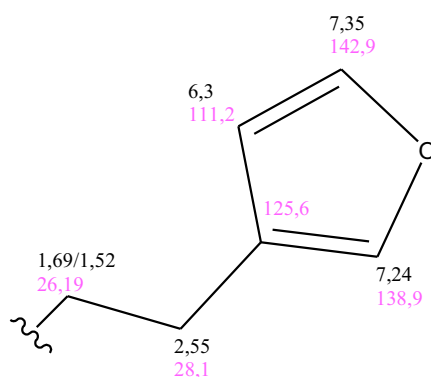


Figura 31. Desplazamientos de los C e H de la cadena lateral de 131.

Tomando en cuenta el resto de las señales de **131**, es destacable la presencia de un metino unido a heteroátomo (δ_{C3} 78,9; δ_{H3} 3,22) y un carbono cuaternario también unido a heteroátomo (δ 74,1). Asimismo en las señales de 1H RMN se observa cuatro señales singuletes que integran para tres protones cada una, correspondientes a cuatro grupos metilo a: δ 0,77 (H-19); δ 0,81 (H-20); δ 0,99 (H-18); δ 1,15 (H-17). Siendo la última correspondiente a metilo sobre un carbono unido a oxígeno dado su corrimiento, lo cual se confirma por el espectro de HMBC dado el acoplamiento fuerte existente entre este y el carbono δ 74,1 (C-8). Los sistemas de spin observados en el espectro COSY y las señales de acoplamiento encontradas en el espectro de HMBC llevan a concluir que **131** corresponde a la estructura de labdano planteada, lo cual se ve confirmado por datos de bibliografía^[206]: ent-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol. Las señales del espectro NOESY confirman la estereoquímica planteada (Figura 32). A modo de confirmar la estructura planteada, fueron agregadas sucesivas alícuotas del complejo de desplazamiento tris (dipivalometanoato)-europio, y registrados los espectros de 1H RMN. En estos se observa que se desplazaron solamente los protones de metilos, y dentro de estos, se corrieron diferencialmente los protones de C-18 y C-19 comparado con los de C-17 y C-20.

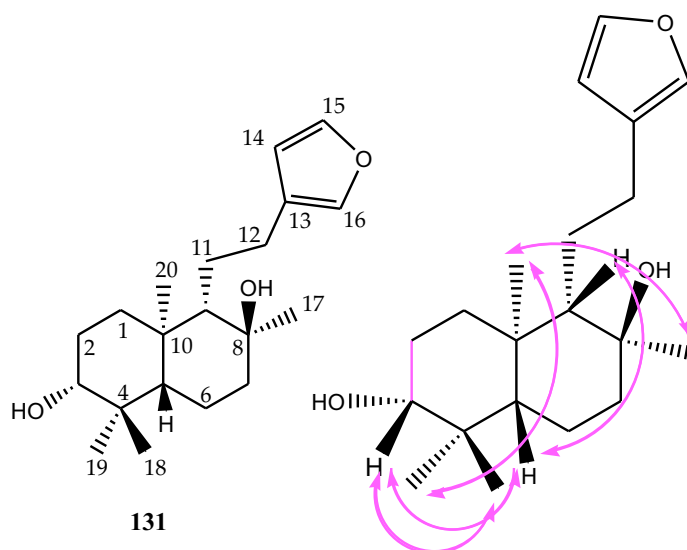


Figura 32. Estructura de **131** y señales de NOESY confirmatorias de la misma.

Este compuesto ya había sido aislado del extracto de partes aéreas de *D. viscosa*, en un estudio realizado en México^[206]. Sin embargo su actividad antiinsecto no había sido antes ensayada; aunque si fue descrita la actividad espasmolítica del mismo, aislado de la misma especie vegetal^[291]. No obstante, existen varios reportes de actividad biológica de diterpenos del tipo labdano, aislados de esta y otras especies vegetales. Tal es el caso de labdanos con actividad antiinflamatoria, aislados de esta misma especie^[172], así como de *Callicarpa longissima* (Verbenaceae)^[292]. En cuanto a insectos, se han encontrado por ejemplo, diterpenos de este tipo con actividad contra dípteros^[293-295]; contra lepidópteros^[296-299]; y también contra pulgones^[300].

A pesar de que en este estudio **131** presentó solamente actividad contra el coleóptero testado, dada la actividad que han presentado otros diterpenos de esta serie y sumado al potencial antiinsecto mostrado por esta especie vegetal, podría esperarse que en las fracciones activas obtenidas existieran otros diterpenos de este tipo responsables de la actividad mostrada.

Triterpenos

Los triterpenos constituyen un grupo extenso y diverso de productos naturales de treinta átomos de carbono, cuyo precursor común es el escualeno. A partir del escualeno y a través de transformaciones bioquímicas, se originan dos grandes grupos de estructuras policíclicas triterpenoidales: los tetracíclicos (esteroles), precursores de los esteroides, y los pentacíclicos^[287].

De la fracción 2aC1Ae (del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*) fueron aislados **122** y **123**.

El compuesto **122** muestra en su espectro de masas un ion molecular m/z 412 concordante con la fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$.

En el espectro de 1H RMN se observa la presencia de una señal a δ 5,72 (s, 1H, H-4) correspondiente a un protón alílico aislado. El mismo presenta correlación en HMBC con un carbonilo δ 199,8 C-3. Existen cuatro señales de metilos desdoblados a δ 0,83 (m, 6H, H-26, H-27), δ 0,85 (m, 3H, H-29) y δ 0,92 (m, H-21); así como dos señales de metilos singuletes: a δ 1,18 (s, 3H, H-19) y a δ 0,71 (s, 3H, H-18).

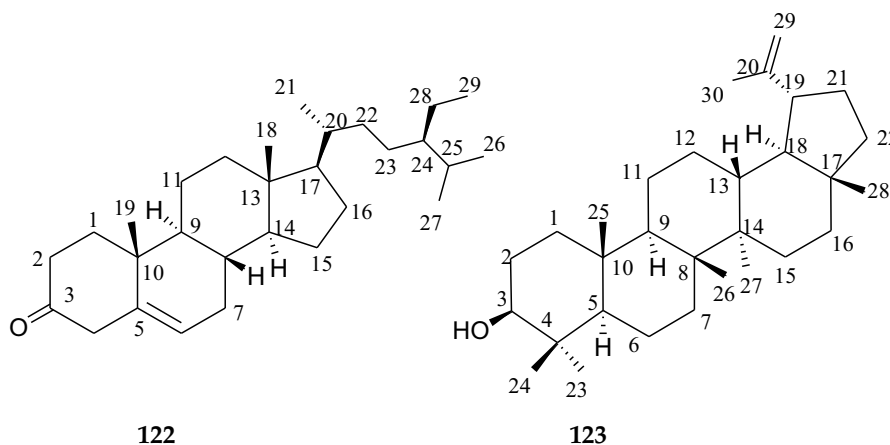
En el espectro de ^{13}C RMN se observan 29 señales de carbonos que confirman, junto con las señales del espectro de 1H RMN, y por comparación con datos de bibliografía, que **122** corresponde a sitosterona^[301], descrito aquí por primera vez en esta especie vegetal.

El compuesto **123** muestra en su espectro de masas un ion molecular a m/z 426 concordante con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$.

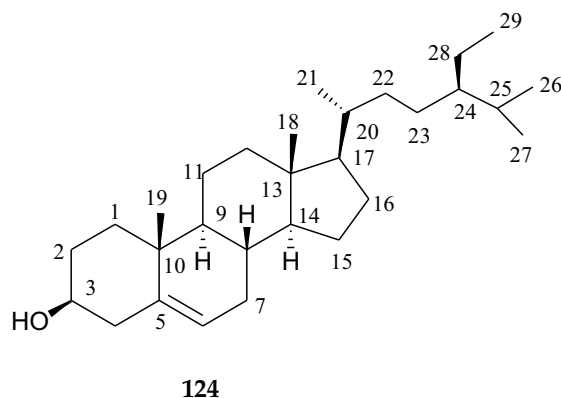
Su espectro de 1H RMN muestra señales correspondientes a un grupo metilvinilo a δ 4,68 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-29) y δ 4,57 (dd, $J = 2,5$ Hz 1,3 Hz, 1H, H-29); a un metilo sobre doble enlace a δ 1,68 (3H, H-30); y doble doblete a δ 3,19 (dd, $J = 11,4$, Hz 4,9 Hz, 1H, H-3) indicativo de un grupo hidroxilo en el C-3. Se observan además, la existencia de seis singuletes cuya intensidad corresponde a tres protones cada uno a δ 0,76 (H-24), δ 0,79 (H-28), δ 0,83 (H-25), δ 0,94 (H-27), δ 0,97 (H-23) y δ 1,03 (H-26), lo cual sugiere la presencia en la molécula de seis metilos sin funcionalización.

Su espectro de ^{13}C RMN muestra la presencia de 30 átomos de carbono que a su vez confirman los datos expuestos anteriormente. Por comparación con datos de bibliografía fue

corroborado que la estructura de **123** corresponde al triterpeno pentacíclico lupeol^[302], aislado por primera vez en esta especie vegetal.



De 2bC1Ae (del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*) fue aislado, como sólido blanco, **124**, compuesto que muestra en su espectro de masas un ion molecular m/z 414 concordante con la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Aparecen picos correspondientes a los iones m/z 273 y 255, correspondientes al fragmento tetracíclico de un esteroide. La pérdida de la cadena lateral origina el fragmento a m/z 273 con posterior eliminación de agua que genera el ion a m/z 255. Las señales de los espectros de RMN son muy similares a las presentadas por el compuesto **122**, salvo por la presencia de un sustituyente hidroxilo en C3 en lugar de un carbonilo. Con datos de bibliografía fue posible confirmar que **124** corresponde a sitosterol^[303, 304].



De la fracción 4bC1Dv (del extracto etanólico de hojas de *D.viscosa*), fueron aislados **123**, **129** y **130**.

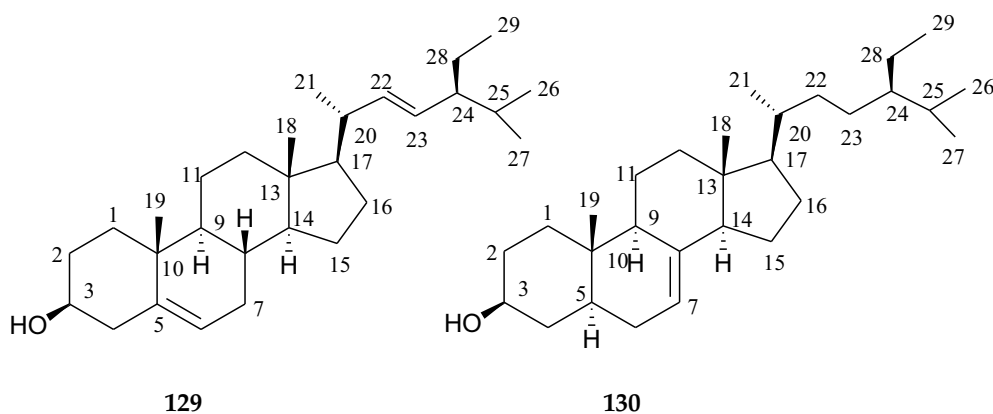
El compuesto **129** presenta en su espectro de masas un ion molecular a m/z 412, correspondiente con la fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$. Aparecen picos correspondientes a los iones m/z 273 y 255, correspondientes al fragmento tetracíclico de un esteroide. La pérdida de la cadena lateral origina el fragmento a m/z 273 con posterior eliminación de agua que genera el ion a m/z 255.

El espectro de 1H -RMN presenta una señal a δ 3,51 generada por el protón geminal a un grupo hidroxilo situado en C-3, característico de los fitoesteroles^[305]. Aparecen dos señales doble doblete a δ 5,15 con constantes de acoplamiento 8,8 y 14,8 Hz y a δ 5,02 con las mismas constantes de acoplamiento, que revelan la presencia de un doble enlace trans en la cadena lateral. Se observa además, una señal a δ 5,35 correspondiente a un protón vinílico que está acoplado a larga distancia con los H-4 en el experimento COSY, por lo que el doble enlace se encuentra entre los carbonos C-5 y C-6.

La naturaleza de la cadena lateral del compuesto fue determinada por la pérdida m/z 139 que presenta el ion molecular, así como la presencia de señales características de un radical etilo y tres metilos desdoblados en el espectro 1H -RMN. Los datos espectroscópicos de 1H RMN y ^{13}C RMN son concordantes con la estructura del estigmasterol, y a su vez muy similares a los del sitosterol (aislado previamente de *A. edulis*), esteroide cuya única diferencia de estructura con **129** es el doble enlace en C22-C23, lo cual no solamente cambia las señales de dichos carbonos y sus protones sino que también ocasiona corrimiento de las señales de los protones y carbonos vecinos^[303, 304]. Confirmándose de este modo, que **129** corresponde al esteroide estigmasterol, aislado previamente de esta especie vegetal^[306].

El compuesto **130** presenta en su espectro de masas un ion molecular m/z 414 correspondiente a la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. Presenta en tal espectro los mismos picos que el compuesto **129** y **124**, correspondientes al fragmento tetracíclico de un esteroide luego de la pérdida de la cadena lateral y la subsecuente pérdida de agua (m/z 273 y 255).

La naturaleza de la cadena lateral del compuesto fue determinada por la pérdida m/z 141 que presenta el ion molecular, así como por la presencia de señales características de un radical etilo y tres metilos desdoblados en el espectro ^1H -RMN. Siendo la ausencia del doble enlace, la única diferencia entre las cadenas laterales de **129** y **130**, este último compuesto mostró a su vez en sus espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN junto con los bidimensionales, presentar el doble enlace del esqueleto principal en C7-C8 en lugar de en C5-C6, correspondiendo entonces **130** al esteroide stigmast-7-en-3-ol^[304, 307].



En la Tabla 15 se muestra, a modo de resumen, las actividades antiinsecto de los triterpenos y esteroides aislados, detallados anteriormente. En la misma puede observarse que tanto el lupeol (**123**) como el sitosterol (**124**) mostraron actividad contra *M. persicae* y *E. paenulata*, mientras que en el caso de estigmasterol (**129**) se observó actividad solamente contra los dos áfidos y en el caso de stigmast-7-en-3-ol (**130**) se observó actividad solamente contra *M. persicae*. La sitosterona sin embargo, no mostró actividad contra *M. persicae*, no habiéndose testado contra *E. paenulata* ni contra *R. padi*.

	Índice de Preferencia (IP $\pm$ ES)			
	Especies de Insectos			
	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
119	0,3 $\pm$ 0,1*	-	0,4 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,3
122 (sitosterona)	0,3 $\pm$ 0,1	-	0,0 $\pm$ 0,3	-
123 (lupeol)	0,6 $\pm$ 0,1*	-0,03 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
124 (sitosterol)	0,3 $\pm$ 0,1*	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2*
129 (estigmasterol)	0,3 $\pm$ 0,1*	0,29 $\pm$ 0,05*	0,09 $\pm$ 0,06	-0,2 $\pm$ 0,2
130 (estigmast-7-en-3-ol)	0,61 $\pm$ 0,09*	0,0 $\pm$ 0,1	-	-

Tabla 15. Resultados de actividad antiinsecto de los triterpenos y esteroides puros aislados de *A. edulis* y *D. viscosa*.

*Denota diferencia significativa entre consumo/asentamiento en control y tratado (Test de rangos de Wilcoxon de dos colas, para muestras pareadas, $p < 0,05$).

En el caso de lupeol (**123**), no existen reportes de su actividad contra los insectos testeados en este estudio, sin embargo ha sido aislado de muchas especies vegetales^[308-316] en el marco de estudios fitoquímicos y de actividades biológicas de extractos. Además de ello, existe un reporte donde este compuesto es componente de una fracción activa contra las larvas minadoras de *Ctenoposteutis obliquana* (Lepidoptera: Tortricidae) en ensayos de deterrencia de ingesta. Sin embargo cuando testado puro el mismo no presentó actividad contra dichas larvas^[317].

El sitosterol (**124**) y el estigmasterol (**129**) sí han sido reportados como activos contra algunos insectos. Por ejemplo, fue reportada la actividad deterrente de ingesta de estigmasterol (**129**) contra *S. littura* y *Spilosoma obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae)^[318]; la actividad citotóxica contra *S. littura*^[319]; también este compuesto fue reportado como componente de un extracto activo contra la chinche *Collaria oleosa* (Hemiptera: Miridae)^[320]; y al igual que sitosterol (**124**), mostró inactividad contra *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae)^[321]. A su vez, el sitosterol (**124**) actuó como fagoestimulante contra el gorgojo

Sciopithes obscurus (Coleoptera: Curculionidae)^[322]; así como, junto con estigmasterol (**129**), como estimulante de oviposición para el gorgojo del arroz *S. orizae*^[323]; además de haber sido componente de una fracción de un extracto vegetal, activa contra *M. persicae*^[324].

Al menos 100 esteroides diferentes han sido aislados de las plantas, siendo los mismos importantes en procesos de crecimiento de ellas^[324]. El sitosterol es probablemente, el más abundante y común^[325-328]. A su vez, los esteroides juegan un rol crítico en todos los organismos del reino animal, dado su rol básico como componentes de membranas celulares, y en algunos casos como precursores de hormonas de muda. Sin embargo, los insectos herbívoros no tienen la capacidad de sintetizar colesterol, por lo que dependen de la ingesta de fitoesteroides que puedan ser metabolizados al mismo^[325]. No obstante eso, como se ha mencionado anteriormente, en muchos casos se ha encontrado actividad antiinsecto de ciertos esteroides de las plantas. En estos casos, de fitoesteroides que tienen su función en el metabolismo básico de plantas y presentan además actividad defensiva contra herbívoros, sería interesante dilucidar si las plantas que los producen, lo hacen a distintas concentraciones, o los depositan diferencialmente en la superficie de sus órganos, y/o son capaces de aumentar su biosíntesis como respuesta al daño.

Observando la relación estructura-actividad de los esteroides testeados contra las especies de insectos utilizadas en este estudio, fue posible encontrar una tendencia de acuerdo a la sustitución del C-3. En los casos de **123**, **124**, **129** y **130** todos presentaron actividad frente a *M. persicae*. Mientras que **122**, que presenta en el C-3 un carbonilo en lugar de un hidroxilo, no fue activo contra tal insecto.

Sin identificar

El compuesto **119**, aislado de 2aC1Ae, muestra en su espectro de masas un ion molecular m/z 430 lo cual podría ser concordante con dos fórmulas moleculares ($C_{30}H_{54}O$ y $C_{29}H_{50}O_2$). Hasta el momento, no ha sido posible elucidar a cual de ellas corresponde. En el espectro de ^{13}C RMN se observan señales correspondientes a seis carbonos cuaternarios de doble enlace (δ 117,54; δ 118,53; δ 121,19; δ 122,8; δ 144,74; δ 145,78) así como dos señales de carbono cuaternario sustituido con heteroátomo δ 74,71 y δ 77,36 (esta última es la señal que podría no corresponder al compuesto, dado que habitualmente en ese desplazamiento aparecen señales interferencia). Asimismo, se observan dos señales de metilos dobles (δ 19,83 y δ 19,91) y seis señales de metilos singuletes (δ 11,41; δ 11,92; δ 12,34; δ 22,78; δ 22,87 y δ 23,99), correspondiendo la última a un metilo sobre carbono sustituido con heteroátomo y las tres primeras a metilos sobre dobles enlaces (dado el desplazamiento de los protones, Tabla 11). También se observa tres señales de metinos (δ 32,90; δ 32,99 y δ 28,16) y once señales de metilenos (δ 20,95; δ 21,23; δ 24,63; δ 24,97; δ 31,79; δ 37,49; δ 37,62; δ 37,65; δ 37,69; δ 39,58; δ 40,08). No fue posible asignar con precisión los protones correspondientes a estas últimas debido a los desplazamientos tan similares de las señales de los carbonos.

120 aislado de 2aC1Ae, mostró en su espectro de 1H RMN que era un compuesto puro, pero estaba en cantidad insuficiente para completar el resto de los análisis mono y bidimensionales de RMN con buena resolución.

De la misma fracción (2aC1Ae) fue también aislada una mezcla de compuestos (mezcla 6C2Ae). En el espectro de 1H RMN puede observarse varios grupos de señales en diferentes proporciones, que evidencian la presencia de compuestos diferentes, ya sea de cadenas lineales carbonadas (muchas señales en δ 0,7 - 1,4 ppm) así como de carbonos sustituidos con heteroátomos (δ 3,4 ppm) y carbonos de hibridación sp^2 (δ 4,7 y 5,3 ppm).

2.5 Conclusiones

En el trabajo aquí descrito de caracterización fitoquímica y de actividad antiinsecto de dos especies vegetales locales, el procedimiento de estudio se realizó mediante un criterio guiado por los resultados de ensayos, lo cual llevó a aislar compuestos descritos previamente en su química, aunque, en muchos casos, no en su actividad contra las plagas de insectos utilizadas como modelo.

En el caso de *A. edulis*, arbusto ampliamente distribuido en nuestros campos, fueron realizados dos fraccionamientos iniciales sobre el extracto bruto de ramas, uno por partición líquido-líquido y otro por cromatografía a vacío; resultando ser el segundo el más apropiado para continuar con la purificación de fracciones y aislamiento de compuestos, debido a los rendimientos obtenidos de las fracciones activas; siendo además, óptimo en cuanto a la inversión de tiempo necesaria. En el caso de *D. viscosa* se comenzó entonces, realizando un fraccionamiento del extracto bruto de hojas, por cromatografía a vacío, de donde se obtuvieron fracciones aptas para su purificación y aislamiento de compuestos (en lo que respecta a rendimientos). Sin embargo, en el caso de esta especie vegetal, se aisló también un compuesto puro (**131**) de un extracto obtenido mediante extracción con fluido supercrítico (CO₂), que a pesar de no obtenerse mediante un procedimiento bioguiado como los seguidos en el resto de este trabajo, presentó actividad frente a uno de los insectos modelo. Debido a esto, a la velocidad de obtención de los productos y al hecho de ser una metodología limpia, la extracción con fluidos supercríticos es una metodología a ser tomada en cuenta para futuras búsquedas de metabolitos activos a partir de material vegetal.

Por otro lado, el Chal Chal mostró poseer buena actividad antiinsecto tanto en los extractos de sus hojas como de sus ramas. Actividad que, en el caso de los extractos de las ramas, órgano estudiado en este trabajo, fue posible concentrar en ciertas fracciones luego de los procesos de separación química. De esas fracciones fueron aislados dos sesquiterpenos (**58** y **121**), un diterpeno (**128**), un triterpeno pentacíclico

(**123**), dos esteroides (**122** y **124**), y mezclas de ácidos grasos (**AG1– AG3**); que mostraron diferentes patrones de actividad contra los modelos de insectos utilizados. Dado que *A. edulis* no había sido casi estudiado anteriormente, este trabajo corresponde al primer estudio fitoquímico de esta especie vegetal, promisorio para su uso como bioplaguicida.

D. viscosa, o Chirca de Monte como se le conoce habitualmente en nuestro país, es un arbusto que se encuentra muy a menudo por ejemplo en áreas costeras. A diferencia del caso anterior, sobre esta especie vegetal sí existen reportes de su composición y actividad antiinsecto. En este trabajo los extractos de todos los órganos estudiados de esta especie demostraron buena actividad antiinsecto contra al menos una plaga frente a la que no habían sido ensayados. De las fracciones activas del extracto etanólico de hojas fueron aislados un triterpeno pentacíclico (**123**), dos esteroides (**129** y **130**), y un ácido graso puro (**125**); que mostraron también diferentes patrones de actividad antiinsecto contra los modelos testeados. Además, de las ramas de esta especie fue aislado mediante extracción supercrítica, **131**, diterpeno del tipo labdano que mostró ser activo contra *E. paenulata*, y que de acuerdo a estudios preliminares, está probablemente presente también, en el extracto de hojas.

En síntesis, fueron estudiados los extractos etanólicos de los diferentes órganos de dos especies vegetales nativas, fraccionándose algunos de ellos y obteniéndose como resultado de tales fraccionamientos, subfracciones y compuestos puros que presentaron actividad diferencial contra especies de insecto modelo.

Conclusiones generales

Fueron estudiadas fitoquímicamente tres especies vegetales ampliamente distribuidas en nuestro territorio: el árbol del Paraíso (*Melia azedarach*), meliácea conocida por su capacidad de producción de triterpenos del tipo limonoides, potenciales agentes para el control de insectos; el Chal Chal (*Allophylus edulis*) arbusto nativo perteneciente a la familia de las Sapindáceas sobre el cual existen muy pocos reportes en literatura; y por último una Chirca de Monte (*Dodonaea viscosa*), miembro de la misma familia sobre la cual ya existían reportes de aislamientos de compuestos bioactivos.

Los extractos de frutos del Paraíso colectados localmente fueron sometidos a un proceso de separación enfocado hacia la purificación de limonoides, obteniéndose así un extracto enriquecido en tales compuestos y cinco limonoides puros: dos de ellos, 21 α -metilmelianodiol y 21 β -etilmelianodiol, aislados por primera vez de esta especie vegetal, resultando el primero ser activo contra *Myzus persicae*. Los otros tres: 1-O-Destigloil-1-O-cinamoilohchinolal, 1-O-Destigloil-1-O-benzoilohchinolal y ohchinolal, C-*seco* limonoides que ya habían sido reportados previamente en esta especie vegetal en la región, mostraron, el primero y el último, ser activos contra *Epilachna paenulata* y *Spodoptera littoralis*. Además, es importante destacar, que el extracto rico en limonoides mostró mayor actividad contra las cuatro especies de insectos que los productos aislados de ese extracto

En el caso de las sapindáceas fueron estudiados extractos etanólicos de las mismas y realizados los fraccionamientos bioguiados que llevaron al aislamiento de compuestos que, aunque en algunos casos son ubicuos de las plantas en general, presentaron siempre patrones interesantes de actividad anti insecto selectiva para ciertos herbívoros.

El extracto etanólico de ramas de *A. edulis* fue fraccionado mediante partición líquido-líquido, así como mediante cromatografía a vacío, observándose que la segunda técnica resultó ser la más apta para la continuación del fraccionamiento bioguiado (en lo que respecta a tiempo invertido y rendimiento y complejidad de fracciones activas). Fueron aislados dos sesquiterpenos –cariofileno y espatulenol– siendo el primero activo contra *M. persicae*, *R. padi* y *E. paenulata*; un diterpeno (2-oxo-13-hidroxi-*neo*-cleroda-3,14-dieno) aislado por primera vez en esta familia vegetal,

sobre el cual no fue posible realizar ensayos de actividad pero que pertenece a una serie de compuestos que han mostrado anteriormente ser potenciales agentes controladores de insectos; un triterpeno pentacíclico (lupeol) y dos esteroides (sitosterona y sitosterol), siendo lupeol y sitosterol activos contra *E. paenulata* y *M. persicae*; así como mezclas de ácidos grasos activas contra los dos áfidos. Dado que *A. edulis* no había sido casi estudiado anteriormente, este trabajo corresponde al primer estudio fitoquímico de esta especie vegetal, promisorio para su uso como bioplaguicida.

En el caso de *D. viscosa*, fueron aislados del extracto etanólico de hojas, en el marco del fraccionamiento bioquímico, tres triterpenos (lupeol, estigmasterol y estigmast-7-en-3-ol) también activos todos contra *M. persicae*, y, en un caso, contra *R. padi* (estigmasterol), y en otro, (estigmast-7-en-3-ol) contra *E. paenulata*. Asimismo, en el marco de otro proceso de extracción, realizado con fluidos supercríticos (CO₂), de las ramas de esta especie fue aislado un diterpeno del tipo labdano que mostró actividad contra *E. paenulata*. El aislamiento de este compuesto mediante tal proceso, rápido y amigable con el medio ambiente, lleva a considerar este tipo de extracción para futuras búsquedas de metabolitos activos a partir de material vegetal.

Cabe destacar que este trabajo debería continuar con el estudio de las fracciones polares activas obtenidas de los fraccionamientos mediante cromatografía a vacío de las dos Sapindáceas estudiadas. Asimismo, el estudio de los extractos de *Serjania meridionalis* podría traer aparejado resultados promisorios en cuanto a su uso como bioplaguicida. Además sería interesante realizar, estudios detallados de la relación estructura actividad de fitoesteroides frente a las especies de insectos modelo. Estudios de correlación entre señales de RMN de fracciones y su actividad anti-insecto son también actividades pertinentes a ser completadas, incursionando en el campo de la metabolómica como primera aproximación para hallar compuestos bioactivos.

Bibliografía

1. Philogène, C., C. Regnault-Roger, y C. Vincent, *Botanicals: Yesterday's and Today's Promises in Lavoisier eds Biopesticides of Plant Origin en Biopesticides of Plant Origin*, C. Regnault-Roger, P. C, yC. Vincent, Editors. 2005 Intercept Ltd: Paris. p. pp 1-15.
2. EPA. <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>.
3. <http://www.politics.co.uk/reference/organophosphates>. 2012.
4. Reigart, J.R. y J.R. Roberts, *Recognition and management of pesticide poisonings*. 5th ed. 1999, Washington, DC.
5. Vijverberg, H.P.M. y J.V.D. Bercken, *Action of Pyrethroid insecticides on the vertebrate nervous system*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1982. 8 p. 421-440.
6. Burt, P.E. y R.E. Goodchild, *The action of pyrethroids in the insect central nervous system. I. Features of molecular structure associated with toxicity to cockroaches and to their giant fibre axons*. Pesticide Science, 1977. 8(6) p. 681-691.
7. NAS, *Insect pest management and control.*, in National Academy of science. 1969: Washington, DC.
8. Tschirley, F., *The role of pesticides in increasing agricultural production*, en *Pesticides*. 1979, Humana Press: Clifton, NJ.
9. Balachowsky, A., *La lutte contre les insects*. 1951, Payot, Paris.
10. Isman, M., *Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. Annual Review of Entomology, 2005. 51 p. 45-66.
11. Mansson, E. y E. Schylter, *Hylobius pine weevils adult host selection and antifeedants: feeding behaviour on host and non-host woody scandinavian plant*. Agricultural and Forest Entomology, 2004. 6 p. 165-171.
12. Moyna, P. *Los productos naturales en Latinoamérica. ¿Quo Vadis?* in XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. 2007. La Plata, Argentina.
13. Kingston, D.G.I., *Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation*. Journal of Natural Products, 2010. 74(3) p. 496-511.
14. MGAP. febrero 2012; <http://www.mgap.gub.uy/DGSSAA/index.htm>.
15. (2010) Uruguay XXI. *Promoción de Inversiones y Exportaciones*. Uruguay de un vistazo, reseña de los principales datos económicos de Uruguay.,
16. Castiglioni, E., G. Giani, C. Binnewies, y O. Bentancur, *Susceptibilidad de la chinche Piezodorus guildinii Westwood (Hemiptera: Pentatomidae) al insecticida Endosulfán*. Agrociencia, 2008. 12(1) p. 31-34.
17. <http://www.rapaluguay.org/agrotoxicos/Uruguay/estimacion-efectos.html>. 2012.
18. Lampkin, N., *Organic Farming in the European Union. Overview, Policies and Perspectives*, in *Farming in the European Union Perspectives for the 21st Century*. 1999: Baden, Austria.
19. Castillo, L., A. González-Coloma, A. González, M. Díaz, E. Santos, E. Alonso-Paz, M.J. Bassagoda, y C. Rossini, *Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects*. Industrial Crops and Products, 2009. 29(1) p. 235-240.

20. Carpinella, M., M. Defago, G. Valladares, y S. Palacios, *Role of Melia azedarach L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects*, en *Naturally Occuring Bioactive Compounds*. 2006, Elsevier.
21. Gepp, V. (2011) *Virosis de cultivos hortícolas en el Uruguay*.
22. Bentancourt, C.M., I.B. Scatoni, y E. Morelli, *Insectos del Uruguay*. 2009: Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias.
23. Bentancourt, C.M. y I.B. Scatoni, *Guía de Insectos y Ácaros de Importancia Agrícola y Forestal en el Uruguay*. 1999, Montevideo: Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.
24. Tan, Q.-G. y X.-D. Luo, *Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities*. Chemical Reviews, 2011. 111(11) p. 7437-7522.
25. Isman, M.B., O. Koul, A. Luczynski, y J. Kaminski, *Insecticidal and antifeedant bioactivities of Neem oils and their relationship to azadirachtin content*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990. 38(6) p. 1406-1411.
26. Nakatani, M., R.C. Huang, H. Okamura, T. Iwagawa, K. Tadera, y H. Naoki, *3 new antifeeding meliacarpinins from Chinese Melia azedarach Linn*. Tetrahedron, 1995. 51(43) p. 11731-11736.
27. Huang, R.C., J.B. Zhou, H. Suenaga, K. Takezaki, K. Tadera, y M. Nakatani, *Insect antifeeding property of limonoids from Okinawan and Chinese Melia azedarach L, and from Chinese Melia toosendan (Meliaceae)*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995. 59(9) p. 1755-1757.
28. Brattsten, L.B., *Cytochrome-p-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores*. ACS Symposium Series, 1983. 208 p. 173-195.
29. Roy, A. y S. Saraf, *Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006. 29(2) p. 191-201.
30. Heasley, B., *Synthesis of limonoid natural products*. European Journal of Organic Chemistry, 2011 p. 19-46.
31. Champagne, D.E., O. Koul, M.B. Isman, G.G.E. Scudder, y G.H.N. Towers, *Biological activity of limonoids from the Rutales*. Phytochemistry, 1992. 31(2) p. 377-394.
32. Okamura, H., K. Yamauchi, K. Miyawaki, T. Iwagawa, y M. Nakatani, *Synthesis and Biological Activities of Degraded Limonoids, (+)-Fraxinellonone and Its Related Compounds*. Tetrahedron Letters, 1997. 38 p. 263-266.
33. Ahn, J.-W., S.-U. Choi, y C.-O. Lee, *Cytotoxic limonoids from Melia azedarach var Japonica*. Phytochemistry, 1994. 36 p. 1493-1496.
34. Catherine Regnault-Roger, B.J.P., Charles Vincent, *Biopesticides of plant origin*. 1st ed. 2005, Paris: Lavoiser. 313.
35. Pennington, T., B. Styles, y D. Taylor, *The Meliaceae*, in *Flora Neotropica*, NY Botanical Garden. 1981.
36. Isman, M., H. Matsuura, S. MacKinnon, T. Durst, G. Towers, y J. Arnason, *Phytochemistry of the Meliaceae*. Recent Advances on Phytochemistry, 1996. 30 p. 155-178.
37. Arnason, J., S. MacKinnon, M. Isman, y T. Durst, *Insecticides in tropical plants with non neurotoxic modes of action*. Recent Advances on Phytochemistry, 1992. 28 p. 107-131.
38. Koul, O., J.S. Shankar, N. Mehta, S.C. Taneja, A.K. Tripathi, y K.L. Dhar, *Bioefficacy of crude extracts of Aglaia species (Meliaceae) and some active fractions*

- against lepidopteran larvae. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, 1997. 121(4) p. 245-248.
39. Jimenez, A., R. Mata, R. Pereda-Miranda, J. Calderon, M. Isman, R. Nicol, y J. Arnason, *Insecticidal limonoids from Swietenia humilis and Cedrela salvadorensis*. *Journal of Chemical Ecology*, 1997. 23 p. 1225-1234.
 40. Motoo, B., A. Ali, R. Motilal, R. Pingal, A. Ramlal, A. Khan, W. Reynolds, y S. McLean, *Limonoids from Swietenia macrophylla and S. aubrevilleana*. *Journal of Natural Products*, 1999. 62 p. 1514-1517.
 41. MacKinnon, S., T. Durst, J. Arnason, Angerhofer, J. Pezzuto, P. Sanchez-Vindas, L. Poveda, y Gbeassor, *Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunine derivatives*. *Journal of Natural Products*, 1997a. 60 p. 336-341.
 42. Ewete, F., J. Arnason, J. Larson, y B. Philogene, *Biological activities of extracts from traditionally used Nigerian plants against the European corn borer, Ostrinia nubilalis*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 1996a. 80 p. 531-537.
 43. Cespedes, C.L., J.S. Calderon, L. Lina, y E. Aranda, *Growth inhibitory effects on fall armyworm Spodoptera frugiperda of some limonoids isolated from Cedrela spp. (Meliaceae)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. 48(5) p. 1903-1908.
 44. Jimenez, A., C. Villareal, R. Toscano, M. Cook, J. Arnason, R. Bye, y R. Mata, *Limonoids from Swietenia humilis and Guarea grandiflora (Meliaceae)*. *Phytochemistry*, 1998. 49 p. 1981-1988.
 45. Wheeler, D., *The effect of Trichilia americana extract on the growth development and behavior of the Asian army worm, Spodoptera litura*. 2000, University of British Columbia
 46. Arnason, J.T., T. Durst, y B.J.R. Philogène, *Phytochemical discovery of new botanical insecticides*, en *Biopesticides of plant origin*, B.J.R.P. Catherine Regnault-Roger, Charles Vincent, Editor. 2005, Lavoisier: Paris. p. 37-46.
 47. Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto, y N. Frighetto, *Toxic activity of organic extracts from Trichilia pallida Swartz (Meliaceae) against Spodoptera frugiperda (J. E. Smith)*. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 2000. 29(4) p. 799-808.
 48. Nebo, L., A.P. Matos, P.C. Vieira, J.B. Fernandes, M.F. das Gracias Fernandes da Silva, y R.R. Rodrigues, *Insecticidal activity of Trichilia clausenii (Meliaceae) fruits against Spodoptera frugiperda*. *Quimica Nova*, 2010. 33(9) p. 1849-1852.
 49. Bogorni, P.C. y J.D. Vendramim, *Sublethal effect of aqueous extracts of Trichilia spp. on Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) development on maize*. *Neotropical Entomology*, 2005. 34(2) p. 311-317.
 50. Matos, A.P., L. Nebo, P.C. Vieira, J.B. Fernandes, M.F. das Gracias Fernandes da Silva, y R.R. Rodrigues, *Chemical constituents and insecticidal activity from fruits extracts of Trichilia elegans and T. catigua (Meliaceae)*. *Quimica Nova*, 2009. 32(6) p. 1553-1556.
 51. Wheeler, D.A. y M.B. Isman, *Effect of Trichilia americana extract on feeding behavior of Asian armyworm, Spodoptera litura*. *Journal of Chemical Ecology*, 2000. 26(12) p. 2791-2800.
 52. Wheeler, D.A. y M.B. Isman, *Antifeedant and toxic activity of Trichilia americana extract against the larvae of Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 2001. 98(1) p. 9-16.

53. Caballero, C., J. Lopez-Olguin, M. Ruiz, F. Ortego, y P. Castanera, *Antifeedant activity and effects of terpenoids on detoxication enzymes of the beet armyworm, Spodoptera exigua (Hubner)*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2008. 6 p. 177-184.
54. Baldin, E.L.L., D.R. Souza, E.S. Souza, y R.A. Beneduzzi, *Use of plant extracts on whitefly control in tomato grown in greenhouse*. Horticultura Brasileira, 2007. 25(4) p. 602-606.
55. Goncalves Gervasio, R.d.C. y L. Vendramim, *Mode of action of Meliaceae extracts on the Tuta absoluta (Meyrueck, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Arquivos do Instituto Biológico 2004. 71(2) p. 215-220.
56. Ishibashi, F., C. Satasook, M.B. Isman, y G.H.N. Towers, *Insecticidal 1H-cyclopentatetrahydro[b]benzofurans from Aglaia odorata*. Phytochemistry, 1993. 32(2) p. 307-310.
57. Nugroho, B.W., R.A. Edrada, B. Gussregen, V. Wray, L. Witte, y P. Proksch, *Insecticidal rocaglamide derivatives from Aglaia duppreana*. Phytochemistry, 1997. 44(8) p. 1455-1461.
58. Nugroho, B.W., B. Gussregen, V. Wray, L. Witte, G. Bringmann, y P. Proksch, *Insecticidal rocaglamide derivatives from Aglaia elliptica and A. harmsiana*. Phytochemistry, 1997. 45(8) p. 1579-1585.
59. Nugroho, B.W., R.A. Edrada, V. Wray, L. Witte, G. Bringmann, M. Gehling, y P. Proksch, *An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from Aglaia odorata (Meliaceae)*. Phytochemistry, 1999. 51(3) p. 367-376.
60. Chaidir, J. Hiort, B.W. Nugroho, F.I. Bohnenstengel, V. Wray, L. Witte, P.D. Hung, L.C. Kiet, W. Sumaryono, y P. Proksch, *New insecticidal rocaglamide derivatives from flowers of Aglaia duperreana (Meliaceae)*. Phytochemistry, 1999. 52(5) p. 837-842.
61. Bacher, M., O. Hofer, G. Brader, S. Vajrodaya, y H. Greger, *Thapsakins: possible biogenetic intermediates towards insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from Aglaia edulis*. Phytochemistry, 1999. 52(2) p. 253-263.
62. Schneider, C., F.I. Bohnenstengel, B.W. Nugroho, V. Wray, L. Witte, P.D. Hung, L.C. Kiet, y P. Proksch, *Insecticidal rocaglamide derivatives from Aglaia spectabilis (Meliaceae)*. Phytochemistry, 2000. 54(8) p. 731-736.
63. Satasook, C., M.B. Isman, y P. Wiriyachitra, *Activity of rocaglamide, an insecticidal natural product, against the variegated cutworm, Peridroma saucia (Lepidoptera: Noctuidae)*. Pesticide Science, 1992. 36(1) p. 53-58.
64. Mordue, A.J. y A.J. Nisbet, *Azadirachtin from the Neem Tree Azadirachta indica: its Action Against Insects*. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 2000. 29(4) p. 615-631.
65. Koul, O., G. Singh, R. Singh, y J.S. Multani, *Bioefficacy and mode-of-action of aglaroxin A from Aglaia elaeagnoidea (syn. A. roxburghiana) against Helicoverpa armigera and Spodoptera litura*. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 2005. 114(3) p. 197-204.
66. Nathan, S.S., M.Y. Choi, C.H. Paik, y H.Y. Seo, *Food consumption, utilization, and detoxification enzyme activity of the rice leaffolder larvae after treatment with Dysoxylum triterpenes*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007. 88(3) p. 260-267.

67. Nakatani, M., S.A.M. Abdelgaleil, J. Kurawaki, H. Okamura, T. Iwagawa, y M. Doe, *Antifeedant rings B and D opened limonoids from Khaya senegalensis*. Journal of Natural Products, 2001. 64(10) p. 1261-1265.
68. Breuer, M. y B. Devkota, *Control of Thaumetopoea pityocampa (den and schiff) by extracts of Melia azedarach l (Meliaceae)*. Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie, 1990. 110(2) p. 128-135.
69. Mordue, A.J. y A. Blackwell, *Azadirachtin - an update*. Journal of Insect Physiology, 1993. 39(11) p. 903-924.
70. Schmutterer, H., *Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest-control in developing and industrialized countries*. Journal of Insect Physiology, 1988. 34(7) p. 713-&.
71. Akhtar, Y., Y.R. Yeoung, y M.B. Isman, *Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, Trichoplusia ni and Pseudaletia unipuncta*. Phytochemistry Reviews 2008. 7(1) p. 77-88.
72. Greenberg, S.M., A.T. Showler, y T.-X. Liu, *Effects of neem-based insecticides on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)*. Insect Science 2005. 12 p. 17-23.
73. Koul, O. y S. Wahab, *Neem: Today and in the New Millennium*. 2004: Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
74. Nathan, S., K. Kalaivani, K. Sehoon, y K. Murugan, *The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on Cnaphalocrocis medinalis (Guenee), the rice leaffolder*. Chemosphere, 2006. 62(8) p. 1381-1387.
75. Koul, O., J.S. Multani, G. Singh, W.M. Daniewski, y S. Berlozecki, *6 beta-hydroxygedunin from Azadirachta indica. Its potentiation effects with some non-azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(10) p. 2937-2942.
76. Koul, O., W.M. Daniewski, J.S. Multani, M. Gumulka, y G. Singh, *Antifeedant Effects of the Limonoids from Entandrophragma candolei (Meliaceae) on the Gram Pod Borer, Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51 p. 7271-7275.
77. Mordue, A.J., A.J. Nisbet, M. Nasiruddin, y E. Walker, *Differential thresholds of azadirachtin for feeding deterrence and toxicity in locusts and an aphid*. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 1996. 80(1) p. 69-72.
78. Isman, M., *Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization*. Phytoparasitica, 1997. 25(4) p. 339-344.
79. Oelrichs, P.B., M.W. Hill, P.J. Vallely, J.K. MacLeod, y T.F. Molinski, *Toxic tetranortriterpenes of the fruit of Melia azedarach*. Phytochemistry, 1983. 22(2) p. 531-534.
80. Macleod, J., P.D.R. Moeller, T.F. Molinski, y O. Koul, *Antifeedant activity against Spodoptera litura larvae and [¹³C]NMR spectral assignments of the meliatoxins* Journal of Chemical Ecology, 1990. 16(8) p. 2511.
81. Kraus, W., M. Bokel, S. Baumann, U. Keller, A. Klenk, M. Klingele, H. Pohnl, y M. Schwinger, *Control of insect feeding and development by constituents of Melia azedarach and Azadirachta indica en Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants* H.A. Schmutterer, KRS, Editor. 1987. p. 111-125.

82. Kraus, W., R. Cramer, M. Bokel, A. Klenk, y H. Pohnl, *Constituents of neem and related species. A revised structure of azadirachtin*, in *Third Int. Conf. on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products*. 1985: Sofia, Bulgaria.
83. Bohnenstengel, F.I., V. Wray, L. Witte, R.P. Srivastava, y P. Proksch, *Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 1999. 50(6) p. 977-982.
84. Lee, S.M., J.A. Klocke, M.A. Barnby, R.B. Yamasaki, y M.F. Balandrin, *Insecticidal constituents of Azadirachta indica and Melia azedarach (Meliaceae)*. *ACS Symposium Series*, 1991. 449 p. 293-304.
85. Carpinella, M.C., L.M. Giorda, C.G. Ferrayoli, y S.M. Palacios, *Antifungal effects of different organic extracts from Melia azedarach L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(9) p. 2506-2511.
86. Coria, C., W. Almiron, G. Valladares, C. Carpinella, F. Luduena, M. Defago, y S. Palacios, *Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from Melia azedarach L. on Aedes aegypti (L.) (Diptera : Culicidae)*. *Bioresource Technology*, 2008. 99(8) p. 3066-3070.
87. Valladares, G.R., D. Ferreyra, M.T. Defago, M.C. Carpinella, y S. Palacios, *Effects of Melia azedarach on Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 1999. 70 p. 421-424.
88. Wen, J.H. y H. Shmutterer, *Effects of extracts from fruits and leaves of Melia azedarach L. on Locusta migratoria migratorioides*. *Anz Schadlingskde*, 1991. 64 p. 128-133.
89. Borges, L.M.F., P.H. Ferri, W.J. Silva, W.C. Silva, y J.G. Silva, *In vitro efficacy of extracts of Melia azedarach against the tick Boophilus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003. 17(2) p. 228-231.
90. Rapal. *Rapal Uruguay*. 2012; <http://www.rapaluruguay.org/>.
91. Craig, H., *Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1957. 12(1-2) p. 133-149.
92. Wagner, H. y S. Bladt, *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. 1996, New York: Springer.
93. Schroeder, D.R. y K. Nakanishi, *A simplified isolation procedure for azadirachtin*. *Journal of Natural Products*, 1987. 50(2) p. 241-244.
94. Pitout, S. y S. Bues, *Elevage de plusieurs especes de Lepidopteres Noctuidae sur milieu artificiel simplifié*. *Annales de Zoologie Ecologie Animale* 1970. 2 p. 79-91.
95. Bellomo, A., S. Camarano, C. Rossini, y D. Gonzalez, *Enantiospecific synthesis and insect feeding activity of sulfur-containing cyclitols*. *Carbohydrate Research*, 2009. 344(1) p. 44-51.
96. <http://faculty.vassar.edu/lowry/wilcoxon.html>.
97. Mitsui, K., H. Saito, R. Yamamura, H. Fukaya, Y. Hitotsuyanagi, y K. Takeya, *Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from Cedrela sinensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2007. 55 p. 1442-1447.
98. Xu, G., J. Kim, S.Y. Kim, J. Ryu, Y. Kim, S. Jung, M. Kim, y S. Lee, *Terpenoids and coumarins isolated from the fruits of Poncirus trifoliata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2008. 56(6) p. 839-842.
99. Zhou, H.L., A. Hamazaki, J.D. Fontana, H. Takahashi, T. Esumi, C.B. Wandscheer, H. Tsujimoto, y Y. Fukuyama, *New ring C-seco limonoids from*

- Brazilian Melia azedarach and their cytotoxic activity*. Journal of Natural Products, 2004. 67(9) p. 1544-1547.
100. Puripattanavong, J., S. Weber, V. Brecht, y A.W. Frahm, *Phytochemical investigation of Aglaia andamanica*. Planta Medica, 2000. 66(8) p. 740-745.
 101. Fukuyama, Y., I. Miura, y M. Ochi, *Bitter limonoids from the fruit of Melia azedarach L. var. japonica Makino*. The Chemical Society of Japan, 1983. 56 p. 1139-1142.
 102. Takeya, K., Z.S. Qiao, C. Hirobe, y H. Itokawa, *Cytotoxic trichilin-type limonoids from Melia azedarach*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996. 4(8) p. 1355-1359.
 103. Nakatani, M., S. Arikawa, H. Okamura, y T. Iwagawa, *Isolation of a new insect antifeeding azadirachtin derivative from Okinawan Melia azedarach Linn*. Heterocycles, 1994. 38(2) p. 327-331.
 104. Huang, R.C., K. Tadera, F. Yagi, Y. Minami, H. Okamura, T. Iwagawa, y M. Nakatani, *Limonoids from Melia azedarach*. Phytochemistry, 1996. 43(3) p. 581-583.
 105. Nakatani, M., R.C. Huang, H. Okamura, T. Iwagawa, y K. Tadera, *Salannal, a new limonoid from Melia azedarach Linn*. Chemistry Letters, 1995(11) p. 995-996.
 106. D'Ambrosio, M. y A. Guerriero, *Degraded limonoids from Melia azedarach and biogenetic implications*. Phytochemistry, 2002. 60(4) p. 419-424.
 107. Huang, R., H. Okamura, T. Iwagawa, H. Suenaga, y M. Nakatani, *Limonoid antifeedants from the root bark of Chinese Melia azedarach L*. Reports of the Faculty of Science, Kagoshima University: Mathematics, Physics and Chemistry, 1994 27 p. 45-52.
 108. Kraus, W. y W. Grimminger, *23-(R,S)-hydroxytoonacilide and 21-(R,S)-hydroxytoonacilide, two new B-seco-tetranortriterpenoids for deterring insects from Toona ciliata Mj Roem var. Australis (Meliaceae)*. New Journal of Chemistry, 1980. 4(11) p. 651-655.
 109. Takeya, K., Z.S. Qiao, C. Hirobe, y H. Itokawa, *Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from Melia azedarach*. Phytochemistry, 1996. 42(3) p. 709-712.
 110. Kelecom, A., M. Cabral, y E. Garcia, *A new euphane triterpene from the Brazilian Melia azedarach*. Journal of the Brazilian Chemical Society 1996 7(1) p. 39-41.
 111. Carpinella, M.C., M.T. Defago, G. Valladares, y S.M. Palacios, *Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from Melia azedarach (Meliaceae) with potential use for pest management*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(2) p. 369-374.
 112. Ntalli, N.G., F. Cottiglia, C.A. Bueno, L.E. Alche, M. Leonti, S. Vargiu, E. Bifulco, U. Menkissoglu-Spiroudi, y P. Caboni, *Cytotoxic tirucallane triterpenoids from Melia azedarach fruits*. Molecules, 2010. 15(9) p. 5866-5877.
 113. Bernays, E.A., *When host choice is a problem for a generalist herbivore: experiments with the whitefly, Bemisia tabaci*. Ecological Entomology, 1999. 24. p. 260-267.
 114. Luise Lang, K., L. Sibelle Campos, E.P. Bernardes, F. Schenkel, J. Duran, J. Palermo, y E. Deagosto, *Chemical variation produces species-specific changes in cucurbitacin antifeedant effect.*, in Pest Management Science. 2012.
 115. Salam, A.L.A. y A.A.I. Ahmed, *Evaluation of using the extract of chinaberry fruits, Melia azedarach L. in the control of the cotton leafworm, Spodoptera littoralis in Egypt*. International conference on pests in agriculture, 6-8 January 1997, at le Corum, Montpellier, France. Volume 3., 1997 p. 1159-1162.
 116. Schmidt, G.H., H. Rembold, A.A.I. Ahmed, y M. Breuer, *Effect of Melia azedarach fruit extract on juvenile hormone titer and protein content in the hemolymph of two*

- species of noctuid lepidopteran larvae [Insecta: Lepidoptera: Noctuidae].*
Phytoparasitica, 1998. 26(4) p. 283-291.
117. Carrizo, P., A. Pelicano, y P. Caffarini, *Evaluation of cetonic extracts from paradise, eucalyptus and castor oil trees on Myzus persicae (Homoptera: Aphididae).* Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo, 2004. 36(1) p. 47-52.
 118. Singh, M.P., M.S. Khuman, y J.S. Salam, *Efficacy of certain plant extracts against Myzus persicae Sulz. (Homoptera: Aphididae) on cabbage in Manipur.* Indian Journal of Plant Protection, 1995. 23(2) p. 139-141.
 119. Carpinella, C., C. Ferrayoli, G. Valladares, M. Defago, y S. Palacios, *Potent limonoid insect antifeedant from Melia azedarach.* Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002. 66(8) p. 1731-1736.
 120. Itokawa, H., Z.S. Qiao, C. Hirobe, y K. Takeya, *Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from Melia azedarach.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1995. 43(7) p. 1171-1175.
 121. Nakatani, M., R.C. Huang, H. Okamura, y T. Iwagawa, *The structure of a new antifeeding meliacarpinin from chinese Melia azedarach L.* Chemistry Letters, 1993(12) p. 2125-2128.
 122. Mordue, A.J., E.D. Morgan, y A.J. Nisbet, *Azadirachtin, a Natural Product in Insect Control*, en *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005, Elsevier. p. 117-135.
 123. Morgan, E.D., *Azadirachtin, a scientific gold mine.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. 17(12) p. 4096-4105.
 124. Toky, O.P., D. Riddell-Black, P.J.C. Harris, P. Vasudevan, y P.A. Davies, *Biomass production in short rotation effluent-irrigated plantations in North-West India.* Journal of Scientific & Industrial Research. 70(8) p. 601-609.
 125. Díaz, M., C. Castillo, C.E. Díaz Hernández, A. González-Coloma, y C. Rossini, *Limonoids from Melia azedarach with deterrent activity against insects.* Natural Products Journal, 2011. 2 p. 36-44.
 126. Fernandez-Mateos, A., A.I. Ramos Silvo, R.R. Gonzalez, y A.S.J. Simmonds, *A brief and stereoselective synthesis of limonoid models, with antifeedant activity against Locusts migratoria.* Tetrahedron, 2006. 62(33) p. 7809-7816.
 127. Ruberto, G., A. Renda, C. Tringali, E.M. Napoli, y M.S.J. Simmonds, *Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against Spodoptera frugiperda larvae. A structure-activity relationship study.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(23) p. 6766-6774.
 128. delaPuente, M.L., R.B. Grossman, S.V. Ley, M.S.J. Simmonds, y W.M. Blaney, *Chemistry of insect antifeedants from Azadirachta indica. Synthesis of biologically active, simple analogues of azadirachtin, containing the hydroxytetrahydrofurancarboxylate hemiketal moiety.* Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions, 1996. 1(13) p. 1517-1521.
 129. delaPuente, M.L., S.V. Ley, M.S.J. Simmonds, y W.M. Blaney, *Chemistry of insect antifeedants from Azadirachta indica .21. Synthesis of model compounds of azadirachtin using a decalin framework as a functional group scaffolding.* Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions, 1996. 1(13) p. 1523-1529.
 130. Ley, S.V., J.C. Anderson, W.M. Blaney, E.D. Morgan, R.N. Sheppard, M.S.J. Simmonds, A.M.Z. Slawin, S.C. Smith, D.J. Williams, y A. Wood, *Chemistry of insect antifeedants from Azadirachta indica. 2. Characterization and structure activity*

- relationships of some novel rearranged azadirachtins*. Tetrahedron, 1991. 47(44) p. 9231-9246.
131. Ley, S.V., A.A. Somovilla, H.B. Broughton, D. Craig, A.M.Z. Slawin, P.L. Toogood, y D.J. Williams, *Chemistry of insect antifeedants from Azadirachta indica*. 4. *Synthesis towards the limonoid azadirachtin. Preparation of functionalized decalin fragment*. Tetrahedron, 1989. 45(7) p. 2143-2164.
 132. Emanuel, M.A. y N. Benkeblia, *Processing of ackee fruit (Blighia sapida L.): present and future perspectives*, en *Acta Horticulturae*. 2011. p. 211-213.
 133. Oliveira, C., E.P. Schenkel, G. Gosman, J.C. Palazzo de Melo, L. Auler Menz, y P. Ros, *Farmacognosia: Da planta ao Medicamento*. 1999: UFSC.
 134. Rodriguez, E.M., *The wood of Argentine Sapindaceae. Structure, characteristics, and applications*. Revista de Facultad de Agronomia y Veterinaria [Buenos Aires], 1958. 14(2) p. 271-305.
 135. Diczbalis, Y., B. Nicholls, I. Groves, y K. Lake, *Sapindaceae production and research in Australia*. Acta Horticulturae, 2010. 863 p. 49-58.
 136. Diczbalis, Y.A., *Nutrition management of tropical fruits grown in north Queensland, Australia*. Acta Horticulturae, 2008. 772 p. 375-379.
 137. Vichitrananda, S. y S. Somsri, *Tropical fruit production in Thailand*. Acta Horticulturae, 2008. 787 p. 33-46.
 138. Muthukumran, P., V.H. Begumand, y P. Kalaiarasan, *Anti-diabetic activity of Dodonaea viscosa (L) leaf extracts*. International Journal of Pharmaceutical and Technical Research, 2011. 3(1) p. 136-139.
 139. Simpson, B., D. Claudie, N. Smith, J.P. Wang, R. McKinnon, y S. Semple, *Evaluation of the anti-inflammatory properties of Dodonaea polyandra, a Kaanju traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. 132(1) p. 340-343.
 140. Sofidiya, M.O., F.O. Jimoh, A.A. Aliero, A.J. Afolayan, O.A. Odukoya, y O.B. Familoni, *Antioxidant and antibacterial properties of Lecaniodiscus cupanioides*. Research Journal of Microbiology, 2008. 3(2) p. 91-98.
 141. Veeramani, C., G. Pushpavalli, y K.V. Pugalendi, *In vivo antioxidant and hypolipidemic effect of Cardiospermum halicacabum leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 2010. 21(2) p. 107-125.
 142. Niu, H.M., D.Q. Zeng, C.L. Long, Y.H. Peng, Y.H. Wang, J.F. Luo, H.S. Wang, Y.N. Shi, G.H. Tang, y F.W. Zhao, *Clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids from Dodonaea viscosa*. Journal of Asian Natural Products Research, 2010. 12(1) p. 7-14.
 143. Arulmozhi, D.K., A. Veeranjanyulu, S.L. Bodhankar, y S.K. Arora, *Pharmacological studies of the aqueous extract of Sapindus trifoliatus on central nervous system: possible antimigraine mechanisms*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. 97(3) p. 491-496.
 144. Dharmani, P., P.K. Mishra, R. Maurya, V.S. Chauhan, y G. Palit, *Allophylus serratus: A plant with potential anti-ulcerogenic activity*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. 99(3) p. 361-366.
 145. Waako, P.J., B. Gumede, P. Smith, y P.I. Folb, *The in vitro and in vivo antimalarial activity of Cardiospermum halicacabum L. and Momordica foetida Schumch. et Thonn*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. 99(1) p. 137-143.

146. Getie, M., T. Gebre-Mariam, R. Rietz, C. Hohne, C. Huschka, M. Schmidtke, A. Abate, y R.H.H. Neubert, *Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants Dodonaea viscosa, Rumex nervosus and Rumex abyssinicus*. Fitoterapia, 2003. 74(1-2) p. 139-143.
147. Diaz, M. y C. Rossini, *Bioactive Natural Products from Sapindaceae Deterrent and Toxic Metabolites Against Insects*, en *Insecticides - Pest Engineering*, F. Perveen, Editor. 2012, Intech: Rijeka, Croatia
148. Getie, M., T. Gebre-Mariam, R. Rietz, y R.H.H. Neubert, *Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of Dodonaea viscosa (Sapindaceae)*. Pharmazie, 2002. 57(5) p. 320-322.
149. Wollenweber, E. y J.N. Roitman, *New reports on surface flavonoids from Chamaebatiaria (Rosaceae), Dodonaea (Sapindaceae), Elsholtzia (Lamiaceae), and Silphium (Asteraceae)*. Natural Product Communications, 2007. 2(4) p. 385-389.
150. Quintana de Oliveira, S., M.T. Rojo de Almeida, F. Maraslis, I.T. Silva, T.C. Marques, J.A. Palermo, G.M. Cabrera, M. Soriano, C.M. Oliveira, y E.P. Schenkel, *Isolation of three new ent-labdane diterpenes from Dodonaea viscosa Jacquin (Sapindaceae): Preliminary evaluation of antiherpes activity*. Phytochemistry Letters, 2012. 5 p. 500-505.
151. Mahmoud, I., F.A. Moharram, M.S. Marzouk, H.S.M. Soliman, y R.A. El-Dib, *Two new flavonol glycosides from leaves of Koeleria paniculata*. Pharmazie, 2001. 56(7) p. 580-582.
152. Bousserouel, H., M. Litaudon, B. Morleo, M.T. Martin, O. Thoison, O. Nosjean, J.A. Boutin, P. Renard, y T. Sevenet, *New biologically active linear triterpenes from the bark of three Newcaledonian Cupaniopsis species*. Tetrahedron, 2005. 61(4) p. 845-851.
153. Benlekehal, H., M. Clotteau, M. Dornier, y M. Reynes, *An Amazonian product particularly rich in caffeine: the seed of guarana [Paullinia cupana H.B.K. var. sorbilis (Mart.) Ducke]*. Fruits (Paris), 2001. 56(6) p. 423-435.
154. Sousa, S.A., S.F. Alves, J.A.M. de Paula, T.S. Fiuza, J.R. Paula, y M.T.F. Bara, *Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana (Paullinia cupana Kunth, Sapindaceae) by high performance liquid chromatography*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2009. 20(6) p. 866-870.
155. Avato, P., I. Rosito, P. Papadia, y F.P. Fanizzi, *Cyanolipid-rich seed oils from Allophylus natalensis and A. dregeanus*. Lipids, 2005. 40(10) p. 1051-1056.
156. Arruda, W., G.M. Cavares Oliveira, y I. Garcia da Silva, *Morphological alterations of Aedes aegypti larvae exposed to Magonia pubescens extract*. Entomologia y Vectores, 2003. 10(1) p. 47-60.
157. Rahman, S.S., M.M. Rahman, S.A. Begum, M.M.R. Khan, y M.M.H. Bhuiyan, *Investigation of Sapindus mukorossi extracts for repellency, insecticidal activity and plant growth regulatory effect*. Journal of Applied Sciences Research, 2007(Febrero) p. 95-101.
158. Zidan, Z.H., A.A. Gomaa, F.A. Afifi, E.Z. Fam, y S.M.S. Ahmed, *Bioresidual activity of certain plant extracts on some stored grain insects, in relation to seed viability*. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, 1993. 1(1) p. 113-123.

159. Abdel, A., Shadia, y E.A. Omer, *Bio-evaluation of dodonaea, Dodonaea viscosa L. Jacq. extracts on the cotton leafworm, Spodoptera littoralis (Boisd.) as indicated by life table parameters*. Annals of Agricultural Science (Cairo), 1995. 40(2) p. 891-900.
160. Deepa, B. y O.K. Remadevi, *Contact toxicity of the leaf extracts of Dodonaea viscosa (Sapindaceae) to Spodoptera litura (Fab.)*. Hexapoda, 2007. 14(1) p. 66-67.
161. El-Din, M.M. y S.E. El-Gengaihi, *Joint action of some botanical extracts against the Egyptian cotton leafworm Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2000. 10(1/2) p. 51-56.
162. Malarvannan, S., S. Sekar, V.R. Prabavathy, y N. Sudha, *Individual and synergistic efficacy of leaf powder of Argemone mexicana against tobacco caterpillar, Spodoptera litura Fab, (Noctuidae: Lepidoptera)*. Emerging trends of researches in insect pest management and environmental safety, Volume I, 2008 p. 155-164.
163. Khan, A., F. Gumbs, A. Persad, y *Pesticidal bioactivity of ackee (Blighia sapida Koenig) against three stored-product insect pests*. Tropical Agriculture 2002. 79(4) p. 217-223.
164. Mikolajczak, K.L., R.V. Madrigal, C.R. Smith, y D.K. Reed, *Insecticidal effects of cyanolipids on 3 species of stored product insects, European Corn-Borer (Lepidoptera, Pyralidae) larvae, and striped cucumber beetle (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Journal of Economic Entomology, 1984. 77(5) p. 1144-1148.
165. Perez, D., J. Iannaccone, y H. Pinedo, *Toxicological effect from the stem cortex of the amazonic plant soapberry Paullinia clavigera (Sapindaceae) upon three arthropods*. Ciencia E Investigacion Agraria, 2010. 37(3) p. 133-143.
166. Silva, H.H.G.d., I.G.d. Silva, R.M.G. dos Santos, E. Rodrigues Filho, y C.N. Elias, *Larvicidal activity of tannins isolated of Magonia pubescens St. Hil. (Sapindaceae) against Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2004. 37(5) p. 396-9.
167. Macedo, M.L.R., M.d.G.M. Freire, J.C. Novello, y S. Marangoni, *Talisia esculenta lectin and larval development of Callosobruchus maculatus and Zabrotes subfasciatus (Coleoptera: Bruchidae)*. Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects, 2002. 1571(2) p. 83-88.
168. Abou-Zaid, M.M., B.V. Helson, C. Nozzolillo, y J.T. Arnason, *Ethyl m-digallate from red maple, Acer rubrum L., as the major resistance factor to forest tent caterpillar, Malacosoma disstria Hbn.* Journal of Chemical Ecology, 2001. 27(12) p. 2517-2527.
169. Klein Gebbinck, E.A., B.J.M. Jansen, y A. de Groot, *Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds*. Phytochemistry, 2002. 61(7) p. 737-770.
170. Sosa, M.E. y C.E. Tonn, *Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects*. Phytchemical Reviews, 2008. 7(1) p. 3-24.
171. Omosa, L.K., J.O. Midiwo, S. Derese, A. Yenesew, M.G. Peter, y M. Heydenreich, *neo-Clerodane diterpenoids from the leaf exudate of Dodonaea angustifolia*. Phytochemistry Letters, 2010. 3(4) p. 217-220.
172. Wabo, H.K., P. Chabert, P. Tane, O. Note, M.F. Tala, J. Peluso, C. Muller, H. Kikuchi, Y. Oshima, y A. Lobstein, *Labdane-type diterpenes and flavones from Dodonaea viscosa*. Fitoterapia, 2012. 83(5) p. 859-63.
173. Gomig, F., E.F. Pietrovski, A. Guedes, E.M. Dalmarco, M.T. Calderari, C.L. Guimaraes, R.M. Pinheiro, D.A. Cabrini, y M.F. Otuki, *Topical anti-inflammatory*

- activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008. 118(2) p. 220-224.
174. Broggini, L.S.C., R.S. Fernandes, T. Nogueira, F.R. Suzano, A.L. Caetano, H.S. Buck, L.B. Couto, S.C. Franca, y P.S. Pereira, *Behavioral and enzymatic bioassays with Serjania erecta* Radlk., Sapindaceae, correlated with cognitive dysfunctions. *Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2010. 20(4) p. 519-528.
 175. Arruda, A.P.C.C.B.N., R.G. Coelho, N.K. Honda, C. Ferrazoli, A. Pott, y C.A. Hiruma-Lima, *Gastroprotective Effect of Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): involvement of sensory neurons, endogenous nonprotein sulphhydryls, and nitric oxide. *Journal of Medicinal Food*, 2009. 12(6) p. 1411-1415.
 176. Slomp, L., P.S. Pereira, S.d.C. Franca, S. Zingaretti, y R.O. Beleboni, *In vitro nematocidal effects of medicinal plants from Sao Paulo state, Brazil*. *Pharmaceutical Biology*, 2009. 47(3) p. 230-235.
 177. Rodrigues, A.M.S., J.E. De Paula, N. Degallier, J.F. Molez, y L.S. Espindola, *Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2006. 22(2) p. 314-317.
 178. de Mesquita, M.L., J. Desrivot, C. Bories, A. Fournet, J.E. de Paula, P. Grellier, y L.S. Espindola, *Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005. 100(7) p. 783-787.
 179. de Lima, M.R.F., J.d.S. Luna, A.F. dos Santos, M.C.C. de Andrade, A.E.G. Sant'Ana, J.P. Genet, B. Marquez, L. Neuville, y N. Moreau, *Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006. 105(1/2) p. 137-147.
 180. Ekabo, O.A., N.R. Farnsworth, T.O. Henderson, G.H. Mao, y R. Mukherjee, *Antifungal and molluscicidal saponins from Serjania salzmanniana*. *Journal of Natural Products*, 1996. 59(4) p. 431-435.
 181. David, J.P., M. Meira, J.M. David, H.N. Brandao, A. Branco, M.d.F. Agra, M.R.V. Barbosa, L.P. de Queiroz, y A.M. Giulietti, *Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants*. *Fitoterapia*, 2007. 78(3) p. 215-218.
 182. Polanco-Hernandez, G., F. Escalante-Erosa, K. Garcia-Sosa, K. Acosta-Viana, M.J. Chan-Bacab, H. Sagua-Franco, J. Gonzalez, L. Osorio-Rodriguez, R.E. Moo-Puc, y L.M. Pena-Rodriguez, *In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula*. *Parasitology Research*, 2012. 110(1) p. 31-35.
 183. Polanco-Hernandez, G., F. Escalante-Erosa, K. Garcia-Sosa, M.J. Chan-Bacab, H. Sagua-Franco, J. Gonzalez, L. Osorio-Rodriguez, y L.M. Pena-Rodriguez, *Metabolites from the leaf extract of Serjania yucatanensis with trypanocidal activity against Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 2012. 111(1) p. 451-455.
 184. *Encyclopedia of life*. 2012 29/10/12; <http://eol.org/>.
 185. Carrere, R. (2011) *Una planta trepadora indigena con gran potencial apicola: isipo timbo (Serjania meridionalis)*.
 186. Kubitzki, K., *The Families and Genera of Vascular Plants*. . Vol. Vol. X Flowering Plants Eudicots. Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceas. 2011.
 187. Marwah, R.G., M.O. Fatope, R. Al Mahrooqi, G.B. Varma, H. Al Abadi, y S.K.S. Al-Burtamani, *Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman*. *Food Chemistry*, 2007. 101(2) p. 465-470.

188. Sofidiya, M.O., F.O. Jimoh, A.A. Aliero, A.J. Afolayan, O.A. Odukoya, y O.B. Familoni, *Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of six Sapindaceae members*. Journal of Medicinal Plants Research. 6(1) p. 154-160.
189. Bradacs, G., L. Maes, y J. Heilmann, *In vitro Cytotoxic, Antiprotozoal and Antimicrobial Activities of Medicinal Plants from Vanuatu*. Phytoterapy Research, 2010. 24 p. 800-809.
190. Zhang, X.-Y., X.-H. Cai, y X.-D. Luo, *Chemical constituents of Allophylus longipes*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012. 10(1) p. 36-39.
191. Rodriguez, T.V., J.V. Gonzales, L.M. Sanchez, M.N. Perez, y E.M. Faz, *Detection and determination of chemical groups in an extract of Allophylus cominia (L.)*. Journal of Herbal Pharmacotherapy, 2005. 5(4) p. 31-8.
192. Ciepichal, E., J. Wojcik, T. Bienkowski, M. Kania, M. Swist, W. Danikiewicz, A. Marczewski, J. Hertel, Z. Matysiak, E. Swiezewska, y T. Chojnacki, *Alloprenols: novel alpha-trans-polyprenols of Allophylus caudatus*. Chemistry and Physics of Lipids, 2007. 147(2) p. 103-112.
193. David, J.P., I.D. dos Santos, y J.M. David, *A new sesquiterpene from the fruits of Allophylus laevigatus*. Fitoterapia, 2004. 75(7-8) p. 795-798.
194. <http://micol.fcien.edu.uy/flora/Allophylus-edulis.html>.
<http://micol.fcien.edu.uy/flora/Allophylus-edulis.html>.
195. Hoffmann-Bohm, K.L., Hermann; Seligmann, Otto; Wagner, Hildebert., *Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the leaves of Allophyllus edulis var. edulis and gracilis*. Planta Medica, 1992. 58(6) p. 544-8.
196. Arisawa, M.M., Yuuji; Nishi, Yumiko; Ueno, Hajime; Suzuki, Shoichi; Hayashi, Toshimitsu; Shimizu, Mineo; Yoshizaki, Masao; Morita, Naokata; Berganza, Luis H., *Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Constituents of angiotensin converting enzyme inhibitory fraction from "Cocu," Allophylus edulis Radlk*. Shoyakugaku Zasshi, 1989. 43(1) p. 78-80.
197. Yajia, M.E., D.A. Marti, C.J. Bidau, A.G. Amat, A.G. Riglos, y A. Silvestroni, *Genotoxicity evaluation of Allophylus edulis (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract*. Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare Wocmap-2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology, 1999(501) p. 31-35.
198. <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD393S/AD393s13.htm>.
<http://www.fao.org/DOCREP/006/AD393S/AD393s13.htm>.
199. Körbes, V.C., *Plantas medicinais*. . 48 ed. 1995: Francisco Beltrão: Associação de Estudo, Orientação e Assistência Social.
200. Gonzalez Coloma, A., M. Reina, R. Cabrera, P. Castanera, y C. Gutierrez, *Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from Senecio palmensis to Colorado potato beetle*. Journal of Chemical Ecology, 1995. 21(9) p. 1255-1270.
201. Aichholz, R., V. Spitzer, y E. Lorbeer, *Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from Sapindaceae seed oils with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography, A, 1997. 787(1 + 2) p. 181-194.
202. Braekman, J.C., D. Daloze, y J.M. Pasteels, *Cyanogenic and other glucosides in a Neo-Guinean bug Leptocoris isolata. Possible precursors in its host plant*. Biochemical Systematics and Ecology, 1982. 10(4) p. 355-3664.

203. Díaz, M., A. González, I. Castro-Gamboa, D. Gonzáles, y C. Rossini, *First record of L-quebrachitol in Allophylus edulis (Sapindaceae)*. Carbohydrate Research, 2008. 343(15) p. 2699-2700.
204. Dominguez, X.A., R. Franco, C.G. Cano, y C.N. Chavez, *Medicinal Plants of Mexico. Part XLIV. Isolation of 3,6,4'-trimethoxy-5,7-dihydroxyflavone from chapuliztle (Dodonaea viscosa var. angustifolia Jacq)*. Revista Latinoamericana de Quimica, 1981. 11 p. 150-151.
205. Watt, J.M. y M.G. Breyer-Brandwijk, *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2nd ed, ed. L. E and S Livingstone. 1981, London.
206. Mata, R., J.L. Contreras, D. Crisanto, R. Pereda-Miranda, P. Castaeda, y F. Del Rio, *Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, XVIII. New Secondary Metabolites from Dodonaea viscosa*. Journal of Natural Products, 1991. 54(3) p. 913-917.
207. Wagner, H., C. Ludwig, L. Grotjahn, y M.S.Y. Khan, *Biologically active saponins from Dodonaea viscosa*. Phytochemistry, 1987. 26(3) p. 697-701.
208. Mengiste, B., E. Makonnen, y K. Urga, *In vivo antimalarial activity of Dodonaea angustifolia seed extracts against Plasmodium berghei in mice model*. Momona Ethiopian Journal of Science, 2012. 4(1) p. 47-63.
209. Rajeswari, V.D., S. Gajalakshmi, P. Jayanthi, y S. Vijayalakshmi, *Pharmacological activities of Dodonaea viscosa: a perspective review*. Journal of Pharmacy Research, 2011. 4(10) p. 3331-3333.
210. Riaz, T., M.A. Abbasi, R. Aziz Ur, T. Shahzadi, M. Ajaib, y K.M. Khan, *Phytochemical screening, free radical scavenging, antioxidant activity and phenolic content of Dodonaea viscosa Jacq*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2012. 77(4) p. 423-435.
211. Veerapur, V.P., K.R. Prabhakar, V.K. Parihar, B. Punit, K.K. Srinivasan, K.I. Priyadarsini, y M.K. Unnikrishnan, *Antidiabetic, hypolipidaemic and antioxidant activity of Dodonaea viscosa aerial parts in streptozotocin-induced diabetic rats*. International Journal of Phytomedicine, 2010. 2(1) p. 59-70.
212. Veerapur, V.P., K.R. Prabhakar, B.S. Thippeswamy, P. Bansal, K.K. Srinivasan, y M.K. Unnikrishnan, *Antidiabetic effect of Dodonaea viscosa (L). Lacq. aerial parts in high fructose-fed insulin resistant rats: A mechanism based study*. Indian Journal of Experimental Biology, 2010. 48(8) p. 800-810.
213. Ahmad, M., Q. Mahmood, K. Gulzar, M.S. Akhtar, M. Saleem, y M.I. Qadir, *Antihyperlipidemic and Hepatoprotective Activity of Dodonaea viscosa Leaves Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rabbits (Oryctolagus cuniculus)*. Pakistan Veterinary Journal, 2011. 32(1) p. 50-54.
214. Arun, M. y V.V. Asha, *Gastroprotective effect of Dodonaea viscosa on various experimental ulcer models*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. 118(3) p. 460-465.
215. Rajamanickam, V., A. Rajasekaran, K. Anandarajagopal, M. Palanivelu, M. Jesupillai, y V. Sivakumar, *Anti-ulcer activity of various extracts of roots of Dodonaea viscosa*. International Journal of Chemical Sciences, 2009. 7(4) p. 2675-2679.
216. Rajamanickam, V., A. Rajasekaran, K. Anandarajagopal, D. Sridharan, K. Selvakumar, y B.S. Rathinaraj, *Anti-diarrheal activity of Dodonaea viscosa root extracts*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2010. 1(4) p. P-185.

217. Muhammad, K., H. Abdul, M.U. Amin, G. Ahtasham, U. Naseem, H. Mohammad, Q. Abdul, K.A. Chishti, y M. Wajeeha, *Phytochemical screening and in vitro evaluation of anticandidal activity of Dodonaea viscosa (L.) Jacq. (Sapindaceae)*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011. 5(11) p. 1422-1426.
218. Patel, M. y M.M. Coogan, *Antifungal activity of the plant Dodonaea viscosa var. angustifolia on Candida albicans from HIV-infected patients*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. 118(1) p. 173-176.
219. Pirzada, A.J., W. Shaikh, K. Usmanghani, y E. Mohiuddin, *Antifungal activity of Dodonaea viscosa Jacq extract on pathogenic fungi isolated from superficial skin infection*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. 23(3) p. 337-340.
220. Teshome, K., T. Gebre-Mariam, K. Asres, y E. Engidawork, *Toxicity Studies on Dermal Application of Plant Extract of Dodonaea viscosa used in Ethiopian Traditional Medicine*. Phytotherapy Research, 2010. 24(1) p. 60-69.
221. Malarvannan, S., R. Giridharan, S. Sekar, V.R. Prabavathy, y S. Nair, *Ovicidal activity of crude extracts of few traditional plants against Helicoverpa armigera (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera)*. Journal of Biopesticides, 2009. 2(1) p. 64-71.
222. Malarvannan, S., S.S. Kumar, V.R. Prabavathy, y N. Sudha, *Individual and synergistic effects of leaf powder of few medicinal plants against American bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera)*. Asian Journal of Experimental Sciences, 2008. 22(1) p. 79-88.
223. Malarvannan, S. y H.D. Subashini, *Efficacy of Dodonaea angustifolia crude extracts against spotted bollworm, Earias vitella (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Journal of Entomology, 2007. 4(3) p. 243-247.
224. Sharaby, A., H. Abdel-Rahman, y S. Moawad, *Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, Phthorimaea operculella Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2009. 16(1) p. 1-9.
225. Zhao, H., X. Qin, y M. Yang, *Preliminary study contact toxicity of extracts from Dodonaea viscosa seed against Sitophilus oryzae*. Journal of Yunnan Agricultural University, 2006. 22(6) p. 942-944.
226. Ortega, A., P.E. Garcia, J. Cardenas, C. Mancera, S. Marquina, M.L.D. Garduno, y E. Maldonado, *Methyl dodonates, a new type of diterpenes with a modified clerodane skeleton from Dodonaea viscosa*. Tetrahedron, 2001. 57(15) p. 2981-2989.
227. Banerjee, H.N., *Clerodin from Clerodendron infortunatum*. Science and Culture, 1936. 2 p. 163.
228. Huang, Z., M.-Y. Jiang, Z.-Y. Zhou, y D. Xu, *Two new clerodane diterpenes from Dodonaea viscosa*. Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences, 2010. 65(1) p. 83-86.
229. Osvaldo Salinas-Sanchez, D., M. Herrera-Ruiz, S. Perez, E. Jimenez-Ferrer, y A. Zamilpa, *Anti-inflammatory activity of hautriwaic acid isolated from Dodonaea viscosa leaves*. Molecules, 2012. 17(4) p. 4292-4299.
230. Simpson, B.S., D.J. Claudie, J.P. Gerber, S.M. Pyke, J. Wang, R.A. McKinnon, y S.J. Semple, *In vivo activity of benzoyl ester clerodane diterpenoid derivatives from Dodonaea polyandra*. Journal of Natural Products, 2011. 74(4) p. 650-657.
231. Jefferie, P.R., J.R. Knox, y B. Scaf, *Structure elucidation of some ent-clerodane diterpenes from Dodonaea boroniaefolia and Cyanostegia angustifolia*. Australian Journal of Chemistry, 1973. 26(10) p. 2199-2211.

232. Zhang, L.-B., J. Ji, C. Lei, H.-Y. Wang, Q.-S. Zhao, y A.-J. Hou, *Isoprenylated flavonoid and adipogenesis-promoting constituents of Dodonaea viscosa*. Journal of Natural Products, 2012. 75(4) p. 699-706.
233. Teffo, L.S., M.A. Aderogba, y J.N. Eloff, *Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from Dodonaea viscosa Jacq. var. angustifolia leaf extracts*. South African Journal of Botany, 2010. 76(1) p. 25-29.
234. Muhammad, A., I. Anis, Z. Ali, S. Awadelkarim, A. Khan, A. Khalid, M.R. Shah, M. Galal, I.A. Khan, y M.I. Choudhary, *Methylenebissantin: A rare methylene-bridged bisflavonoid from Dodonaea viscosa which inhibits Plasmodium falciparum enoyl-ACP reductase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012. 22(1) p. 610-612.
235. Simpson, B.S., D.J. Claudie, N.M. Smith, J.P. Gerber, R.A. McKinnon, y S.J. Semple, *Flavonoids from the leaves and stems of Dodonaea polyandra: A Northern Kaanju medicinal plant*. Phytochemistry, 2010. 72(14-15) p. 1883-1888.
236. Cao, S., P. Brodie, M. Callmander, R. Randrianaivo, J. Razafitsalama, E. Rakotobe, V.E. Rasamison, K. TenDyke, Y. Shen, E.M. Suh, y D.G.I. Kingston, *Antiproliferative triterpenoid saponins of Dodonaea viscosa from the Madagascar dry forest*. Journal of Natural Products, 2009. 72(9) p. 1705-1707.
237. Alonso-Paz, E., *Personal Communication*. 2010.
238. Cassel, E., C. Bedinot, y R.M.V. Vargas, *Equipamento de extração supercrítica e processo de obtenção de extratos*. Solicitação de Patente. 2011: Brasil.
239. Ruffinengo, S., M. Eguaras, I. Floris, C. Faverin, P. Bailac, y M. Ponzi, *LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on Varroa destructor*. Journal of Economical Entomology, 2005. . 98 p. 651-655.
240. Muller, C. y M. Riederer, *Plant surface properties in chemical ecology*. Journal of Chemical Ecology, 2005. 31(11) p. 2621-2651.
241. Cui, K., K. Li, y S.-x. Liao, *Physiological and biochemical response of Dodonaea viscosa seeds to desiccation*. Forest Research, 2011. 24(5) p. 619-626.
242. Luzia, D.M.M. y N. Jorge, *Evaluating of the activity antioxidant and fatty acids profile of lychee seeds (Litchi chinensis Sonn.)*. Nutrition & Food Science, 2011. 41(4) p. 261-267.
243. Zhao, Y.-X., W.-J. Liang, H.-J. Fan, Q.-Y. Ma, W.-X. Tian, H.-F. Dai, H.-Z. Jiang, N. Li, y X.-F. Ma, *Fatty acid synthase inhibitors from the hulls of Nephelium lappaceum L.* Carbohydrate Research, 2011. 346(11) p. 1302-1306.
244. Abburra, R.E., J.A. Zygodlo, y C.A. Guzman, *Fatty acids variation in Sapindaceae*. Biochemical Systematics and Ecology, 1992. 20(5) p. 469-71.
245. Kapur, K.K. y A.S. Gupta, *Component fatty acids of Dodonea viscosa seed fat*. Journal of Scientific and Industrial Research, Section B. Physical Sciences, 1959. 18B p. 528-30.
246. Greenway, A.R., D.C. Griffiths, y S.L. Lloyd, *Response of Myzus persicae to components of aphid extracts and to carboxylic acids*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1978. 24(3) p. 369-374.
247. Phelan, P.L. y J.R. Miller, *Post-landing behavior of alate Myzus persicae as altered by (E)- β -farnesene and three carboxylic acids*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1982. 32 p. 46 -53.

248. Puritch, G.S., *The toxic effects of fatty acids and their salts on the Balsam Woolly Aphid, Adelges piceae* (Ratz.). Canadian Journal of Forest Research, 1975. 5 p. 515-522.
249. Shepherd, T., G.W. Robertson, D.W. Griffiths, y A.N.E. Birch, *Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (Rubus idaeus L.)*. Phytochemistry, 1999. 52(7) p. 1239-1254.
250. Sherwood, M.H., A.R. Greenway, y D.C. Griffiths, *Responses of Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae) to plants treated with fatty acids*. Bulletin of Entomological Research, 1981. 71(1) p. 133-136.
251. Tong-Xian, L. y P.A. Stansly, *Insecticidal activity of surfactants and oils against silverleaf whitefly (Bemisia argentifolii) nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on collards and tomato*. Pest Management Science, 2000. 56 p. 861-866.
252. Rudman, P. y F. Gay, *The causes of natural durability in timber. Part XXI. The anti-termite activity of some fatty acids, esters and alcohols*. Holzforschung, 1967. 21(1) p. 24-26.
253. Scheffrahn, R. y M. Rust, *Drywood termite feeding deterrents sugar pine and antitermitic activity of related compounds*. Journal of Chemical Ecology, 1982. 9(1) p. 39-55.
254. Bird, T., P. Hedin, y M. Burks, *Feeding deterrent compounds to the boll weevil, Anthonomus grandis Boheman in Rose of Sharon, Hibiscus syriacus L.* Journal of Chemical Ecology, 1987. 13(5) p. 1087-1097.
255. Eriksson, C., *Isolation, synthesis and structure-activity relationships of antifeedants against the Pine Weevil, Hylobius abietis*, in Organic Chemistry, Department of Chemistry. 2006, Royal Institute of Technology (KTH): Stockholm. p. 53.
256. Honda, H. y W. Bowers, *Feeding and oviposition deterrent activities of flower buds of globemallow, Sphaeralcea emoryi Torrey, against boll weevil, Anthonomus grandis Boheman (Coleoptera: Curculionidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1996. 22(1) p. 139-150.
257. Mansson, P.E., F. Schlyter, C. Eriksson, y K. Sjodin, *Nonanoic acid, other alkanolic acids, and related compounds as antifeedants in Hylobius abietis pine weevils*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2006. 121(3) p. 191-201.
258. Ramsewak, R.S., M.G. Nair, S. Murugesan, W.J. Mattson, y J. Zasada, *Insecticidal fatty acids and triglycerides from Dirca palustris*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. 49(12) p. 5852-5856.
259. Castillo, L., M. Díaz, A. González-Coloma, A. González, E. Alonso-Paz, M.J. Bassagoda, y C. Rossini, *Clytostoma callistegioides (Bignoniaceae) wax extract with activity on aphid settling*. Phytochemistry, 2010. 72 p. 252-257.
260. Rucker, G., *Sesquiterpenes*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1973. 12(10) p. 793-806.
261. Carda, M., E. Falomir, J. Murga, S. Rodríguez, y F. González, *Productos Naturales*, ed. D.d.Q.I.y. Orgánica. 1997, Valencia: Universidad Jaime I.
262. Reina, M., M. Nold, O. Santana, J.C. Orihuela, y A. Gonzalez-Coloma, *C-5-substituted antifeedant silphinene sesquiterpenes from Senecio palmensis*. Journal of Natural Products, 2002. 65(4) p. 448-453.
263. Ragasa, C.Y., J. Ganzon, J. Hofilena, B. Tamboong, y J.A. Rideout, *A new furanoid diterpene from Caesalpinia pulcherrima*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2003. 51(10) p. 1208-1210.

264. Ben Jemaa, M.J., N. Tersim, K.T. Toudert, y M.L. Khouja, *Insecticidal activities of essential oils from leaves of Laurus nobilis L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition*. Journal of Stored Products Research, 2012. 48 p. 97-104.
265. Gois, R.W.d.S., L.M.d. Sousa, T.L.G. Lemos, A.M.C. Arriaga, M. Andrade-Neto, G.M.P. Santiago, Y.S. Ferreira, P.B. Alves, y H.C.R.d. Jesus, *Chemical composition and larvicidal effects of essential oil from Bauhinia acuruana (Moric) against Aedes aegypti*. Journal of Essential Oil Research, 2011. 23(5) p. 59-62.
266. Aguiar, J.C.D., G.M.P. Santiago, P.L. Lavor, H.N.H. Veras, Y.S. Ferreira, M.A.A. Lima, A.M.C. Arriaga, T.L.G. Lemos, J.Q. Lima, H.C.R. de Jesus, P.B. Alves, y R. Braz-Filho, *Chemical constituents and larvicidal activity of Hymenaea courbaril fruit peel*. Natural Product Communications, 2010. 5(12) p. 1977-1980.
267. Li, W.Q., C.H. Jiang, S.S. Chu, M.X. Zuo, y Z.L. Liu, *Chemical Composition and Toxicity against Sitophilus zeamais and Tribolium castaneum of the Essential Oil of Murraya exotica Aerial Parts*. Molecules, 2010. 15(8) p. 5831-5839.
268. Yang, K., Y.X. Zhou, C.F. Wang, S.S. Du, Z.W. Deng, Q.Z. Liu, y Z.L. Liu, *Toxicity of Rhododendron anthopogonoides essential oil and its constituent compounds towards Sitophilus zeamais*. Molecules, 2011. 16(9) p. 7320-7330.
269. Cantrell, C.L., J.A. Klun, C.T. Bryson, M. Kobaisy, y S.O. Duke, *Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (Callicarpa americana) and Japanese (Callicarpa japonica) beautyberry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(15) p. 5948-5953.
270. Aciole, S.D.G., C.F. Piccoli, J.E. Duque, E.V. Costa, M.A. Navarro-Silva, F.A. Marques, B. Maia, M.L.B. Pinheiro, y M.T. Rebelo, *Insecticidal activity of three species of Guatteria (Annonaceae) against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Revista Colombiana De Entomologia, 2011. 37(2) p. 262-268.
271. de Moraes, S.M., V.A. Facundo, L.M. Bertini, E.S.B. Cavalcanti, J.F. dos Anjos, S.A. Ferreira, E.S. de Brito, y M.A. de Souza Neto, *Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species*. Biochemical Systematics and Ecology, 2007. 35(10) p. 670-675.
272. Cetin, H., A. Yanikoglu, y J.E. Cilek, *Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, Culex pipiens, a West Nile virus vector*. Parasitology Research, 2011. 108(4) p. 943-948.
273. Dua, V.K., M.F. Alam, A.C. Pandey, S. Rai, A.K. Chopra, V.K. Kaul, y A.P. Dash, *Insecticidal activity of Valeriana jatamansi (Valerianaceae) against mosquitoes*. Journal of the American Mosquito Control Association, 2008. 24(2) p. 315-318.
274. Dua, V.K., A.C. Pandey, y A.P. Dash, *Adulticidal activity of essential oil of Lantana camara leaves against mosquitoes*. Indian Journal of Medical Research, 2010. 131(3) p. 434-439.
275. Zhu, L. y Y.J. Tian, *Chemical composition and larvicidal activity of Blumea densiflora essential oils against Anopheles anthropophagus: a malarial vector mosquito*. Parasitology Research, 2011. 109(5) p. 1417-1422.
276. Bachrouch, O., J. Mediouni-Ben Jemaa, A.W. Wissem, T. Talou, B. Marzouk, y M. Abderraba, *Composition and insecticidal activity of essential oil from Pistacia lentiscus L. against Ectomyelois ceratoniae Zeller and Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)*. Journal of Stored Products Research, 2010. 46(4) p. 242-247.

277. Alva, M., S. Popich, S. Borkosky, E. Cartagena, y A. Bardon, *Bioactivity of the essential oil of an Argentine collection of Acanthospermum hispidum (Asteraceae)*. Natural Product Communications, 2012. 7(2) p. 245-248.
278. Chu, S.S., Q.R. Liu, G.H. Jiang, y Z.L. Liu, *Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of Amethystea caerulea L.* Natural Product Research, 2012. 26(13) p. 1207-1212.
279. Francois, T., J.D.P. Michel, S.M. Lambert, F. Ndifor, W.N.A. Vyry, A.Z.P. Henri, y M. Chantal, *Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of Piper capense L., Piper guineense Schum. et Thonn., Piper nigrum L. and Piper umbellatum L. grown in Cameroon.* African Journal of Biotechnology, 2009. 8(3) p. 424-431.
280. Zoubiri, S. y A. Baaliouamer, *Chemical composition and insecticidal properties of Lantana camara L. leaf essential oils from Algeria.* Journal of Essential Oil Research, 2012. 24(4) p. 377-383.
281. Messer, A., K. McCormick, Sunjaya, H.H. Hagedorn, F. Tumbel, y J. Meinwald, *Defensive role of tropical tree resins - antitermitic sesquiterpenes from Southeast-Asian Dipterocarpaceae.* Journal of Chemical Ecology, 1990. 16(12) p. 3333-3352.
282. Park, I.K. y S.C. Shin, *Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (Allium sativum) and clove bud (Eugenia caryophyllata) oils against the Japanese termite (Reticulitermes speratus kolbe).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(11) p. 4388-4392.
283. Chaubey, M.K., *Fumigant toxicity of essential oils and pure compounds against Sitophilus oryzae L. (Coleoptera: Curculionidae).* Biological Agriculture & Horticulture, 2012. 28(2) p. 111-119.
284. Liu, Y.-Q., M. Xue, Q.-C. Zhang, F.-Y. Zhou, y J.-Q. Wei, *Toxicity of beta-caryophyllene from Vitex negundo (Lamiales: Verbenaceae) to Aphis gossypii Glover (Homoptera: Aphididae) and its action mechanism.* Acta Entomologica Sinica, 2010. 53(4) p. 396-404.
285. Tomova, B.S., J.S. Waterhouse, y J. Doberski, *The effect of fractionated Tagetes oil volatiles on aphid reproduction.* Entomologia Experimentalis Et Applicata, 2005. 115(1) p. 153-159.
286. Gutierrez, C., A. Fereres, M. Reina, R. Cabrera, y A. GonzalezColoma, *Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on Myzus persicae.* Journal of Chemical Ecology, 1997. 23(6) p. 1641-1650.
287. Mann, J., R.S. Davidson, J.B. Hobbs, D.V. Banthorpe, y J.B. Harborne, *Natural products: their chemistry and biological significance.* 1994, UK: Longman Group.
288. Tori, M., A. Katto, y M. Sono, *Nine new clerodane diterpenoids from rhizomes of Solidago altissima.* Phytochemistry, 1999. 52(3) p. 487-493.
289. Fazio, C., S. Passannanti, M.P. Paternostro, y F. Piozzi, *Neoclerodane diterpenoids from Stachys rosea.* Phytochemistry, 1992. 31(9) p. 3147-3149.
290. Vaccarini, C.E., S.M. Palacios, K.M. Meragelman, y V.E. Sosa, *Antifeedant activity of metabolites from Viguiera tucumanensis.* Nat. Prod. Lett., 2002. 16(5) p. 323-327.
291. Rojas, A., S. Cruz, H. PonceMonter, y R. Mata, *Smooth muscle relaxing compounds from Dodonaea viscosa.* Planta Medica, 1996. 62(2) p. 154-159.
292. Liu, Y.W., Y.B. Cheng, C.C. Liaw, C.H. Chen, J.H. Guh, T.L. Hwang, y Y.C. Shen, *Bioactive diterpenoids from Callicarpa longissima.* Planta Medica, 2012. 78(11) p. 1184-1184.

293. da Silva, H.H.G., R. Geris, E. Rodrigues Filho, C. Rocha, y I.G. da Silva, *Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant Copaifera reticulata Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)*. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 2007. 40(3) p. 264-267.
294. Geris, R., I.G. da Silva, H.H. Garcia da Silva, A. Barison, E. Rodrigues-Filho, y A.G. Ferreira, *Diterpenoids from Copaifera reticulata Ducke with larvicidal activity against Aedes aegypti (L.) (Diptera, Culicidae)*. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo, 2008. 50(1) p. 25-28.
295. Kittakoop, P., S. Wanasith, P. Watts, J. Kramyu, M. Tanticharoen, y Y. Thebtaranonth, *Potent antiviral potamogetonyde and potamogetonol, new furanoid labdane diterpenes from Potamogeton malaianus*. Journal of Natural Products, 2001. 64(3) p. 385-388.
296. Fragoso-Serrano, M., E. Gonzalez-Chimeo, y R. Pereda-Miranda, *Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant Hyptis spicigera*. Journal of Natural Products, 1999. 62(1) p. 45-50.
297. Fukushima, J., M. Yatagai, y T. Ohira, *Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of Chamaecyparis obtusa*. Journal of Wood Science, 2002. 48(4) p. 326-330.
298. Gonzalez-Coloma, A., A. Guadano, C.E. Tonn, y M.E. Sosa, *Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semi-arid lands*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 2005. 60(11-12) p. 855-861.
299. Villegas Gomez, C., M. Martinez-Vazquez, y B. Esquivel, *Antifeedant activity of anticopalic acid isolated from Vitex hemlseyi*. Zeitschrift fuer Naturforschung C Journal of Biosciences, 2009. 64(7-8) p. 502-508.
300. Rose, A.F., K.C. Jones, W.F. Haddon, y D.L. Dreyer, *Grindelane diterpenoids acids from Grindelia humilis - Feeding deterrence of diterpene acids towards aphids*. Phytochemistry, 1981. 20(9) p. 2249-2253.
301. Prachayasittikul, S., S. Suphamong, A. Worachartcheewan, R. Lawung, S. Ruchirawat, y V. Prachayasittikul, *Bioactive metabolites from Spilanthes acmella Murr.* Molecules, 2009. 14(2) p. 850-867.
302. Burns, D., W.F. Reynolds, G. Buchanan, P.B. Reese, y R.G. Enriquez, *Assignment of H-1 and C-13 spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2000. 38(7) p. 488-493.
303. Kolak, U., G. Topcu, S. Birteksoz, G. Otuk, y A. Ulubelen, *Terpenoids and steroids from the roots of Salvia blepharochlaena*. Turkish Journal of Chemistry, 2005. 29(2) p. 177-186.
304. Kojima, H., N. Sato, A. Hatano, y H. Ogura, *Constituents of the labiatae plants. 5. Sterol glucosides from Prunella vulgaris*. Phytochemistry, 1990. 29(7) p. 2351-2355.
305. Della, G.M., P. Monaco, y L. Previtera, *Stigmaterols from Typha latifolia*. Journal of Natural Products, 1990. 53 p. 1430-1435.
306. Abdel-Mogib, M., S.A. Basaif, A.M. Asiri, T.R. Sobahi, y S.M. Batterjee, *New clerodane diterpenoid and flavonol-3-methyl ethers from Dodonaea viscosa*. Pharmazie, 2001. 56(10) p. 830-831.

307. Lee, T.H., J.L. Chiou, C.K. Lee, y Y.H. Kuo, *Separation and determination of chemical constituents in the roots of Rhus javanica L. var. roxburghiana*. Journal of the Chinese Chemical Society, 2005. 52(4) p. 833-841.
308. Fayek, N.M., A.R.A. Monem, M.Y. Mossa, M.R. Meselhy, y A.H. Shazly, *Chemical and biological study of Manilkara zapota (L.) Van Royen leaves (Sapotaceae) cultivated in Egypt*. Pharmacognosy research, 2012. 4(2) p. 85-91.
309. Keawsa-ard, S., S. Natakankitkul, S. Liawruangrath, A. Teerawutgulrag, K. Trisuwan, P. Charoenying, S.G. Pyne, y B. Liawruangrath, *Anticancer and Antibacterial Activities of the Isolated Compounds from Solanum spirale Roxb. Leaves*. Chiang Mai Journal of Science, 2012. 39(3) p. 445-454.
310. Kumari, A. y P. Kakkar, *Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade*. Life Sciences, 2012. 90(15-16) p. 561-570.
311. Mishra, P.M., A. Sree, y M. Panigrahi, *Isolation of a lupane triterpene fatty acid ester with antibacterial activity from the leaves of Finlaysonia obovata*. Chemistry of Natural Compounds, 2012. 48(1) p. 161-163.
312. Sakong, B.M., A.S. Ahmed, L.J. McGaw, y J.N. Eloff, *Isolation and characterization of compounds from Calodendrum capense and Lydenburgia cassinoides with antimicrobial potential against opportunistic pathogens*. South African Journal of Botany, 2012. 79 p. 210-210.
313. Brimson, J.M., S.J. Brimson, C.A. Brimson, V. Rakkhitawatthana, y T. Tencomnao, *Rhinacanthus nasutus extracts prevent glutamate and amyloid-beta neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: possible active compounds include lupeol, stigmasterol and beta-sitosterol*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. 13(4) p. 5074-5097.
314. de Oliveira, P.V., R.P.L. Lemos, y L.M. Conserva, *Chemical constituents of Rourea doniana*. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2012. 22(2) p. 451-454.
315. Dong, L., Y. Zhang, B. Cheng, Y. Wu, Y. Li, H. Yao, y Y. Li, *Chemical Constituents from Ampelopsis sinica var. hanceh Prevent Liver Damage*. Latin American Journal of Pharmacy, 2012. 31(2) p. 195-199.
316. dos Santos, E.O., M. Meira, A.E. do Vale, J.M. David, L.P. de Queiroz, y J.P. David, *Isolation and characterization of new ceramides from aerial parts of Lepidaploa cotoneaster*. Natural Product Communications, 2012. 7(6) p. 781-783.
317. Thoison, O., T. Sevenet, H.M. Niemeyer, y G.B. Russell, *Insect antifeedant compounds from Nothofagus dombeyi and N. pumilio*. Phytochemistry (Elsevier), 2004. 65(14) p. 2173-2176.
318. Tandon, M., Y.N. Shukla, A.K. Tripathi, y S.C. Singh, *Insect antifeedant principles from Vernonia cinerea*. Phytother. Res., 1998. 12(3) p. 195-199.
319. Huang, J.G., L.J. Zhou, H.H. Xu, y W.O. Li, *Insecticidal and cytotoxic activities of extracts of Cacalia tangutica and its two active ingredients against Musca domestica and Aedes albopictus*. Journal of Economical Entomology, 2009. 102(4) p. 1444-1447.
320. Saez, J., H. Granados, G. Escobar, W. Cardona, L. Atehortua, R. Callejas, D. Cortes, y C. Gonzalez, *Piperlonguminine and stigmasterol, compounds from roots and stems of Piper auritum, and insecticidal activity of the extracts*. Revista Colombiana de Quimica, 1998. 27(1) p. 77-81.

- 321. Yan, H., R. Feng, L. Chen, A. Chen, G. Li, y X. Zhang, *Isolation, identification and insecticidal activities of six terpenoids in Sabina vulgaris*. Xibei Zhiwu Xuebao, 2007. 27(1) p. 163-167.
- 322. Shanks, C.H., Jr. y R.P. Doss, *Feeding responses by adults of five species of weevils (Coleoptera: Curculionidae) to sucrose and sterols*. Ann. Entomol. Soc. Am., 1987. 80(1) p. 41-6.
- 323. Maeshima, K., N. Hayashi, T. Murakami, F. Takahashi, y H. Komae, *Identification of chemical oviposition stimulants from rice grain for Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1985. 11(1) p. 1-9.
- 324. Santana, O., M. Reina, B.M. Fraga, J. Sanz, y A. Gonzalez-Coloma, *Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from Echium wildpretii*. Chemistry & Biodiversity, 2012. 9(3) p. 567-576.
- 325. Behmer, S.T. y D.O. Elias, *The nutritional significance of sterol metabolic constraints in the generalist grasshopper Schistocerca americana*. Journal of Insect Physiology, 1999. 45(4) p. 339-348.
- 326. Hamrouni, I., I. Chraief, M. Hammami, y B. Marzouk, *Sterol composition and accumulation in maturing borage (Borago officinalis L.) seeds*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 2005. 82(2) p. 83-86.
- 327. Schmidt, J., B. Spengler, G. Adam, y H. Budzikiewicz, *Sterol constituents in seeds of Ornithopus sativus*. Phytochemistry, 1993. 33(2) p. 506-507.
- 328. Sivakumar, G., C.B. Bati, E. Perri, y N. Uccella, *Gas chromatography screening of bioactive phytosterols from mono-cultivar olive oils*. Food Chemistry, 2006. 95(3) p. 525-528.

ANEXOS

ANEXO I - ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DE COMPUESTOS AISLADOS DE *M. AZEDARACH*.1

21 α -metilmelianodiol (42)	3
21 β -etilmelianodiol (43)	8
1-O-Detigloil-1-O-cinamoilohchinolal (44)	13
1-O-Detigloil-1-O-benzoilohchinolal (45)	17
Ohchinolal (46)	21

ANEXO II - ESPECTROS ^1H RMN Y CROMATOGRAMAS OBTENIDOS PARA LAS FRACCIONES DE LA PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE RAMAS DE *A. EDULIS*.25

Fracción hexano	27
Fracción diclorometano	29
Fracción AcOEt	31
Fracción acuosa	32

ANEXO III - ESPECTROS ^1H RMN 500 MHz DE FRACCIONES DE C1Ae.33

Extracto etanólico bruto de ramas	35
1C1Ae	35
2aC1Ae	36
2bC1Ae	36
3aC1Ae	37
4aC1Ae	37
4bC1Ae	38
5C1Ae	38
6aC1Ae	39
6bC1Ae	39
7aC1Ae	40
7bC1Ae	40
8aC1Ae	41
8bC1Ae	41

ANEXO IV - ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS DE COMPUESTOS AISLADOS DE *A. EDULIS* Y *D. VISCOSA*.43

6,7 – epoxi cariofileno (58)	45
119	49
Mezcla (2-3)C2Ae	54
120	55

Espatulenol (121)	56
Sitosterona (122)	60
Lupeol (123).....	64
Mezcla 6C2Ae	68
Sitosterol (124).....	69
Mezclas de ácidos grasos.....	73
128	78
Estigmasterol (129)	83
Estigmast-7-en-3-ol (130).....	87
Ácido palmítico (125).....	91
131	95

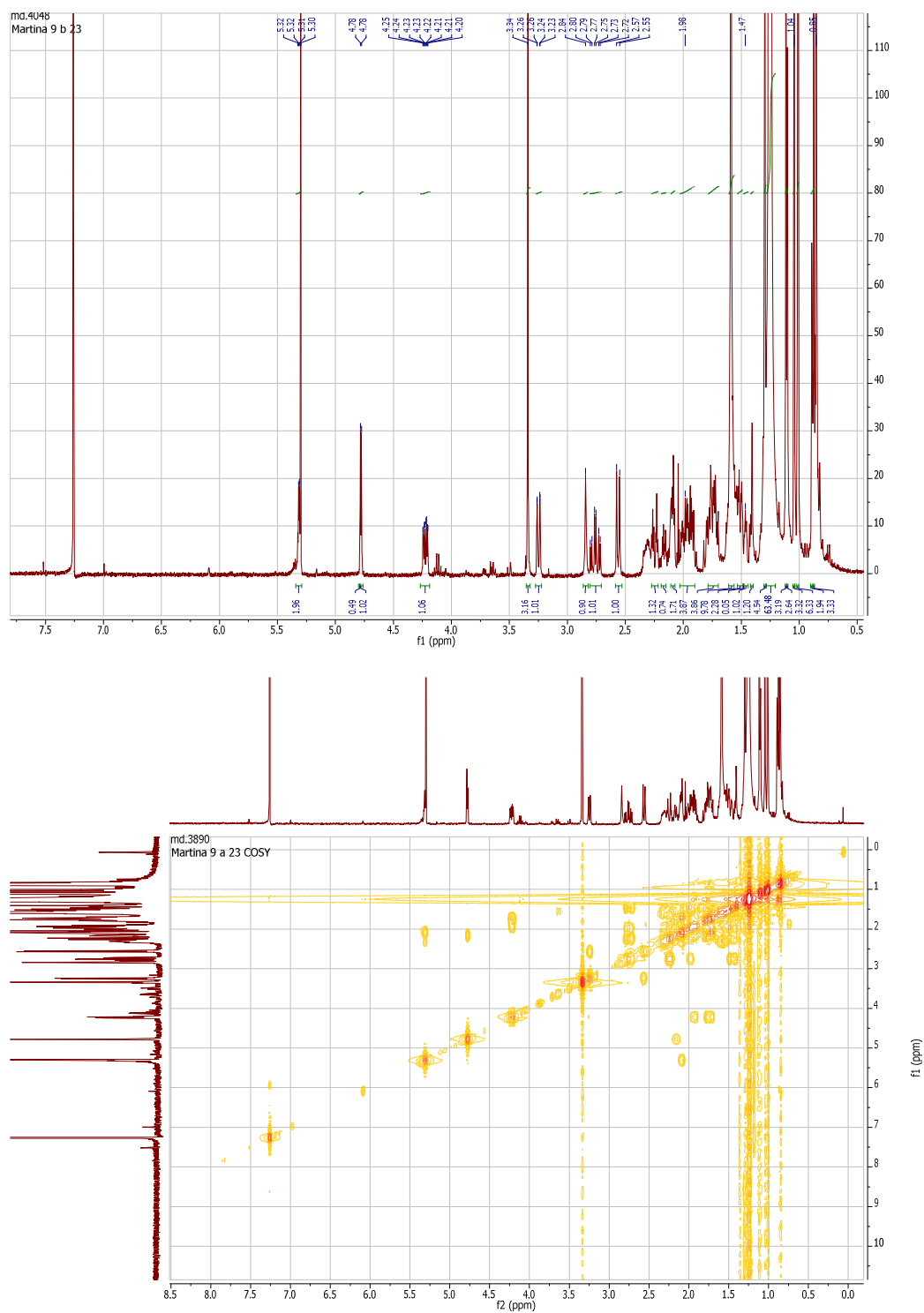
ANEXO V - ESPECTROS ¹ H RMN 500 MHZ DE FRACCIONES DE C1Dv	101
--	-----

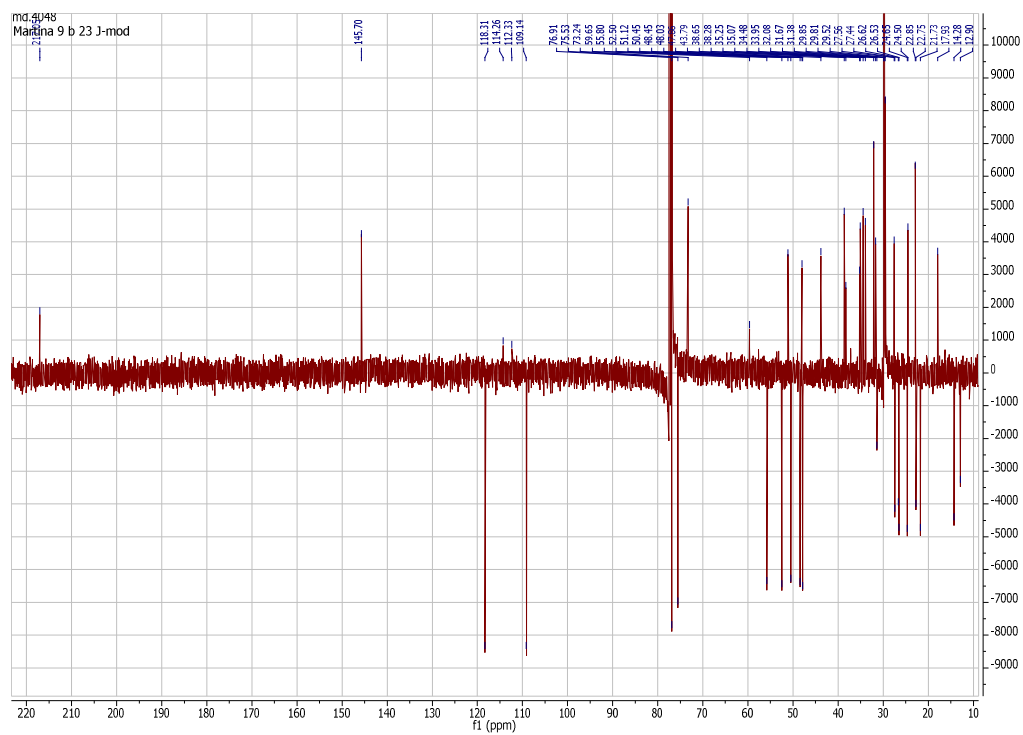
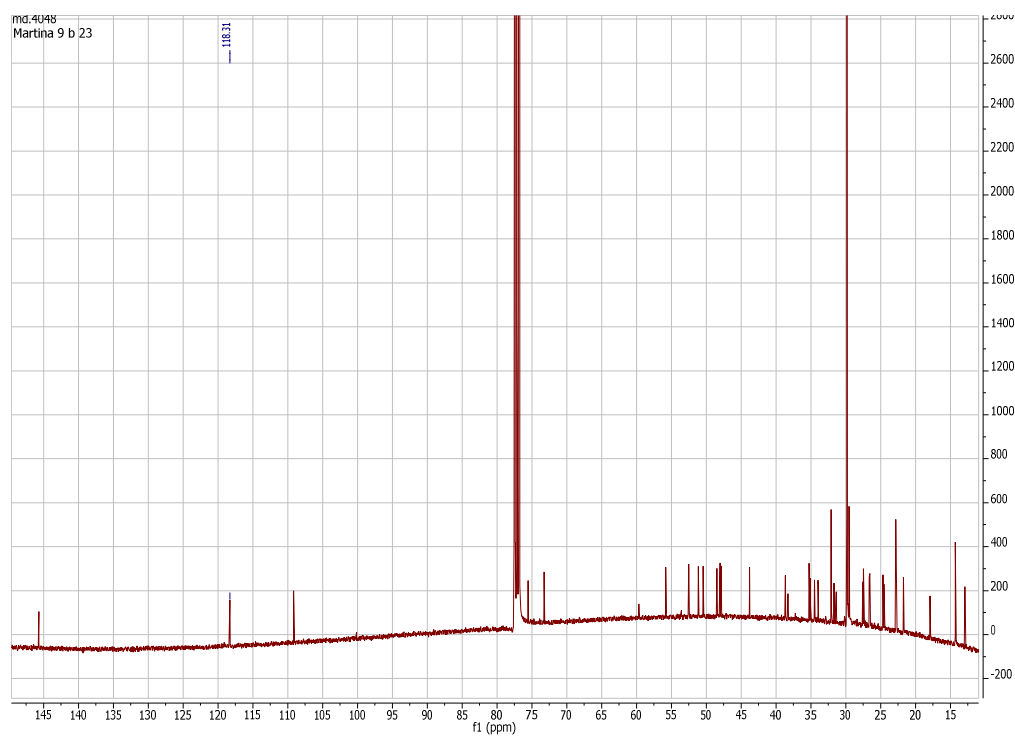
Extracto etanólico bruto de hojas	103
1C1Dv	103
2C1Dv.....	104
3aC1Dv.....	104
3bC1Dv	105
4aC1Dv.....	105
4bC1Dv	106
5aC1Dv.....	106
5bC1 Dv	107
5cC1 Dv.....	107
6aC1 Dv.....	108
6bC1 Dv	108
7C1 Dv.....	109
8aC1 Dv.....	109
8bC1 Dv	110
9aC1 Dv.....	110
9bC1 Dv	111

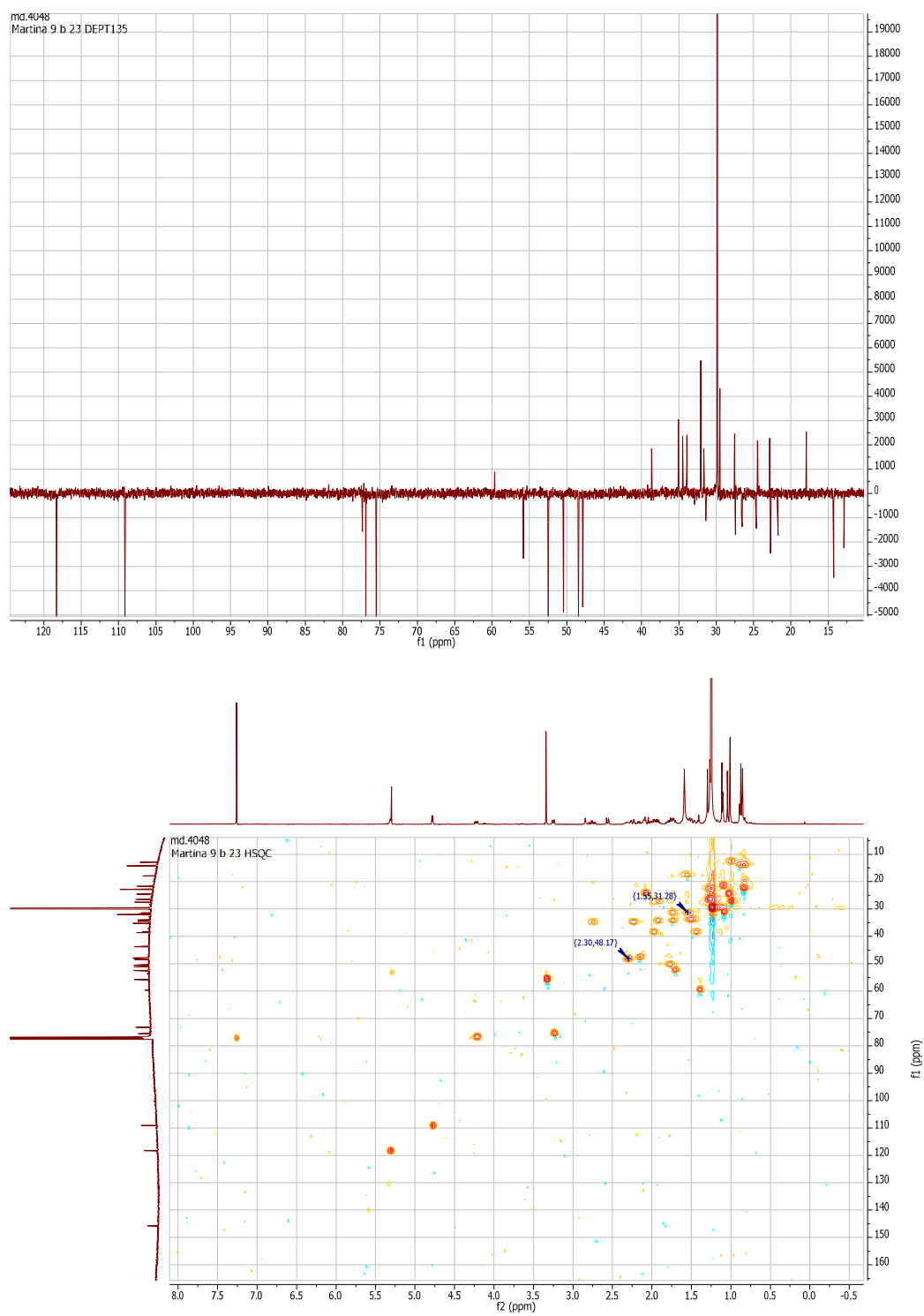
ANEXO VI- TRABAJOS PUBLICADOS.....	113
------------------------------------	-----

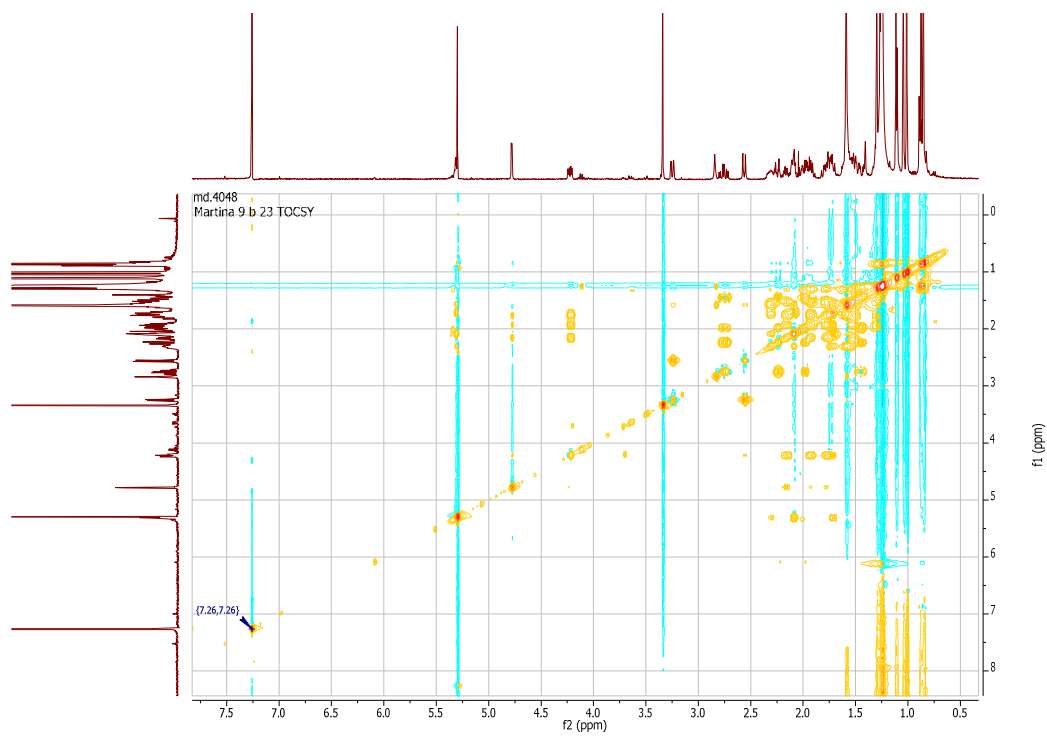
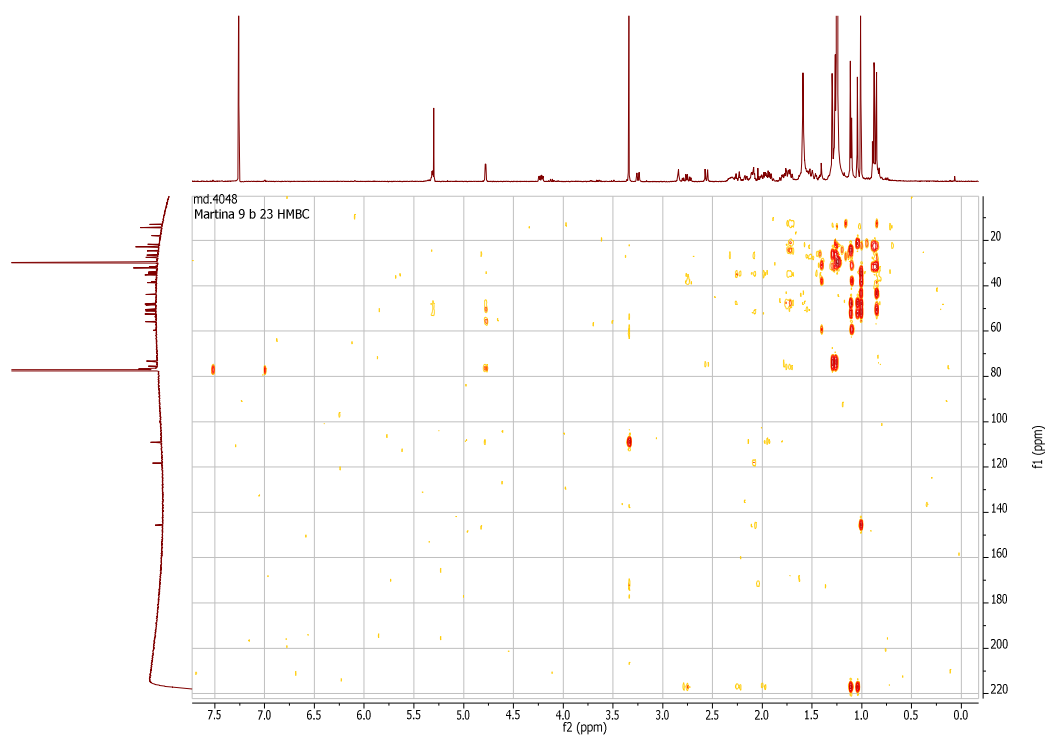
ANEXO I - Análisis espectroscópicos de compuestos aislados de *M. azedarach*.

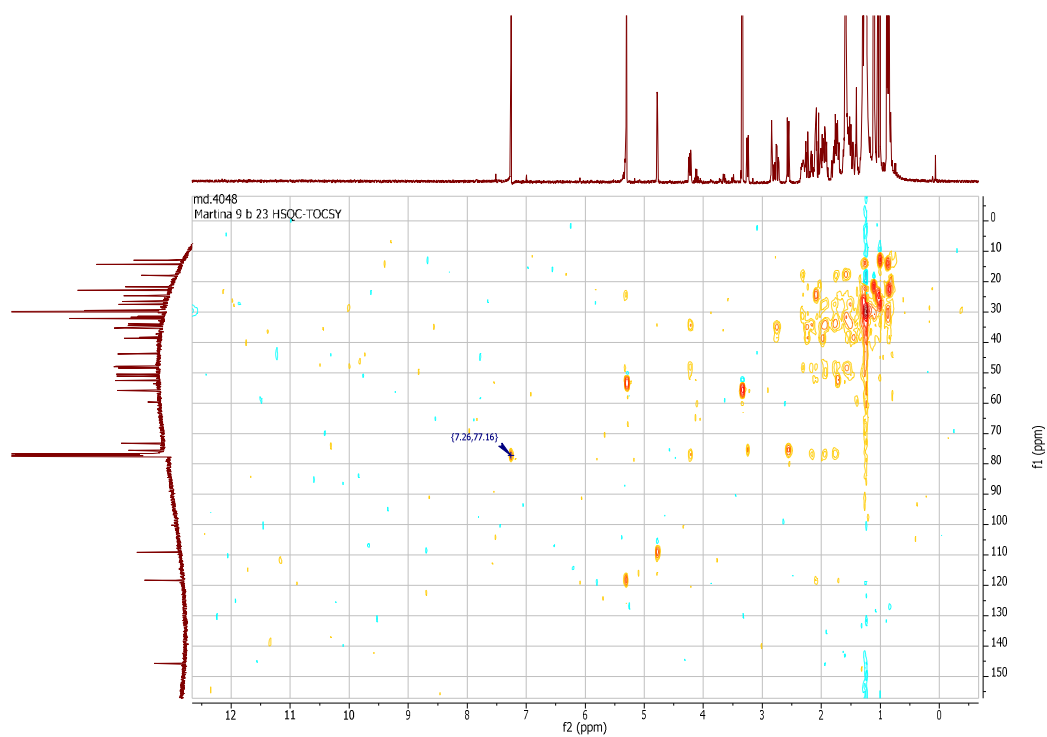
21 α -metilmelianodiol (42)



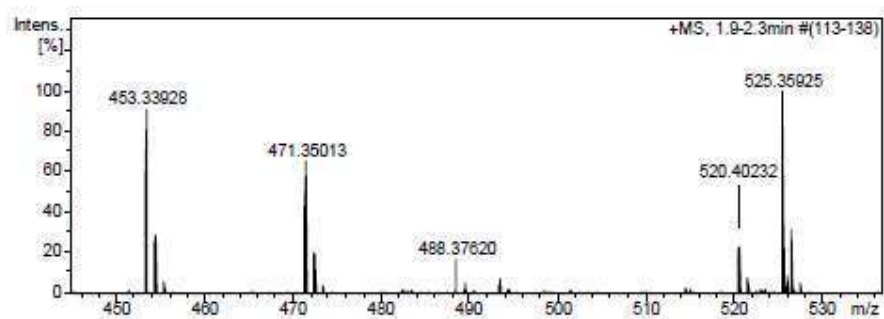
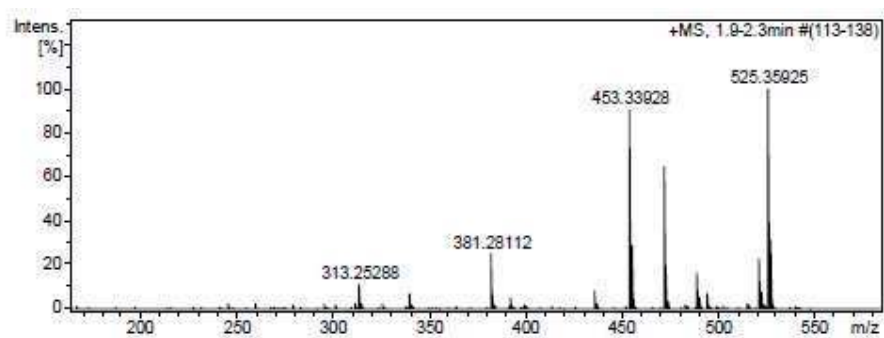




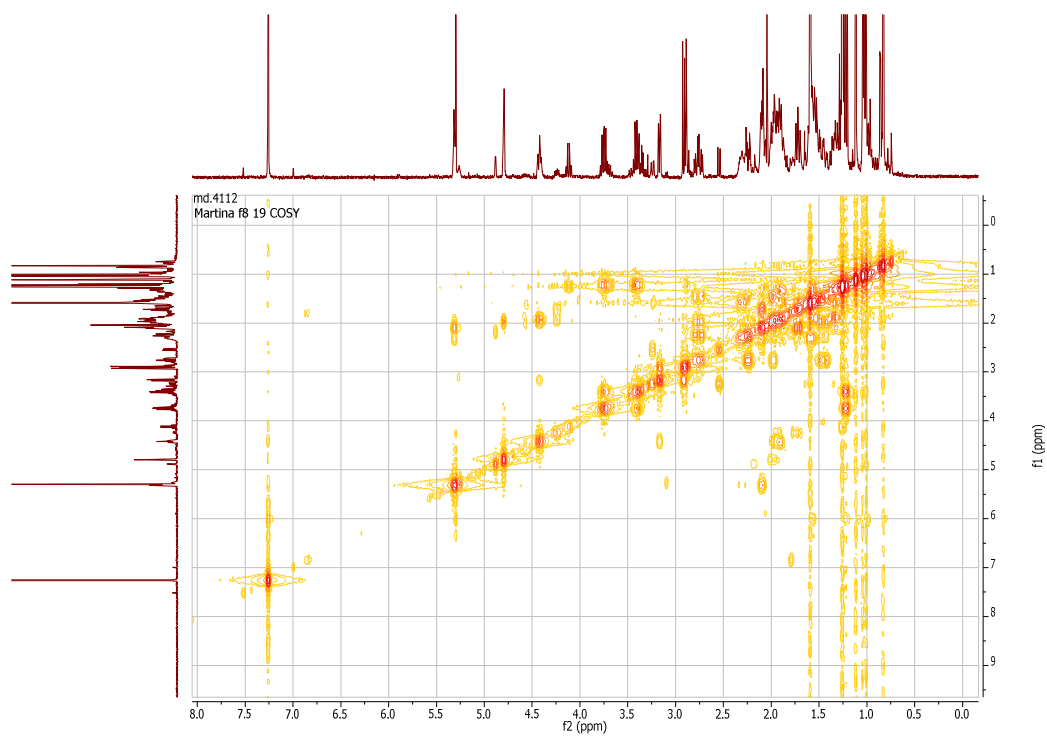
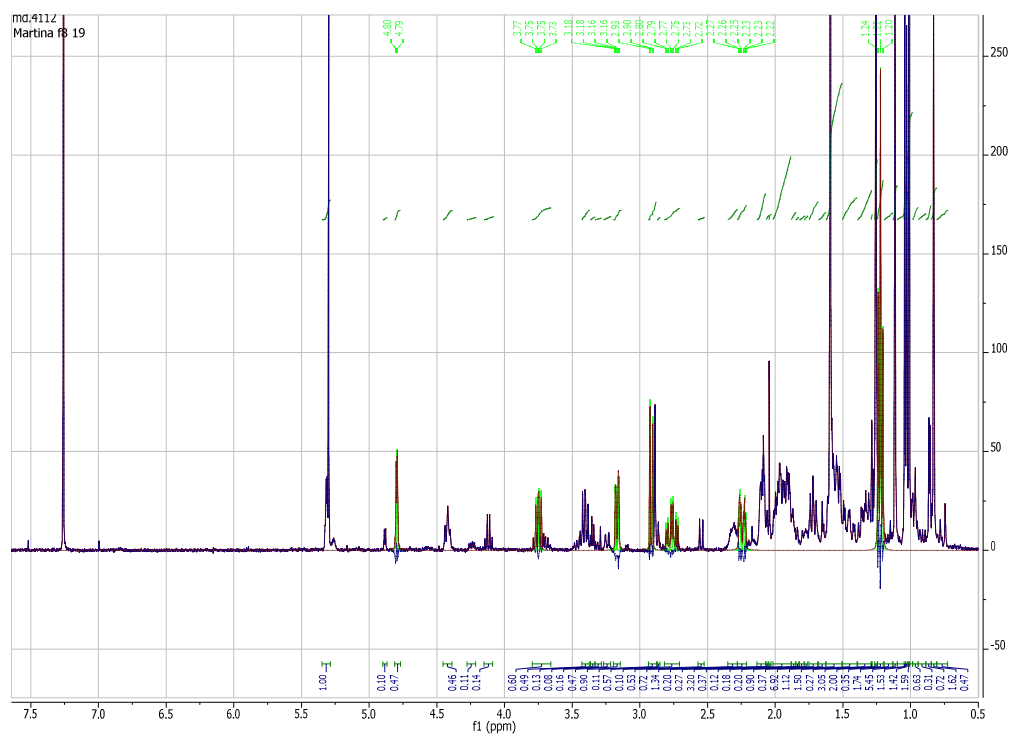


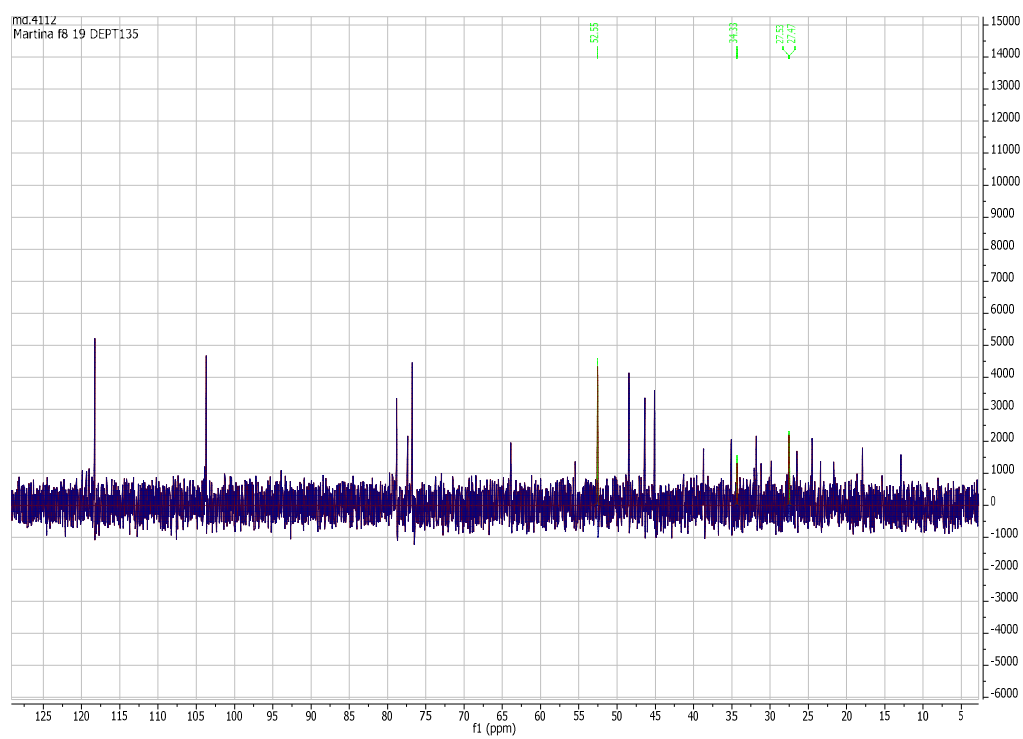
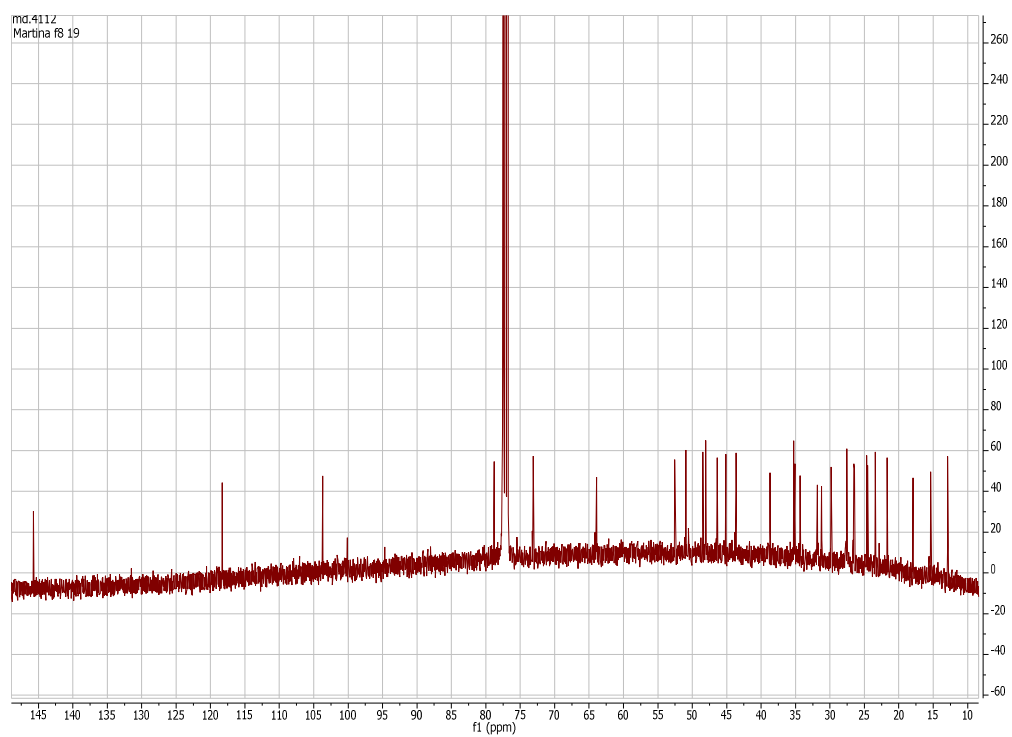


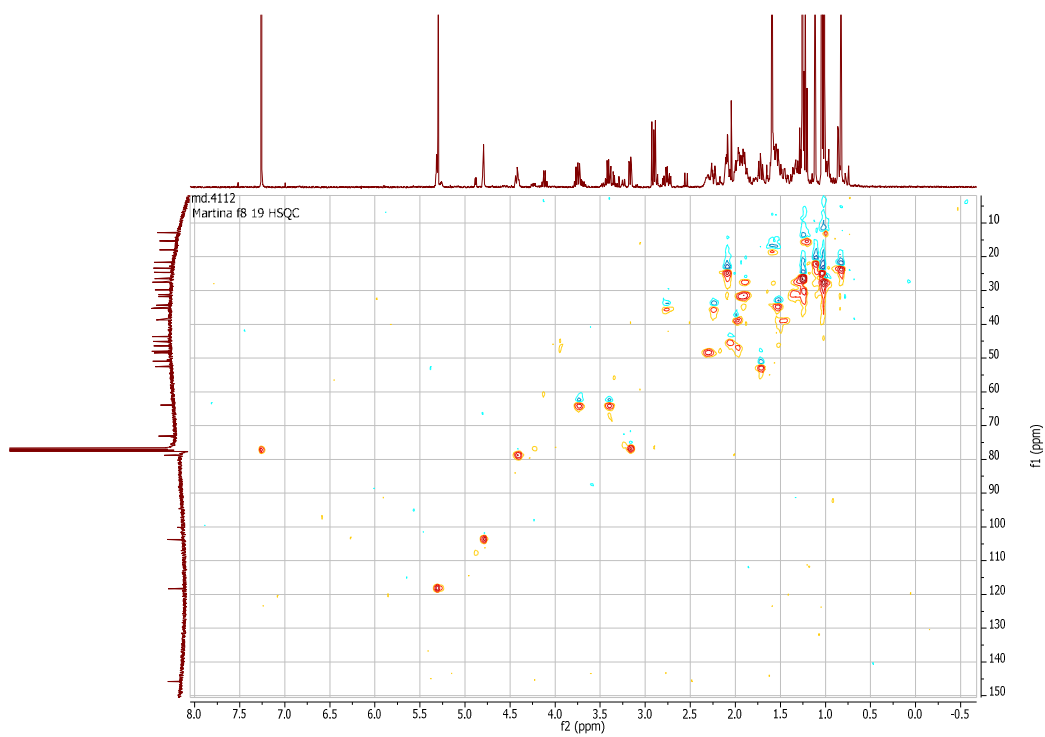
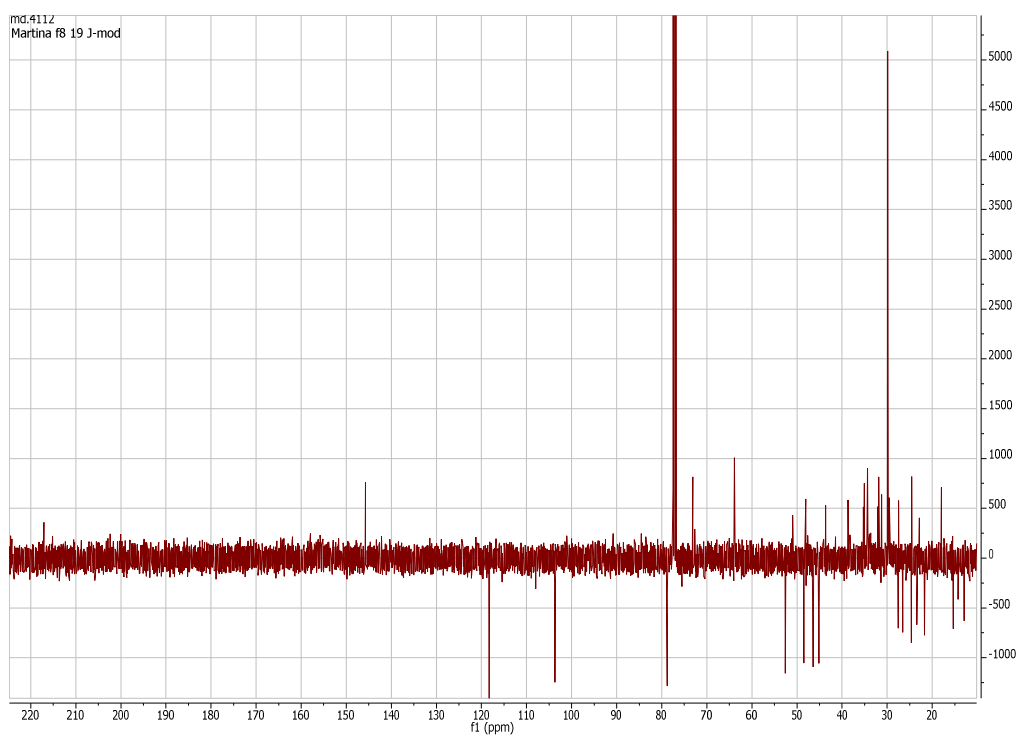
Espectro de masas de alta resolución:

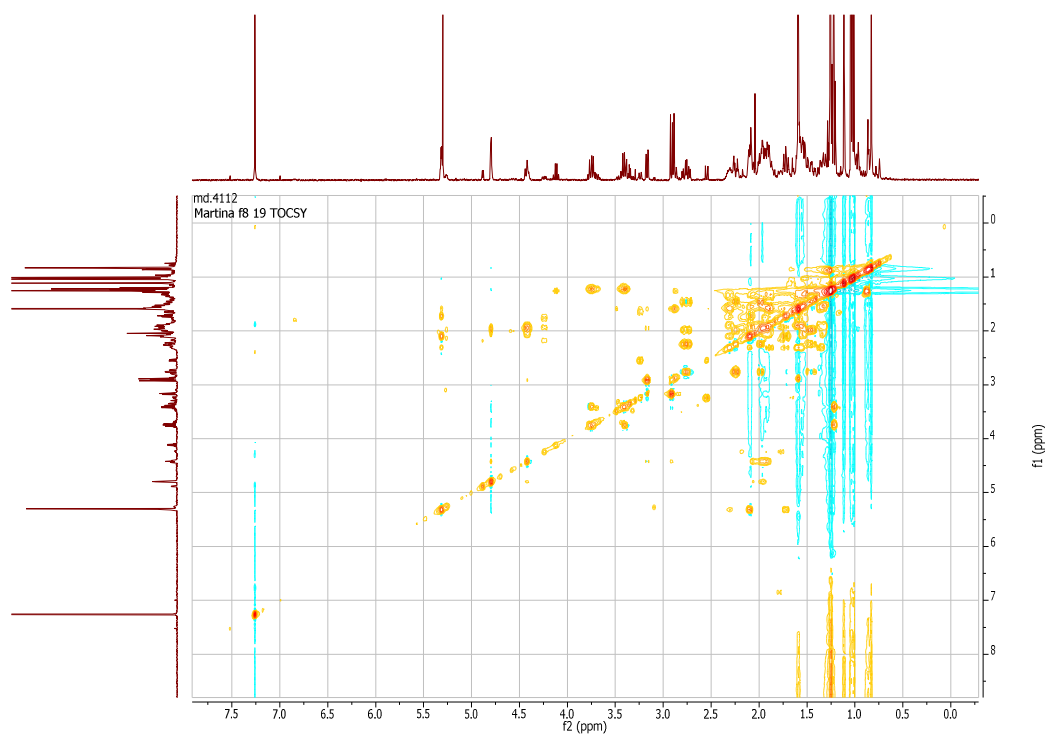
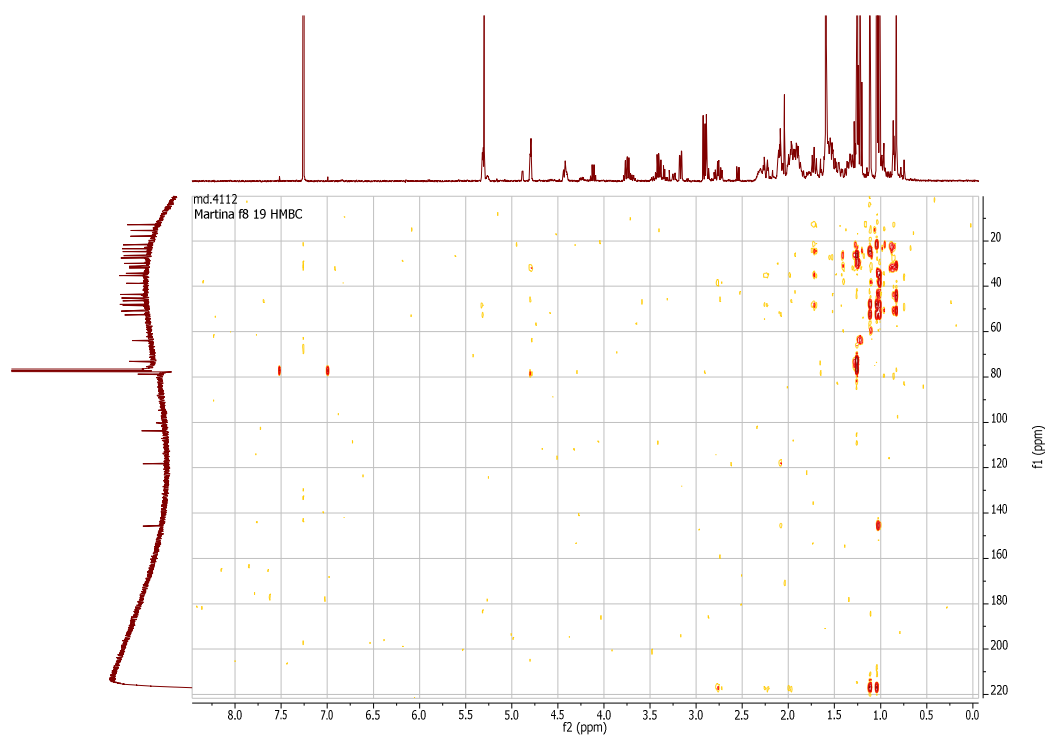


21 β -etilmelianodiol (43)

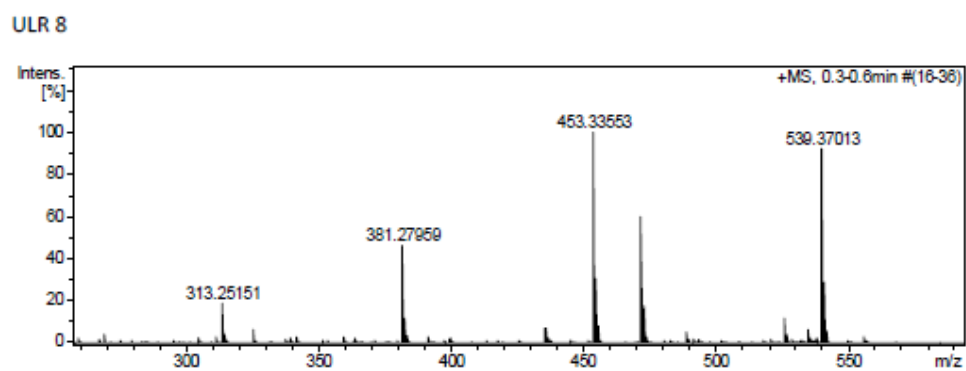




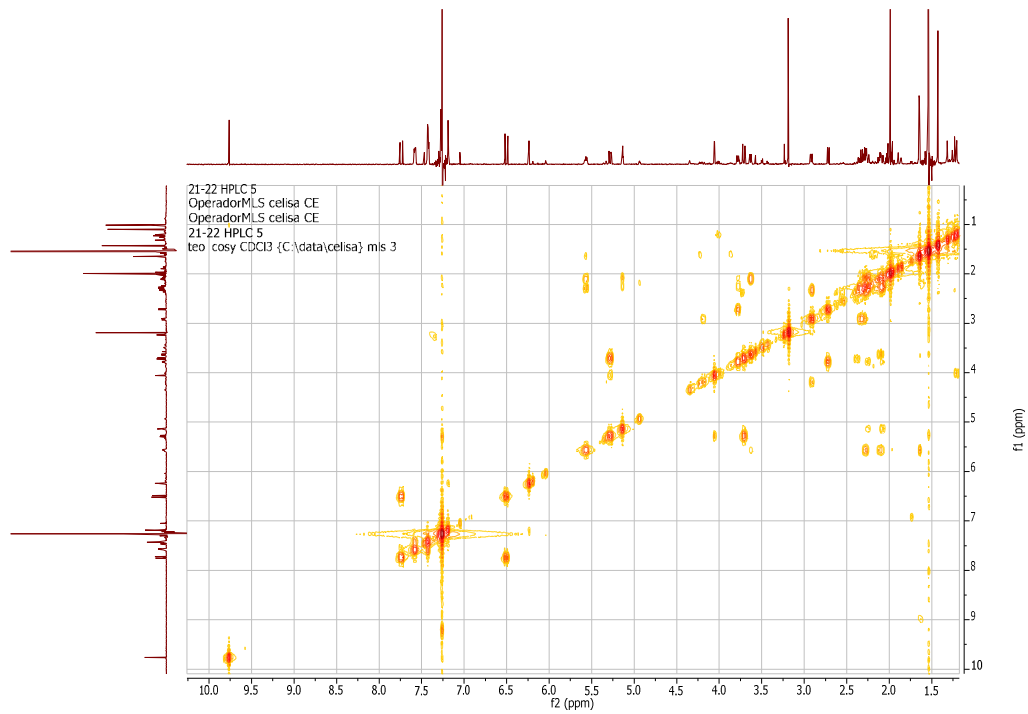
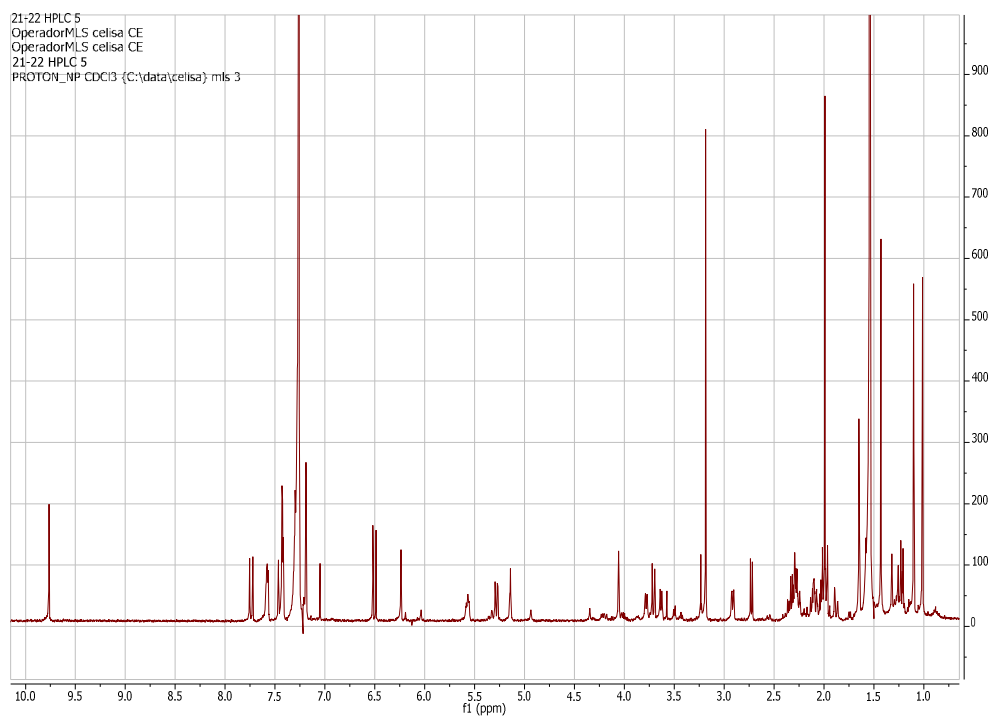


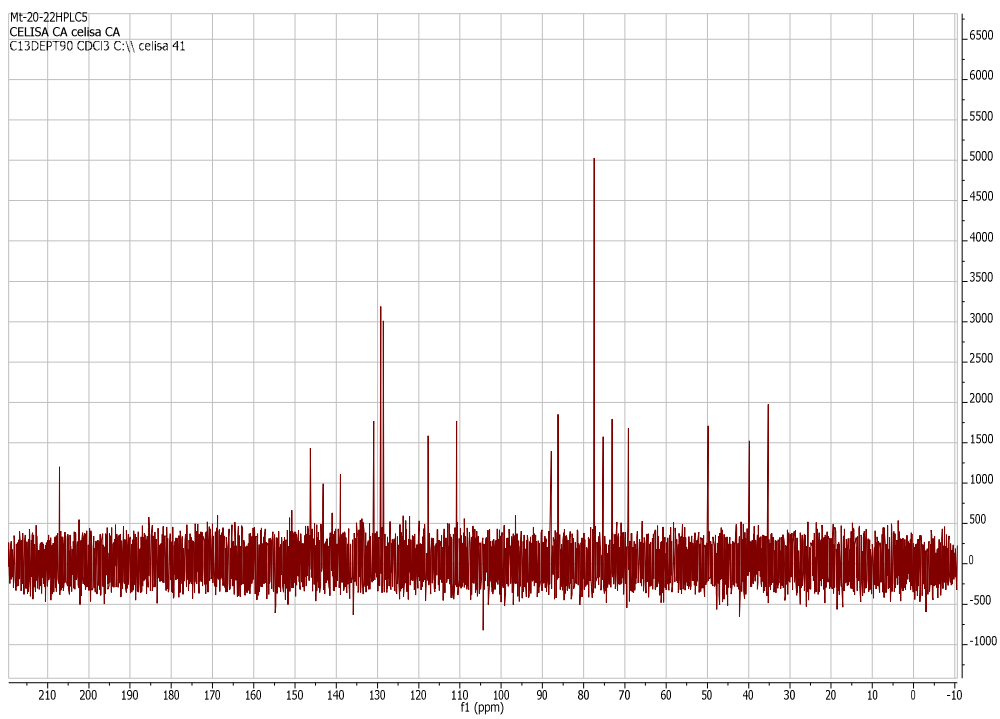
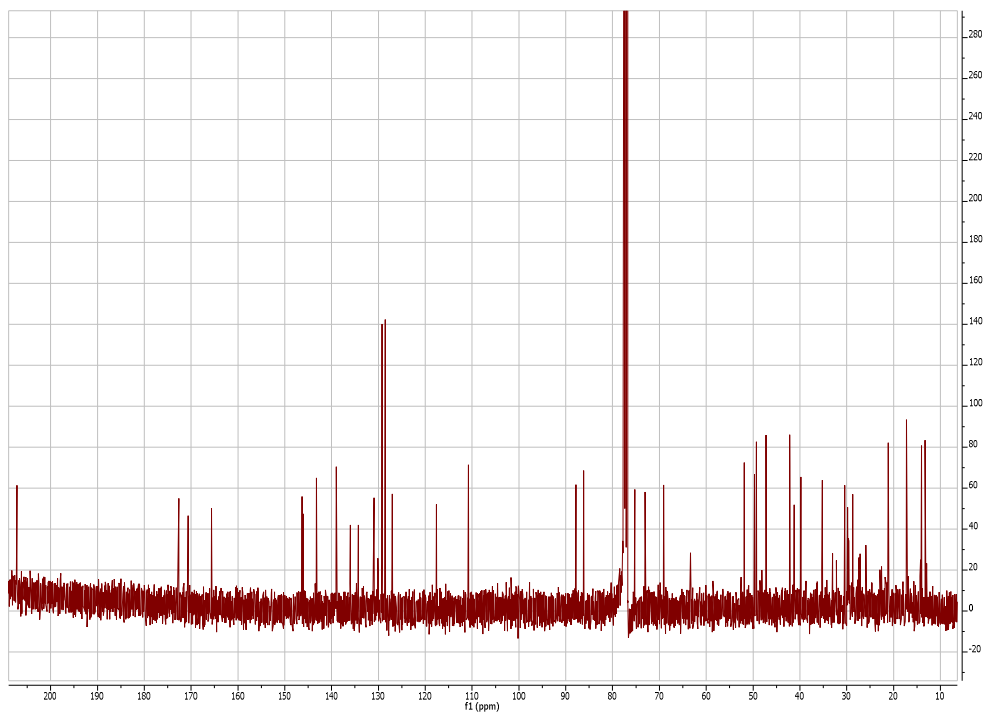


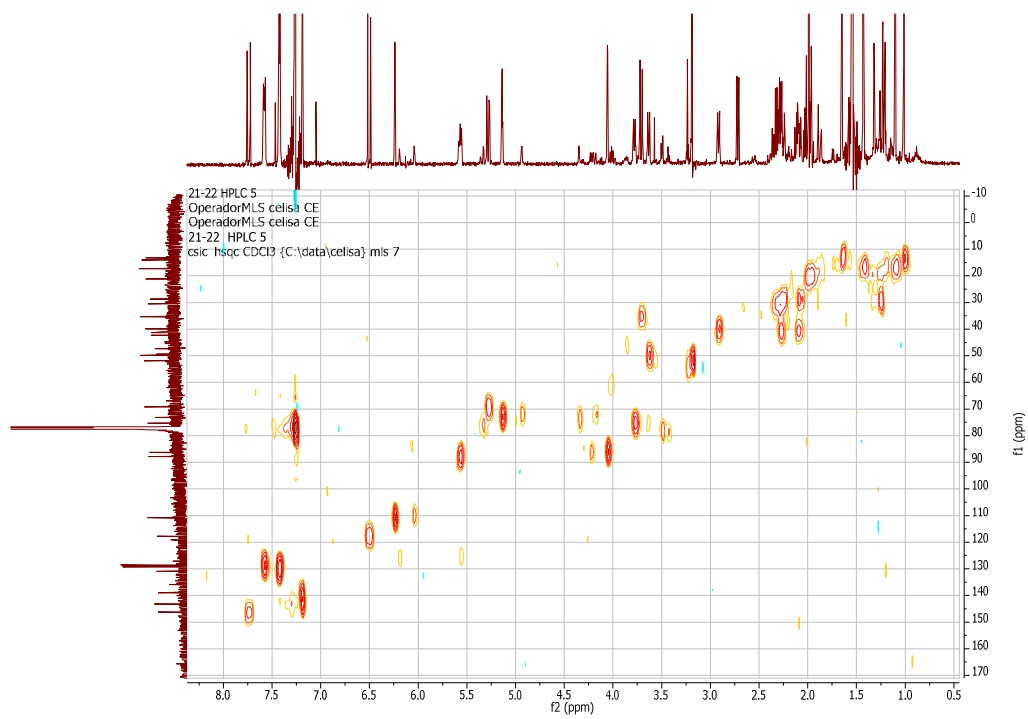
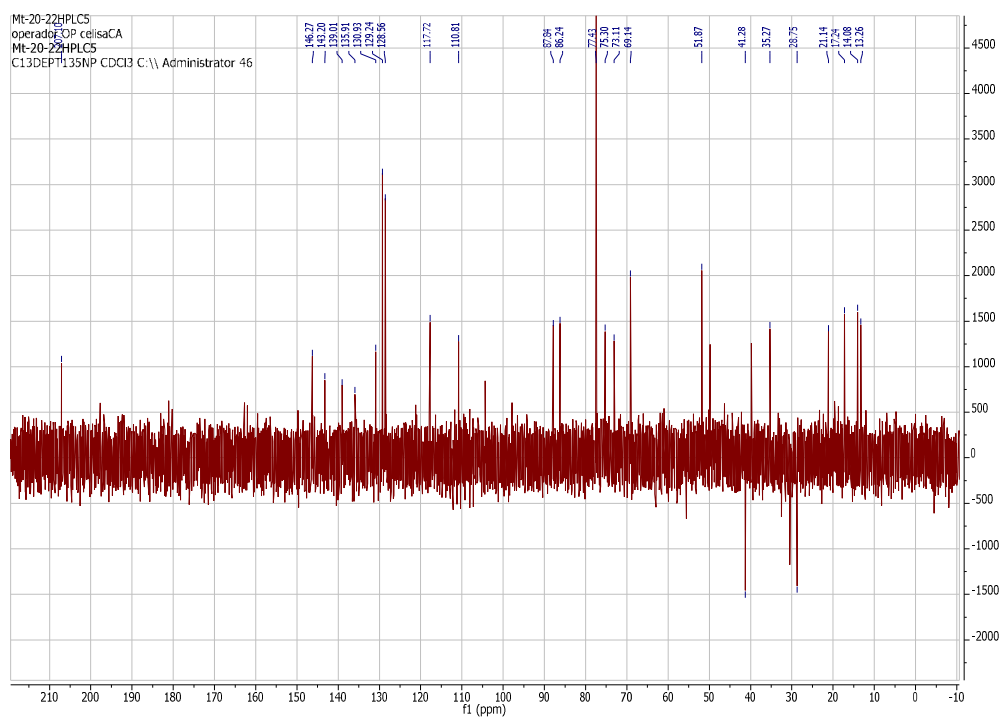
Espectro de masas de alta resolución:

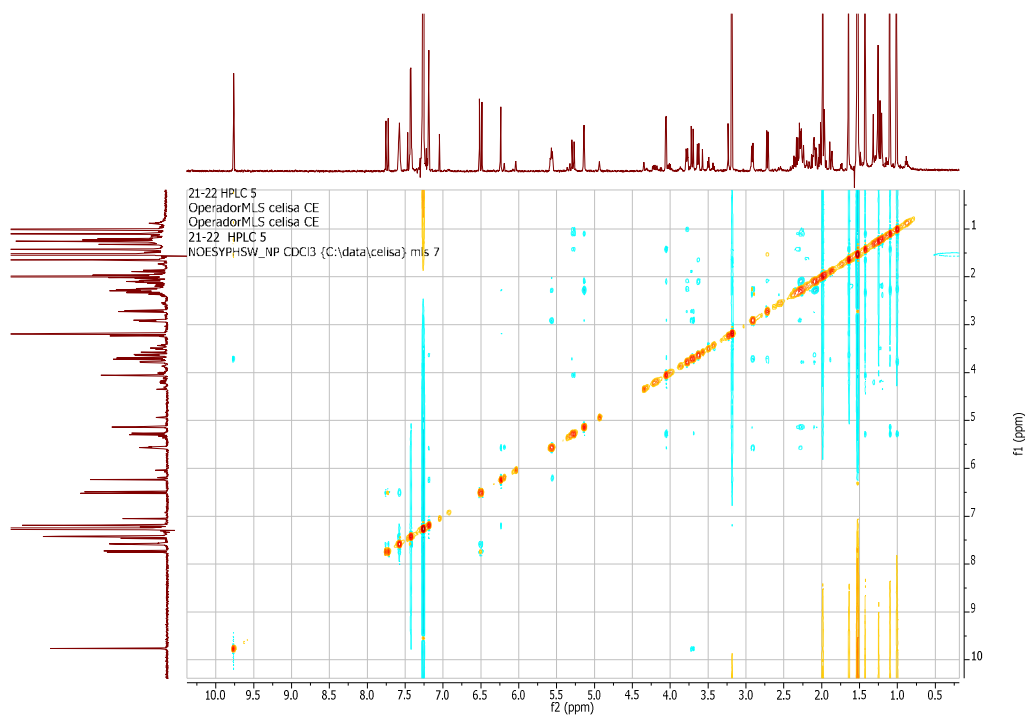
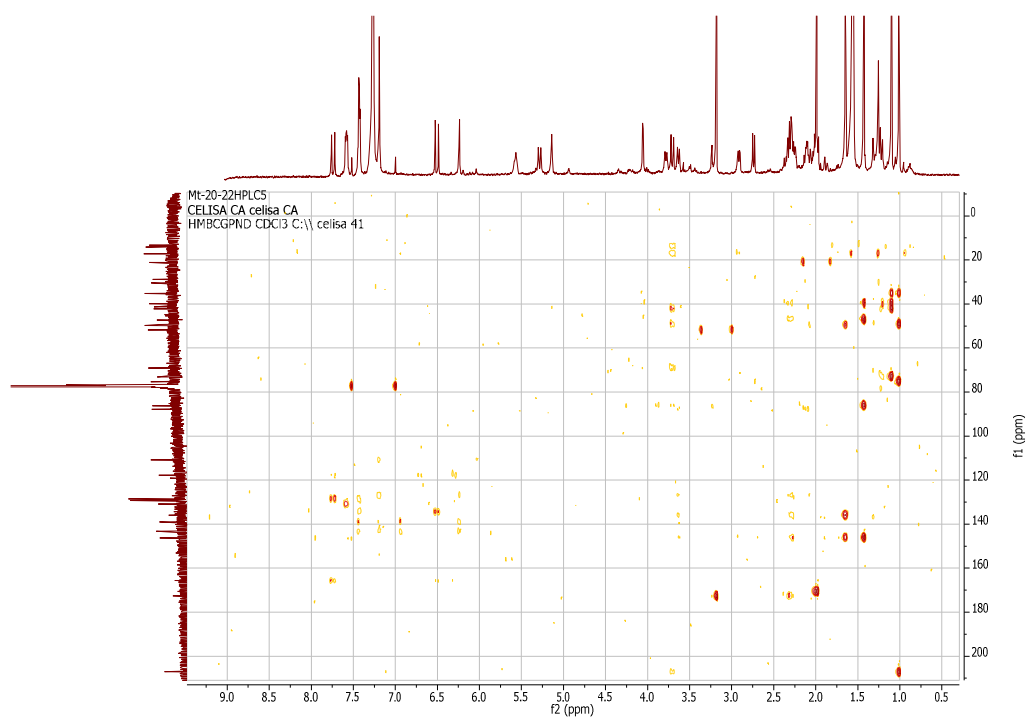


1-O-Detigloil-1-O-cinamoilohchinolal (**44**)

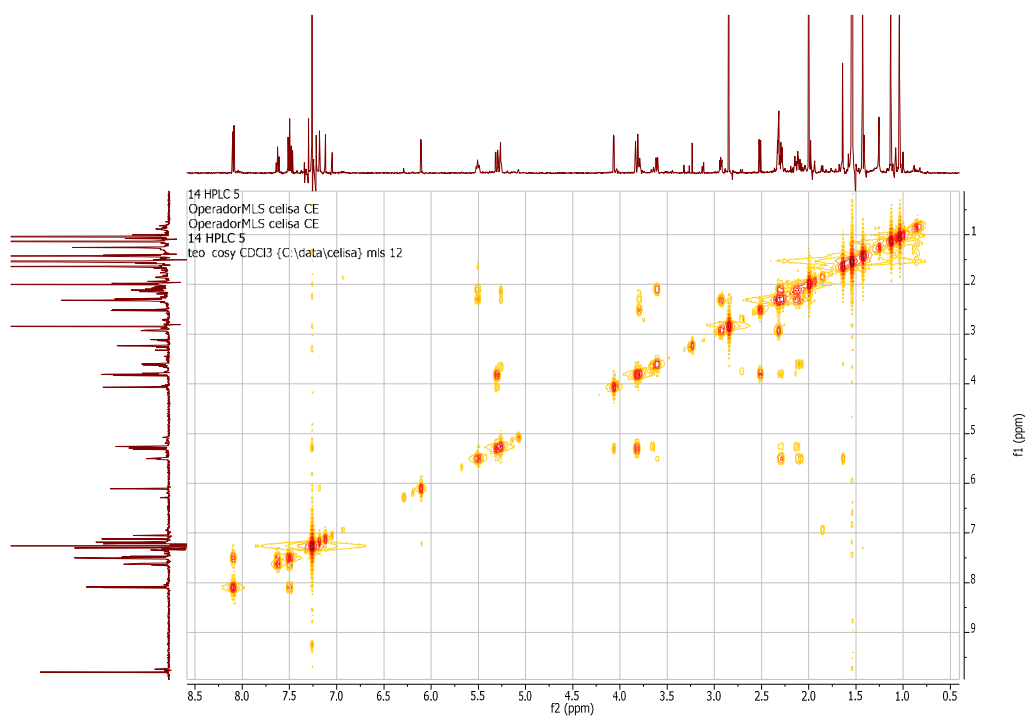
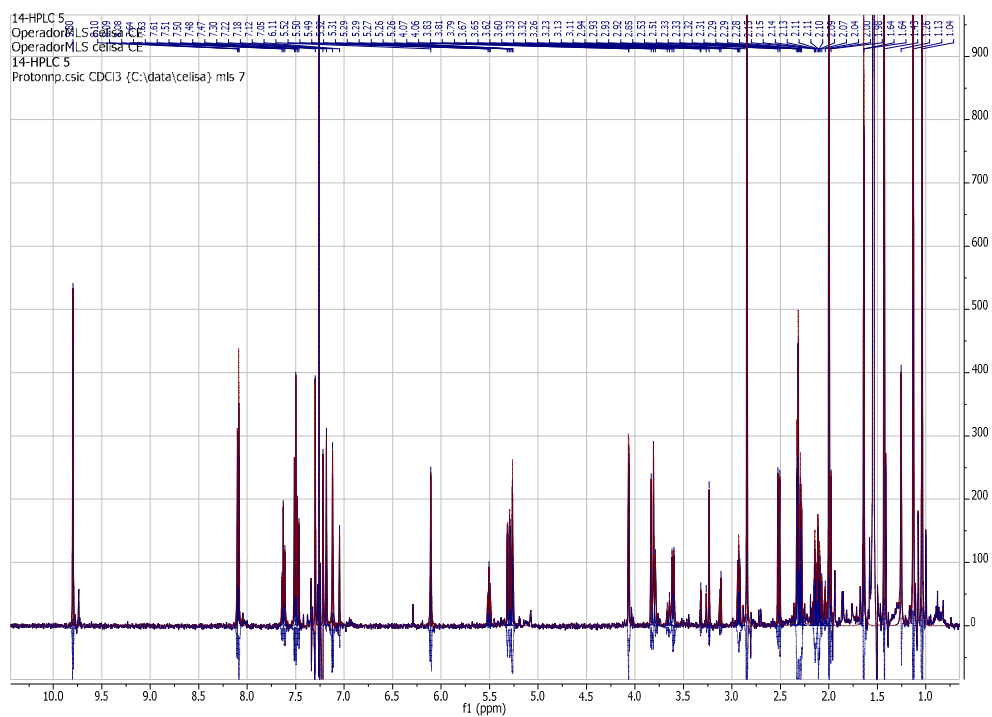


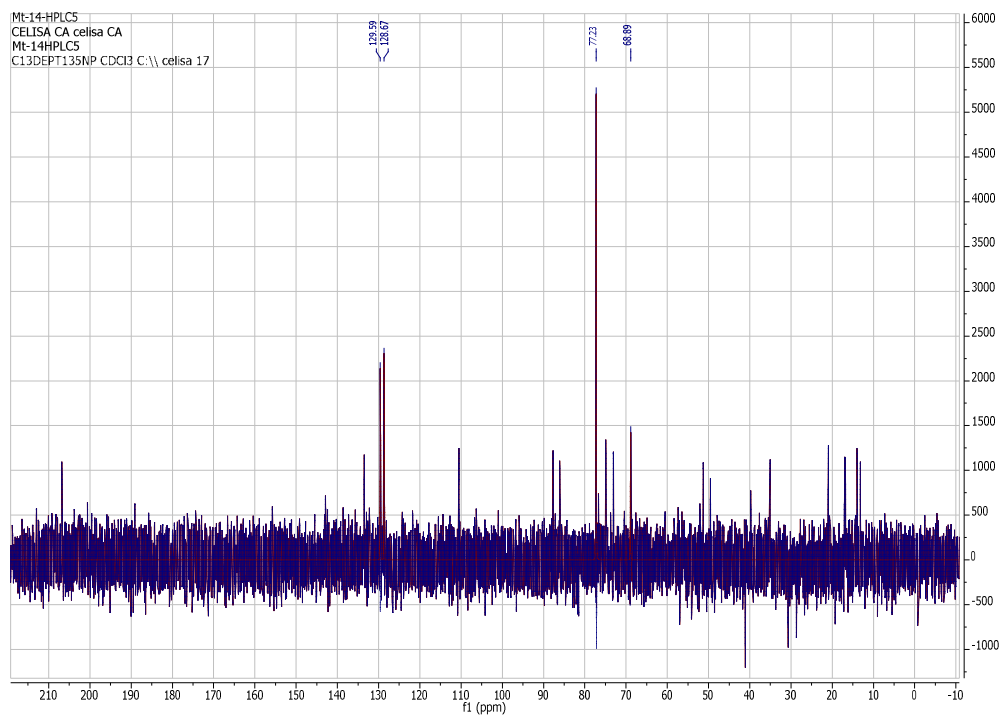
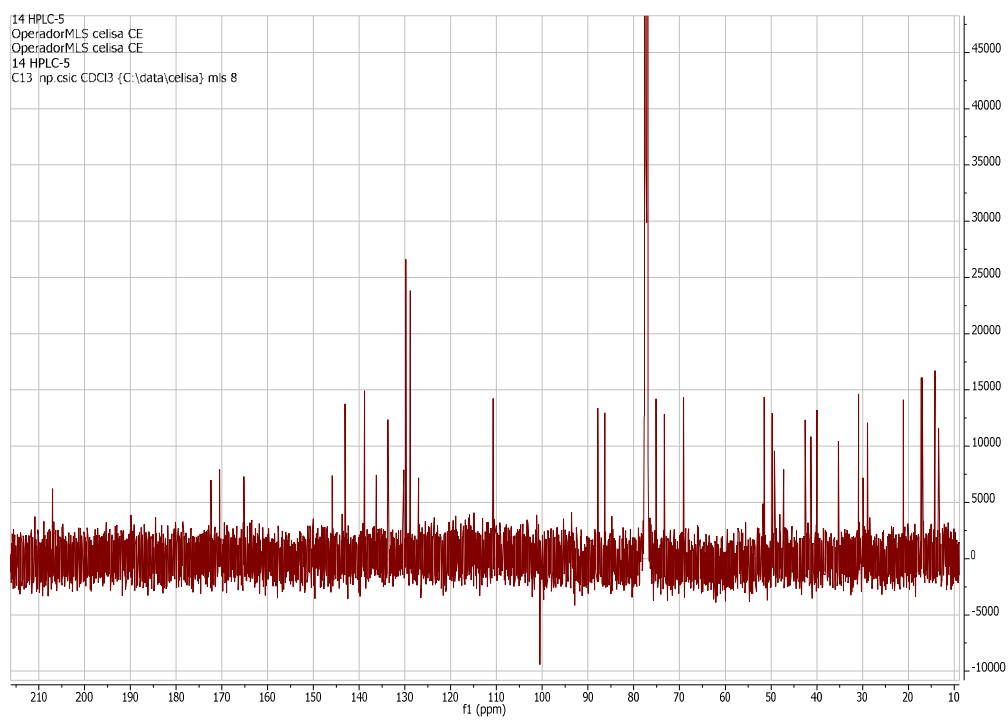


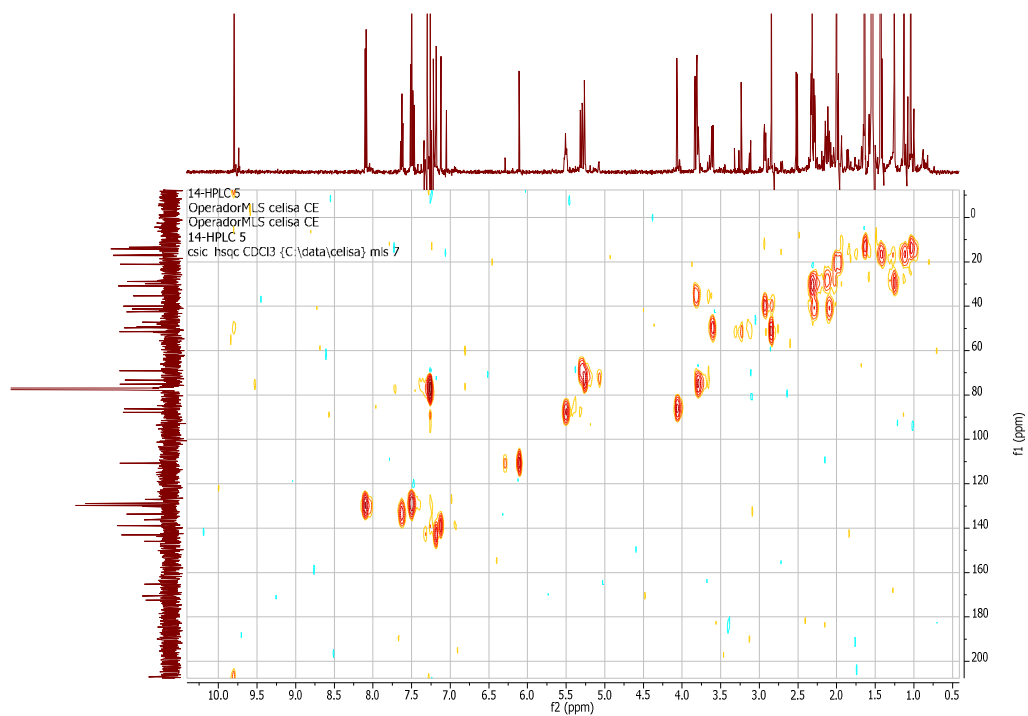
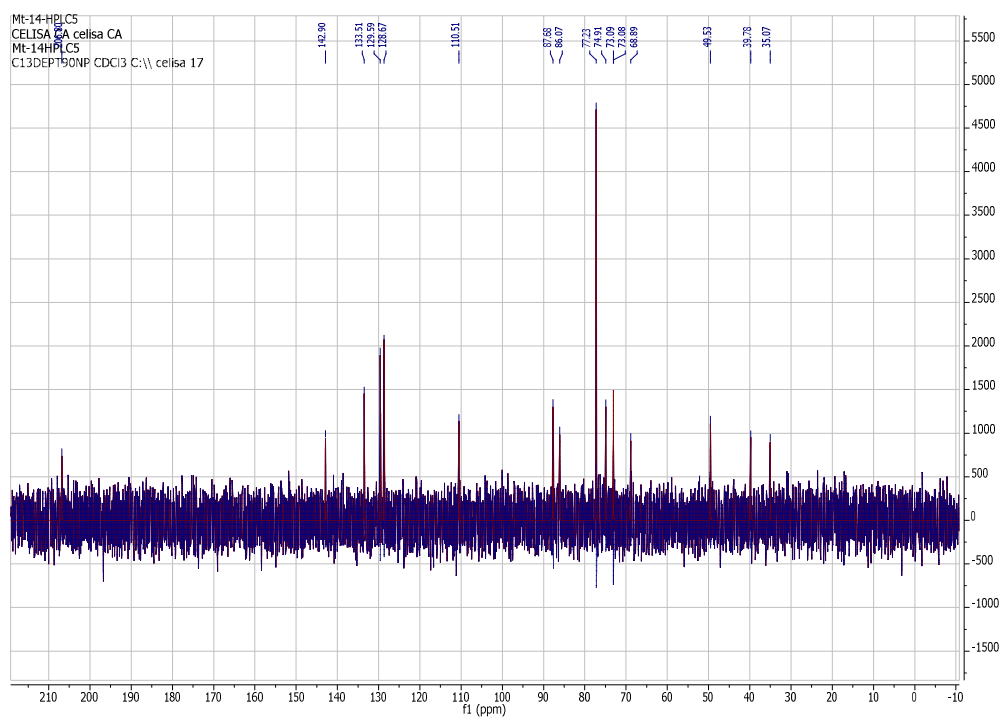


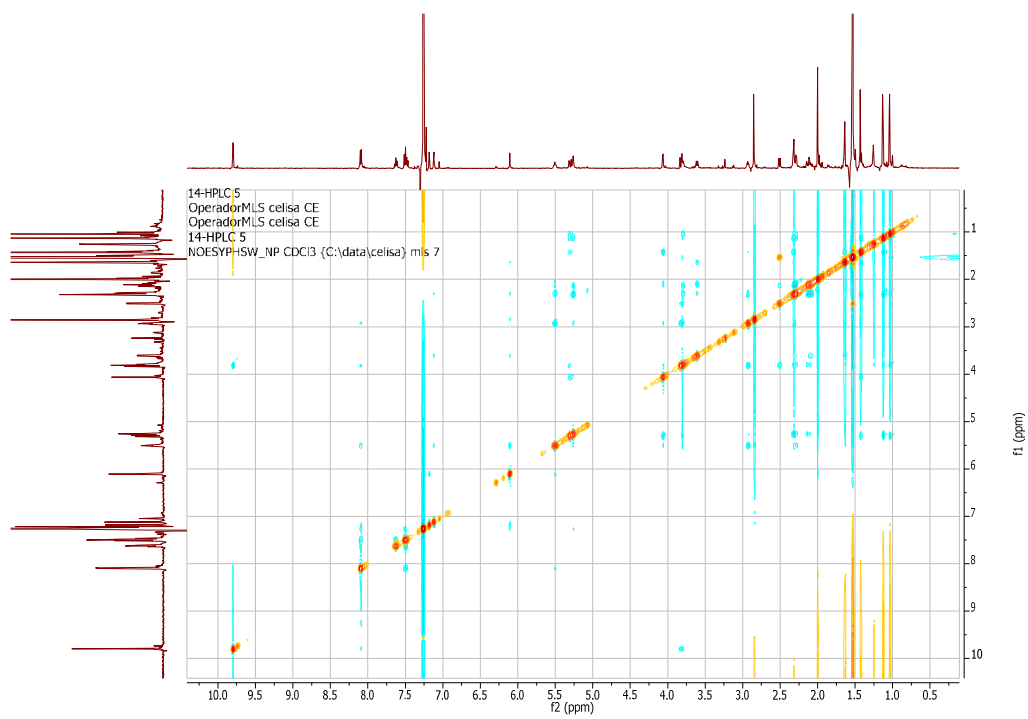
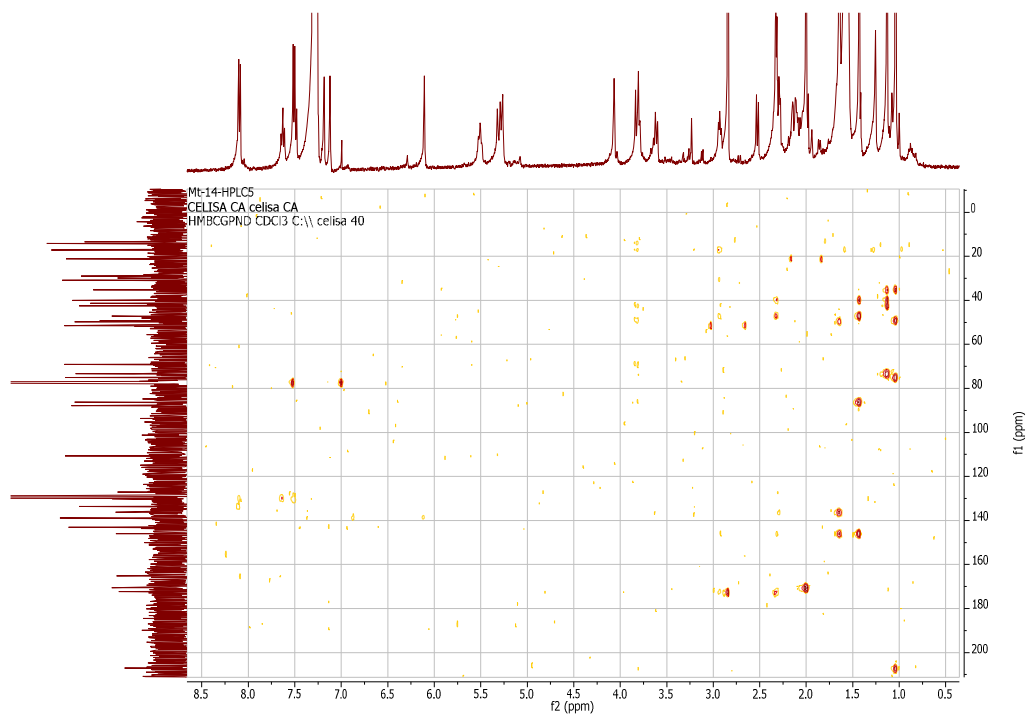


1-O-Detigloil-1-O-benzoilohchinolal (45)

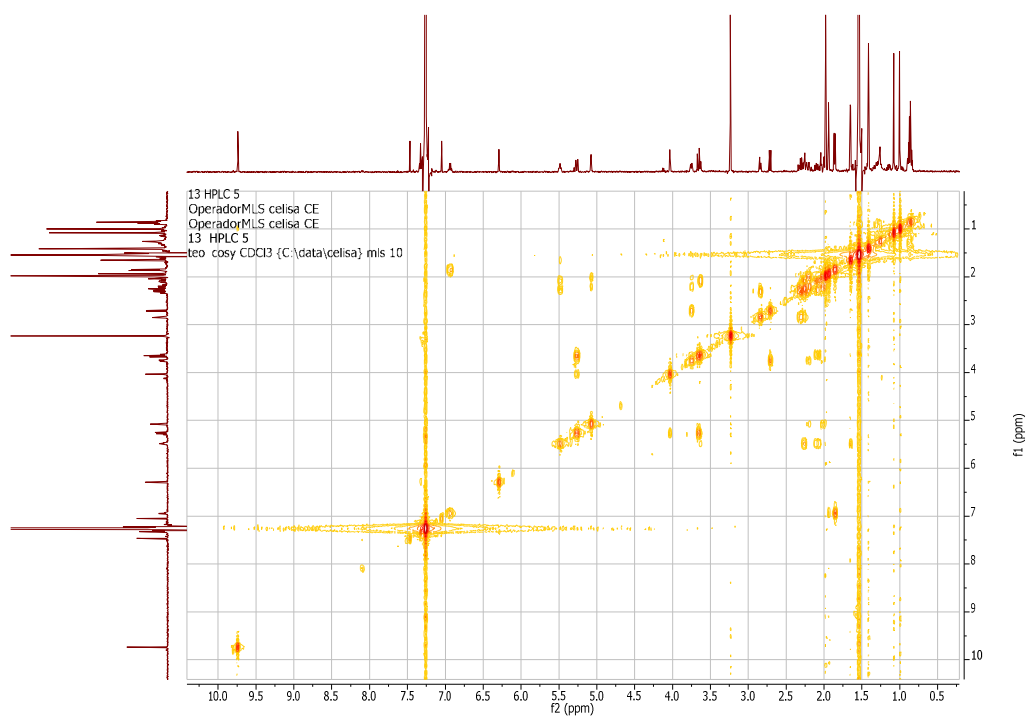
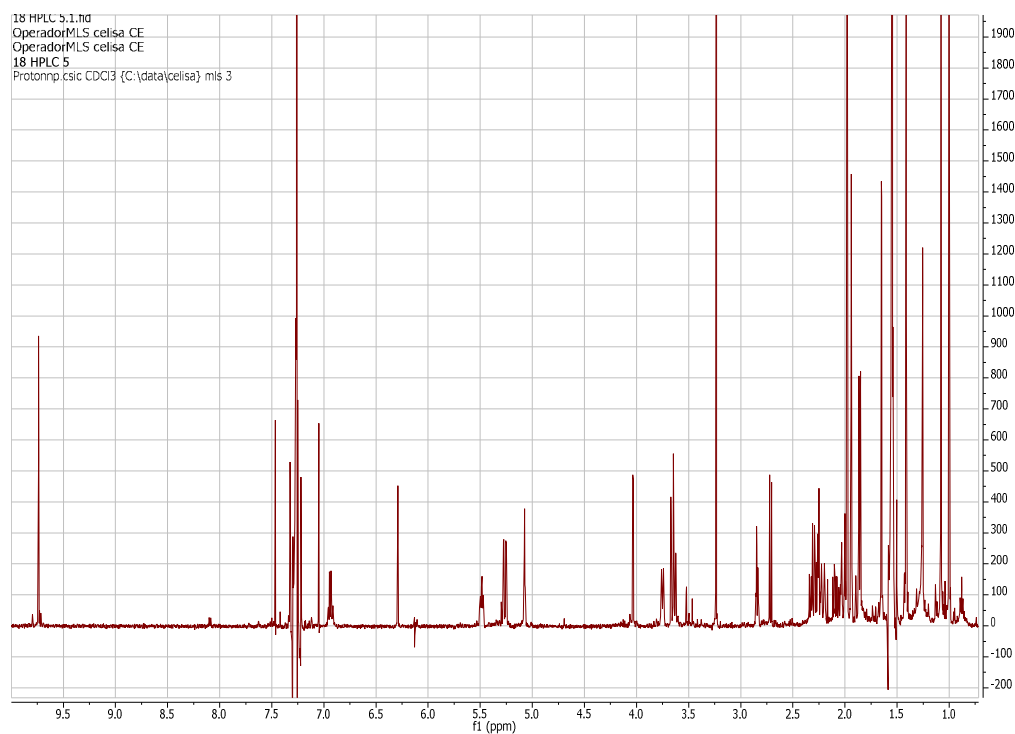


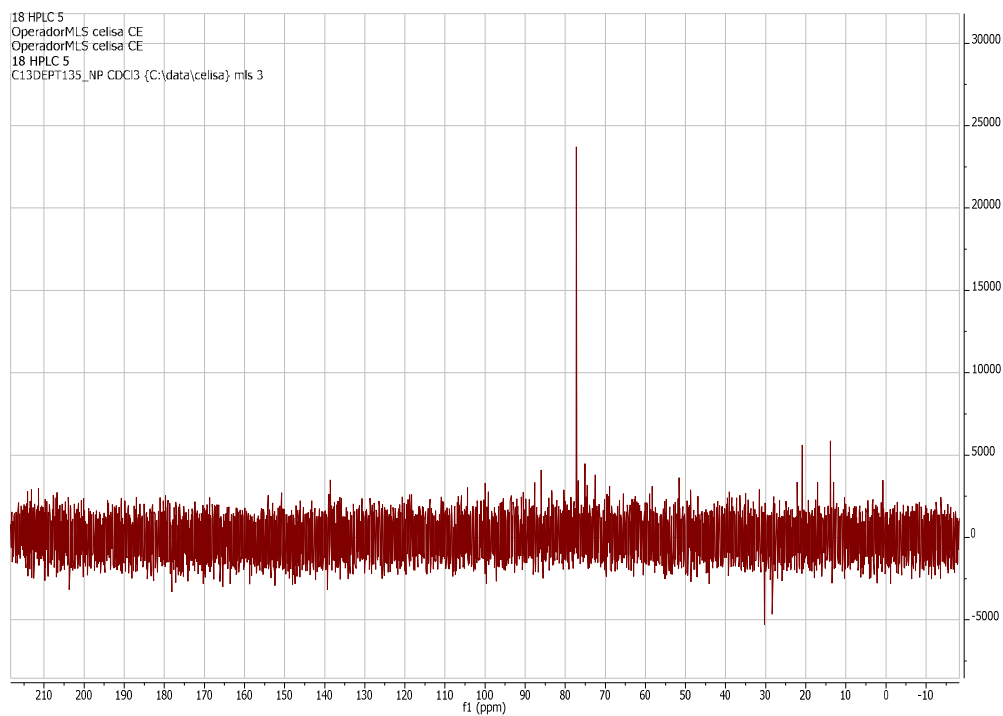
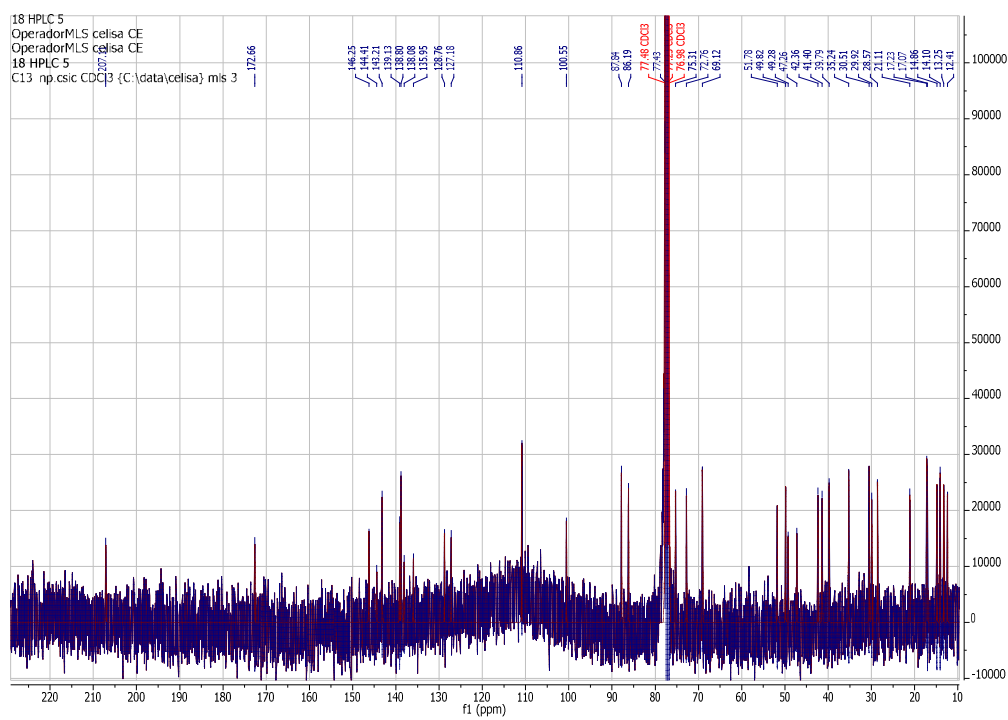


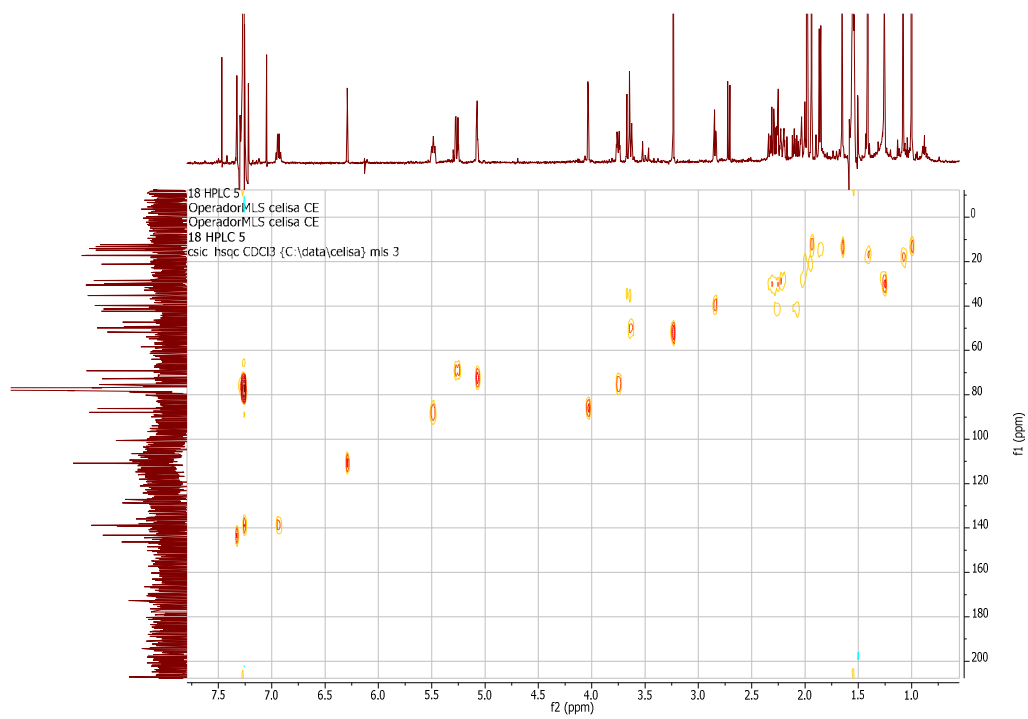
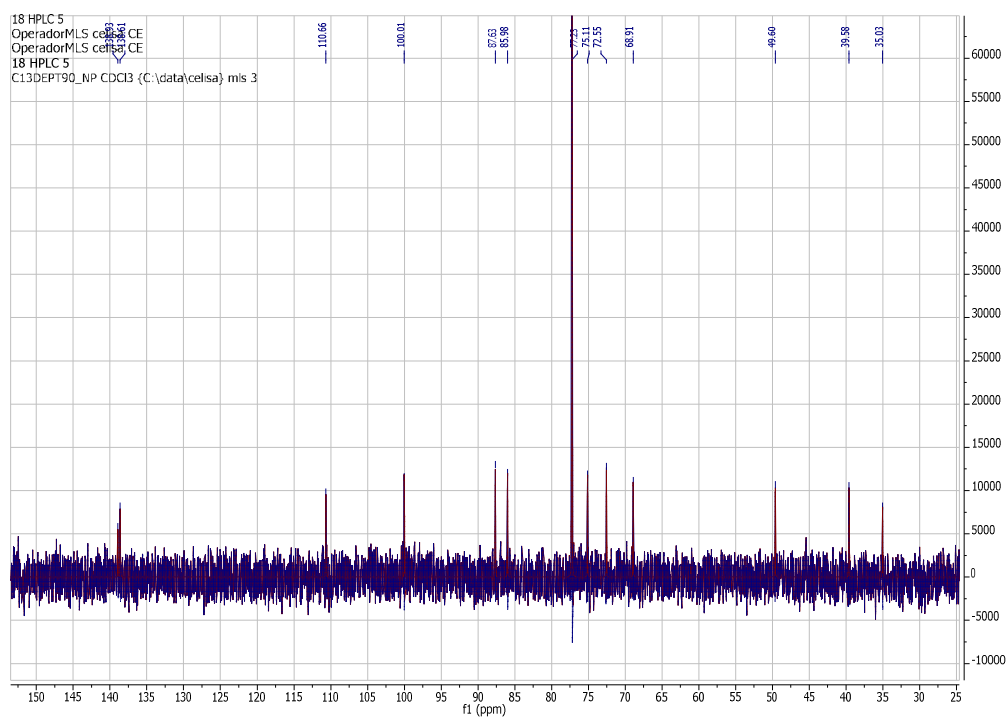


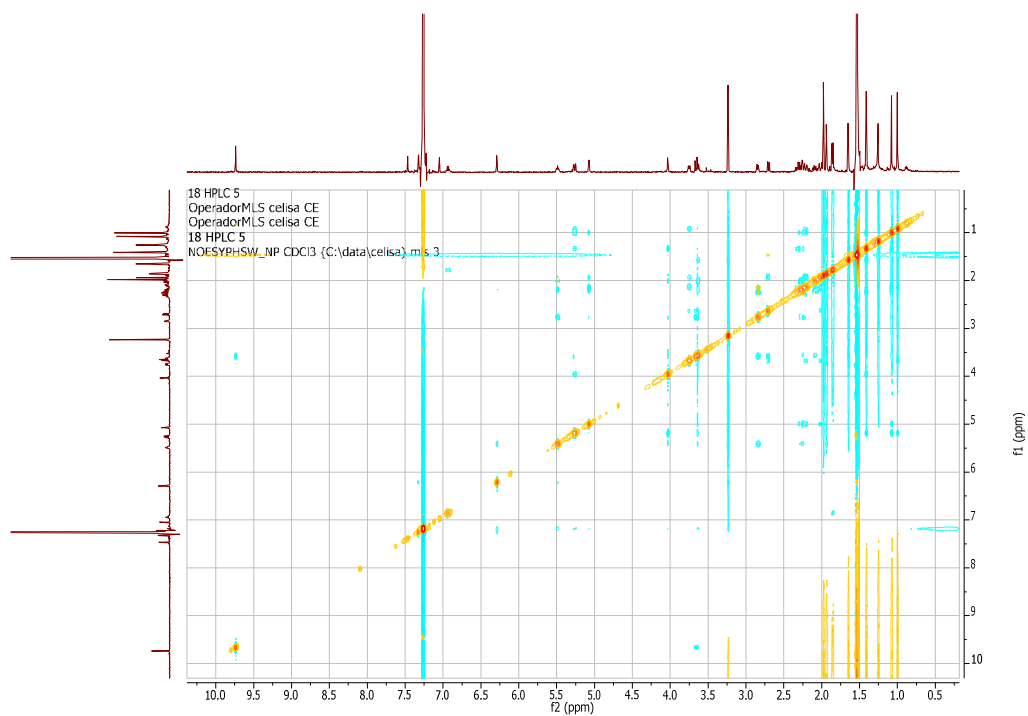
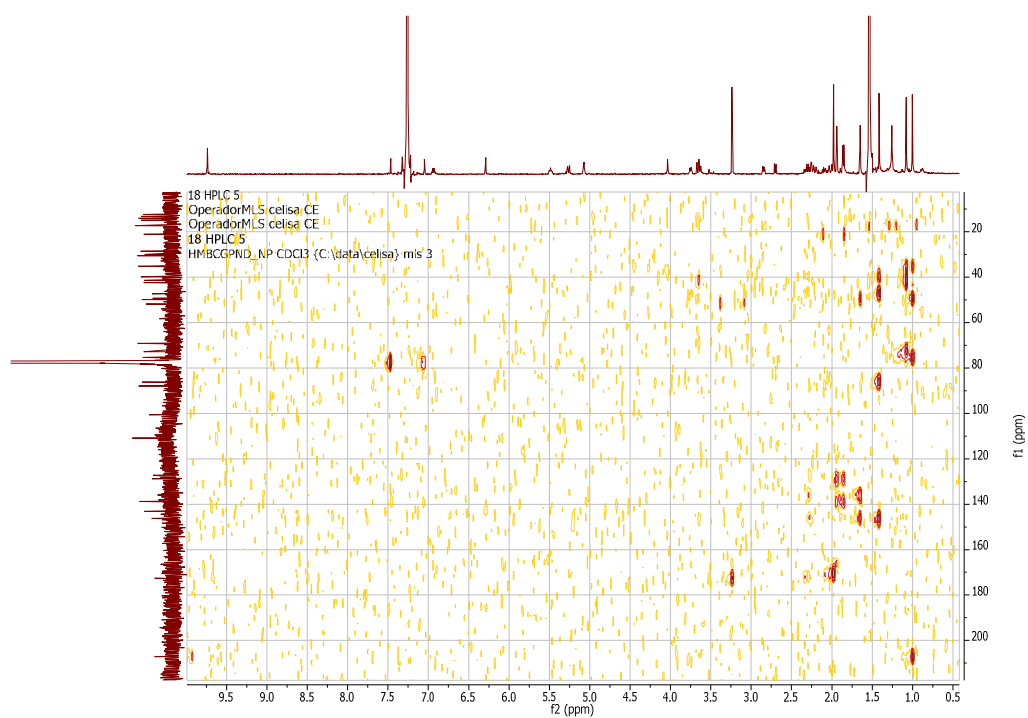


Ohchinolal (46)







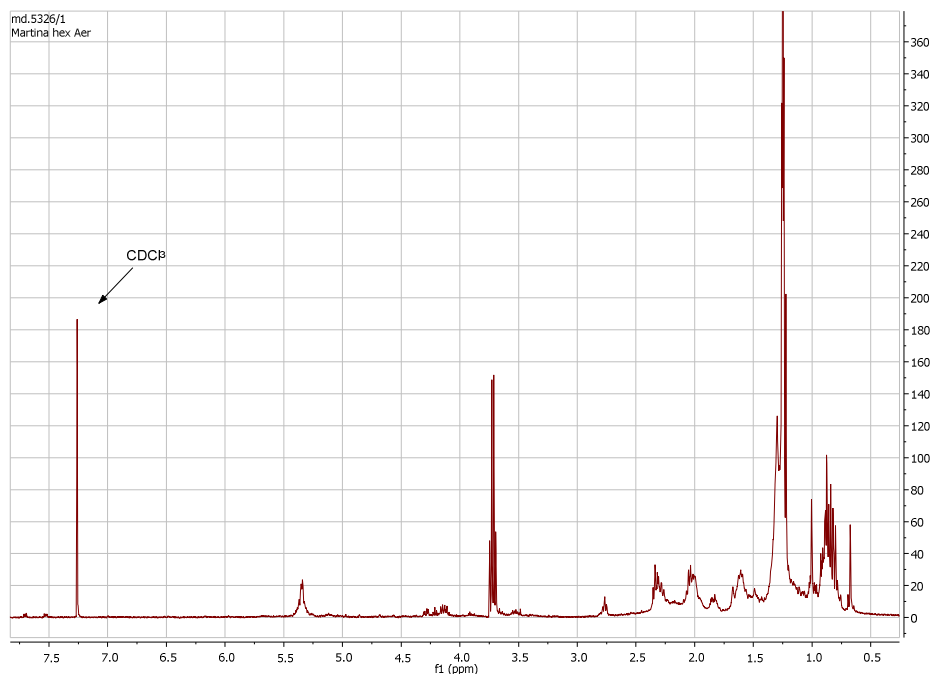


ANEXO II - Espectros ^1H

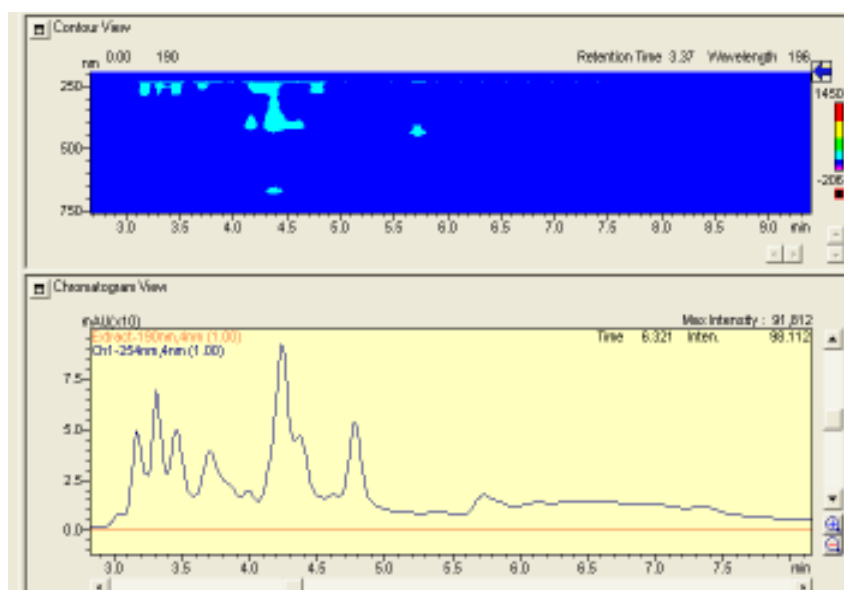
RMN y cromatogramas obtenidos para las fracciones de la partición líquido-líquido del extracto etanólico de ramas de *A. edulis*.

Fracción hexano

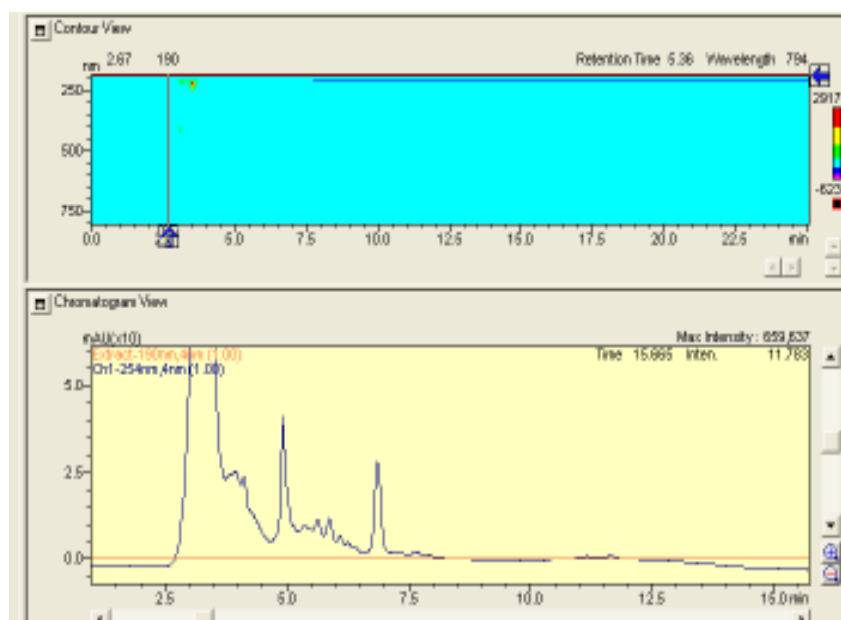
Espectro ^1H RMN CDCl_3 , 400 MHz



Cromatograma obtenido por HPLC a 254 nm. Fase móvil: hexano/AcOEt (65:35).

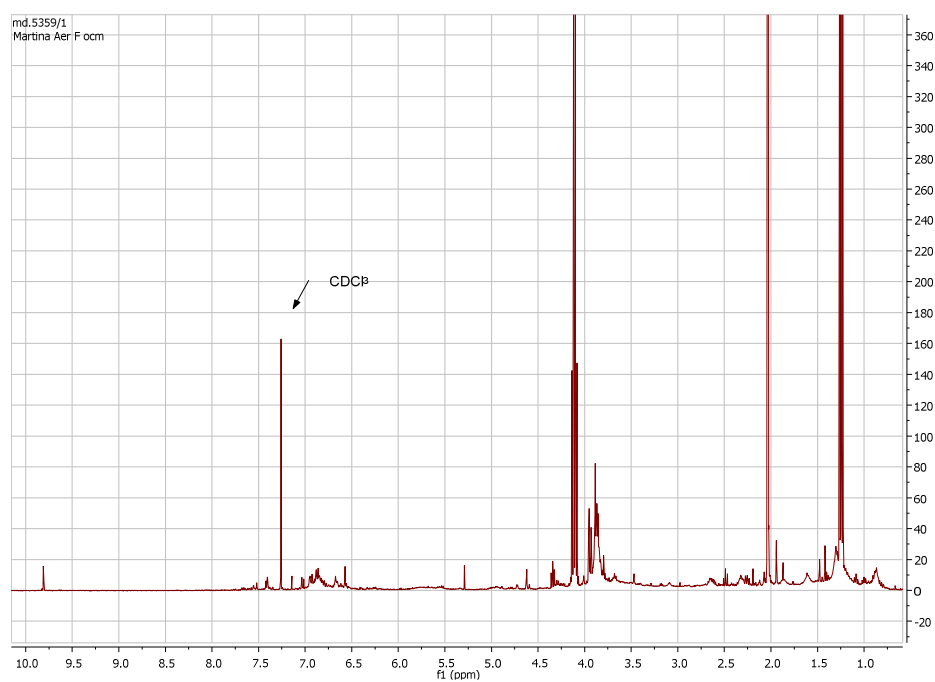


Cromatograma obtenido por HPLC a 254 nm. Fase móvil: DCM/MeOH (97:3).

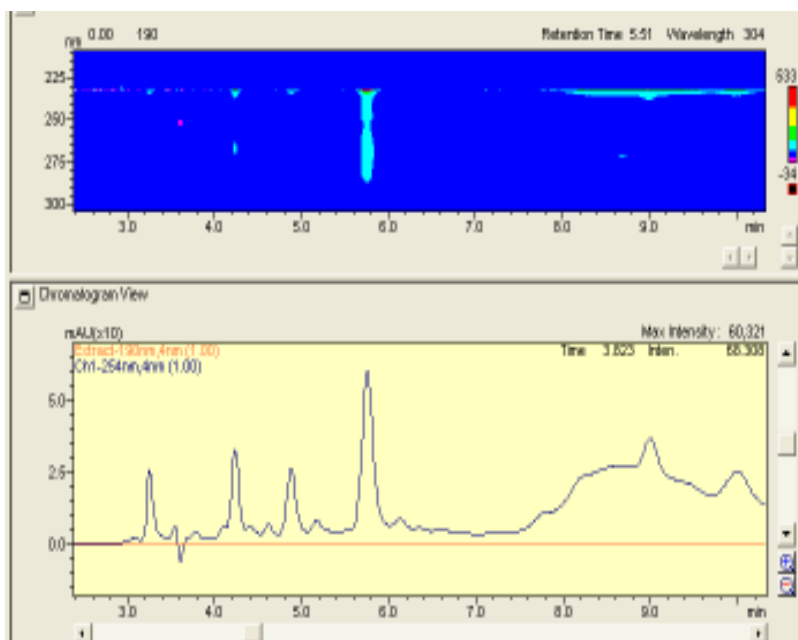


Fracción diclorometano

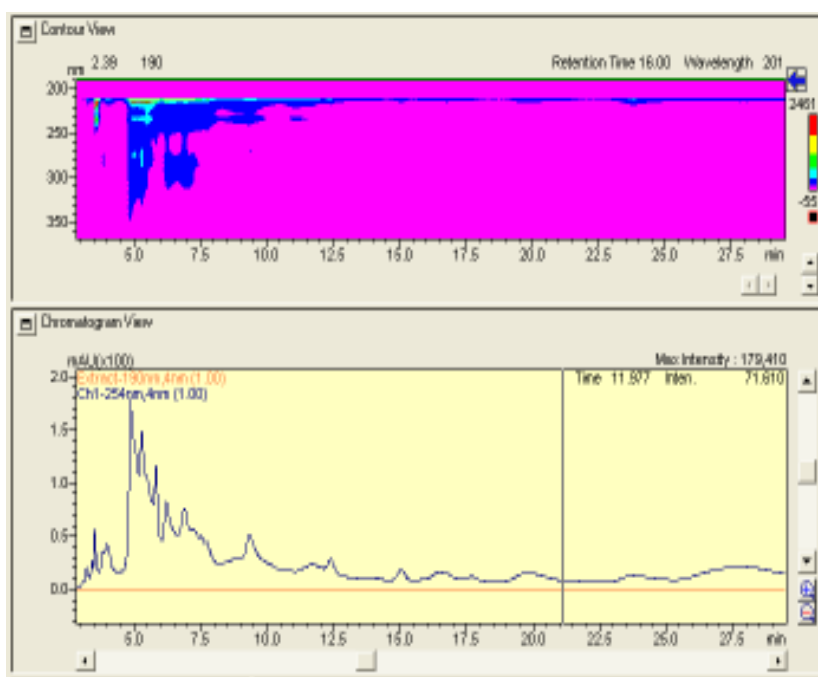
Espectro ^1H RMN CDCl_3 , 400 MHz.



Cromatograma obtenido por HPLC a 254 nm. Fase móvil: hexano/AcOEt (55:45).

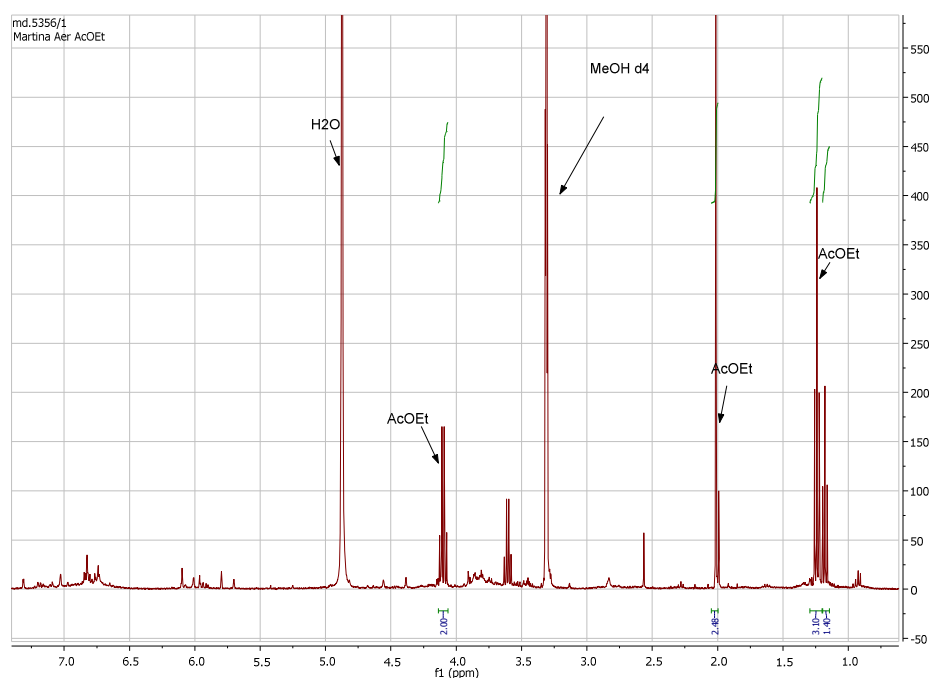


Cromatograma obtenido por HPLC a 254 nm. Fase móvil: DCM/MeOH(97:3).

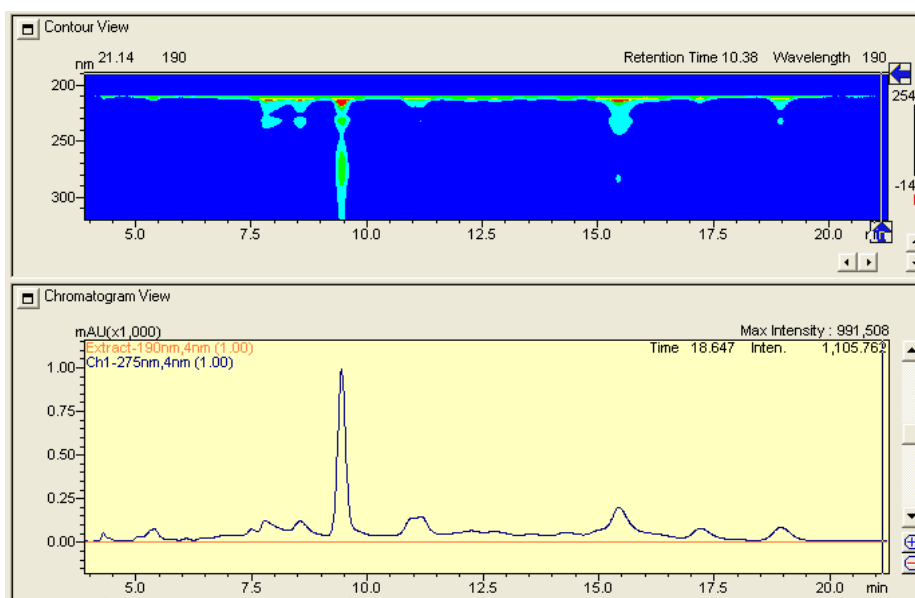


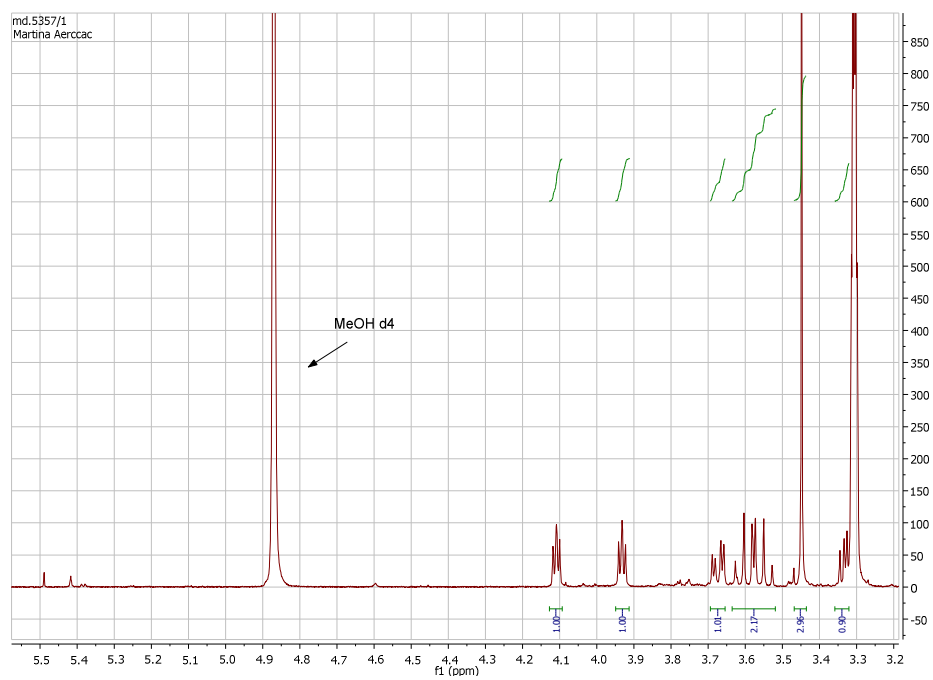
Fracción AcOEt

Espectro ^1H RMN (MeOH d_4 , 400 MHz).



Cromatograma obtenido por HPLC a 254 nm. Fase móvil: DCM/MeOH (9:1).

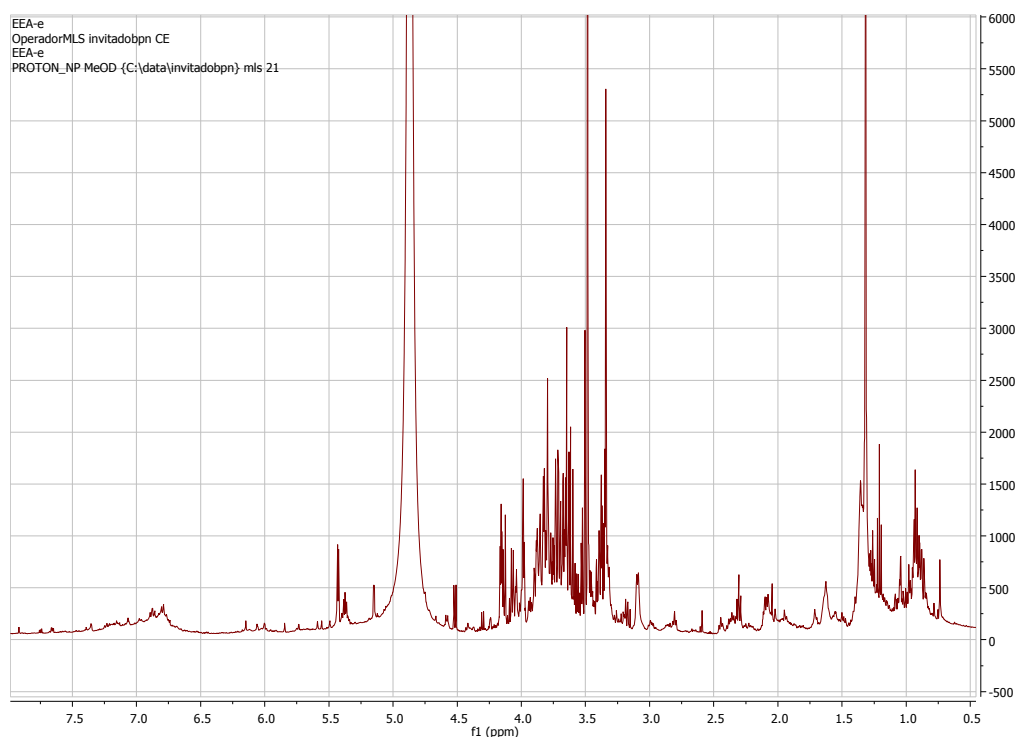
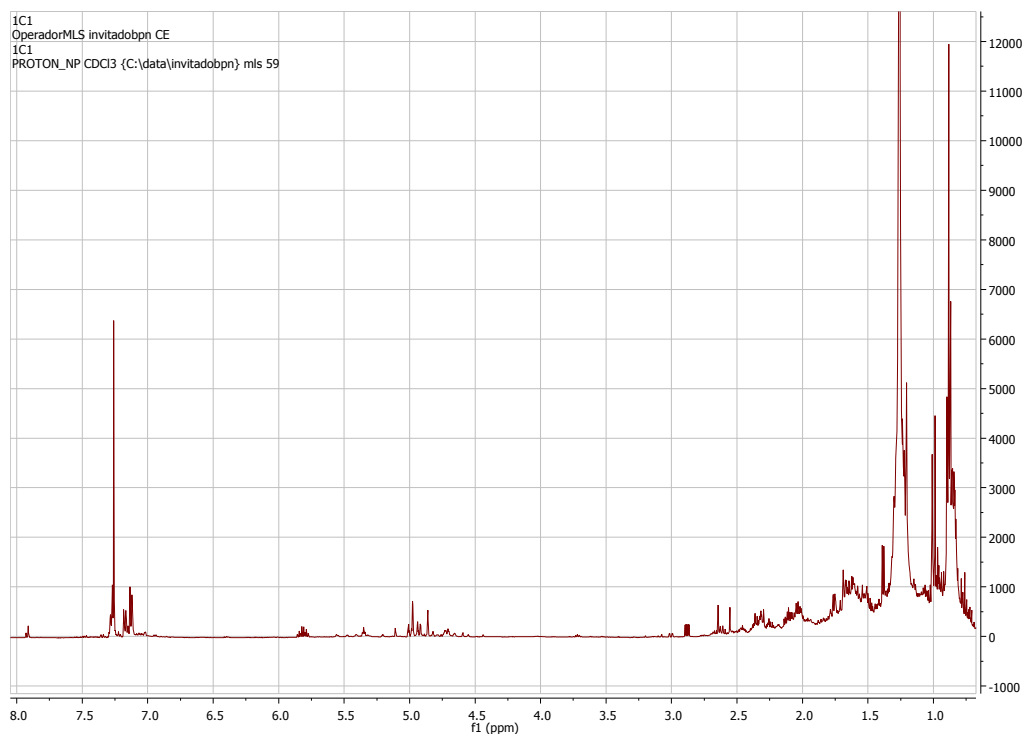


Fracción acuosaEspectro ^1H RMN (MeOH d_4 , 400 MHz).

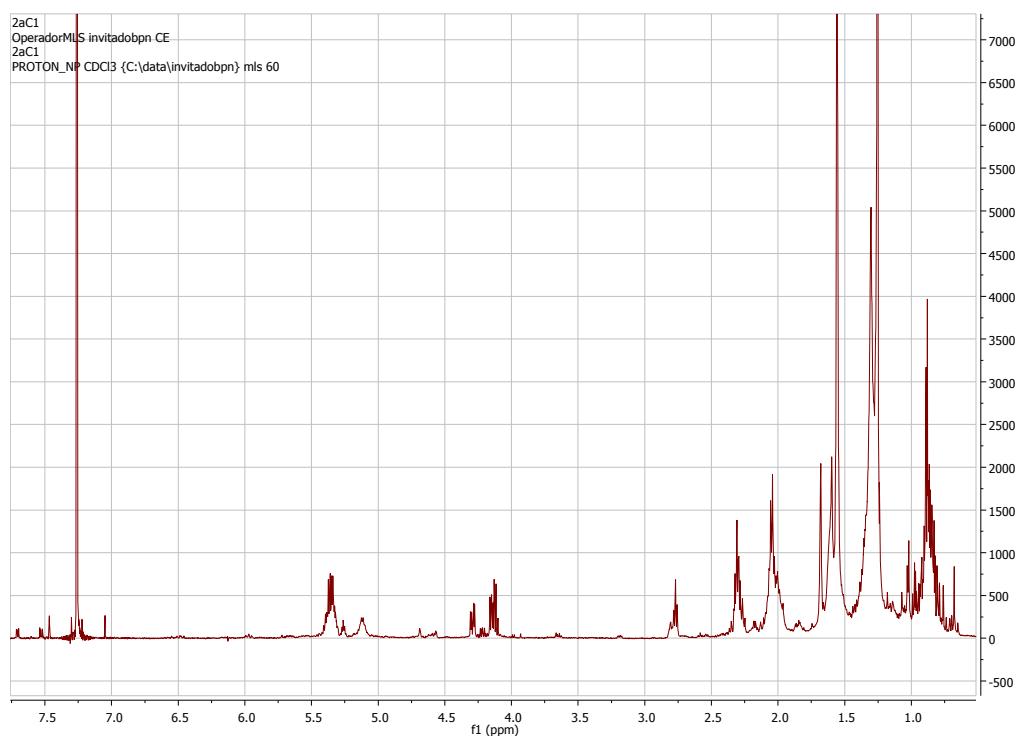
ANEXO III - Espectros ^1H

RMN 500 MHz de fracciones de
C1Ae.

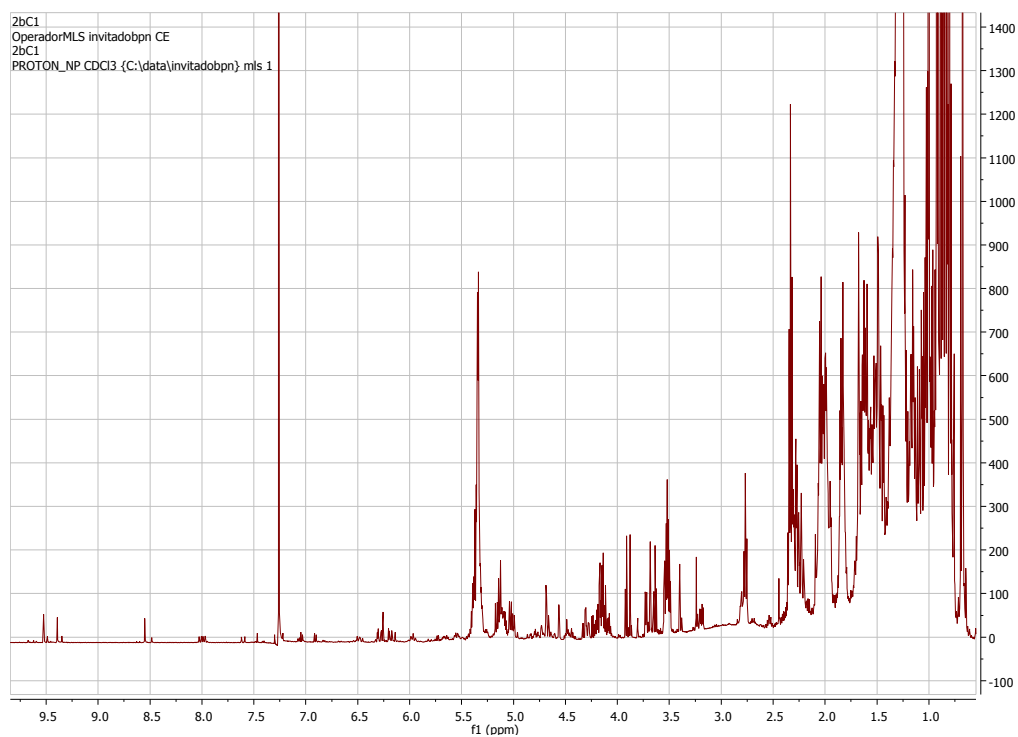
(Obtenidas de la separación del extracto bruto
de ramas de *A. edulis* por cromatografía líquida
a vacío)

Extracto etanólico bruto de ramas1C1Ae

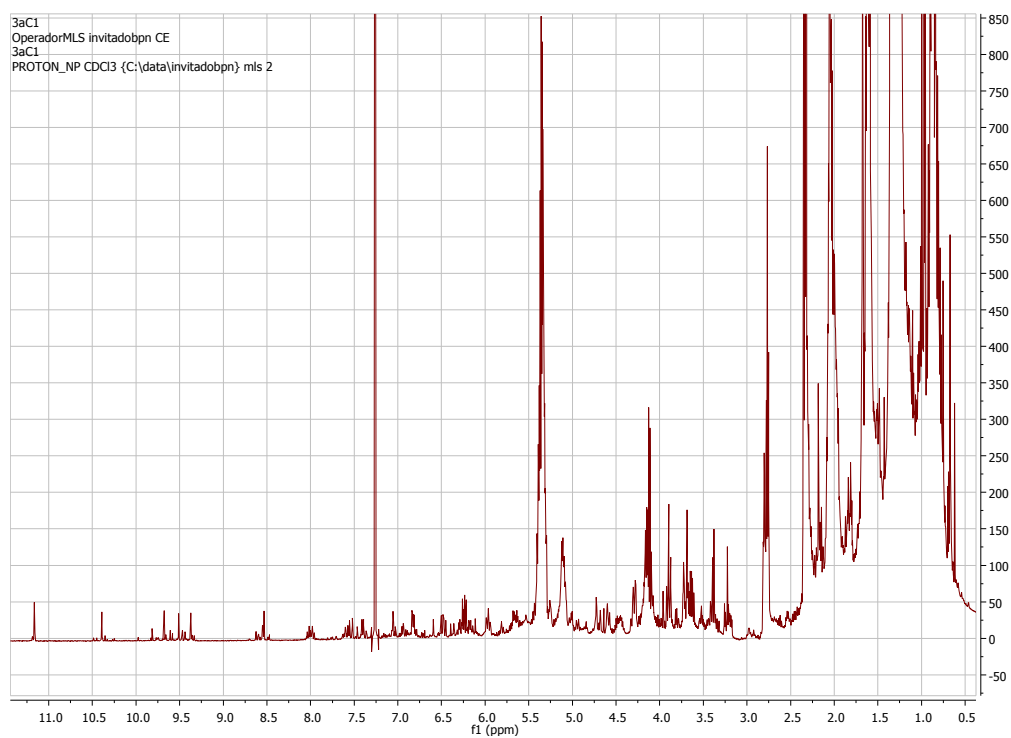
2aC1Ae



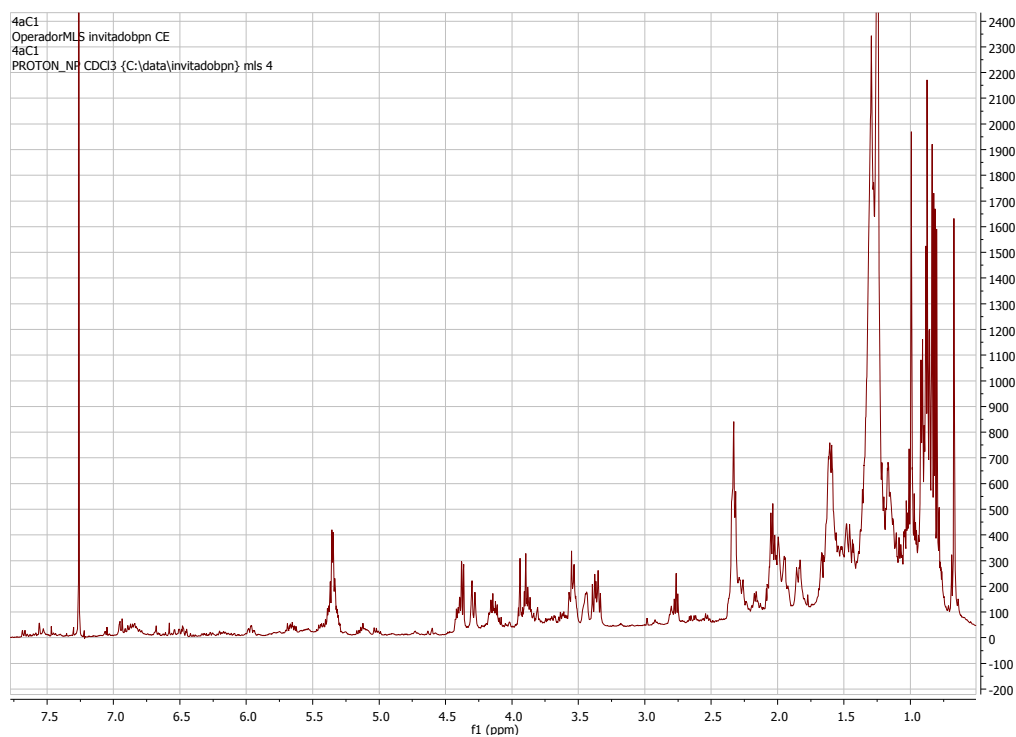
2bC1Ae



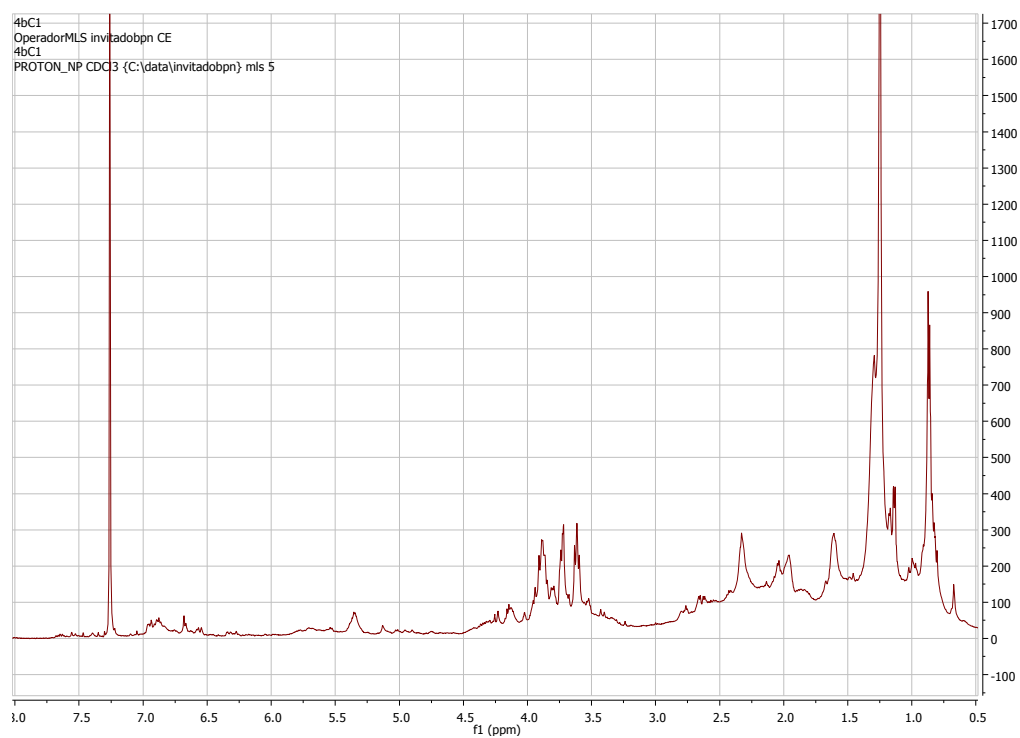
3aC1Ae



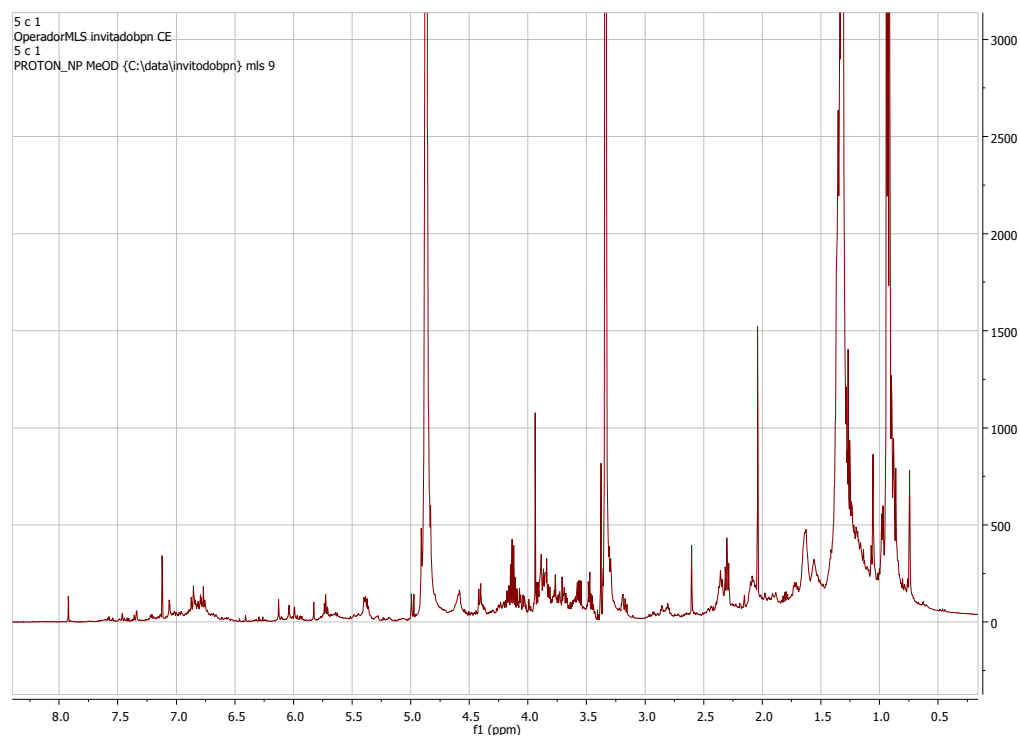
4aC1Ae



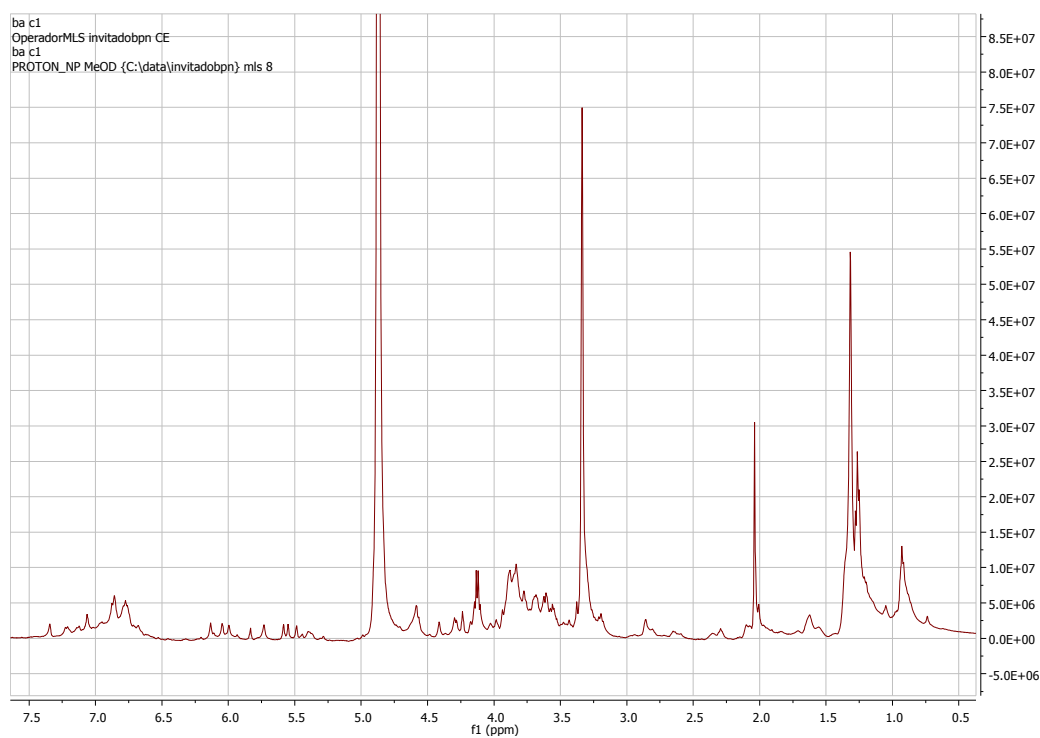
4bC1Ae



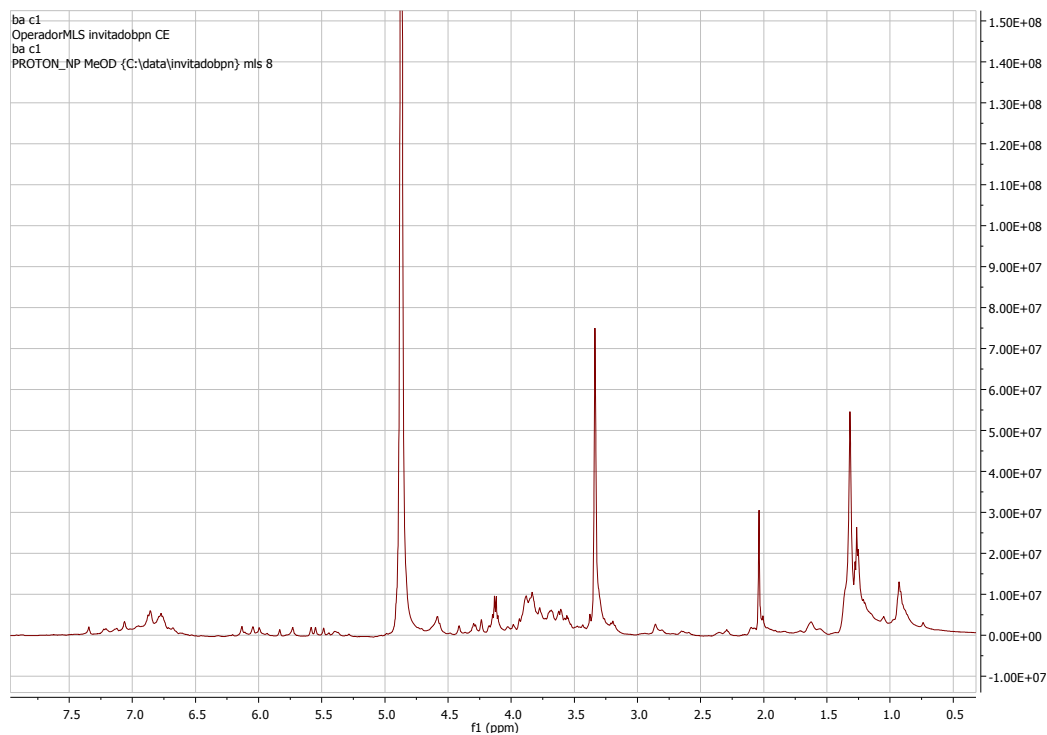
5C1Ae



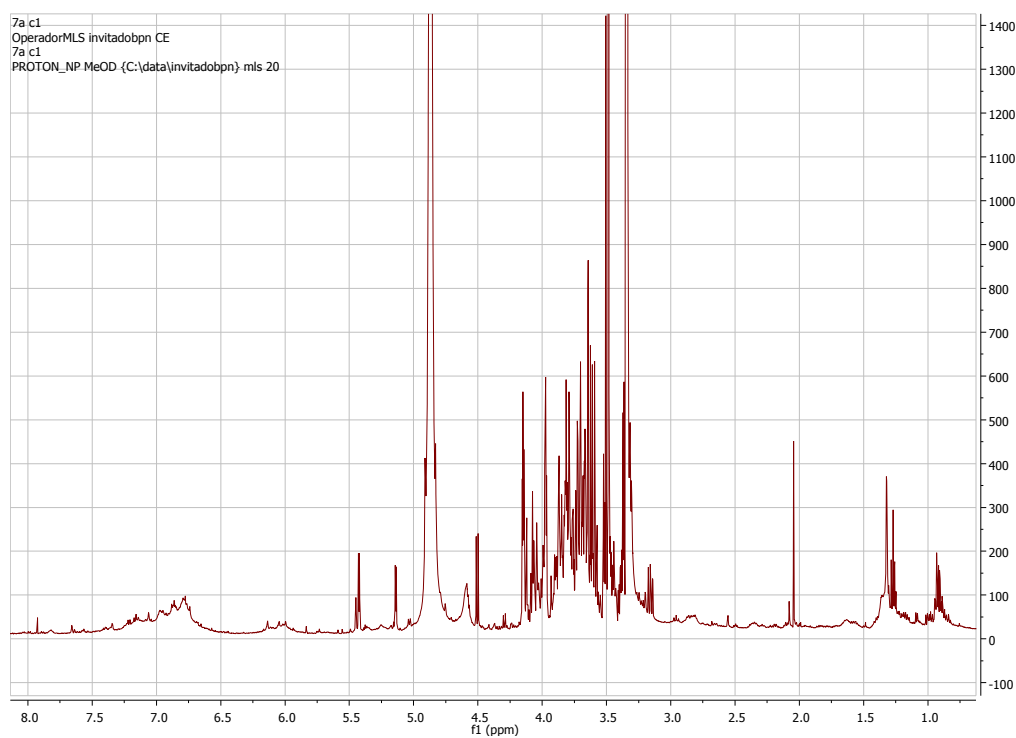
6aC1Ae



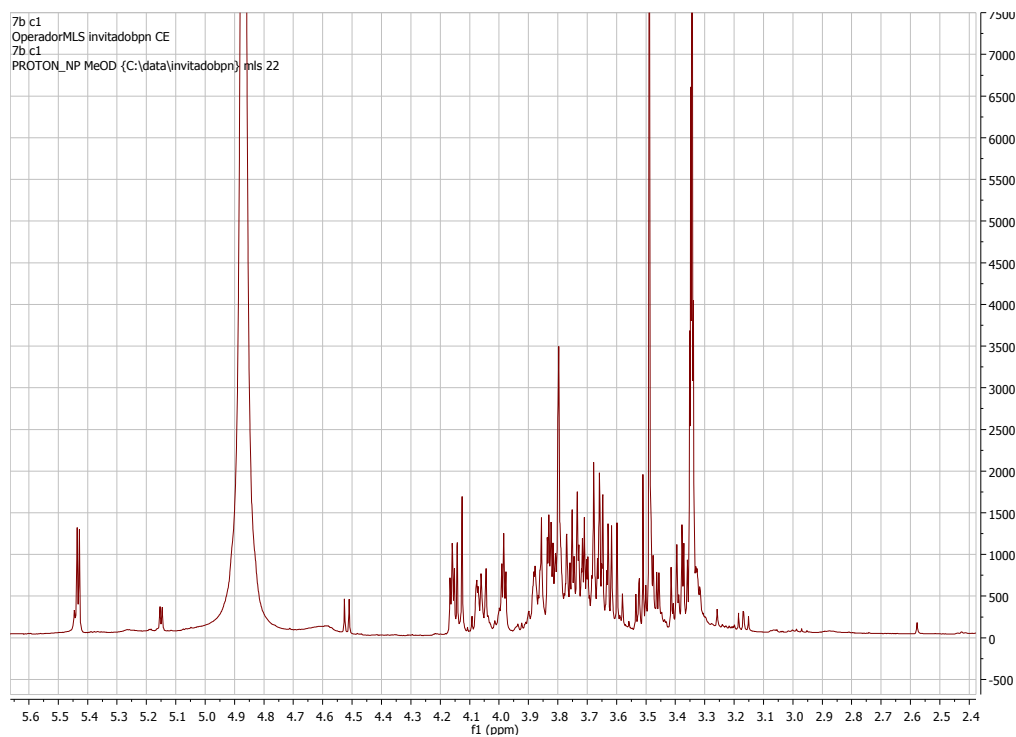
6bC1Ae



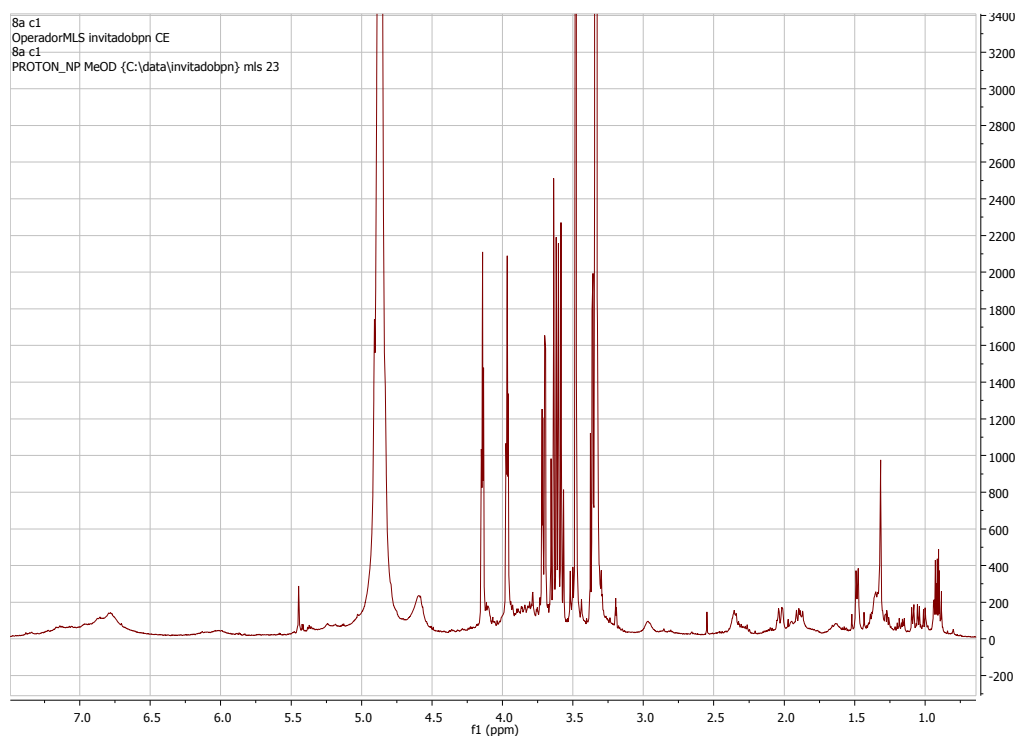
7aC1Ae



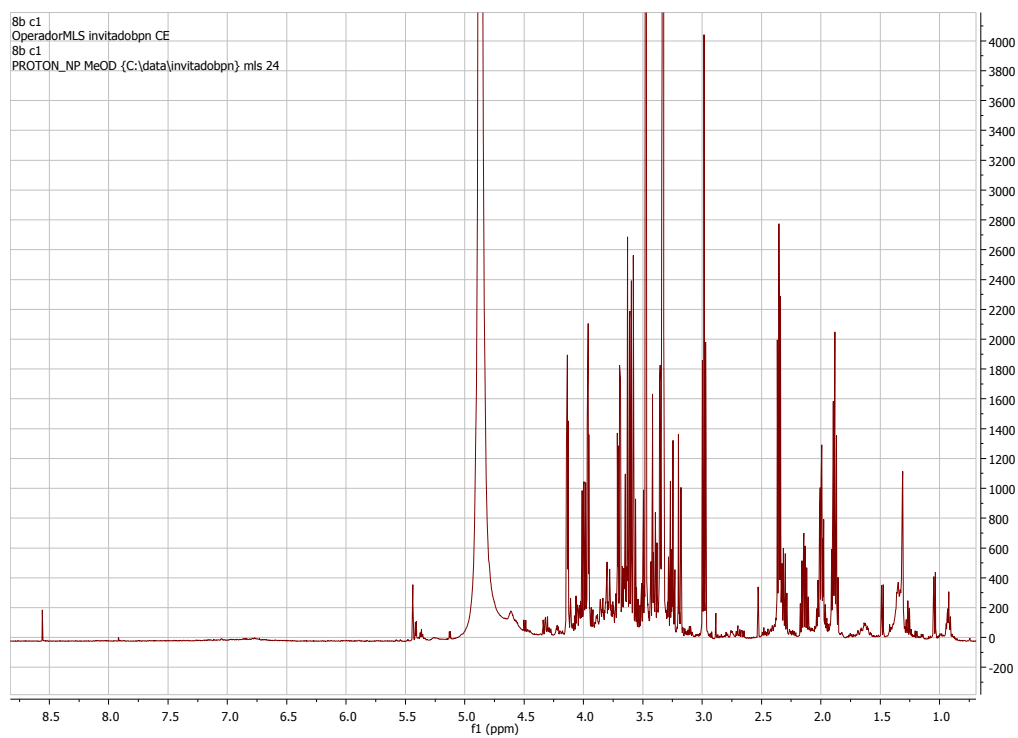
7bC1Ae



8aC1Ae

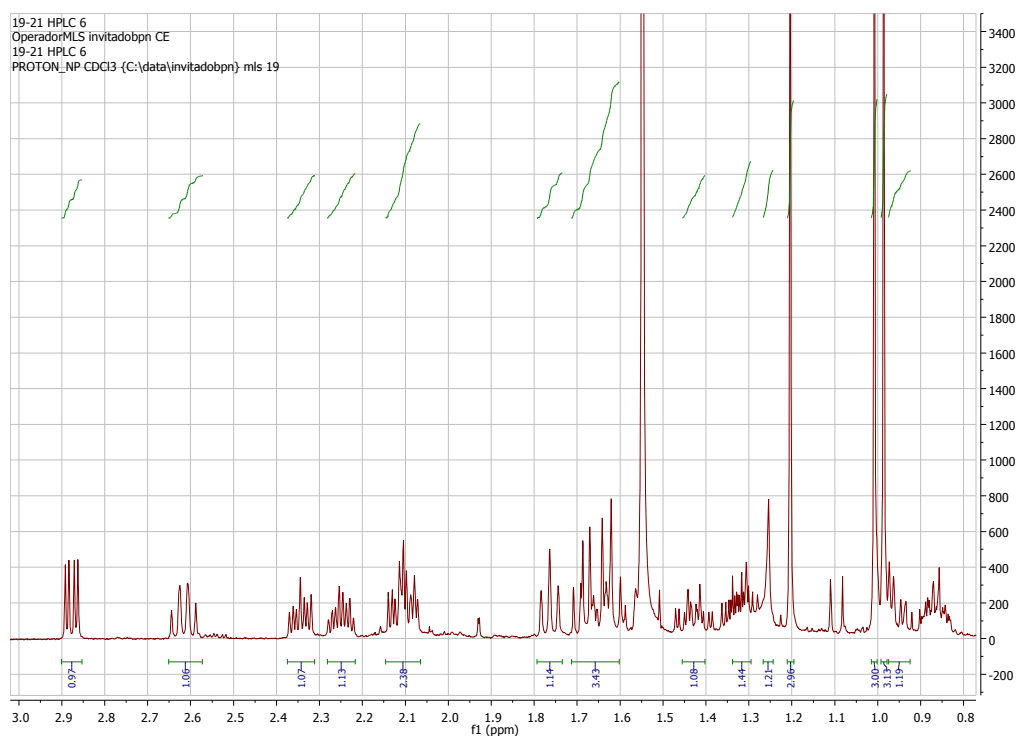
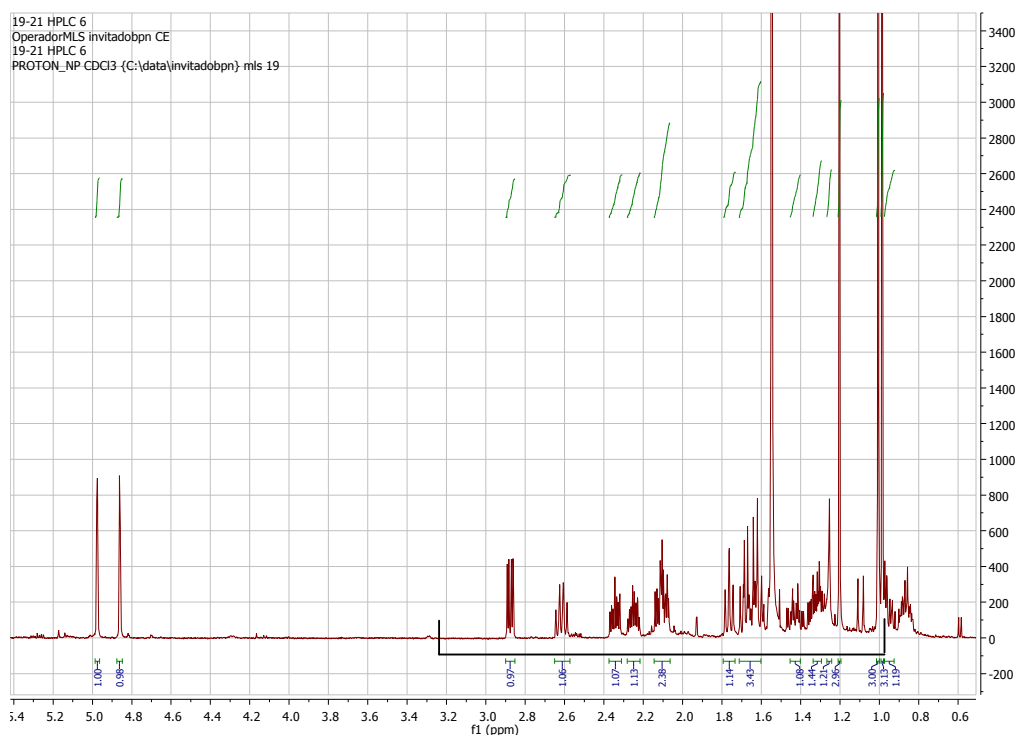


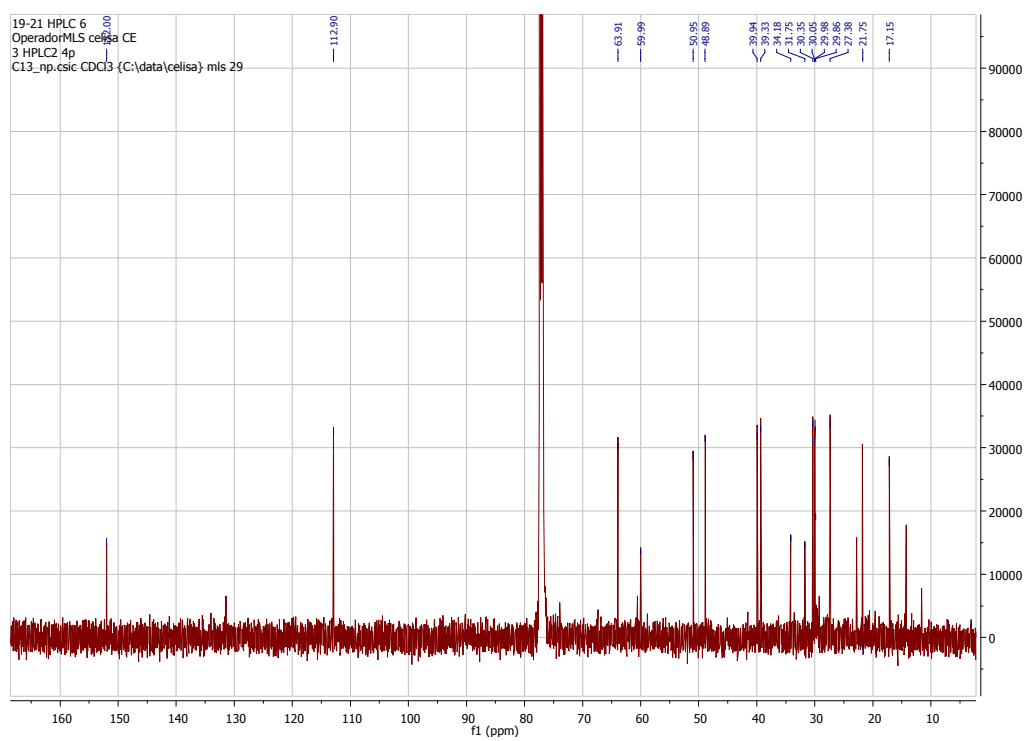
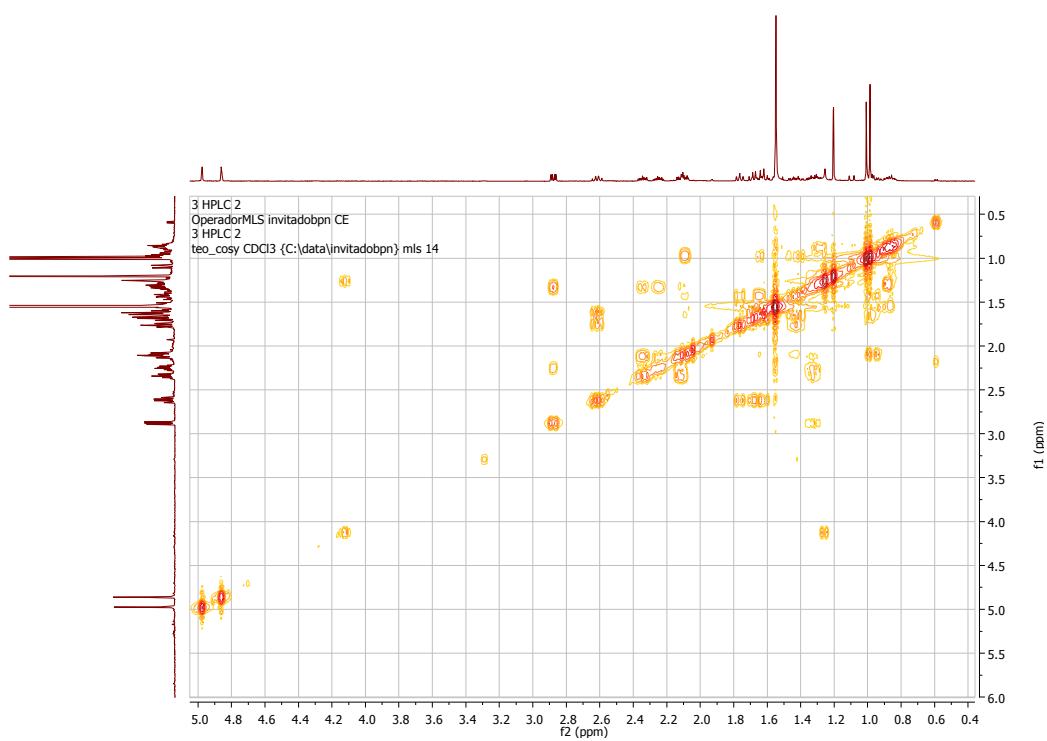
8bC1Ae

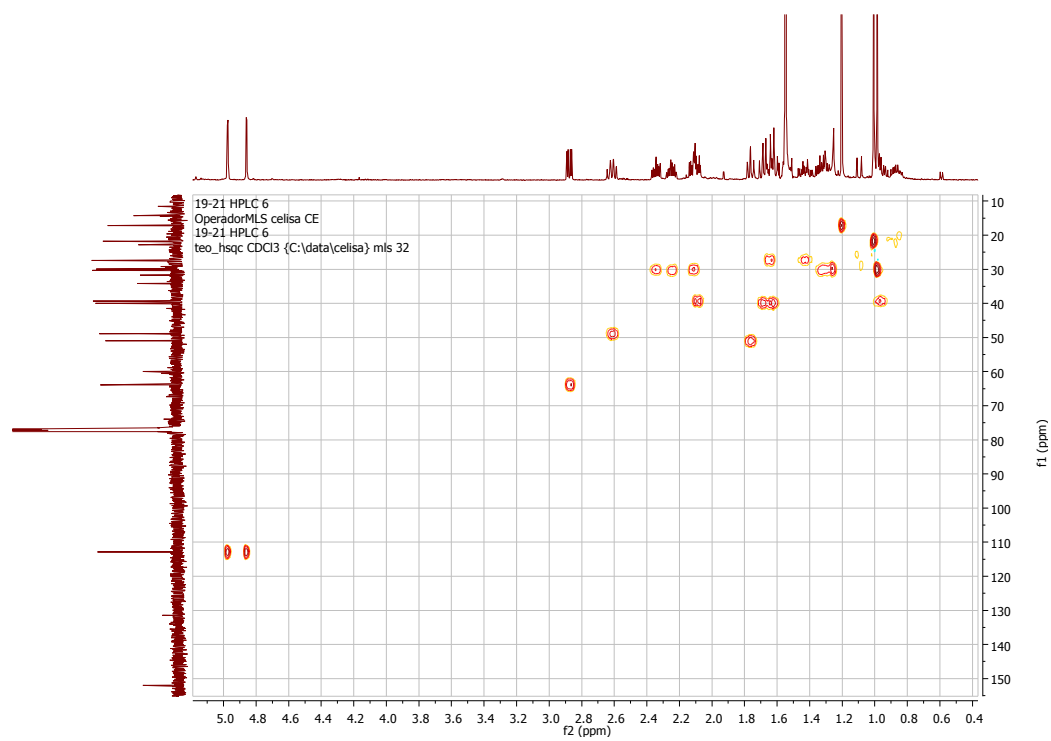
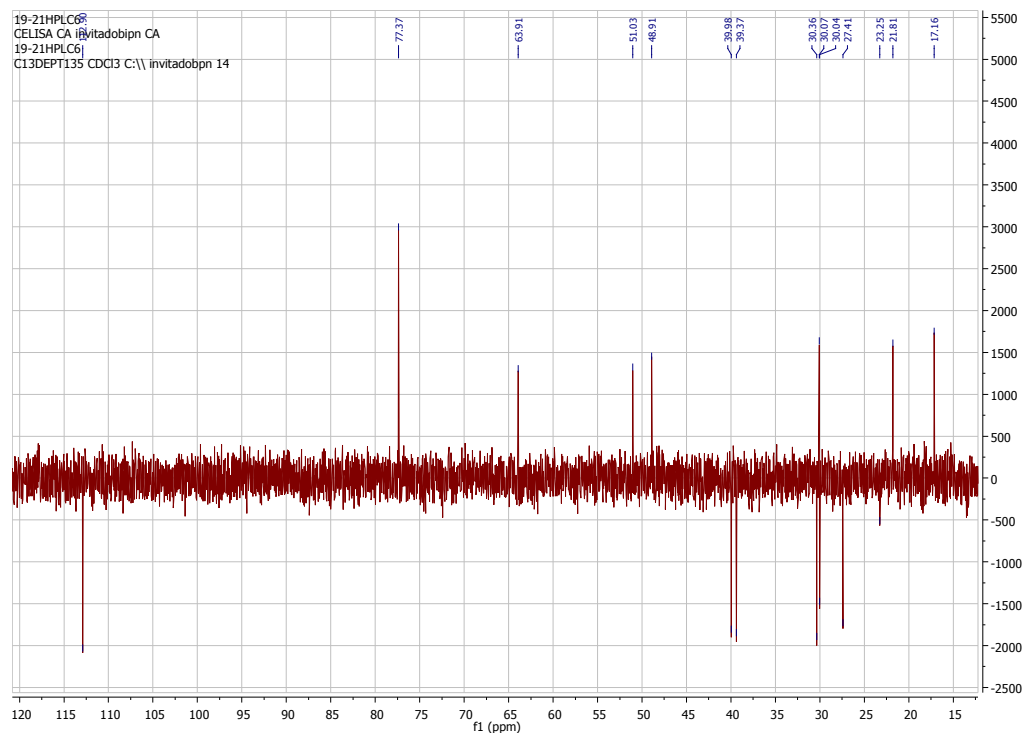


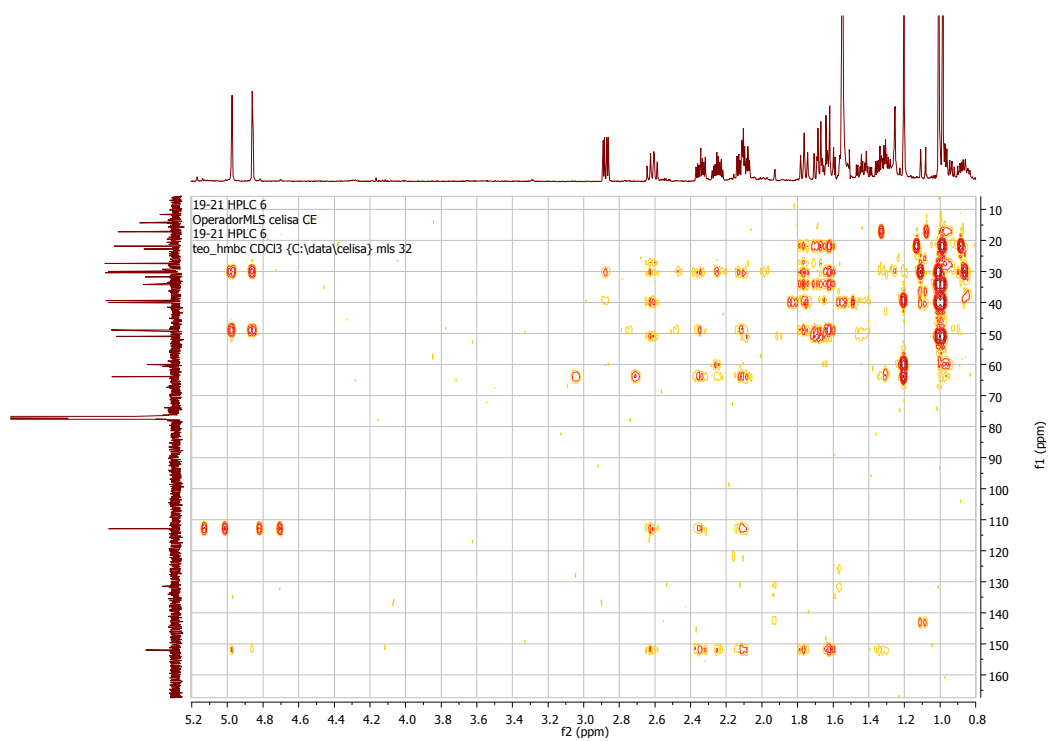
ANEXO IV - Análisis espectroscópicos de compuestos aislados de *A. edulis* y *D. viscosa*.

6,7 – epoxi cariofileno (58)

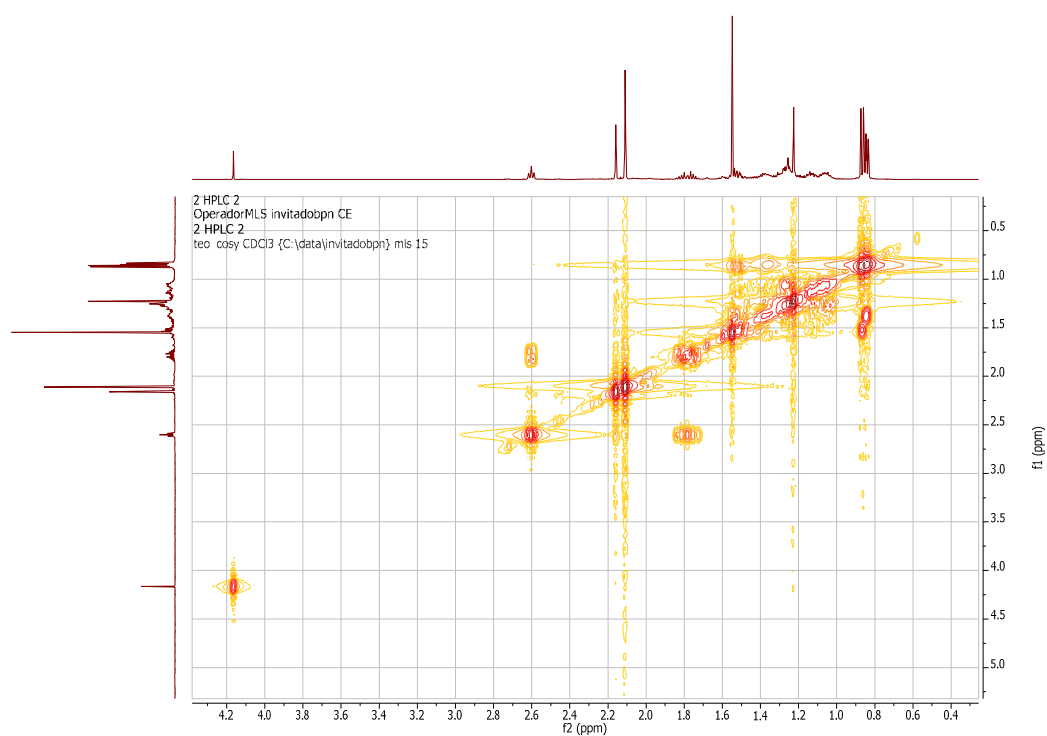
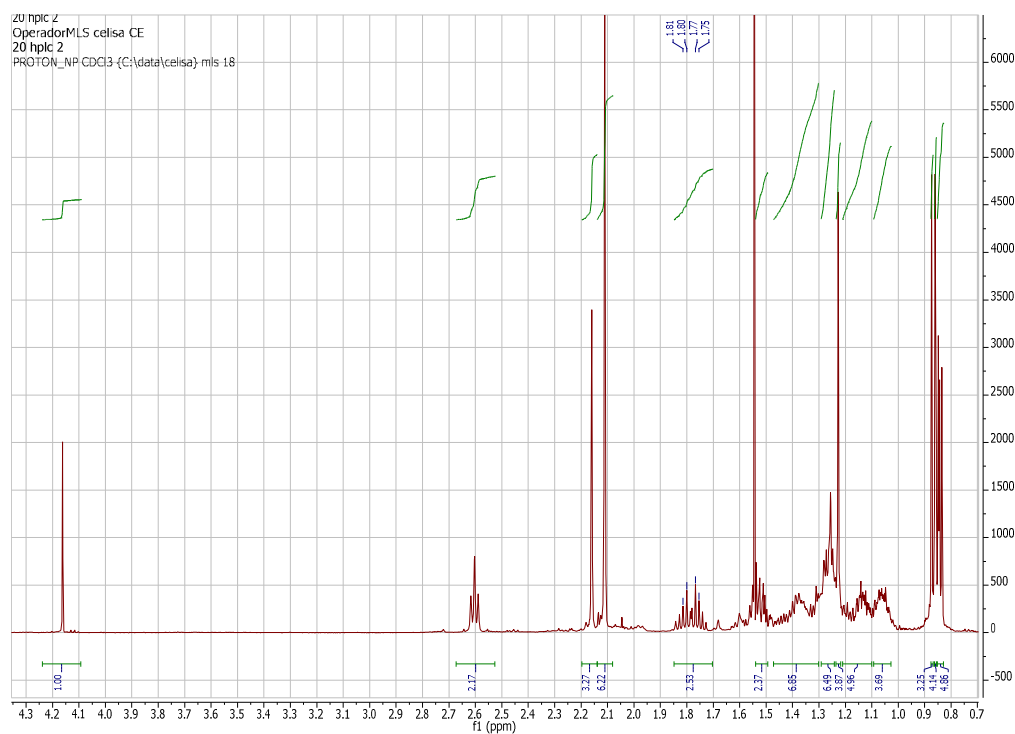


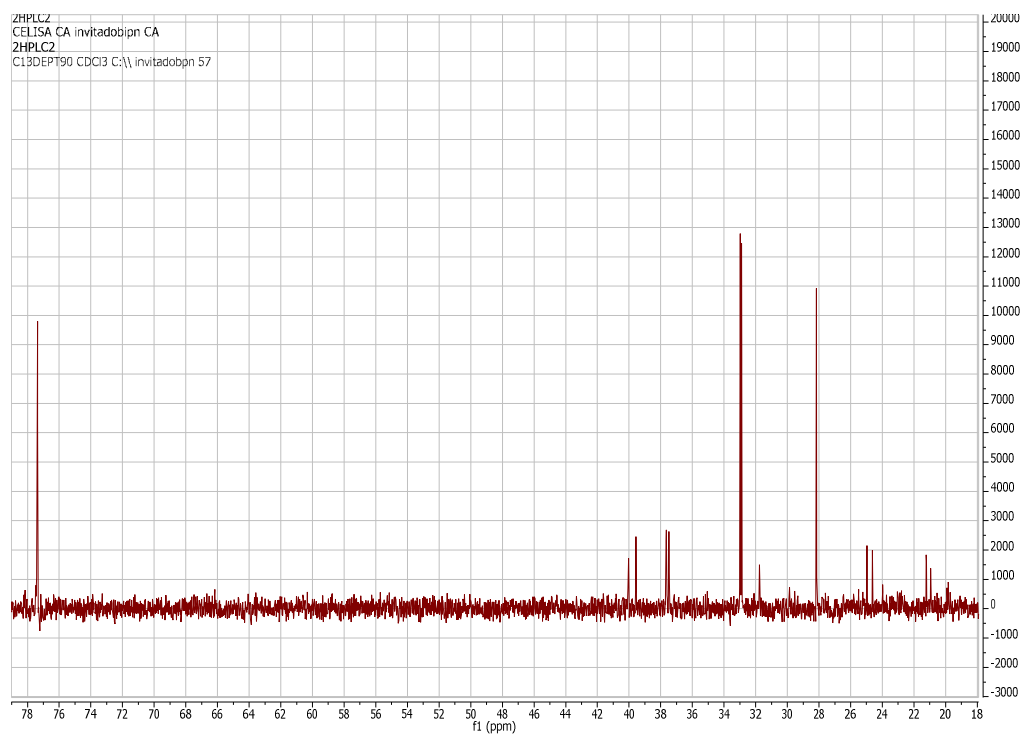
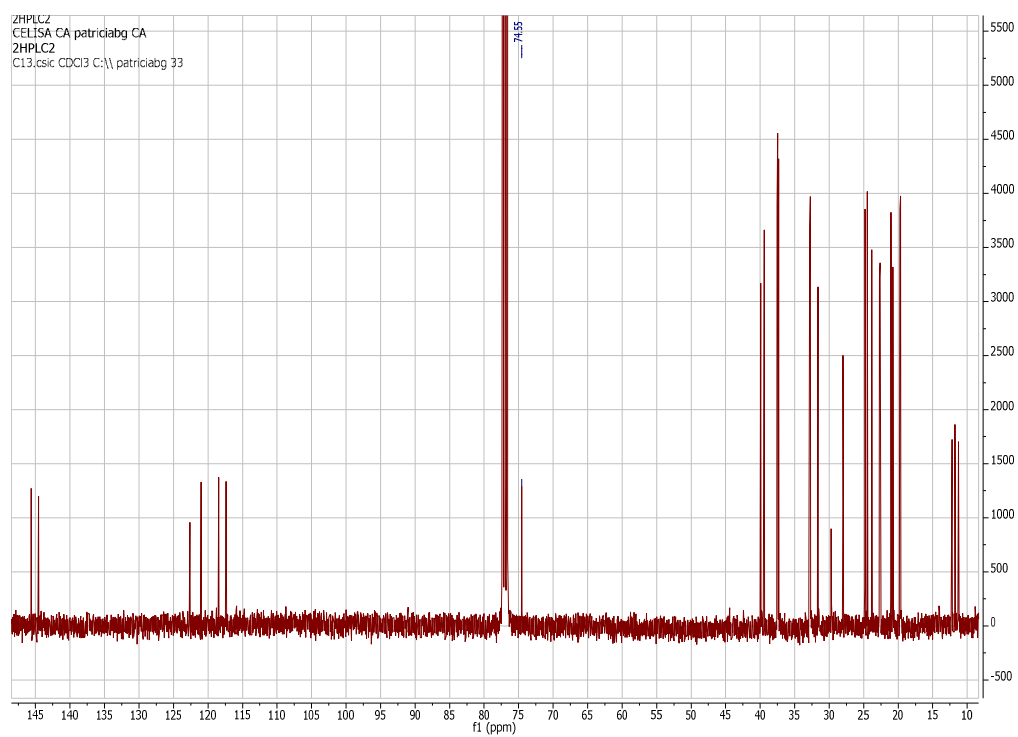


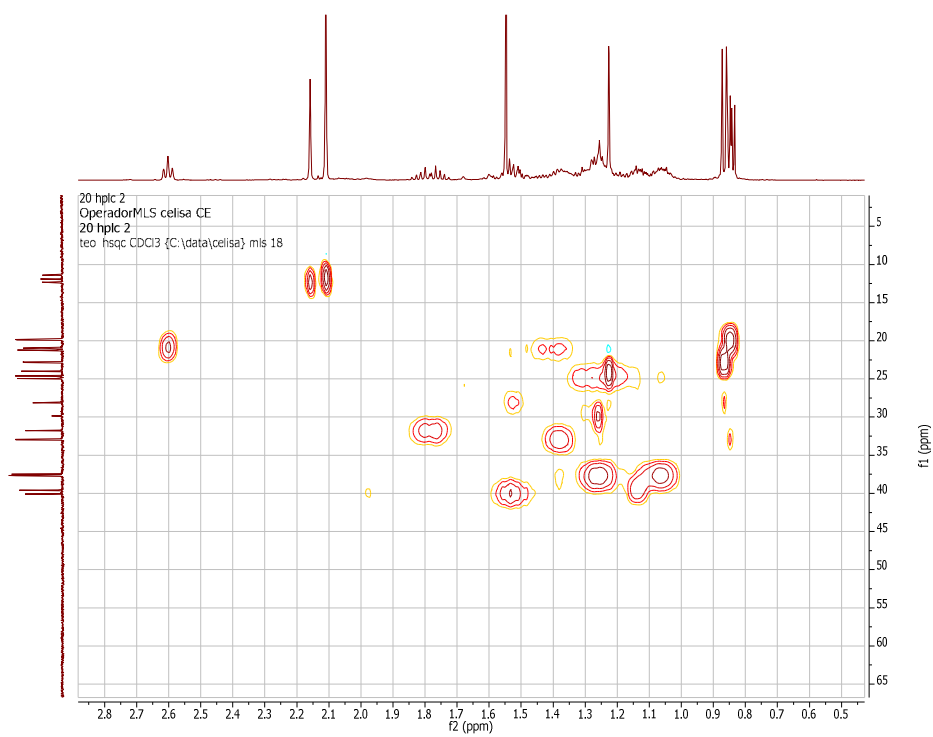
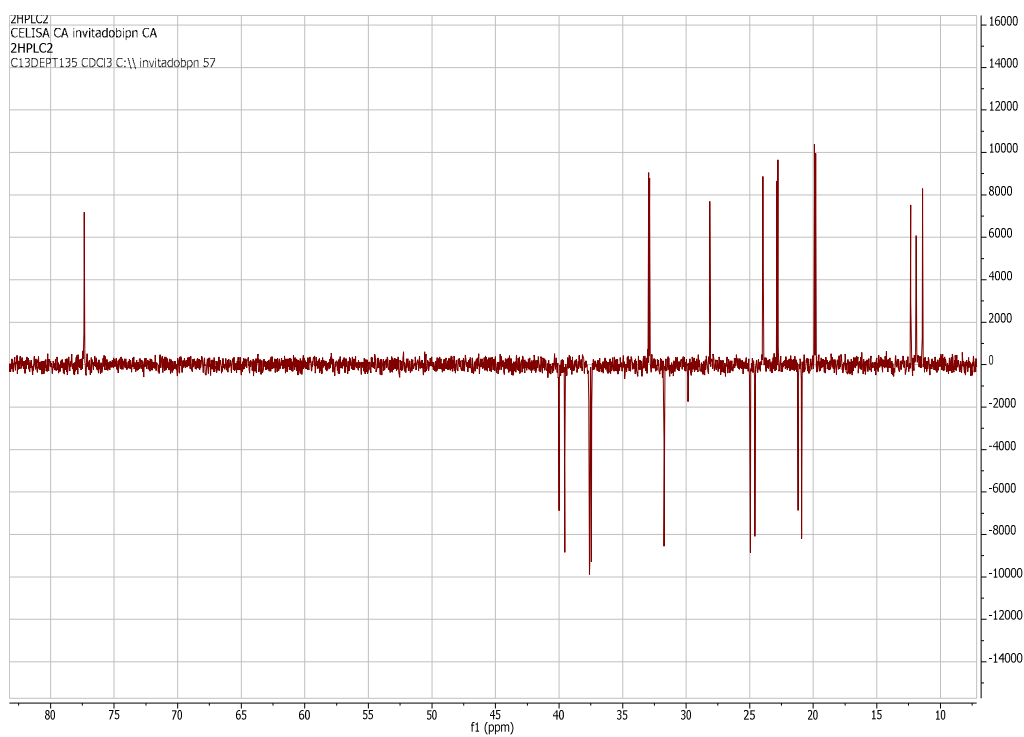


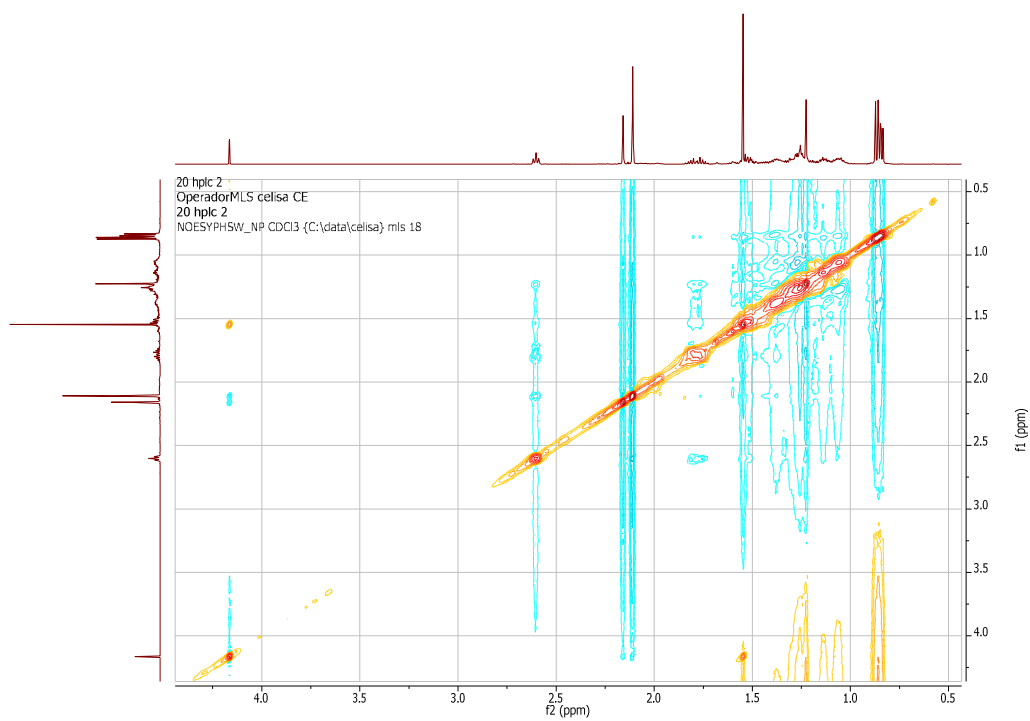
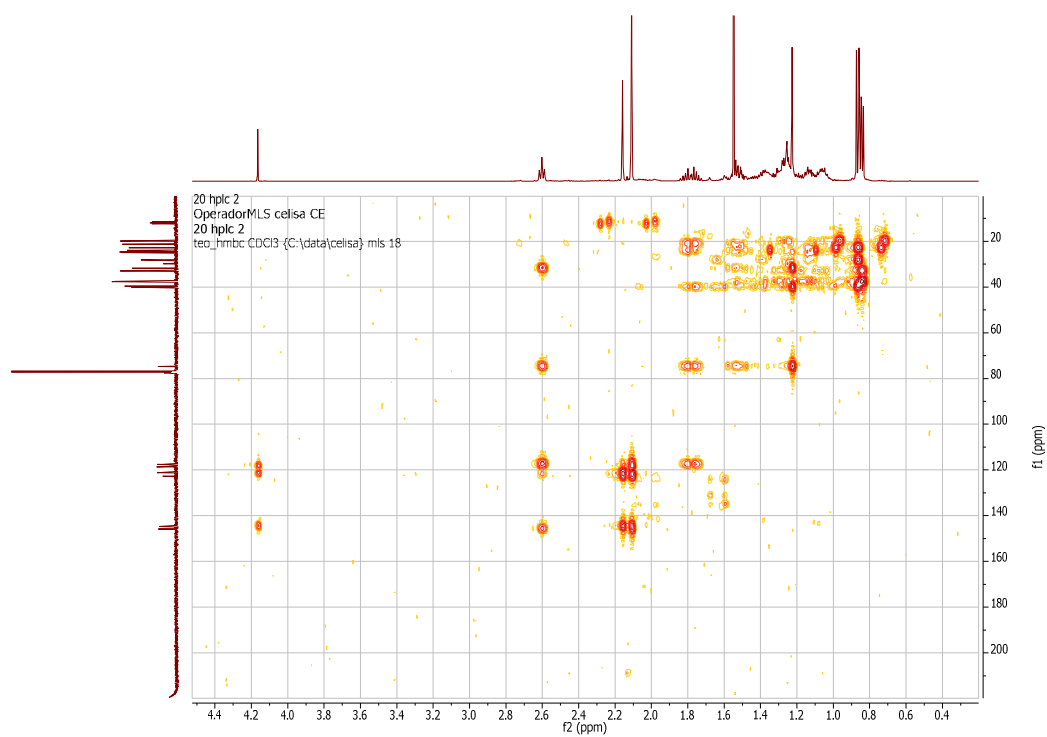


119

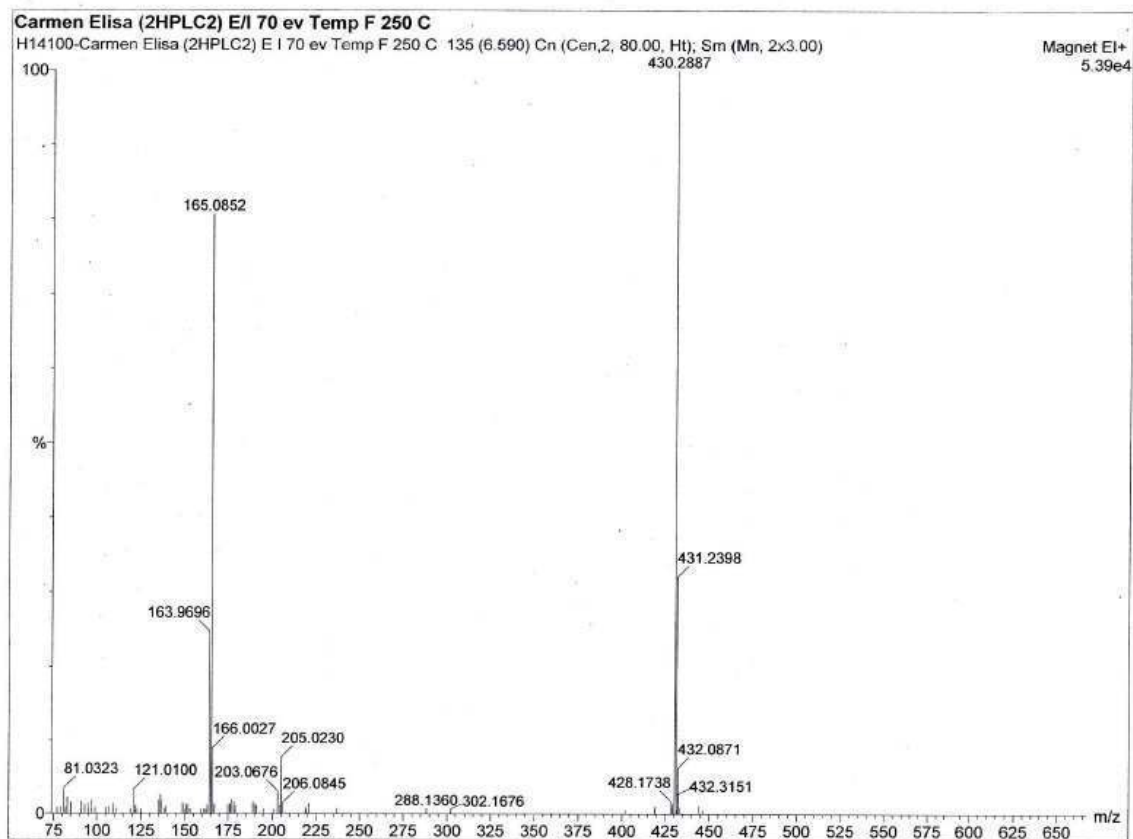




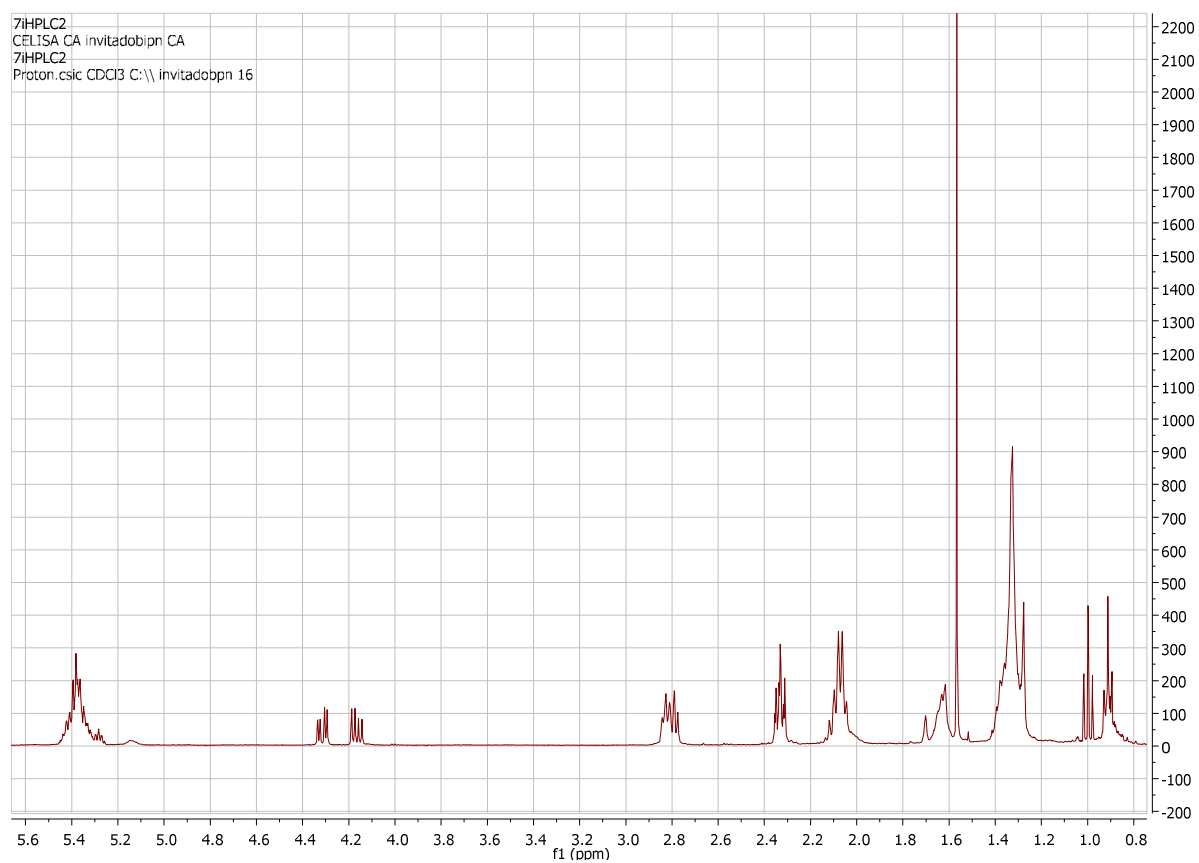




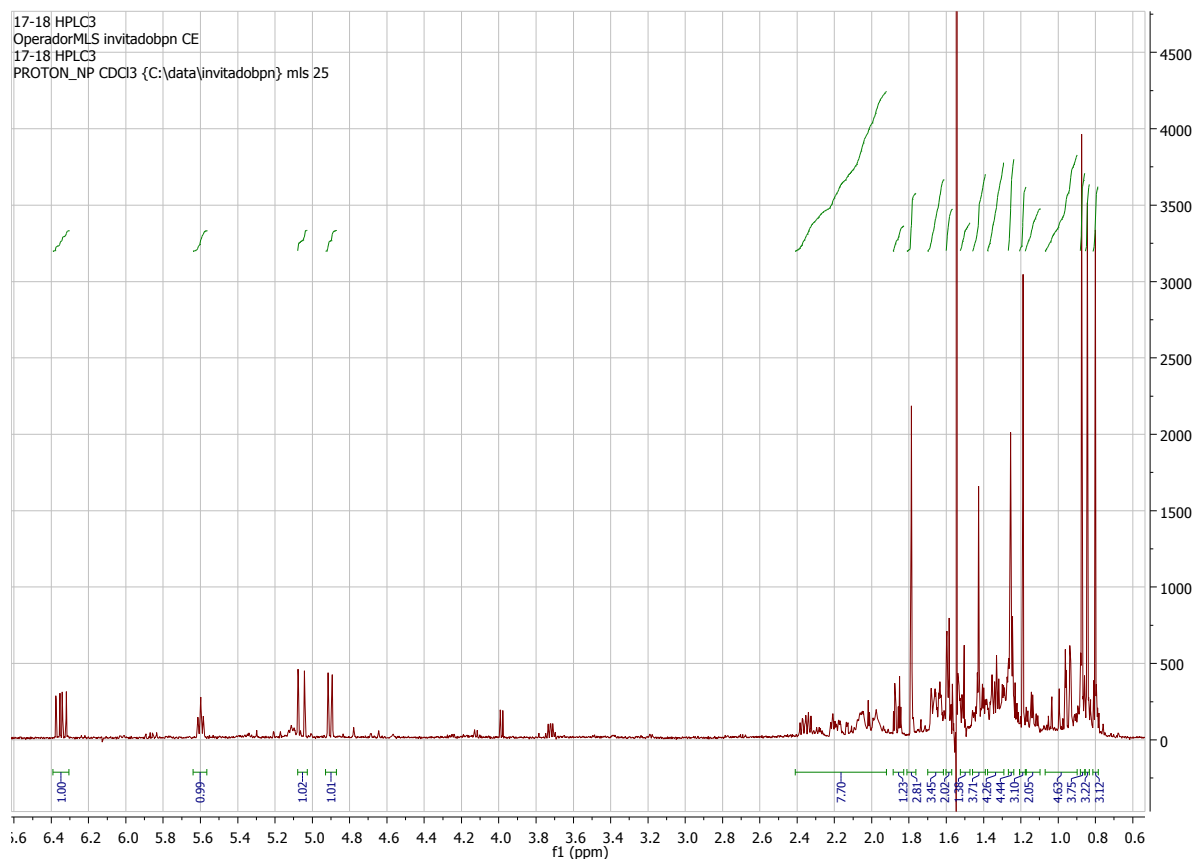
Espectro de masas de alta resolución:



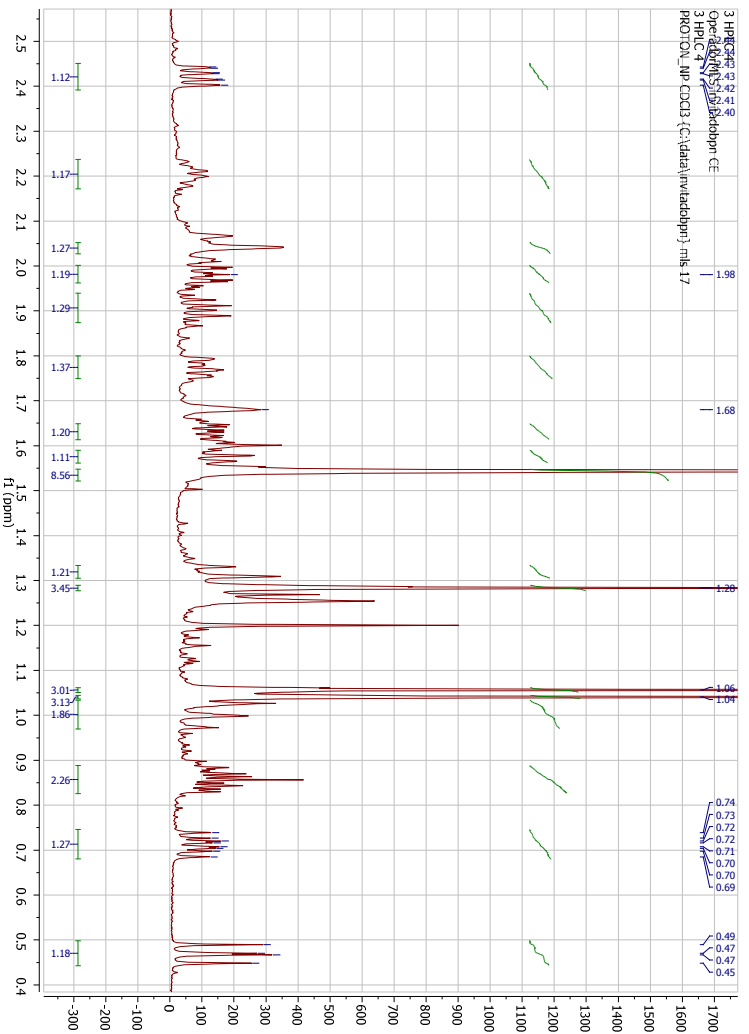
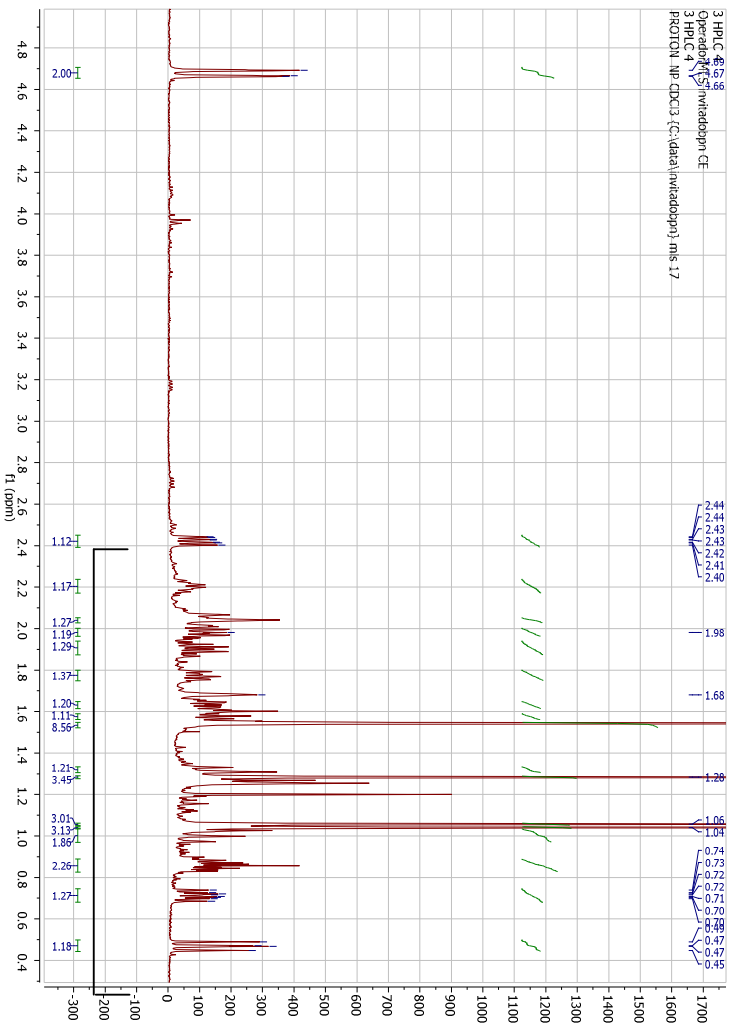
Mezcla (2-3)C2Ae

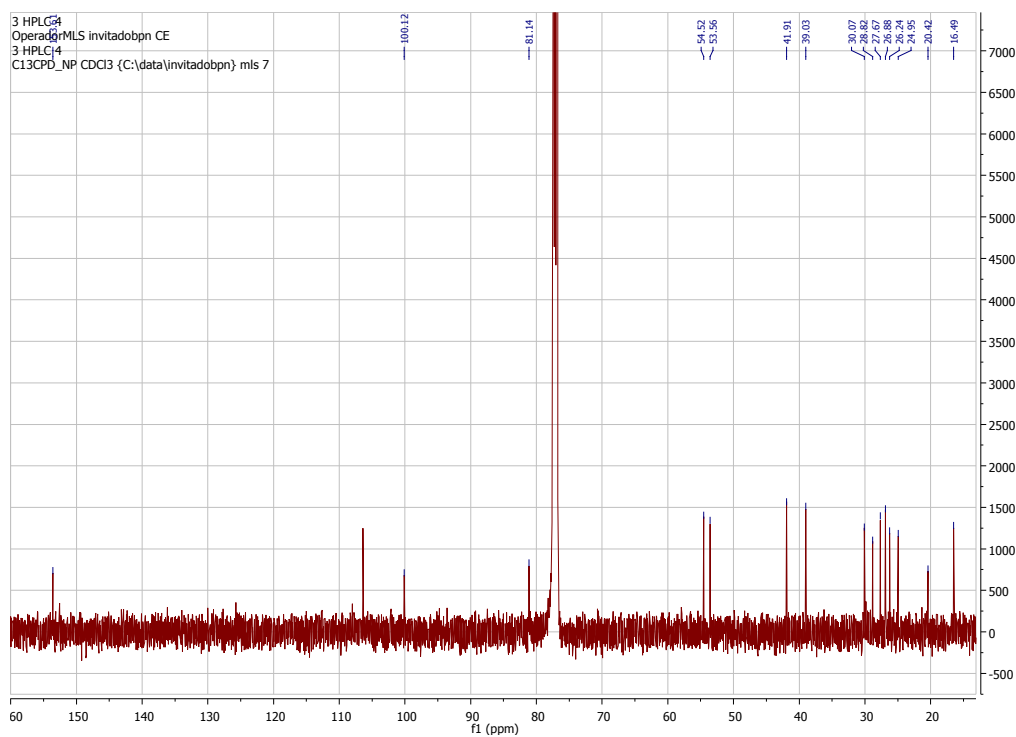
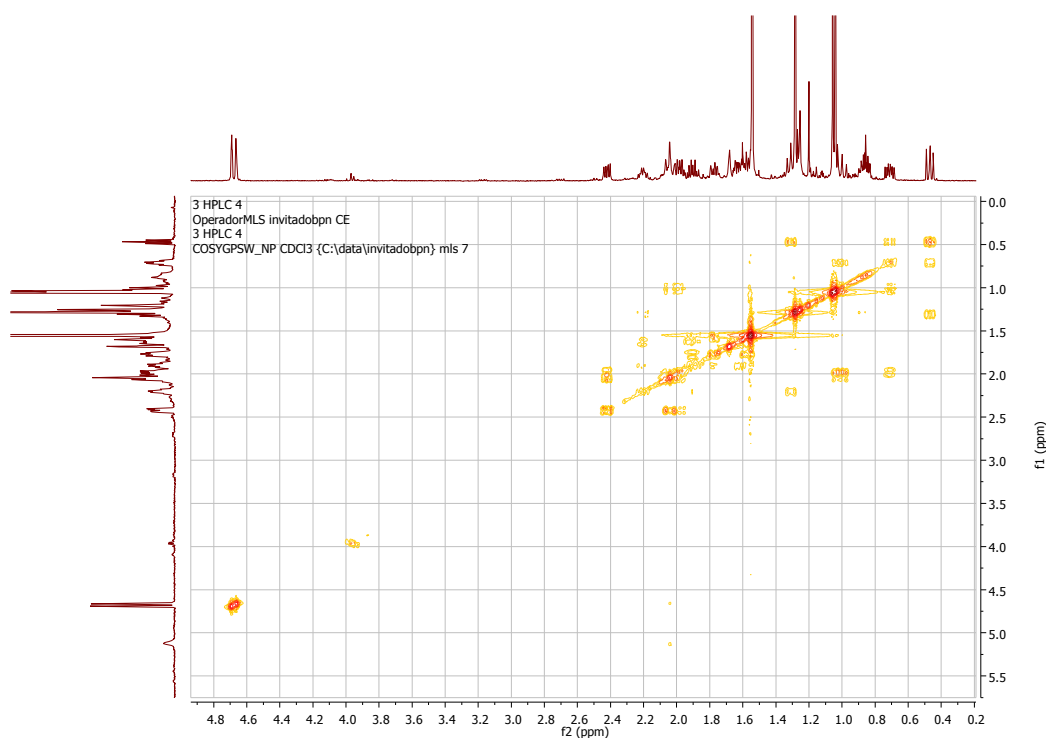


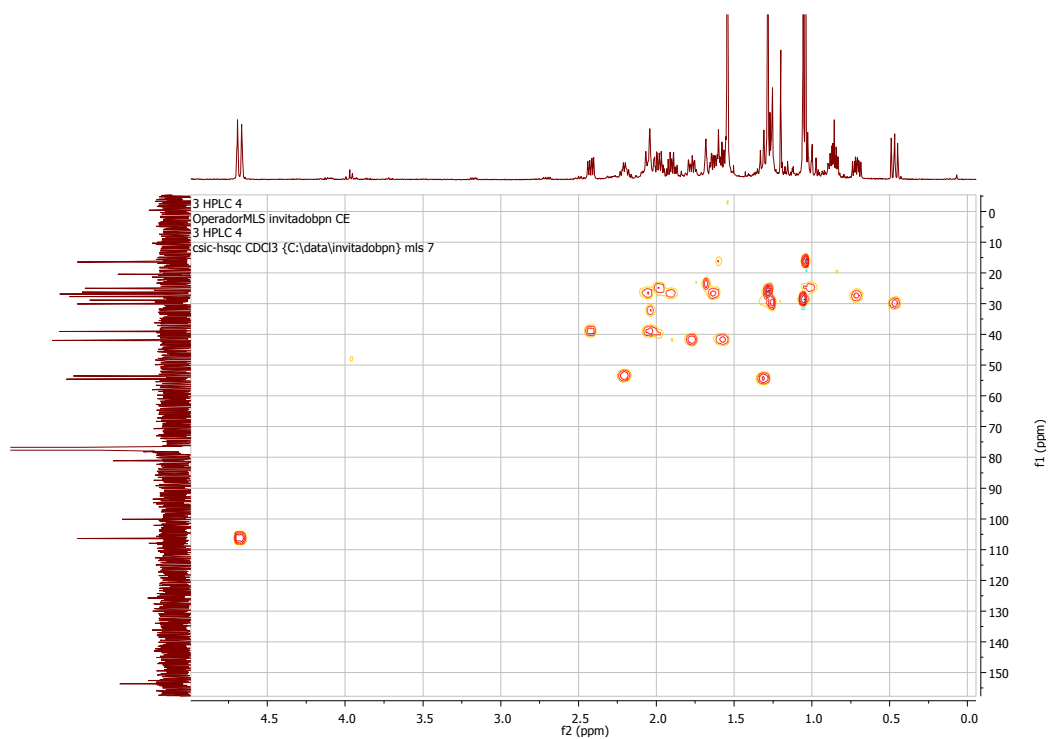
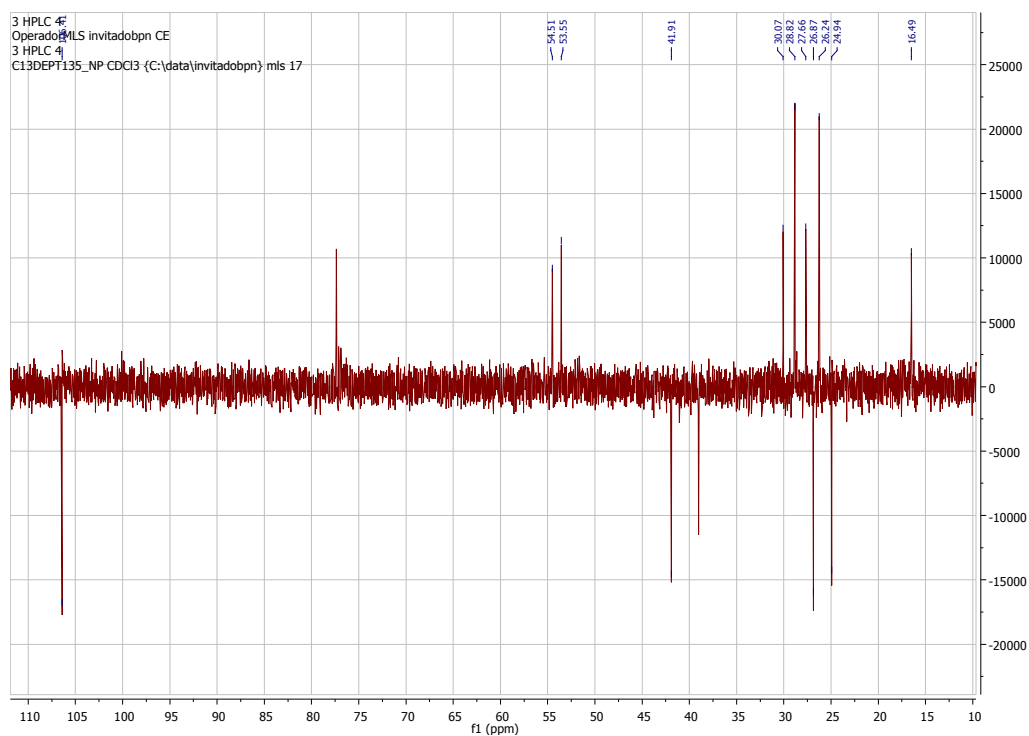
120

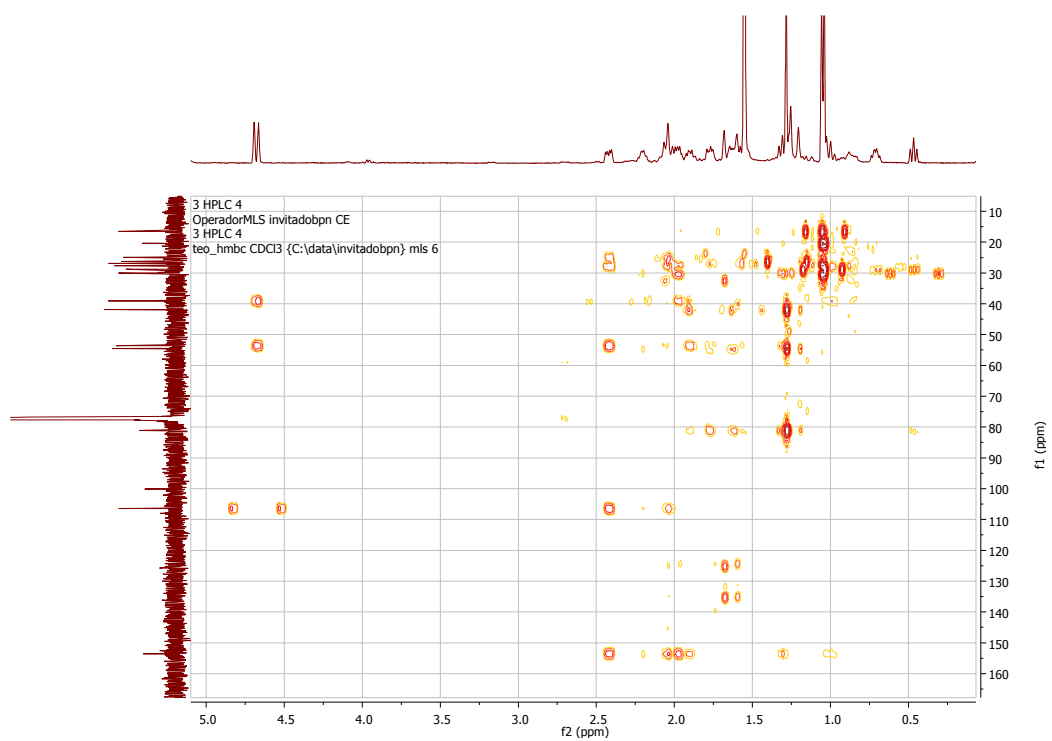


Espatuleno (121)

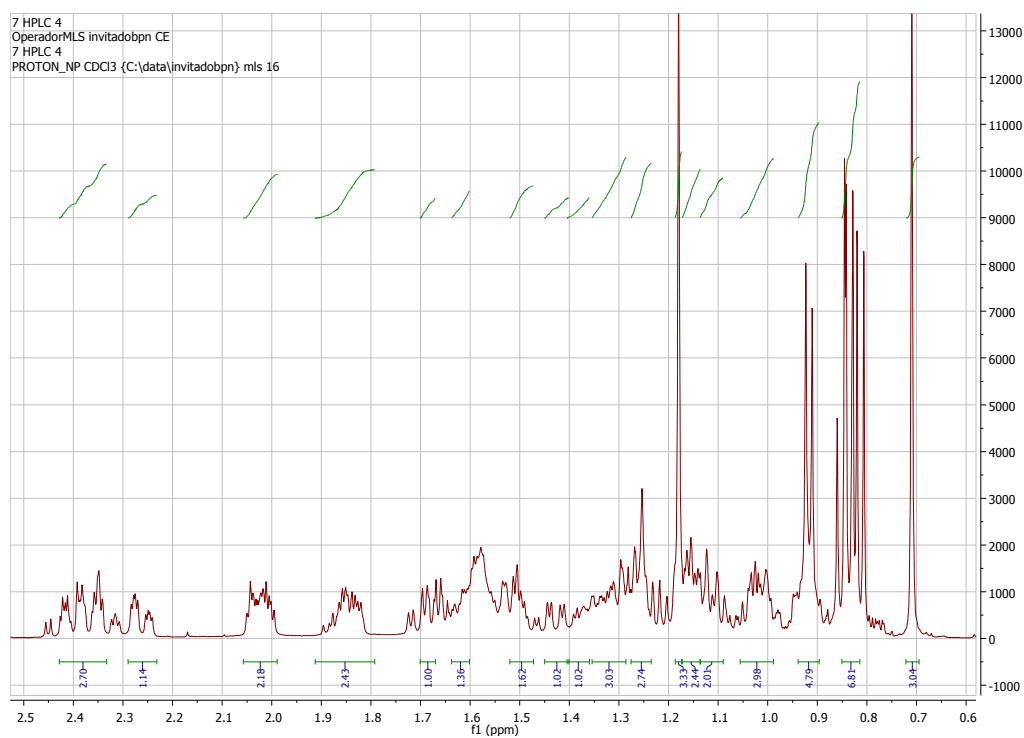
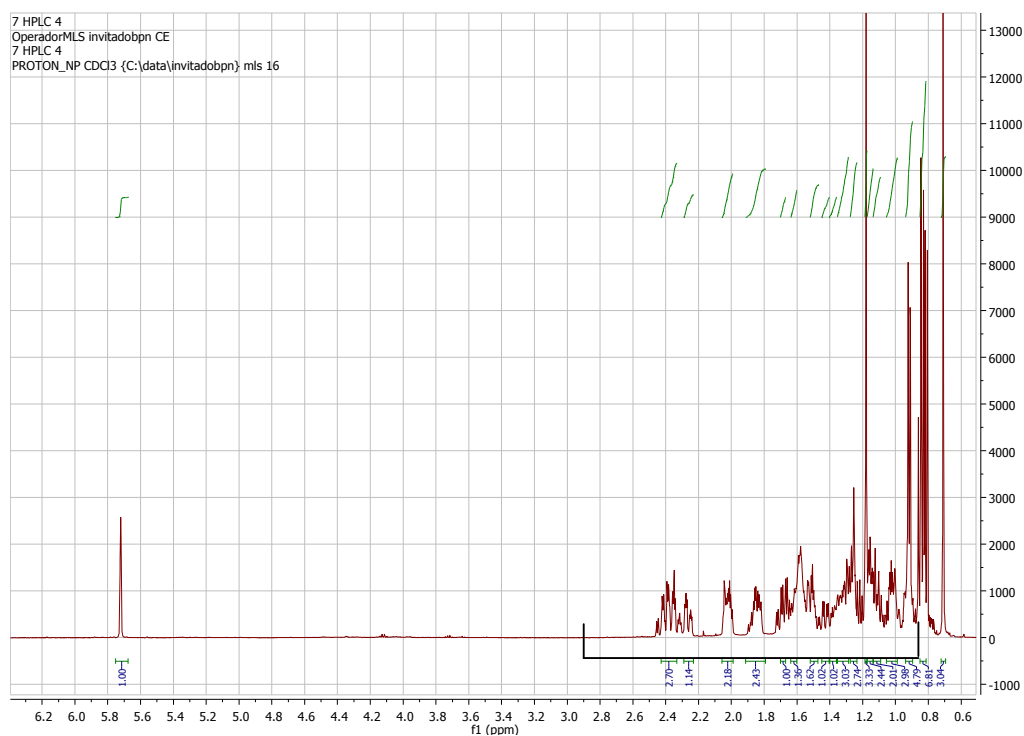


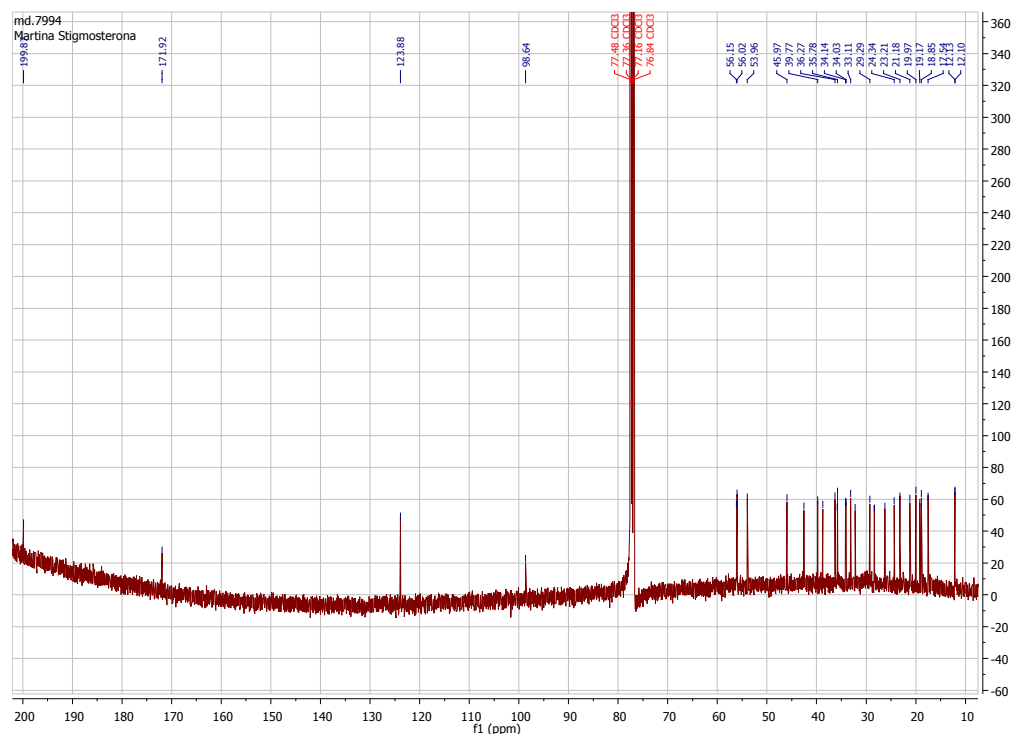
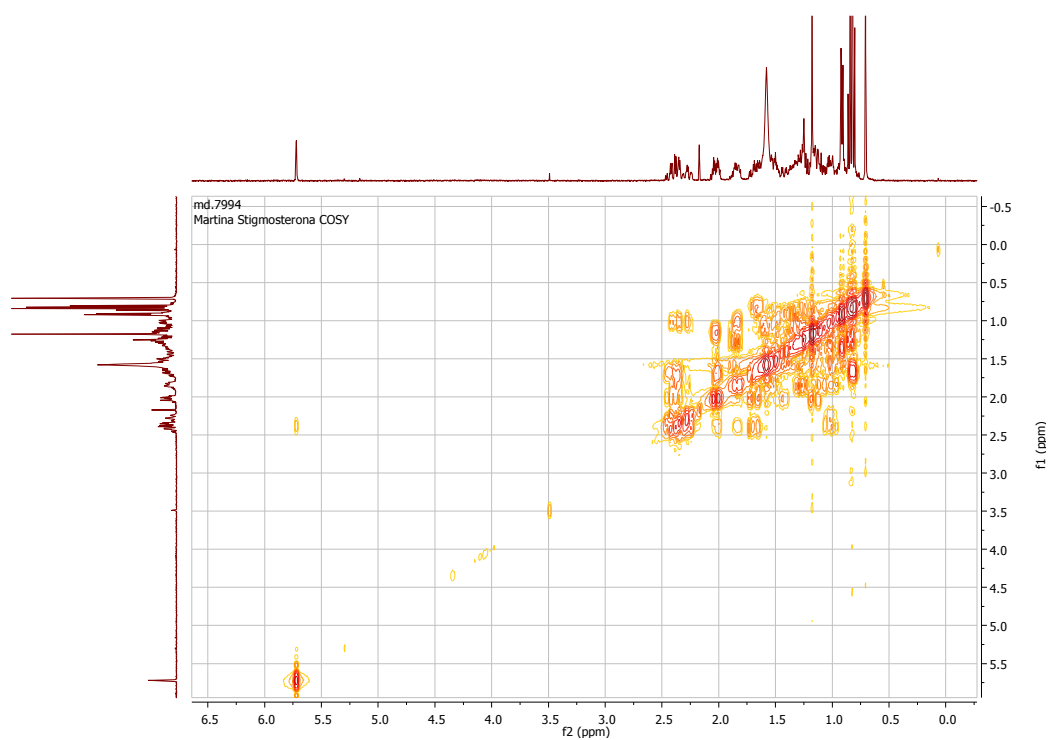


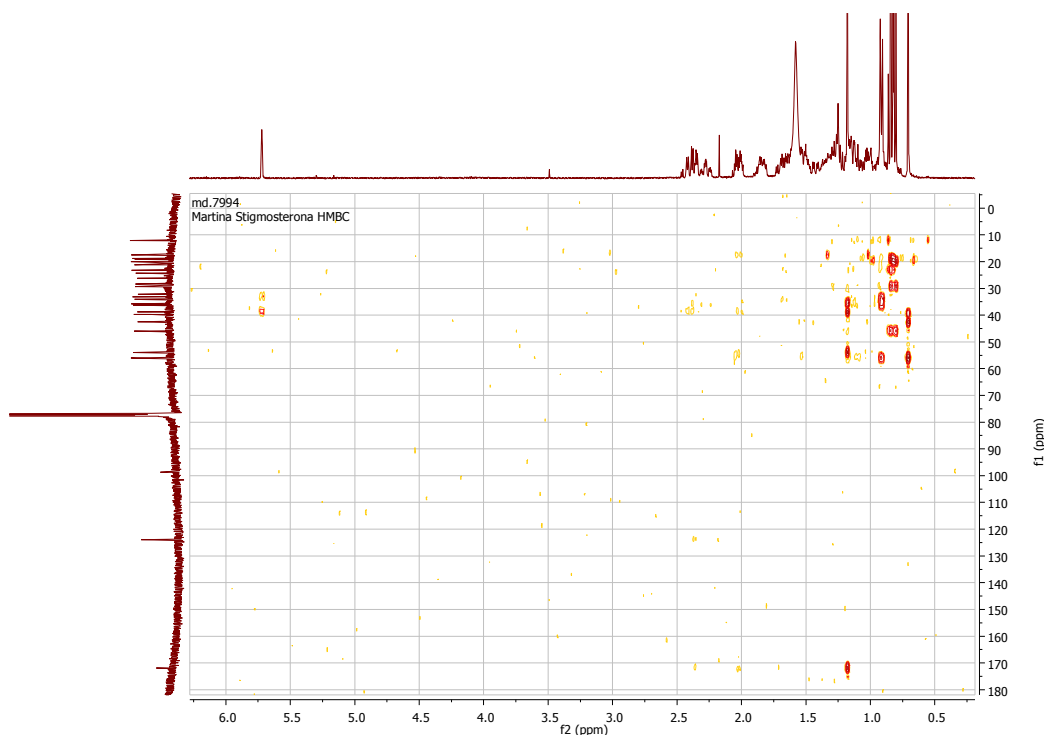
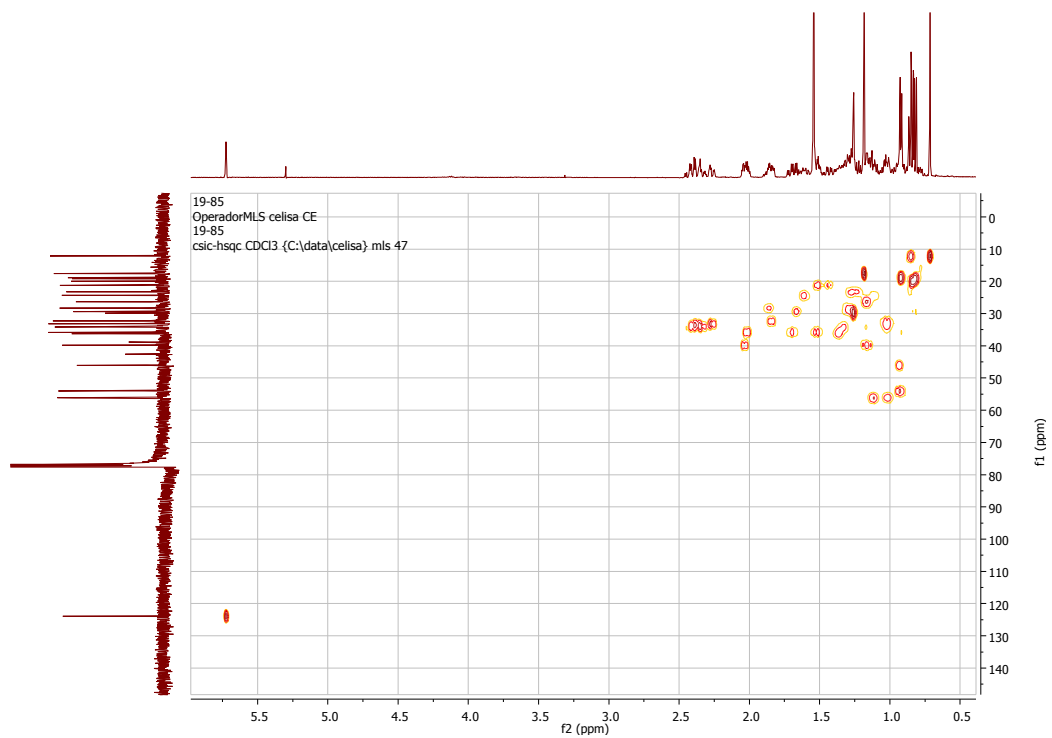


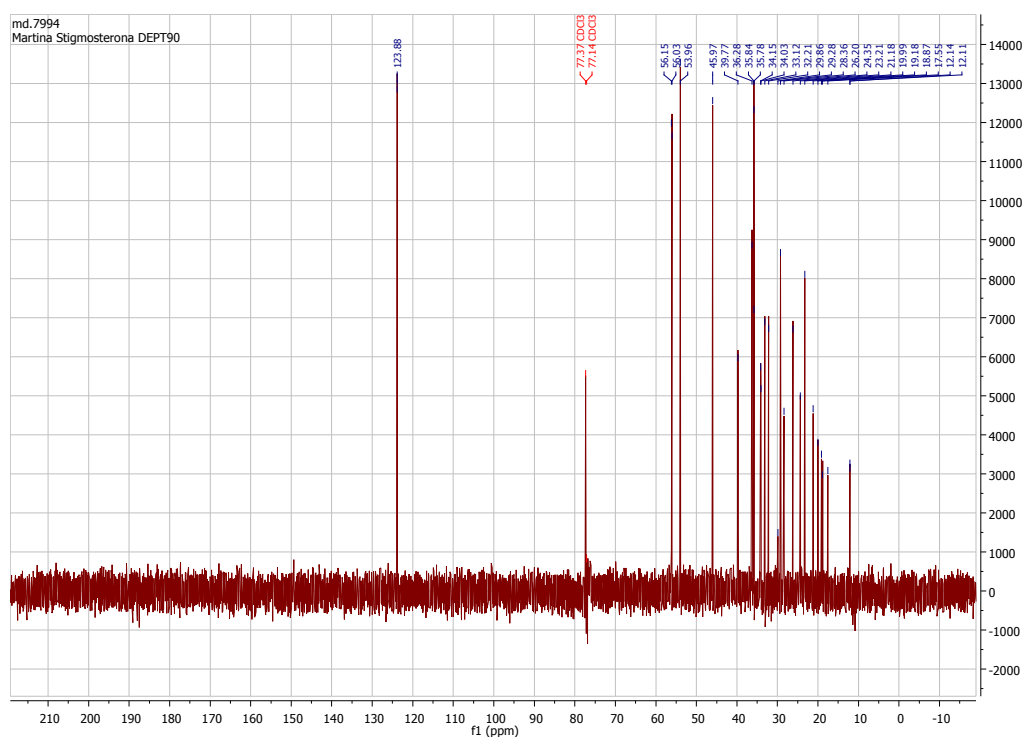
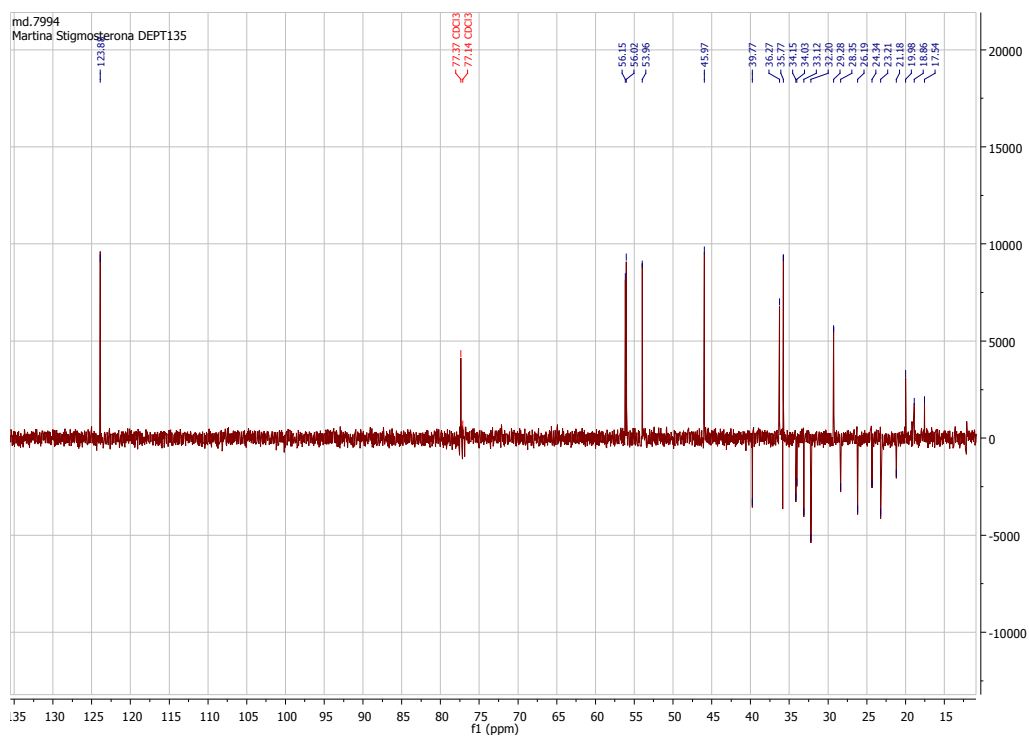


Sitosterona (122)

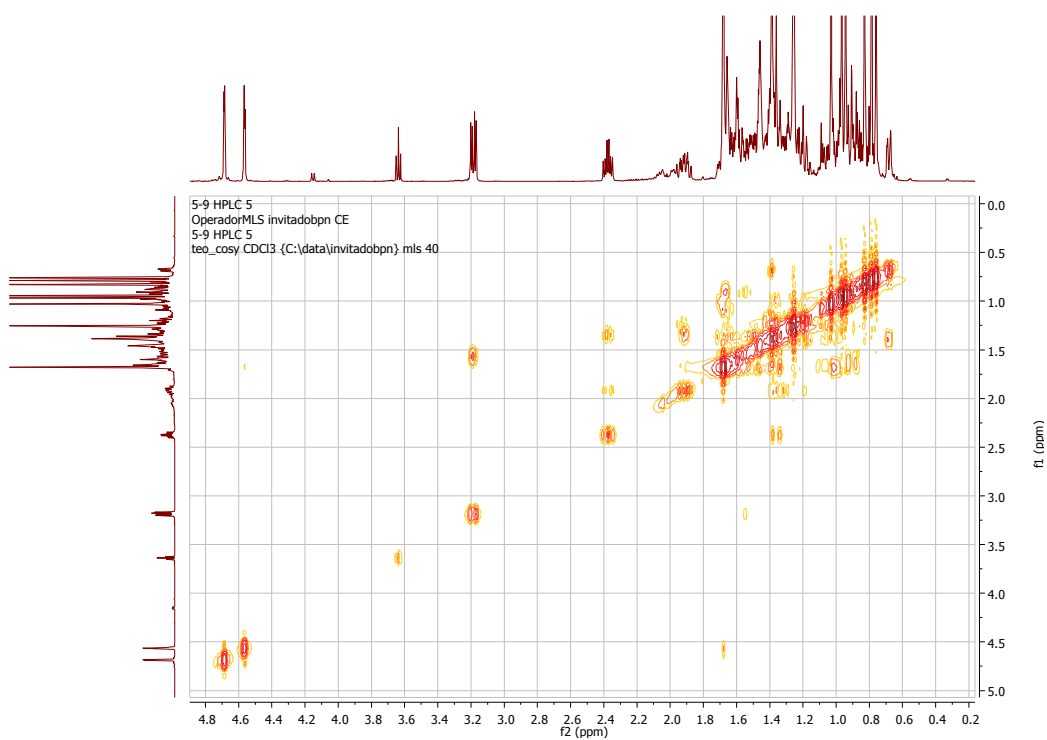
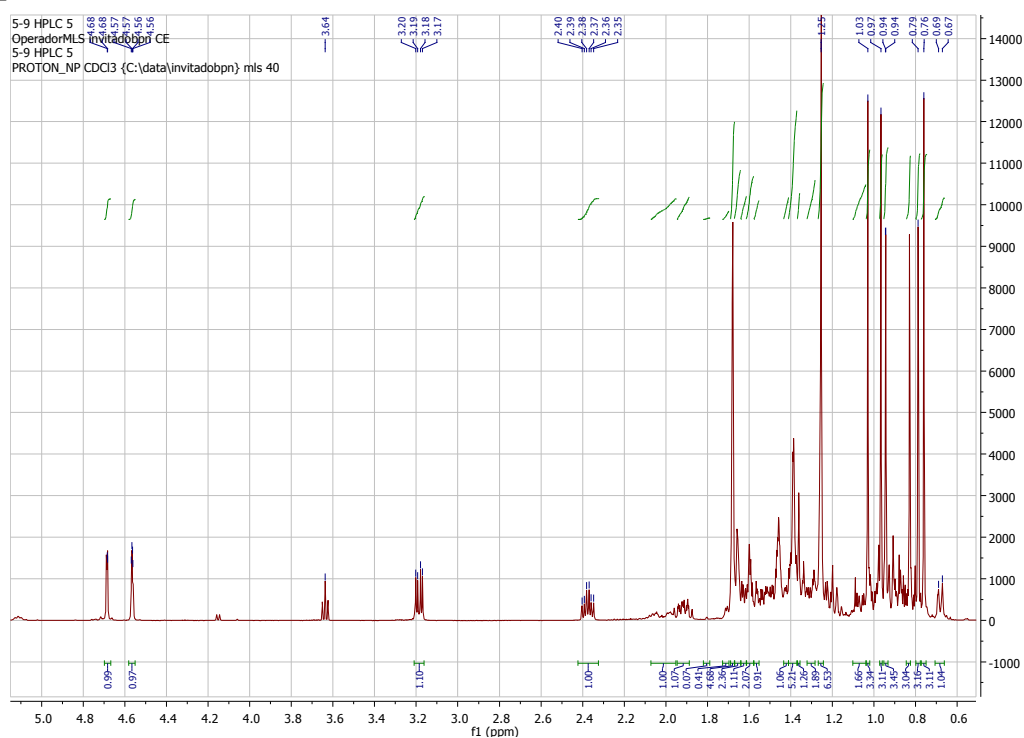


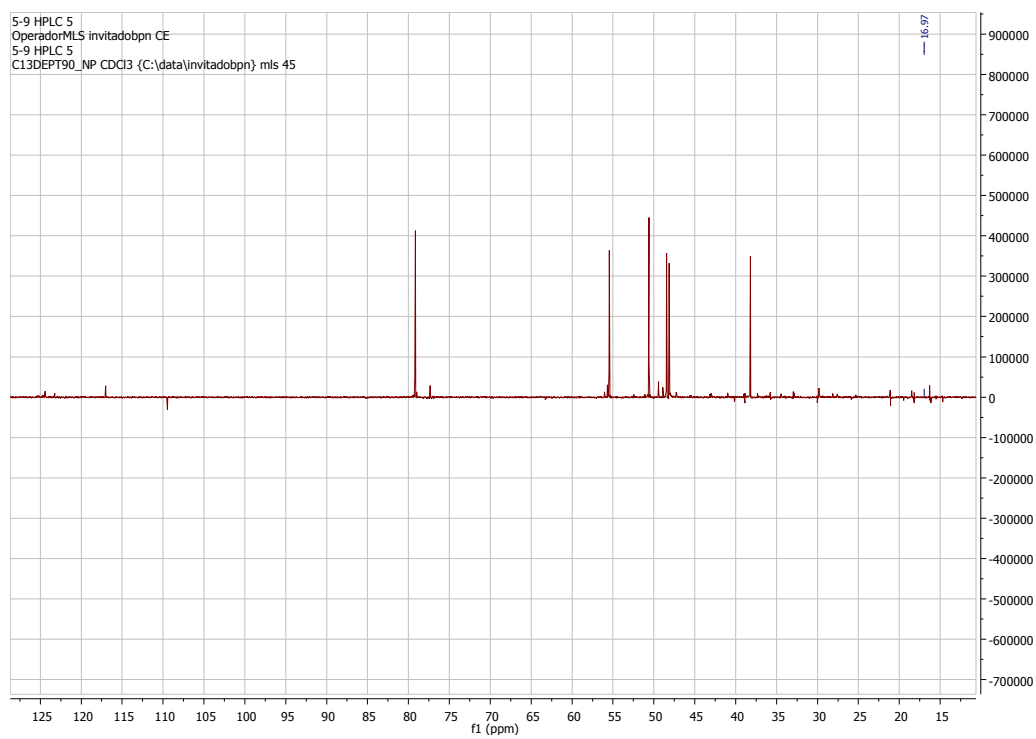
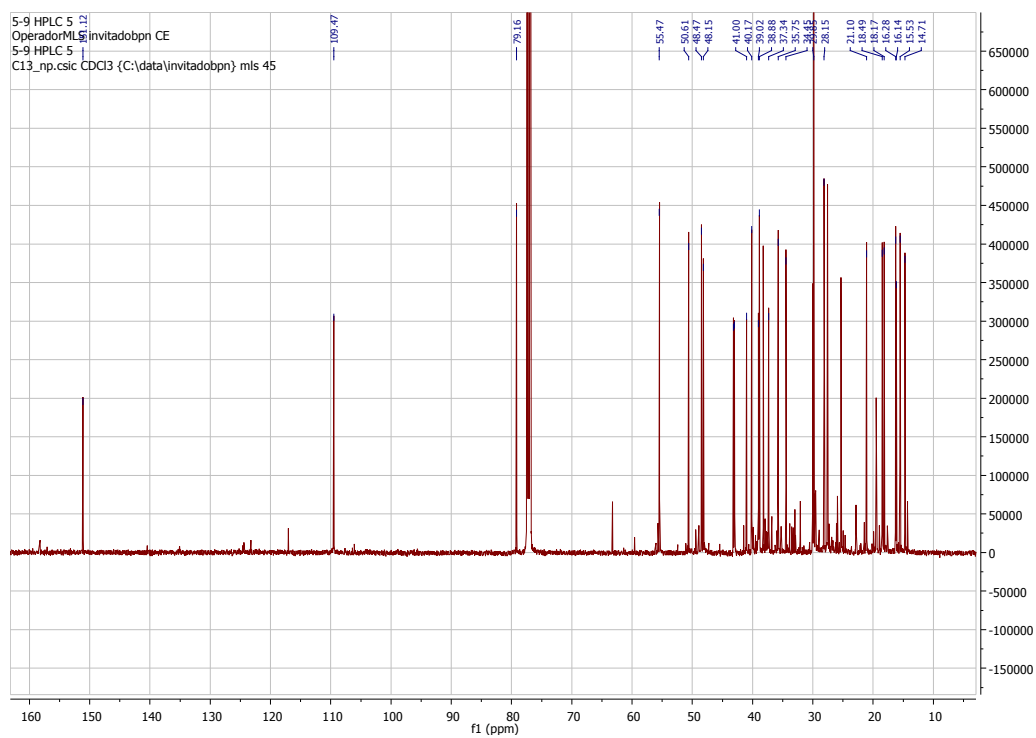


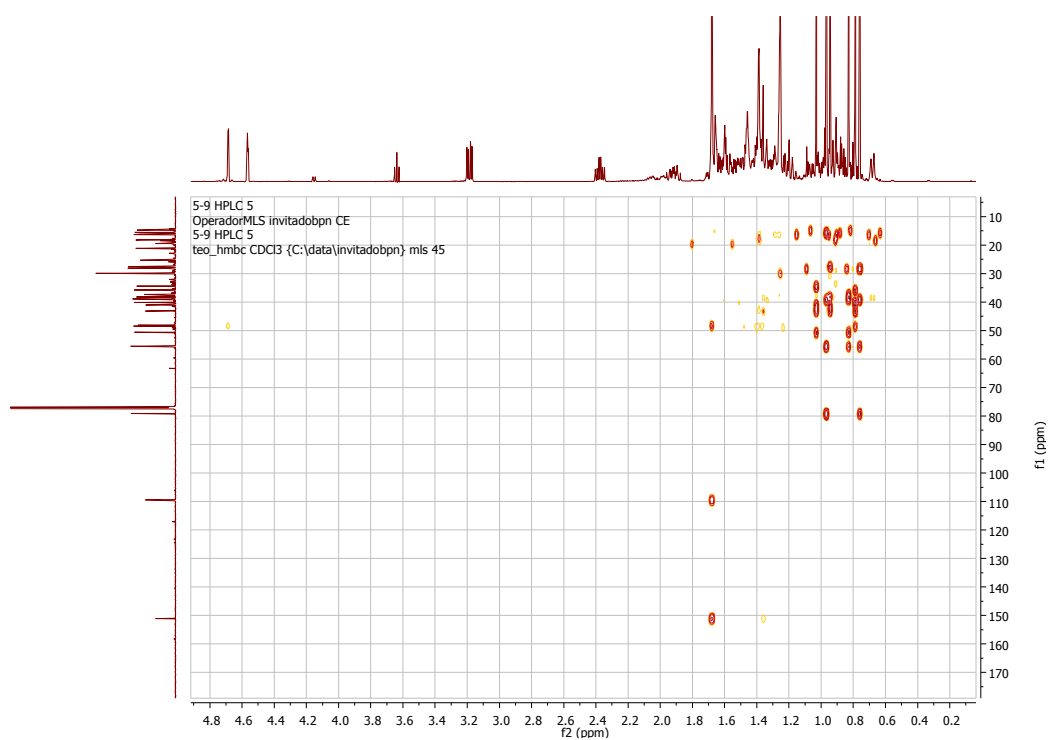
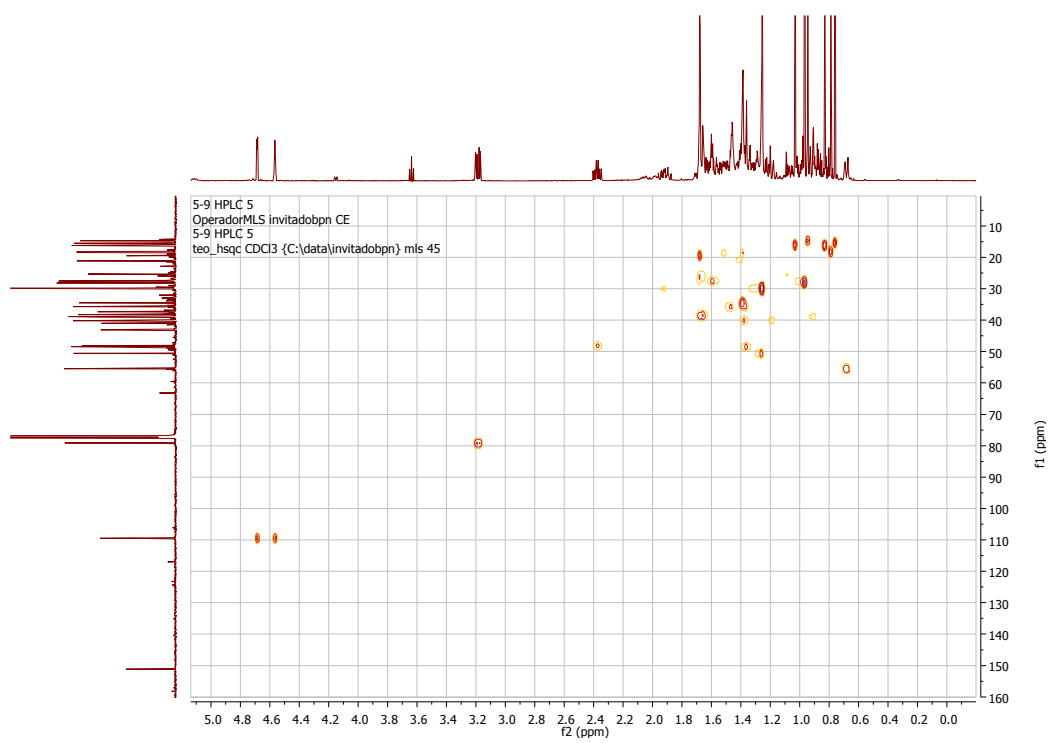




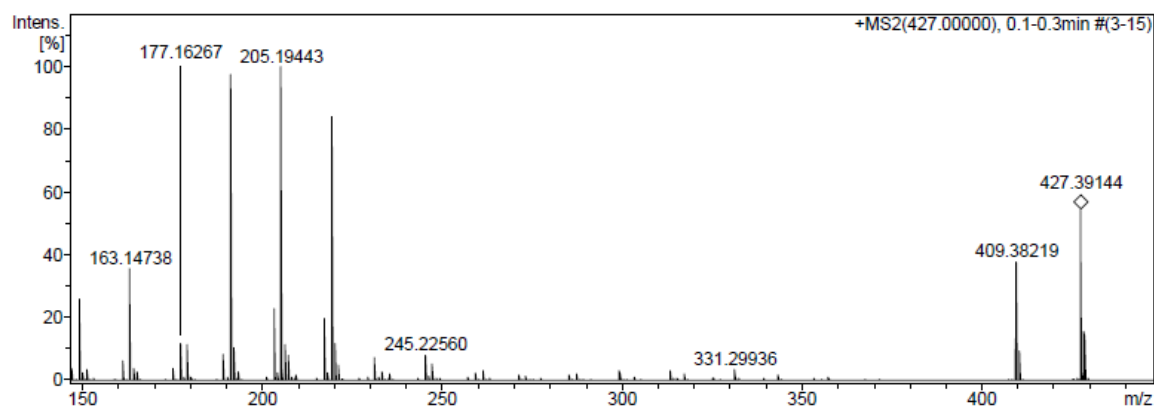
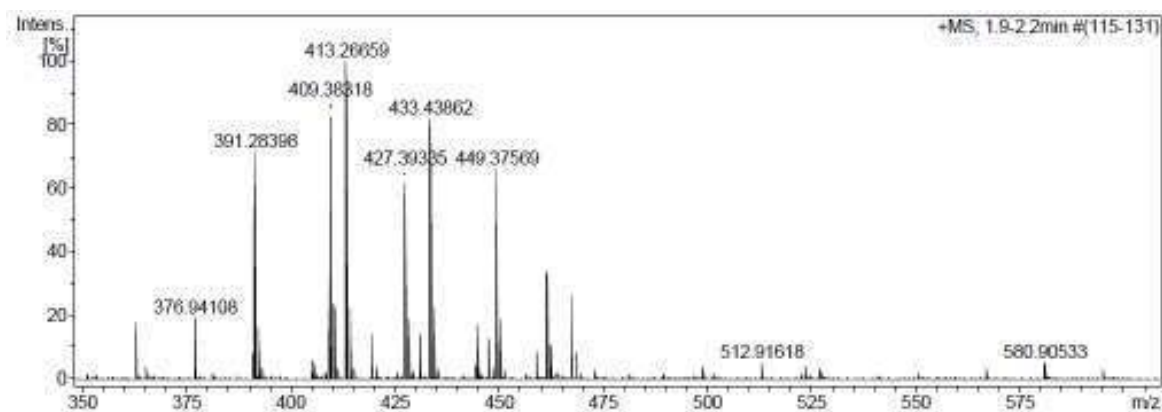
Lupeol (123)



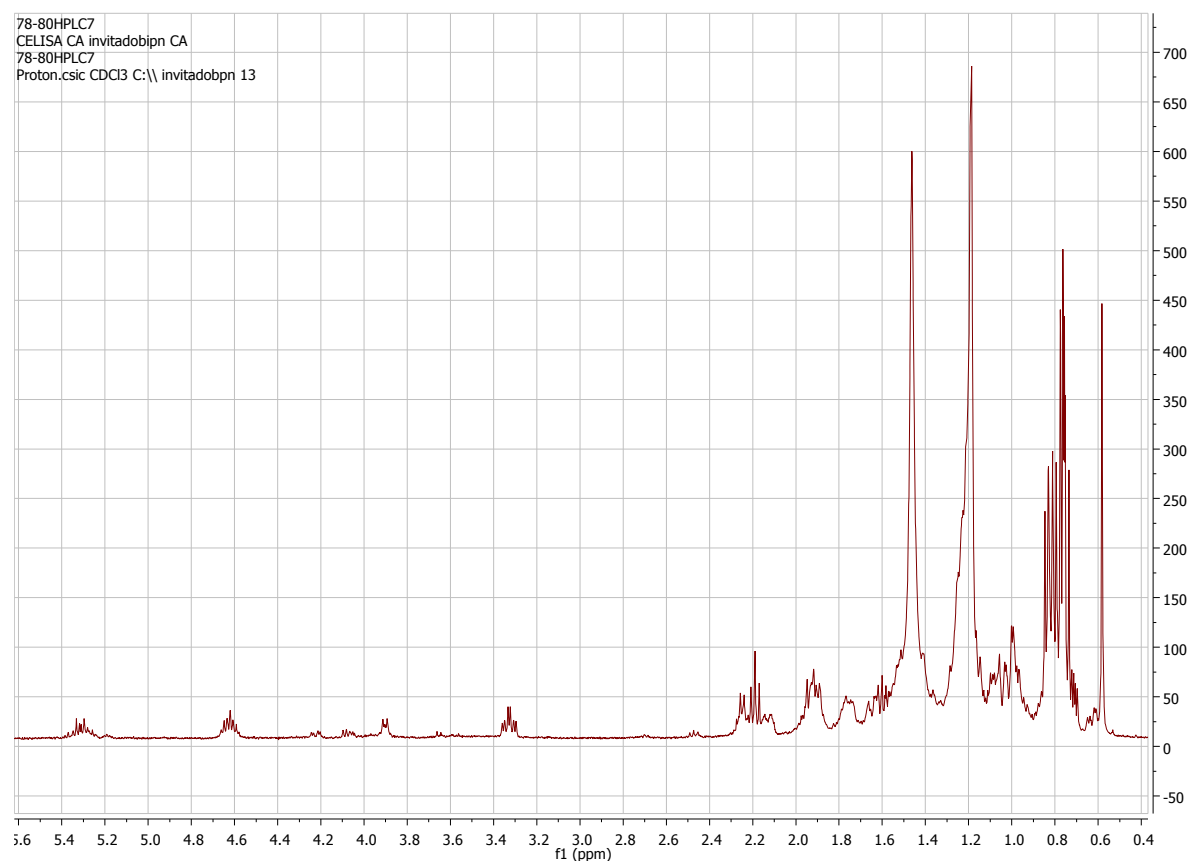




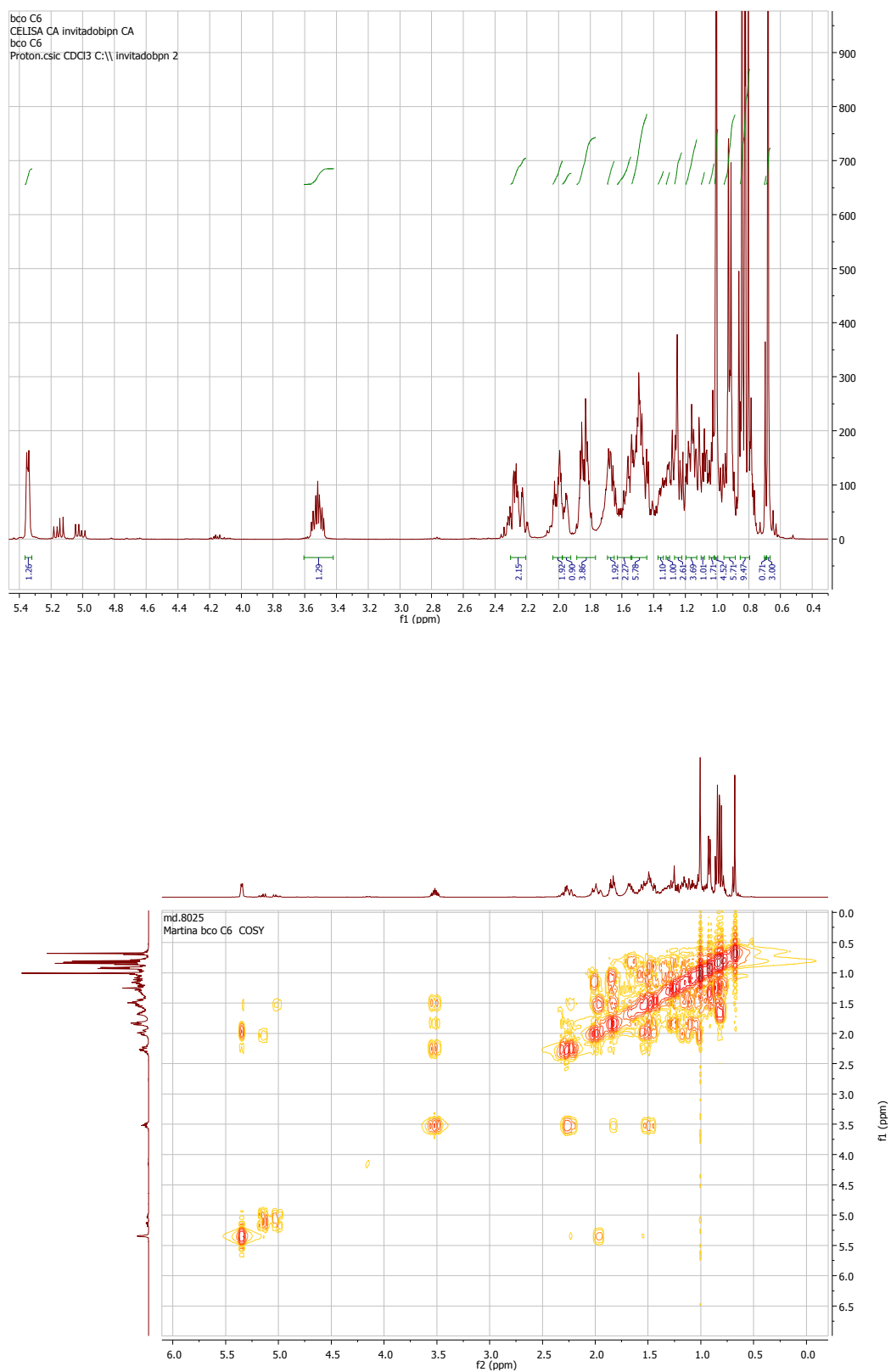
Espectro de masas de alta resolución



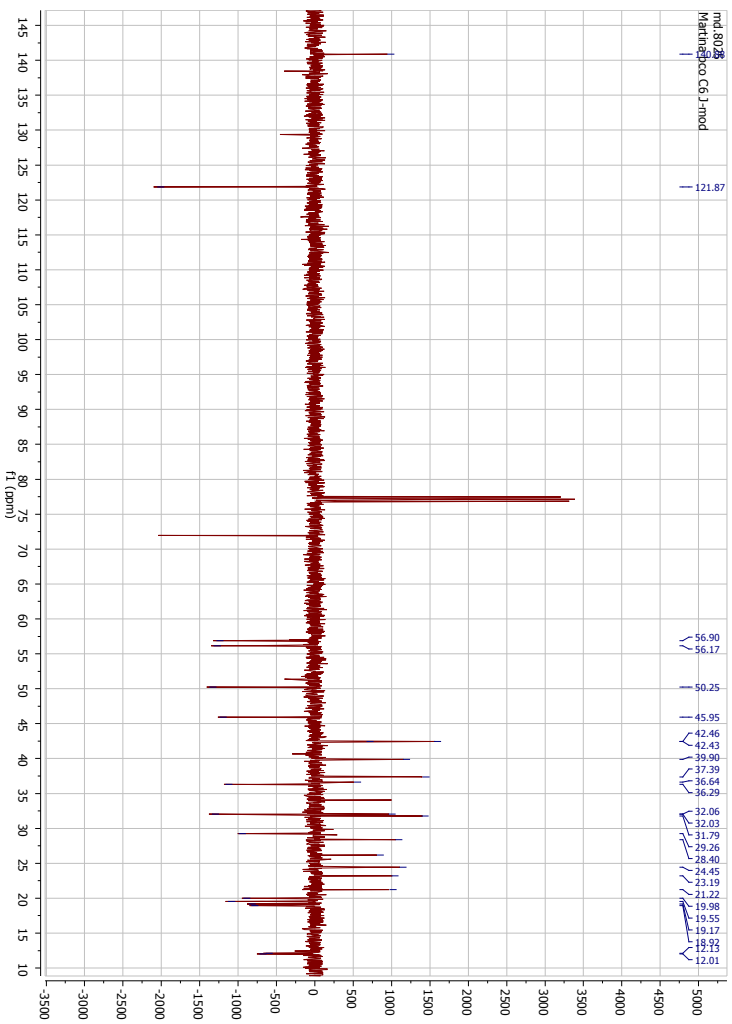
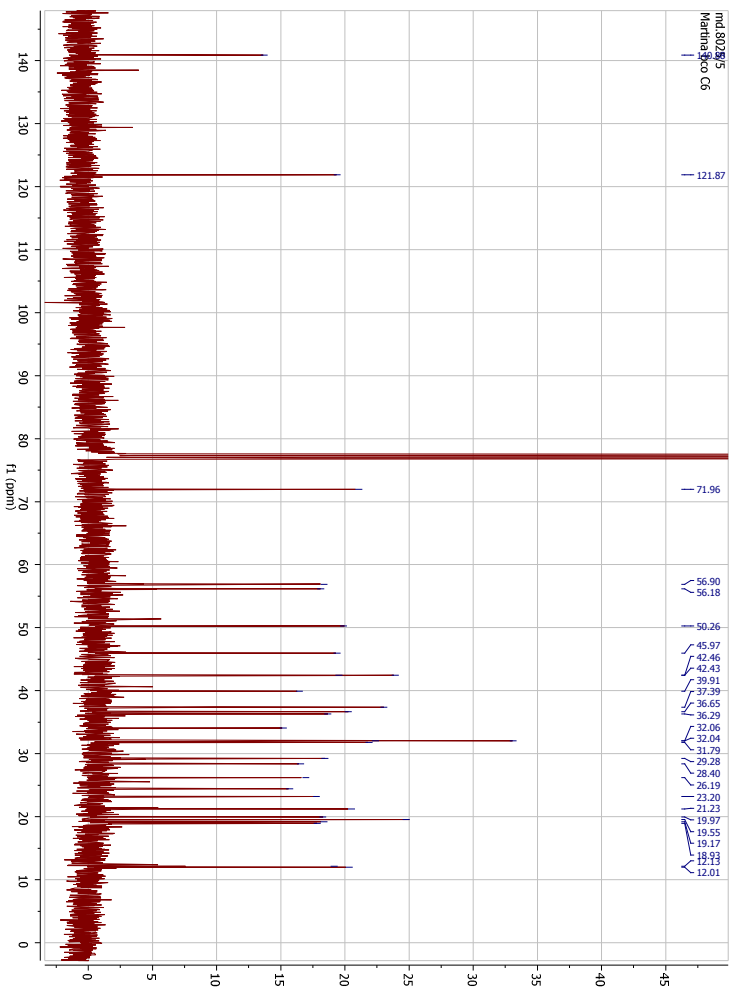
Mezcla 6C2Ae

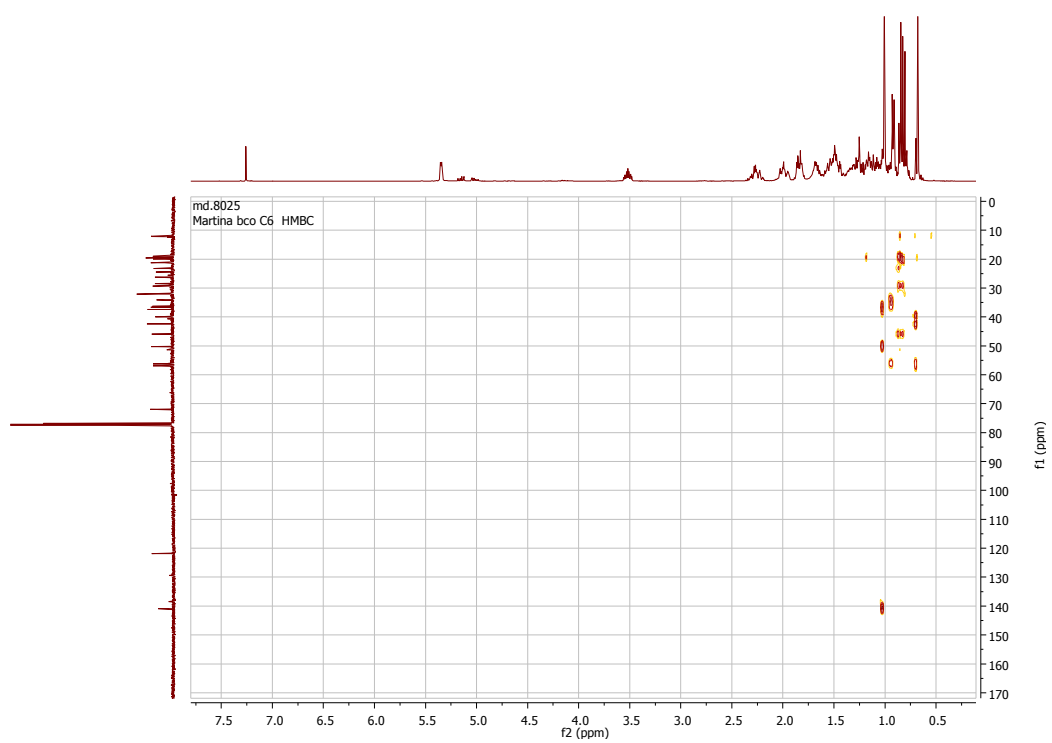
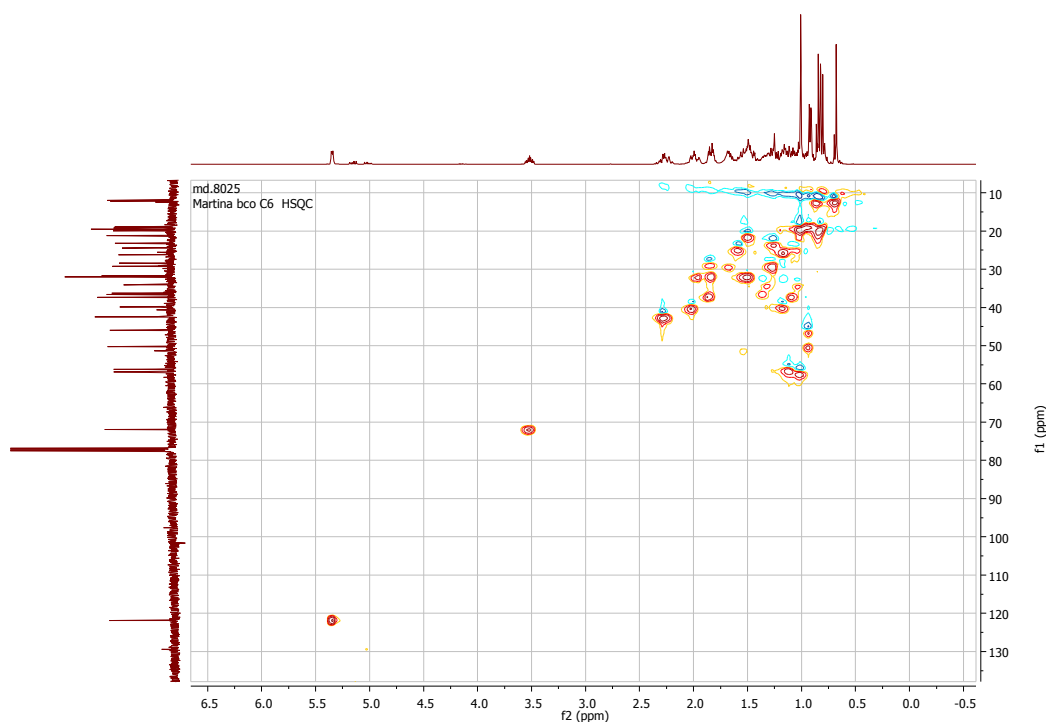


Sitosterol (124)

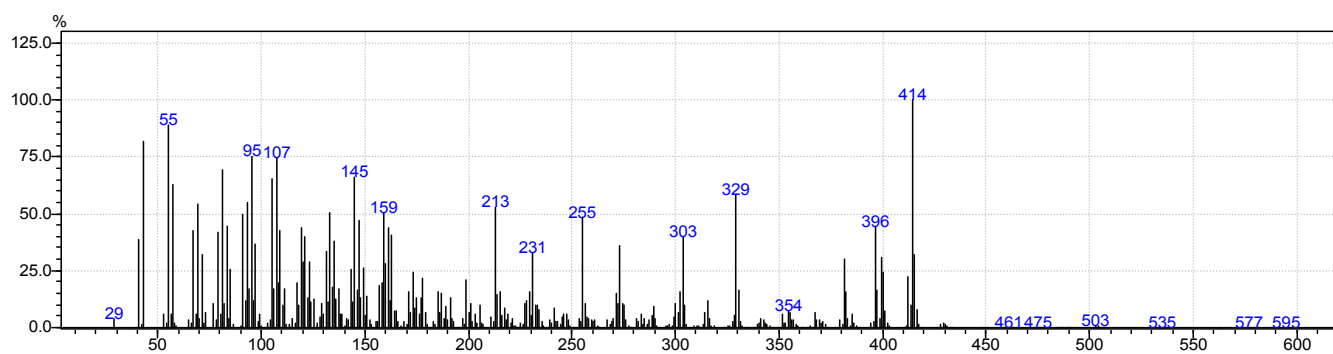


Anexo IV. Datos espectroscópicos de 124



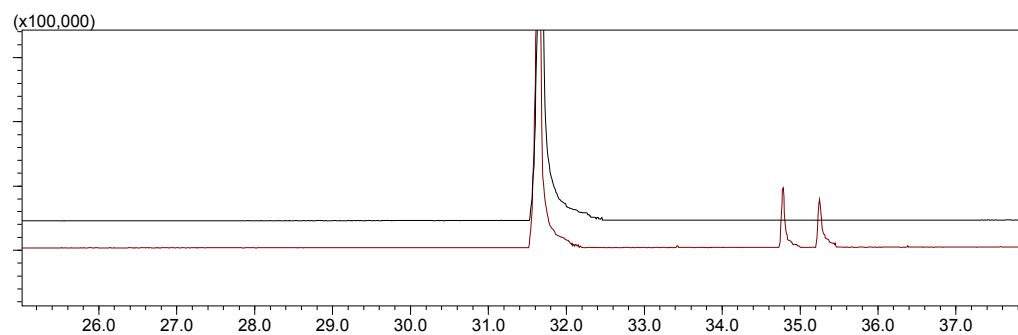


Espectro de masas::

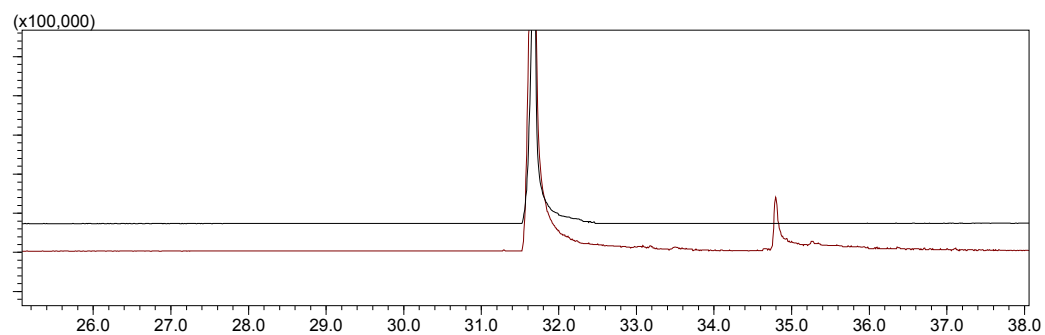


Mezclas de ácidos grasos

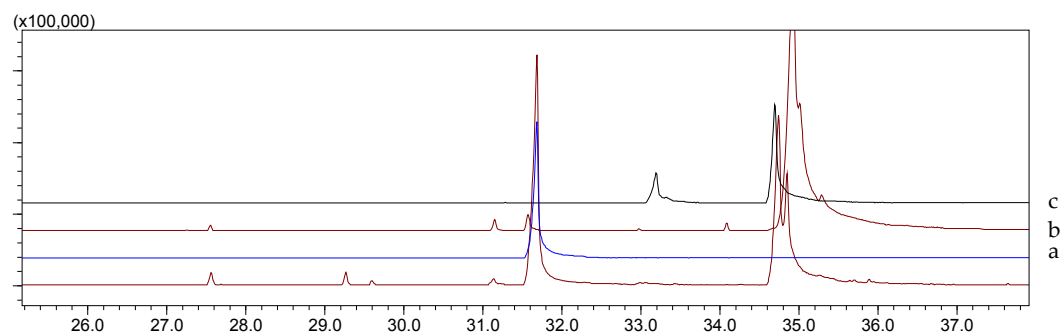
Cromatograma de AG1 (traza inferior) comparando con ácido palmítico (traza superior)



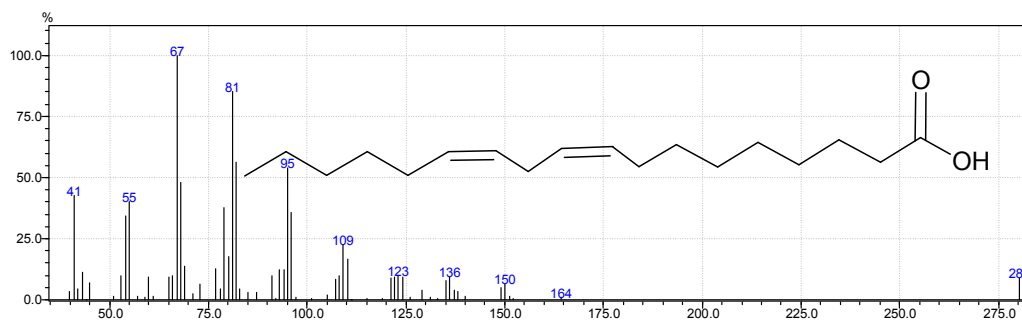
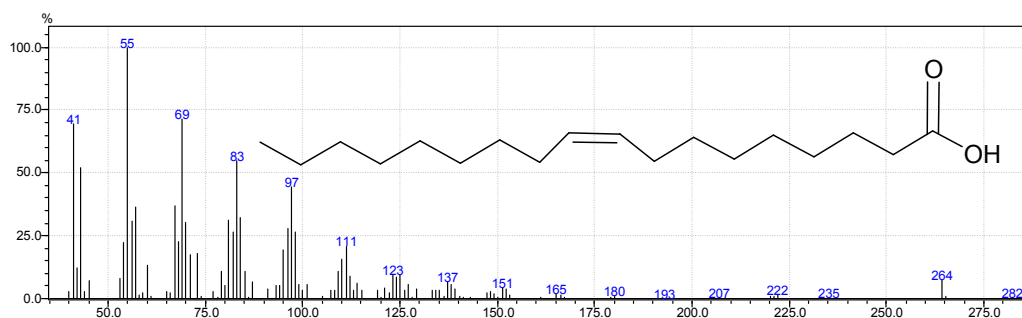
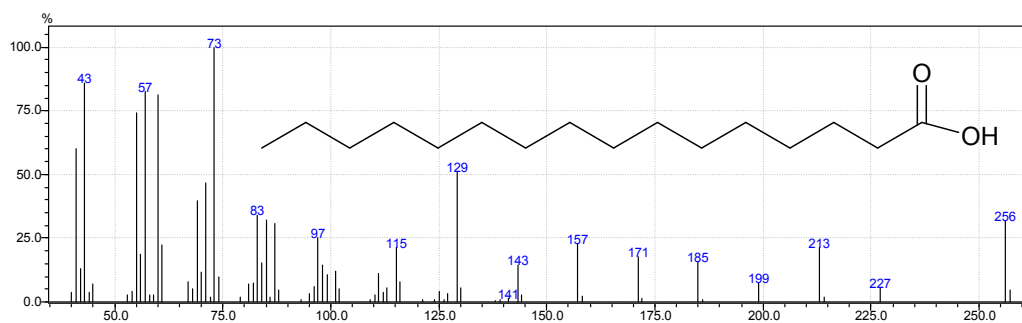
Cromatograma de AG2 (traza inferior) comparando con ácido palmítico (traza superior)



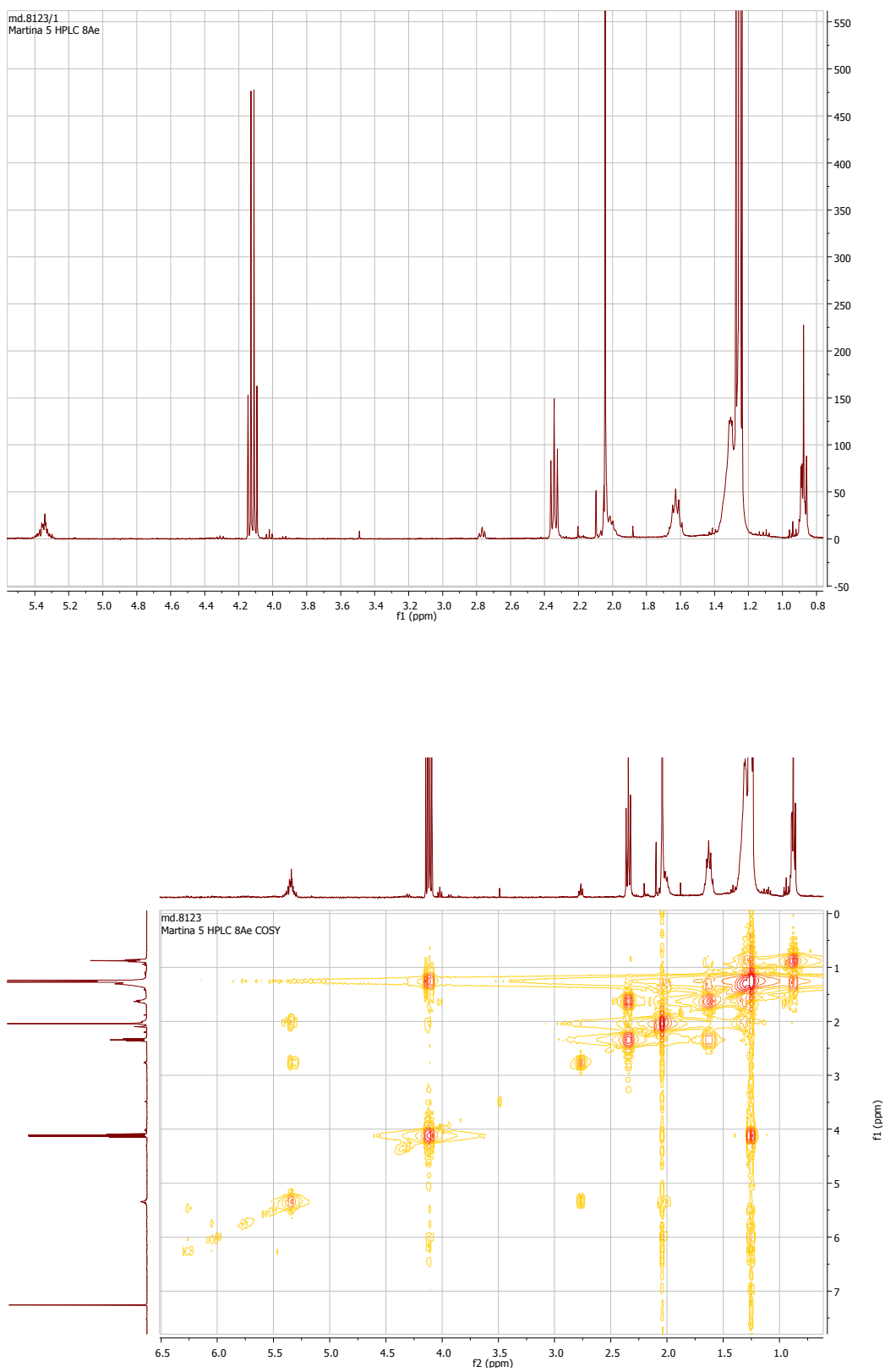
Cromatograma de AG3 (traza inferior) comparando con ácido palmítico (a), oleico (b) y linoleico (c).



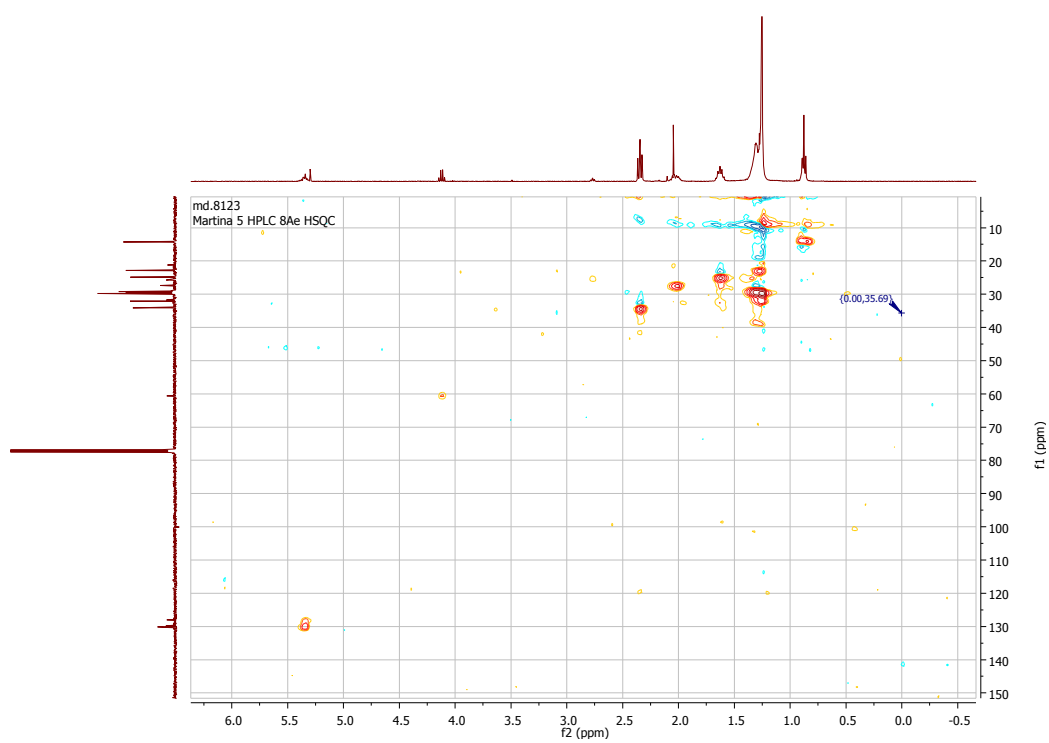
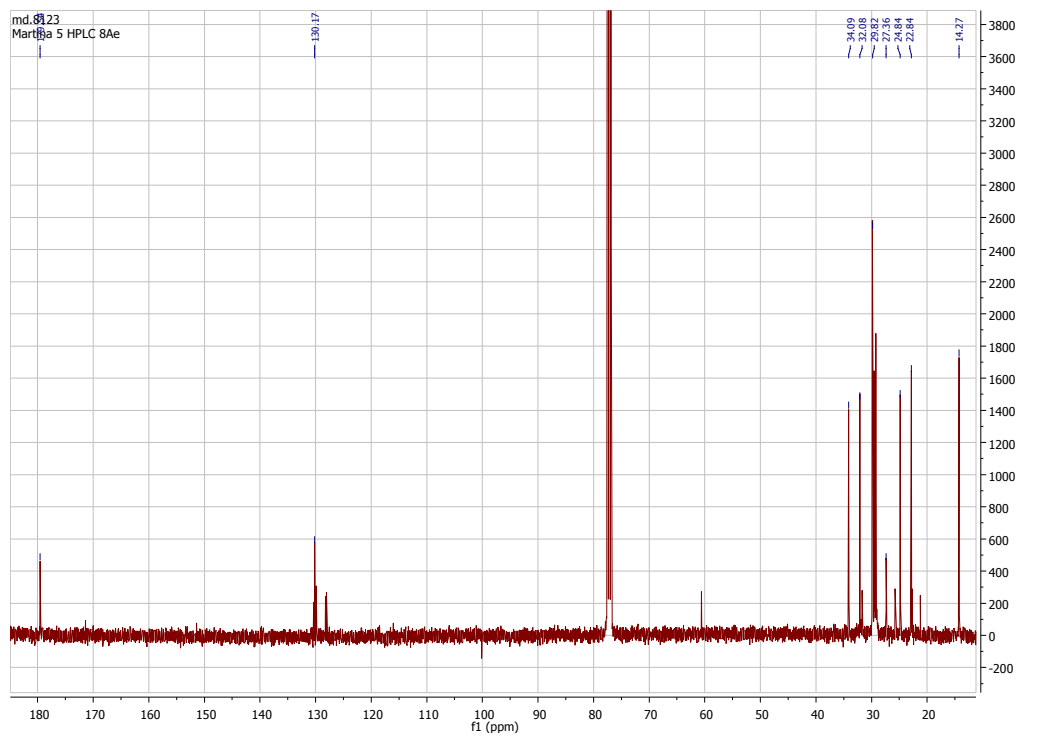
Espectros de masas de los ácidos grasos: ácido palmítico (125), ácido oleico (126) y ácido linoleico (127):



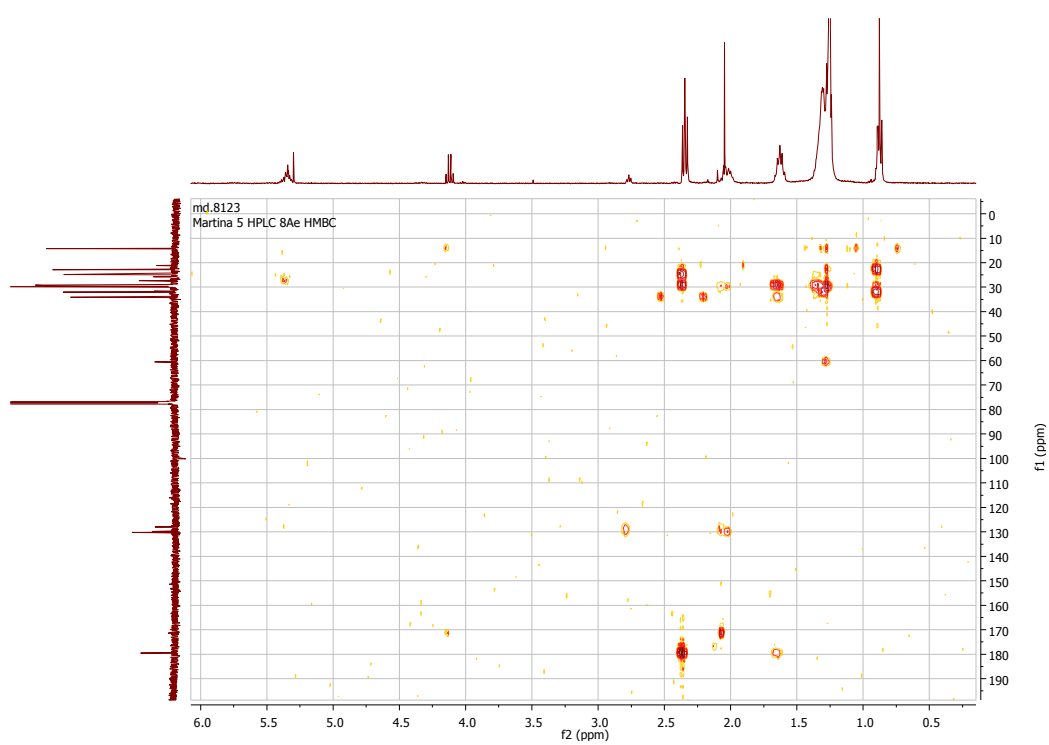
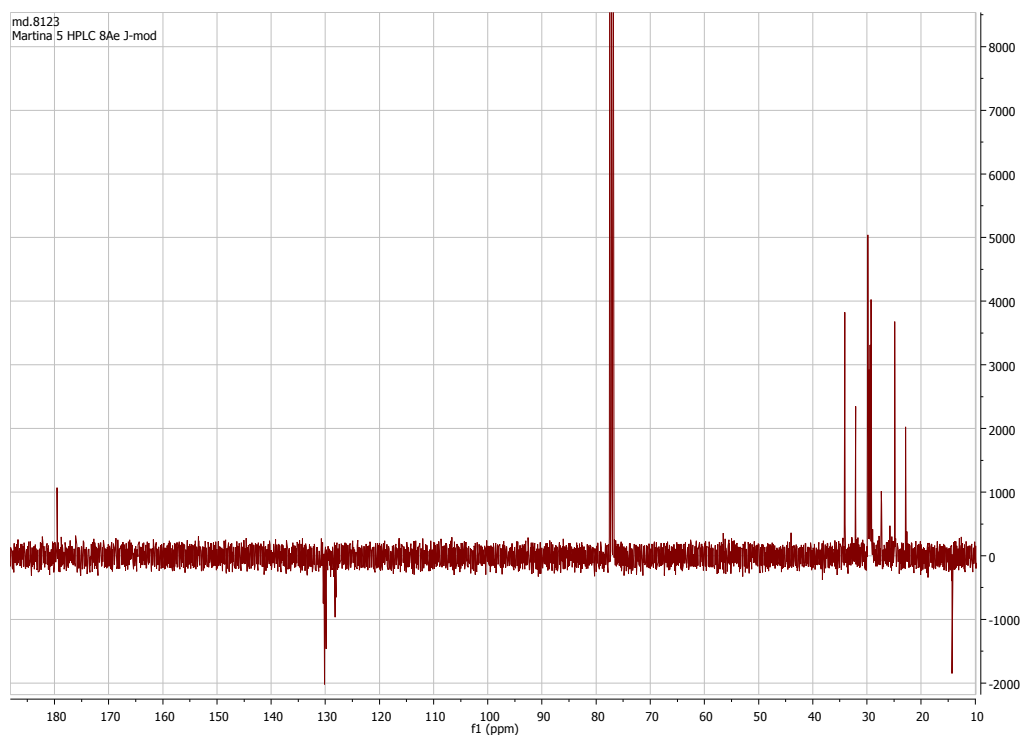
AG2



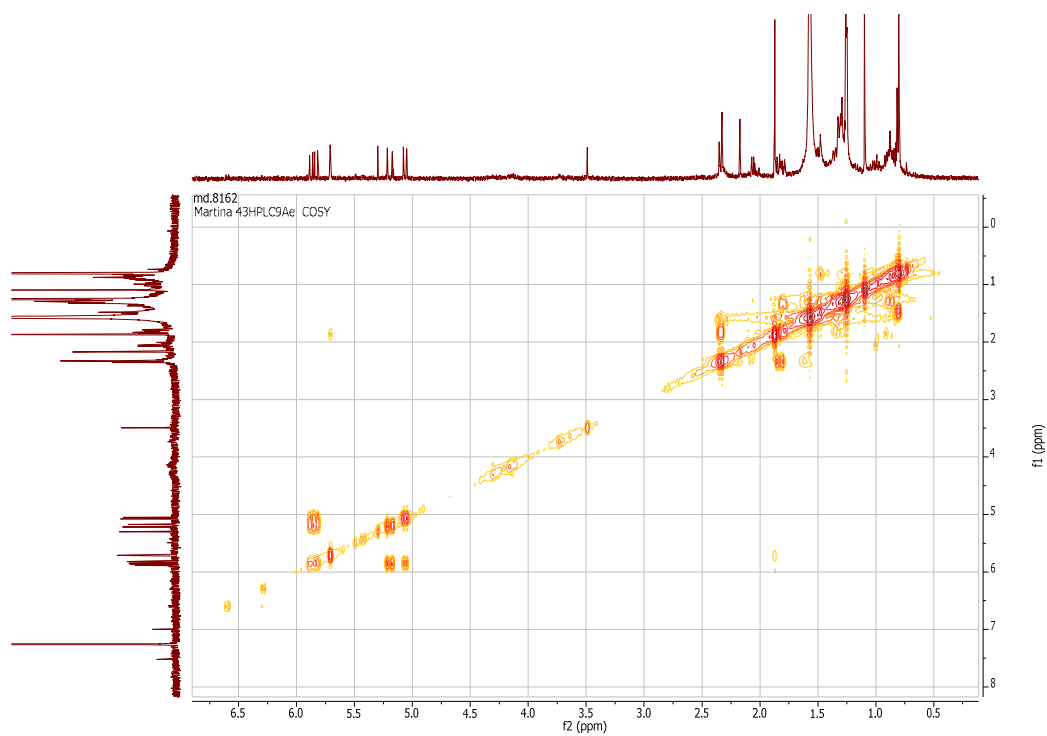
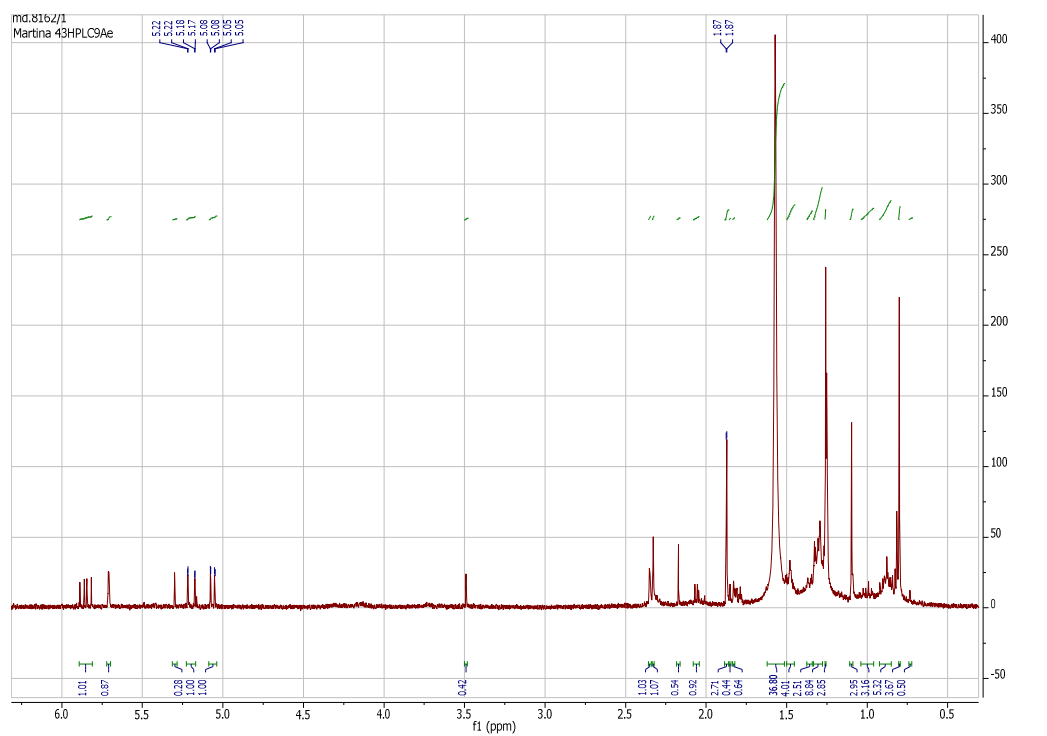
Anexo IV. Datos espectroscópicos de AG1, AG2 y AG3

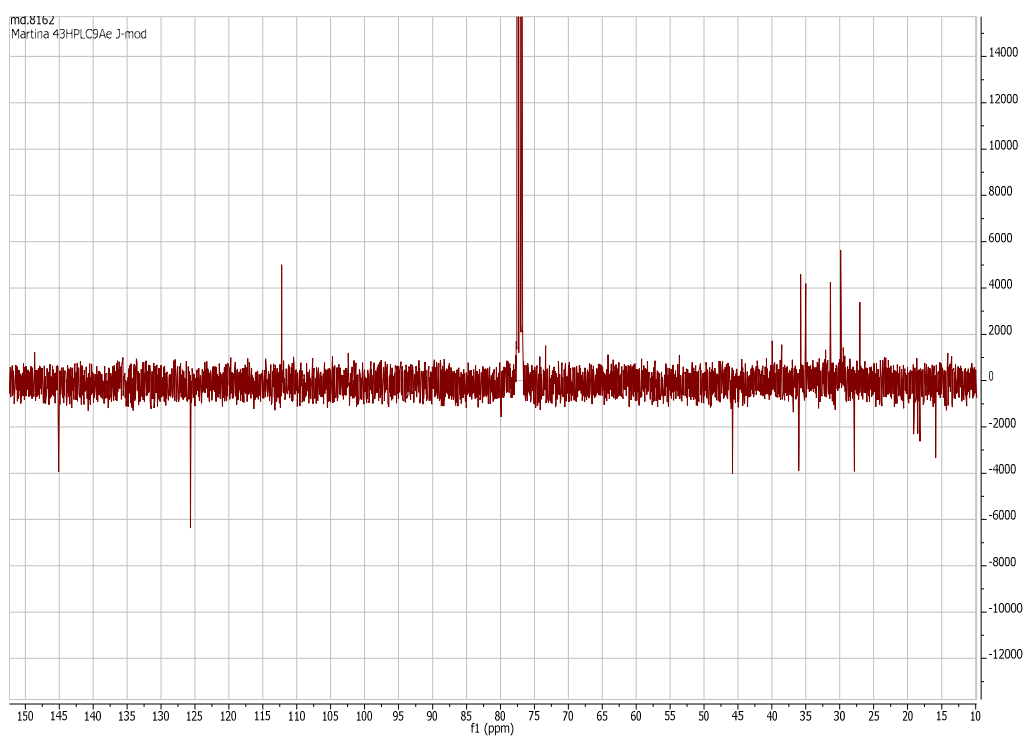
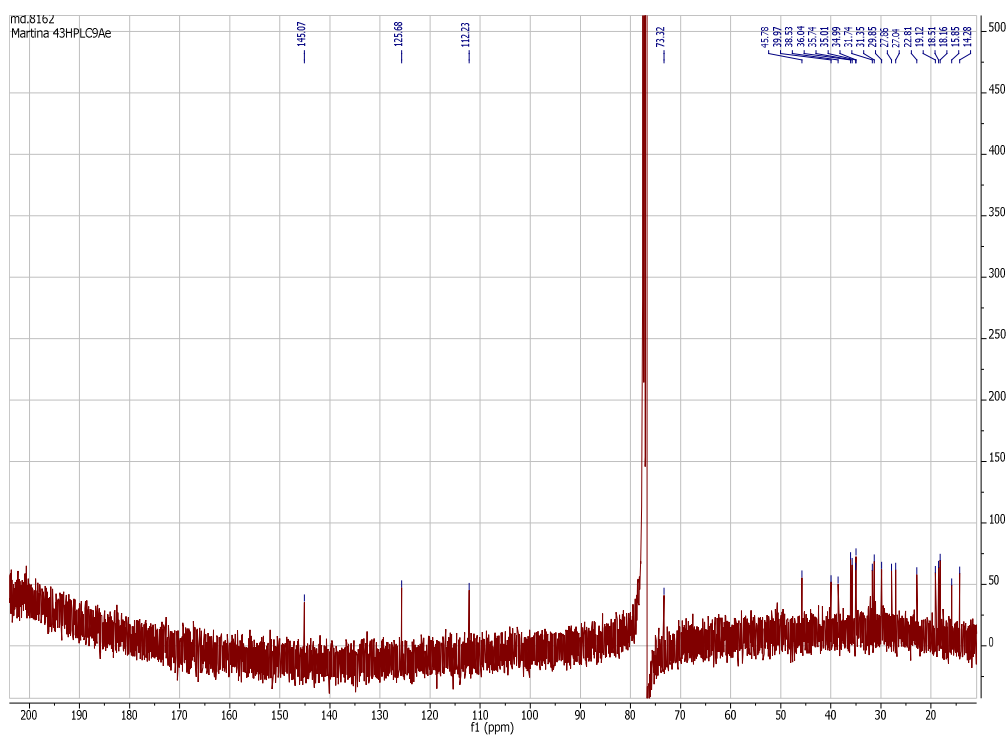


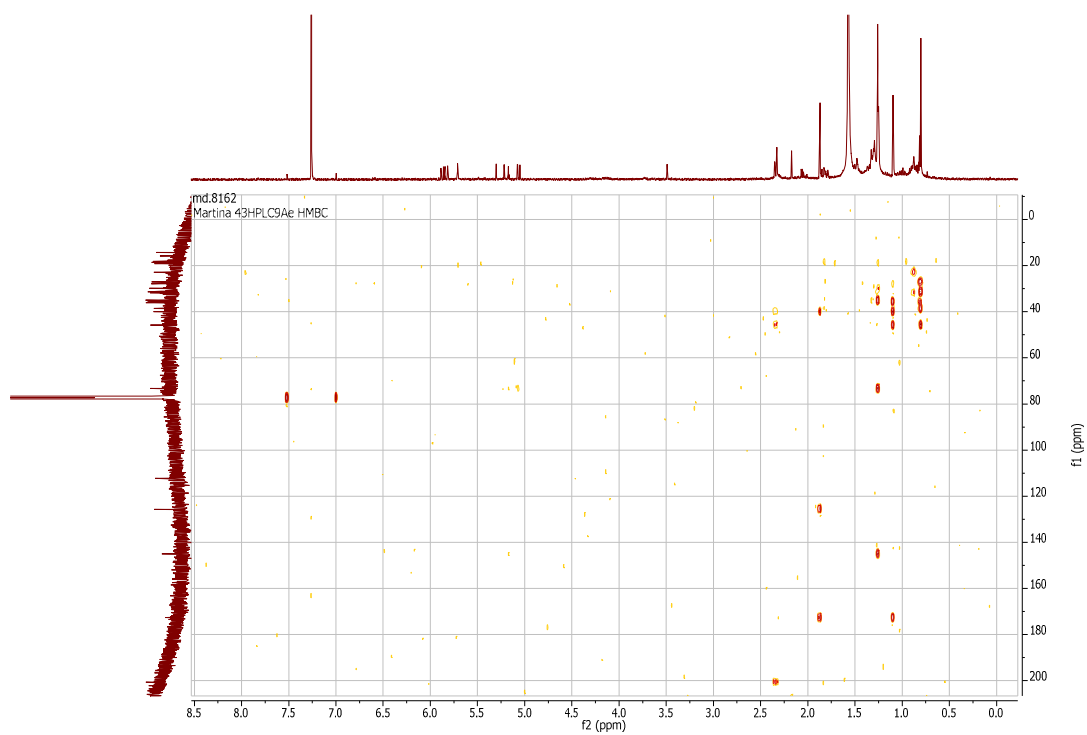
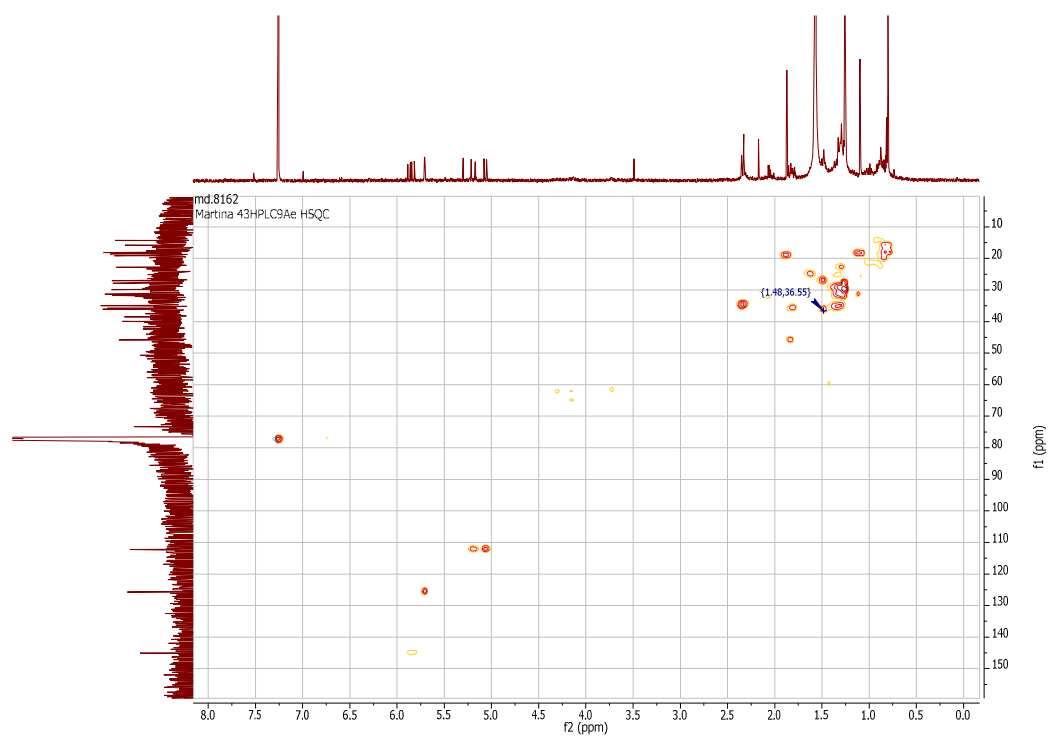
Anexo IV. Datos espectroscópicos de AG1, AG2 y AG3



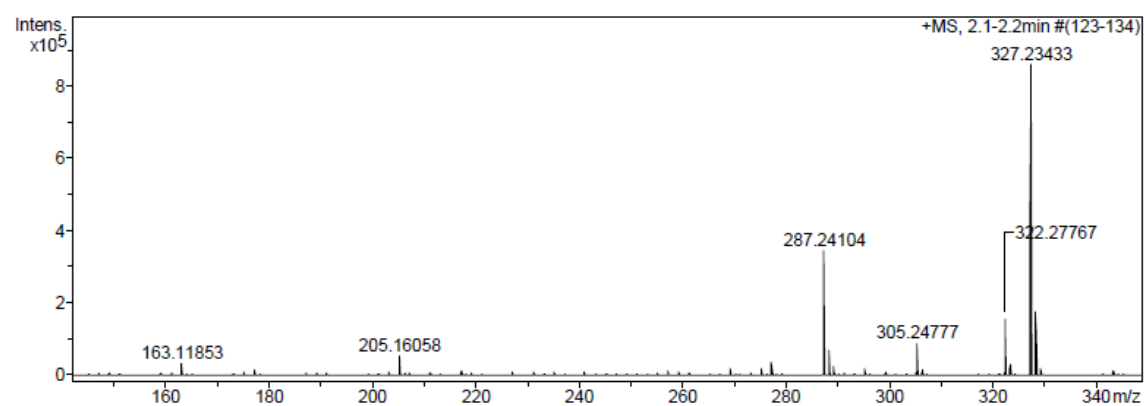
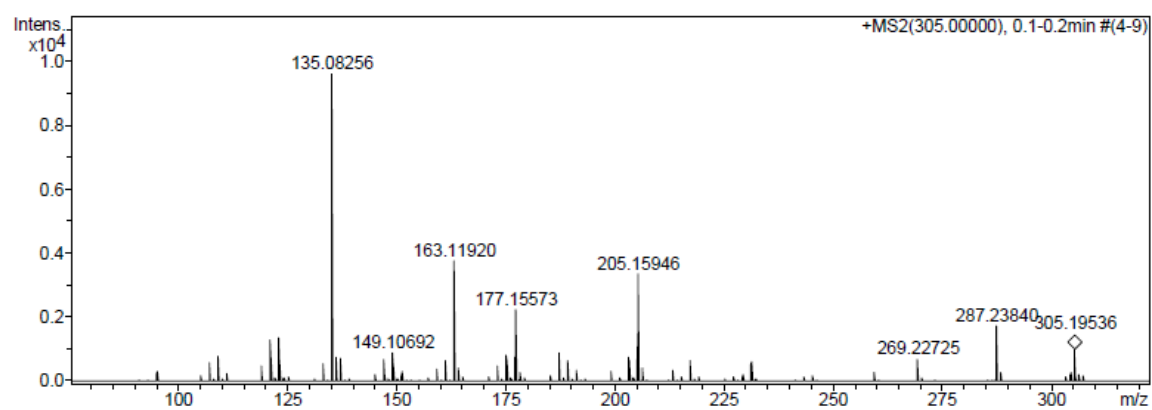
128



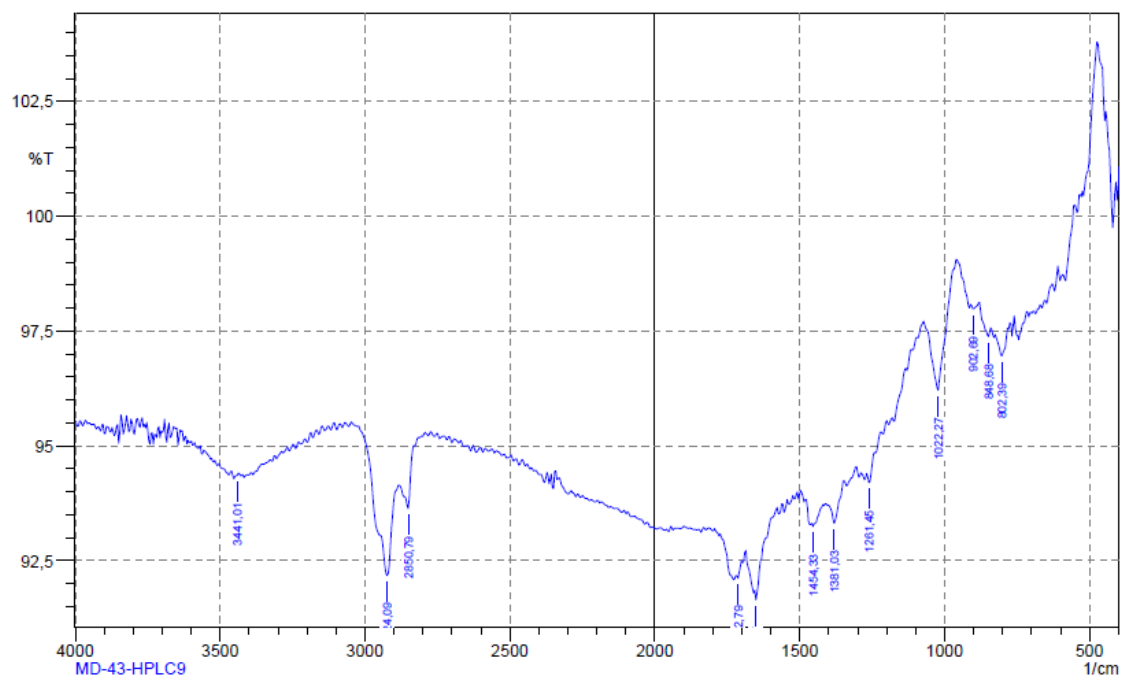




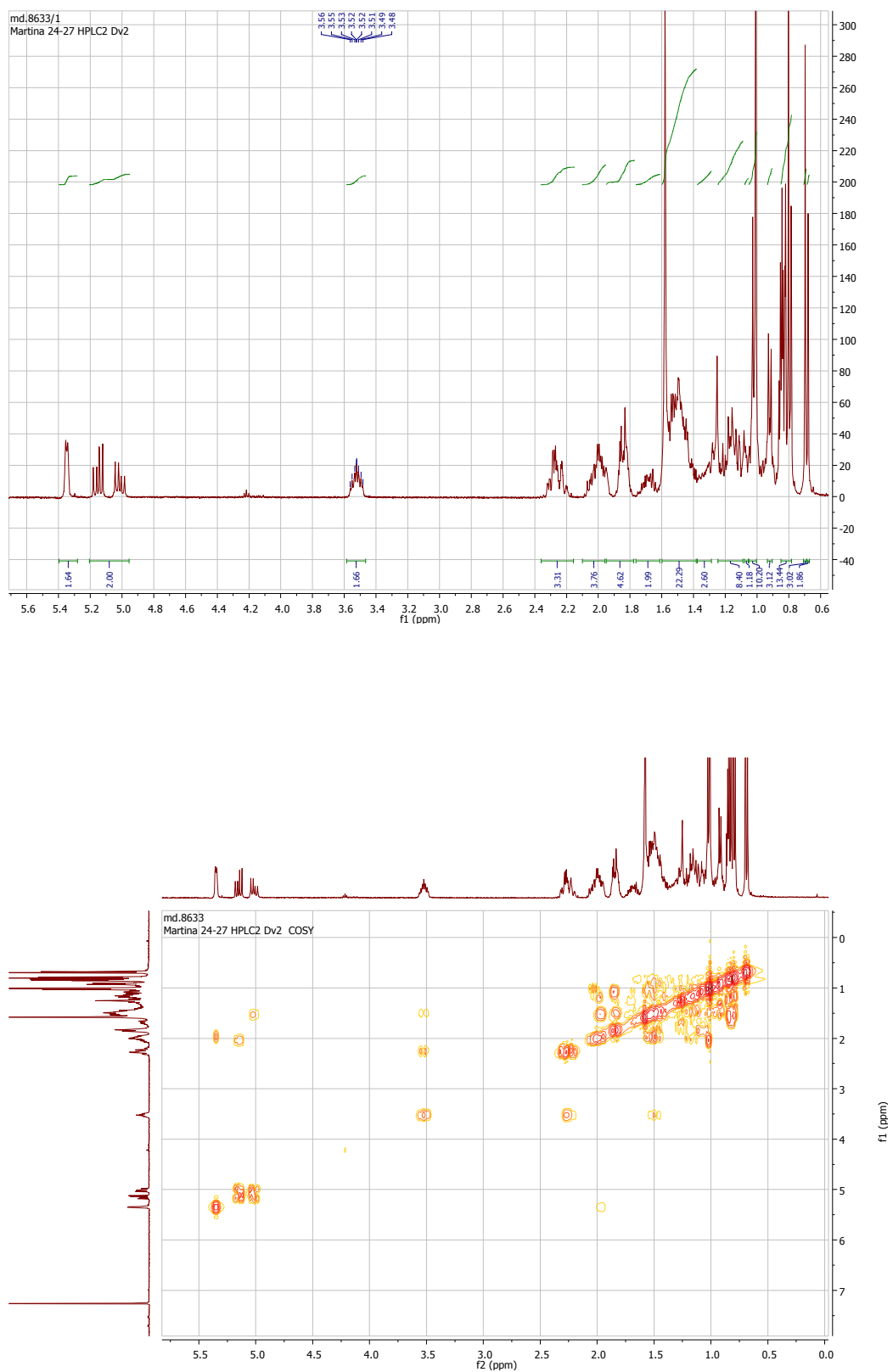
Espectro de masas de alta resolución:

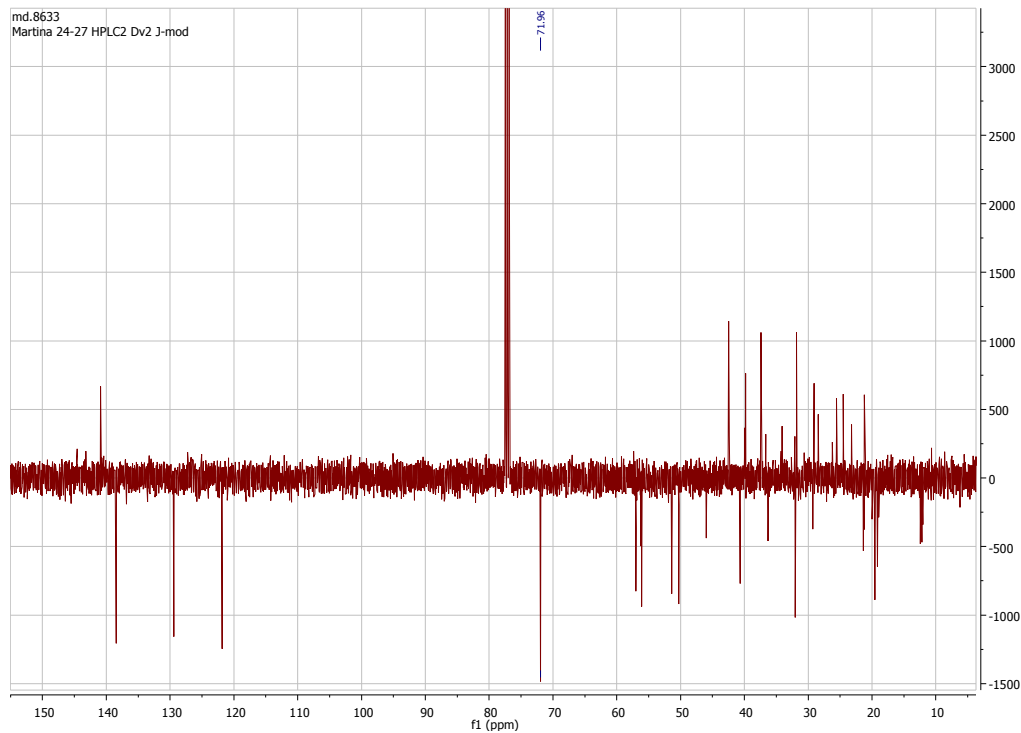
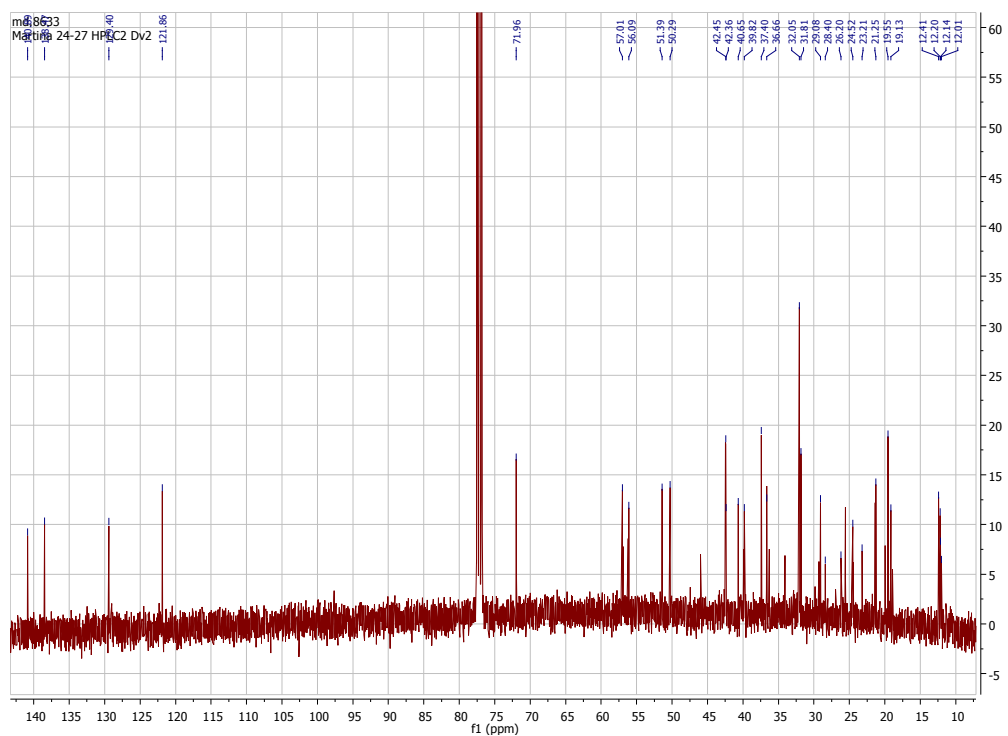


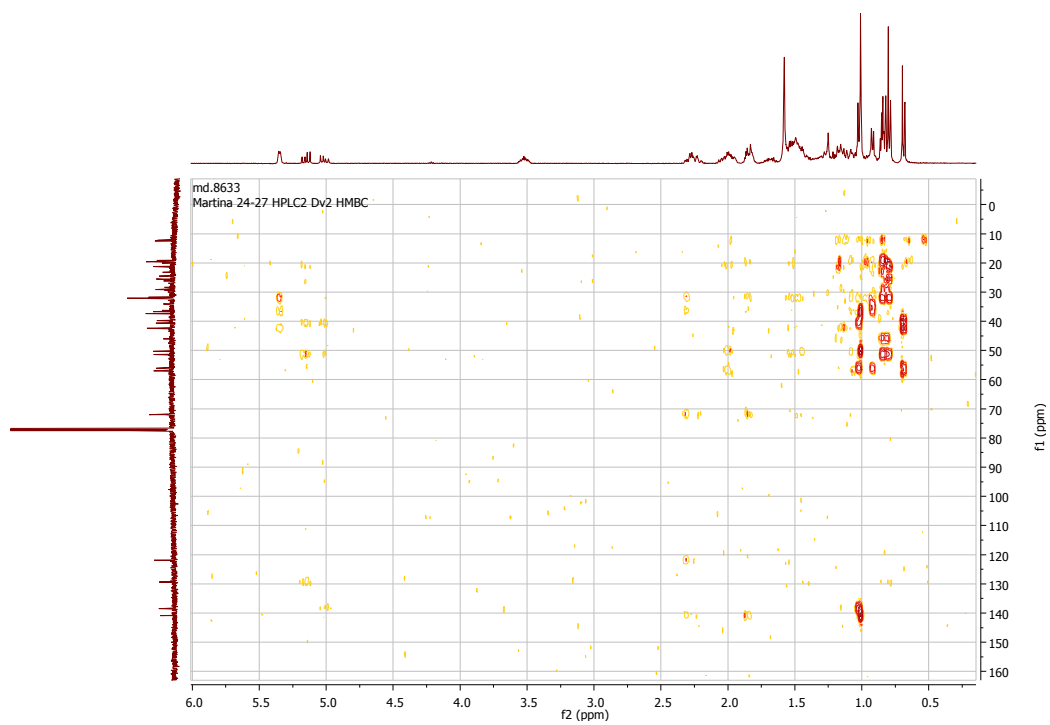
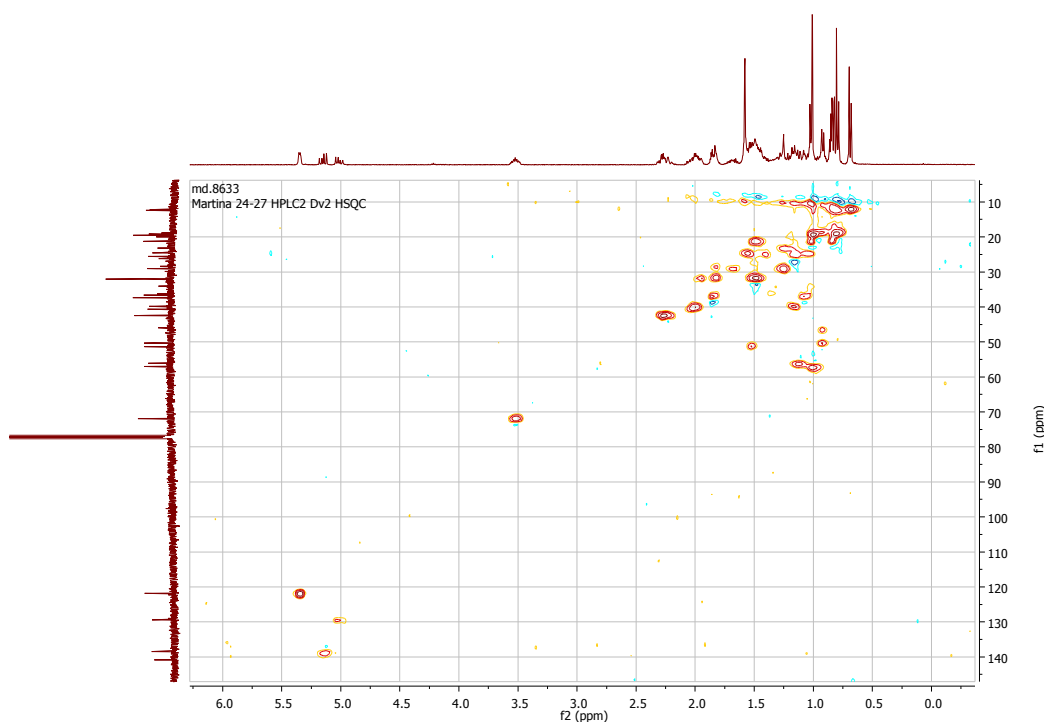
Espectro IR:



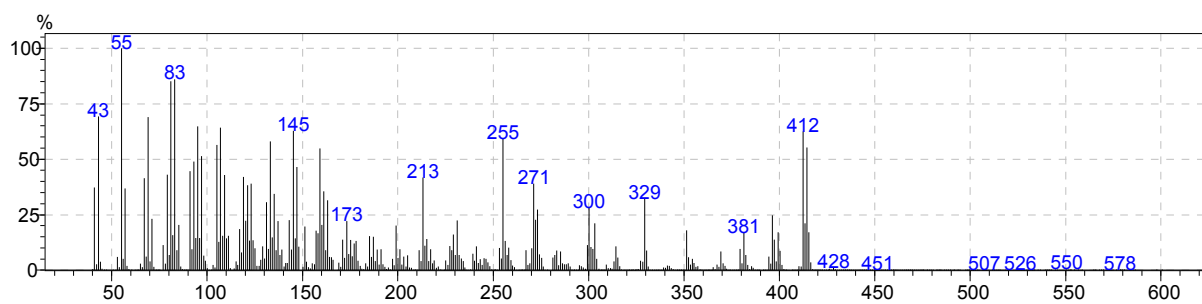
Estigmasterol (129)



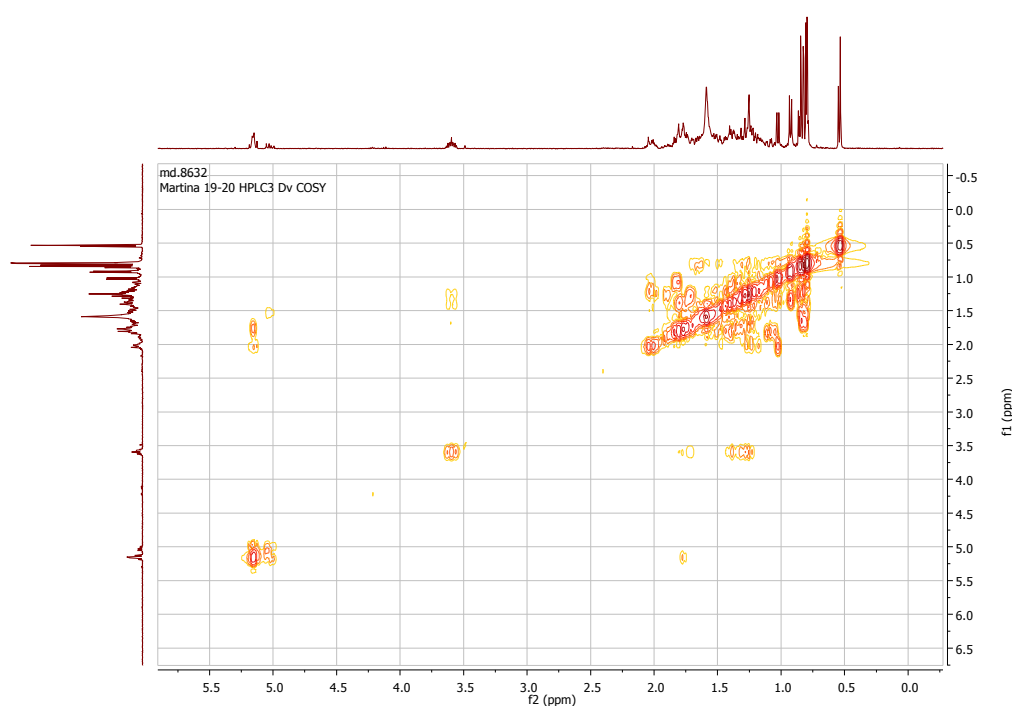
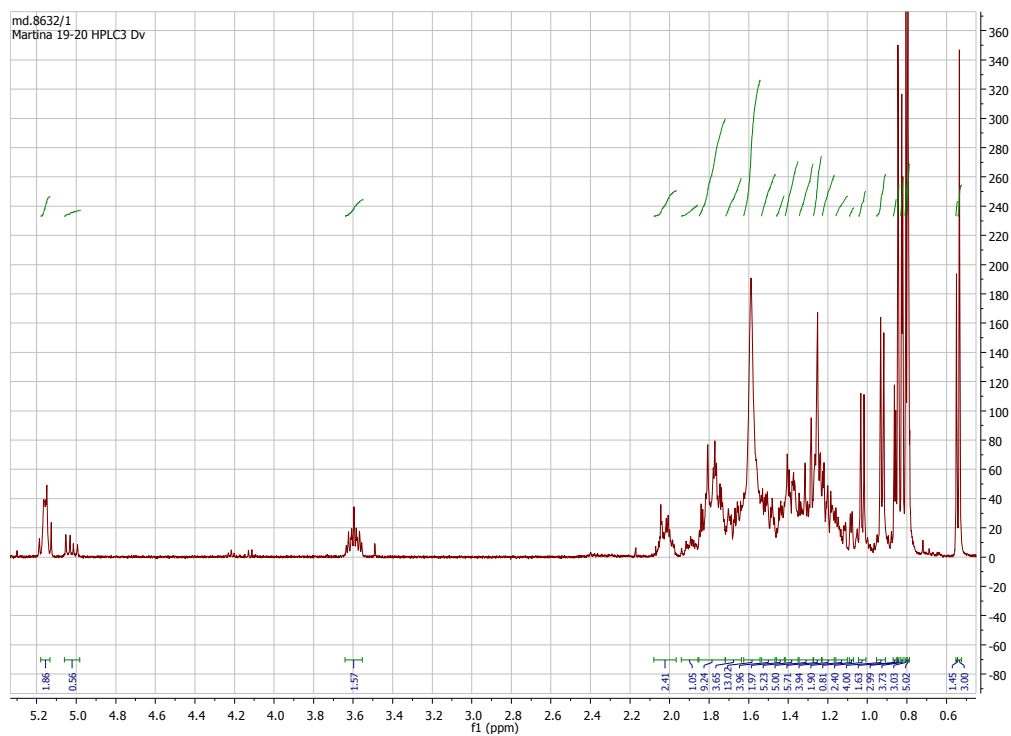




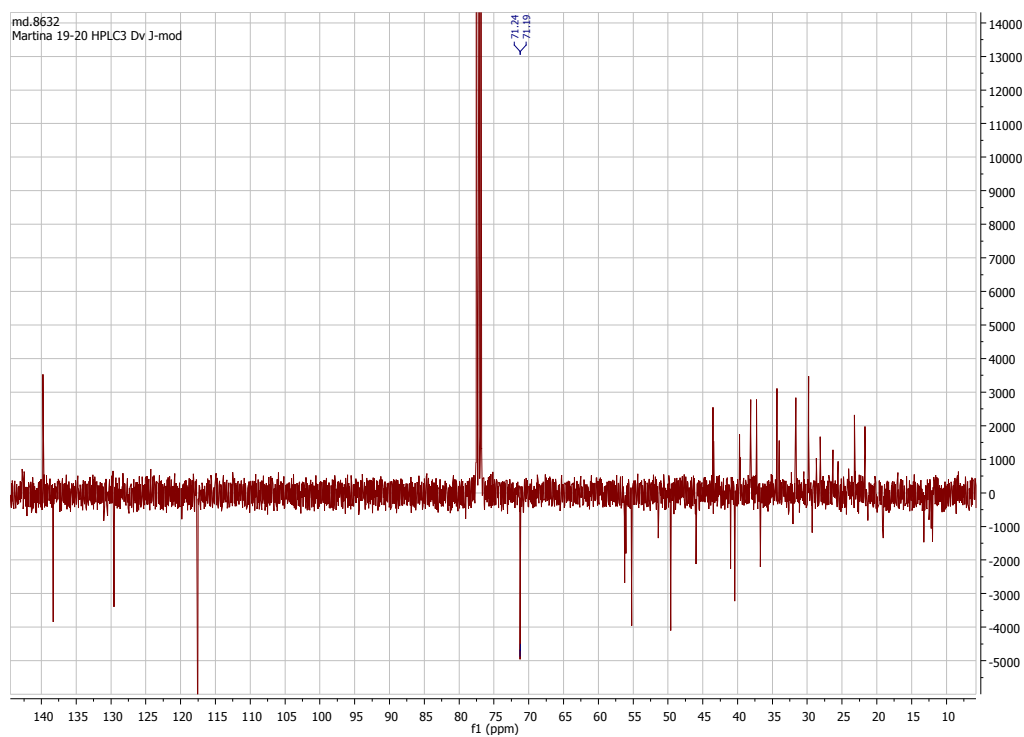
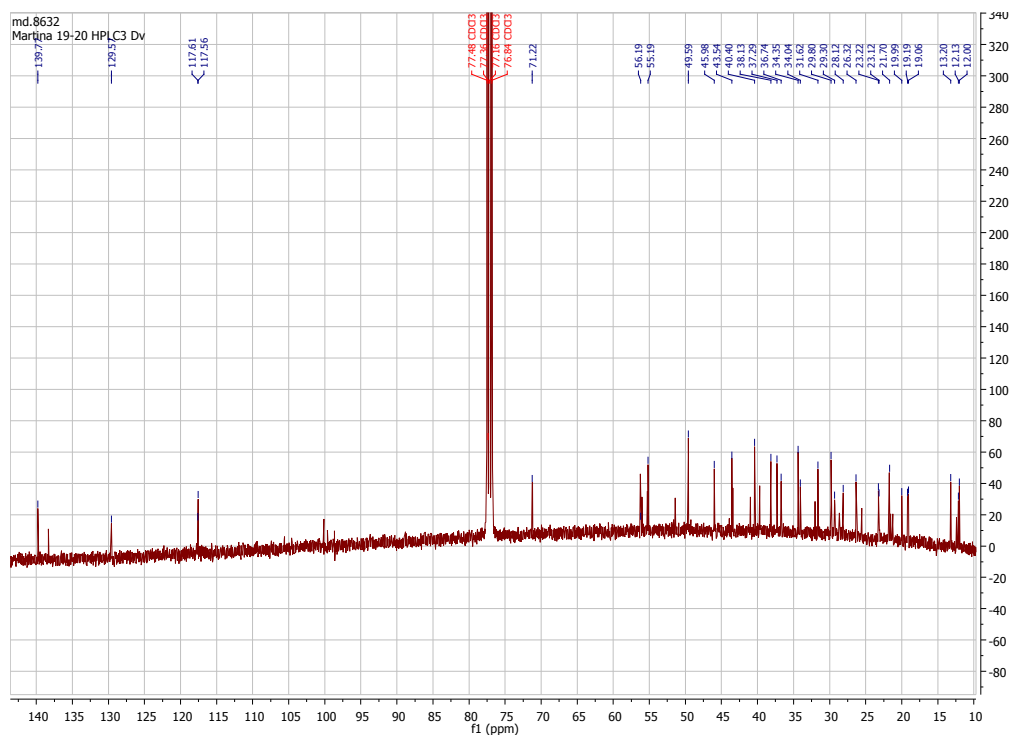
Espectro de masas:

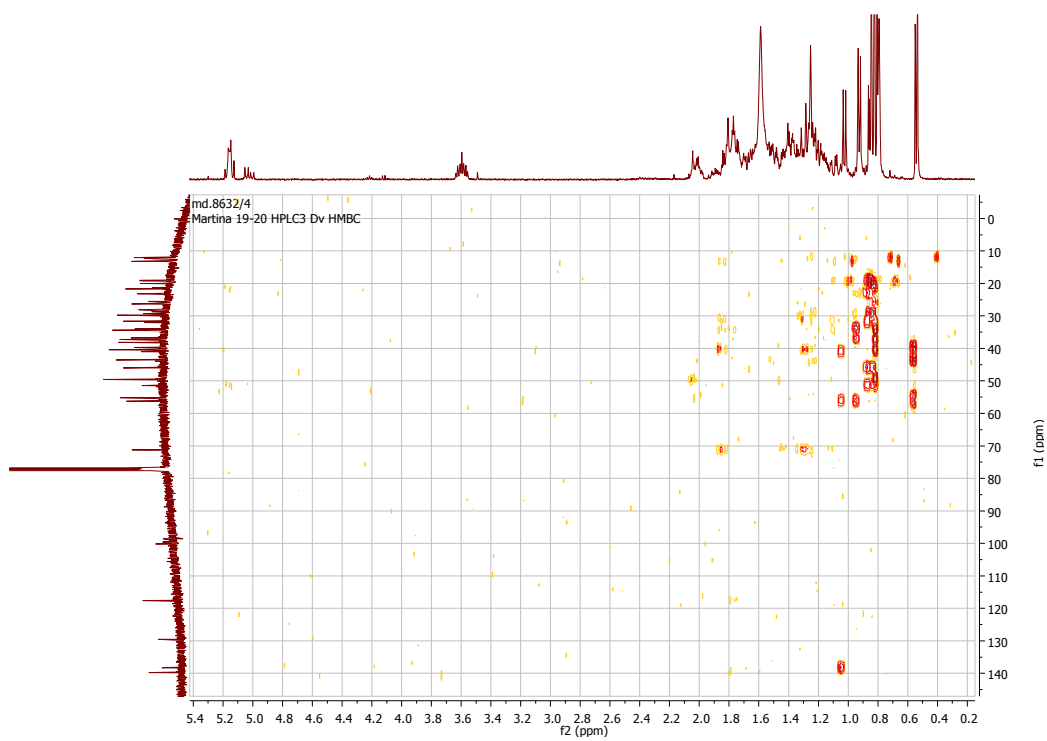
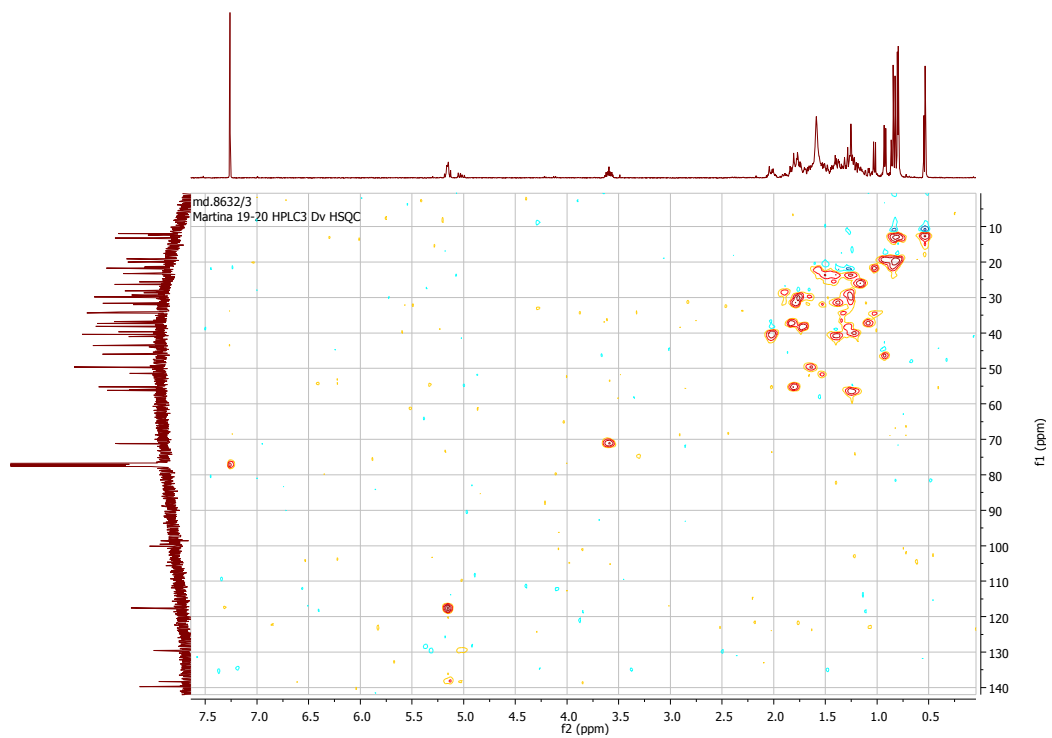


Estigmast-7-en-3-ol (130)

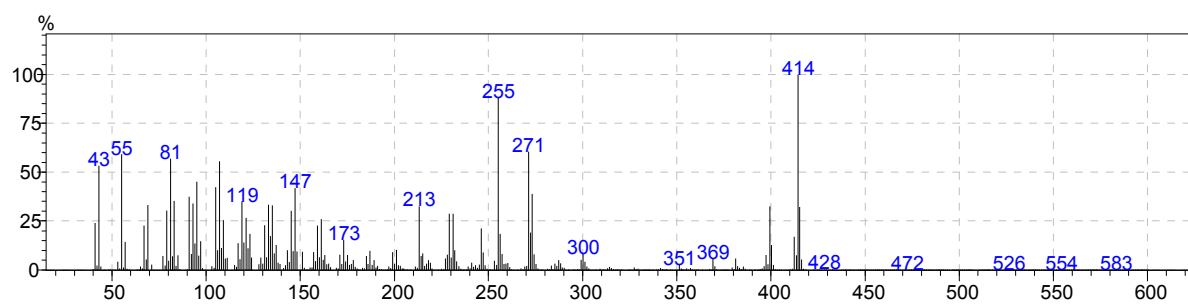


Anexo IV. Datos espectroscópicos de 130

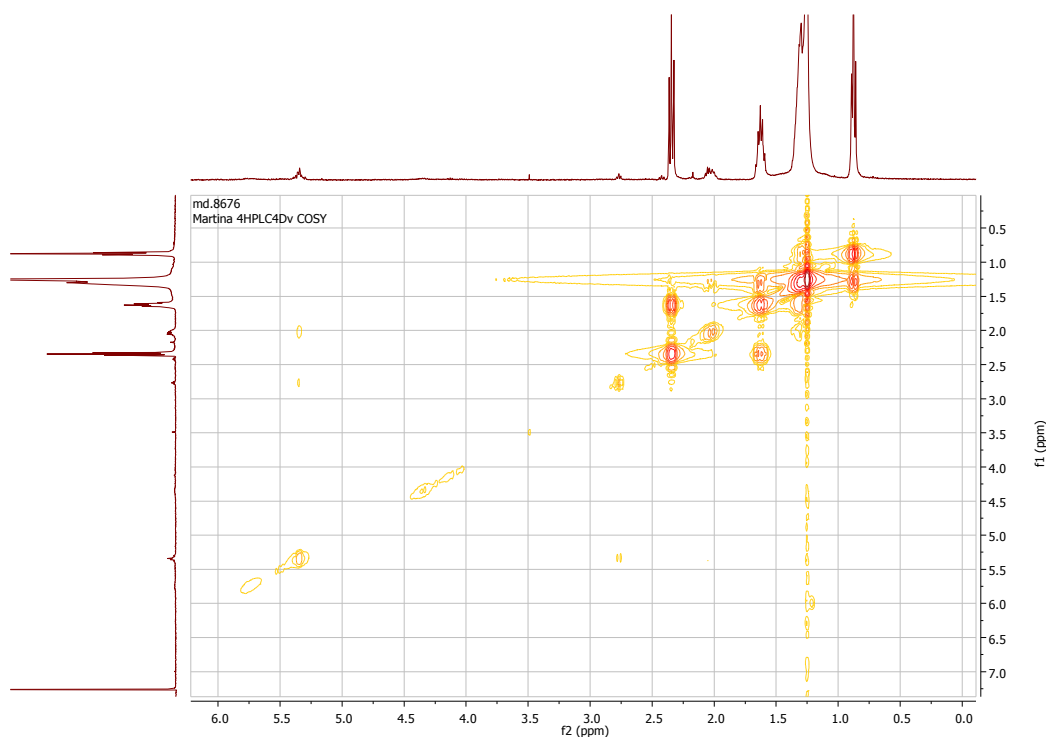
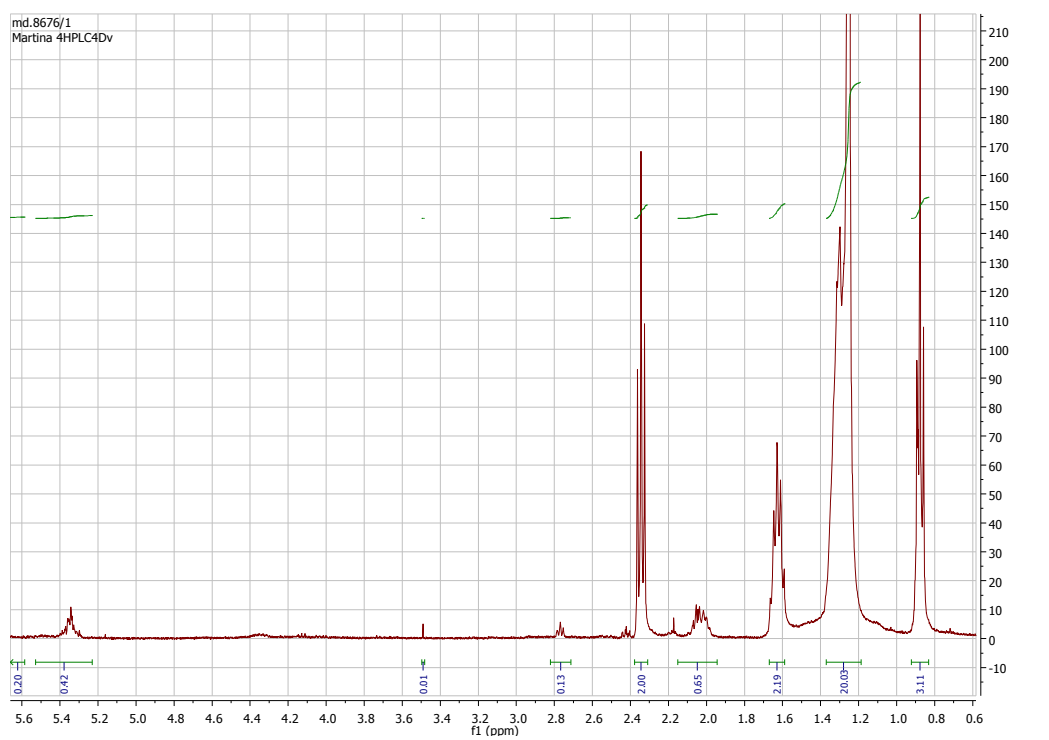




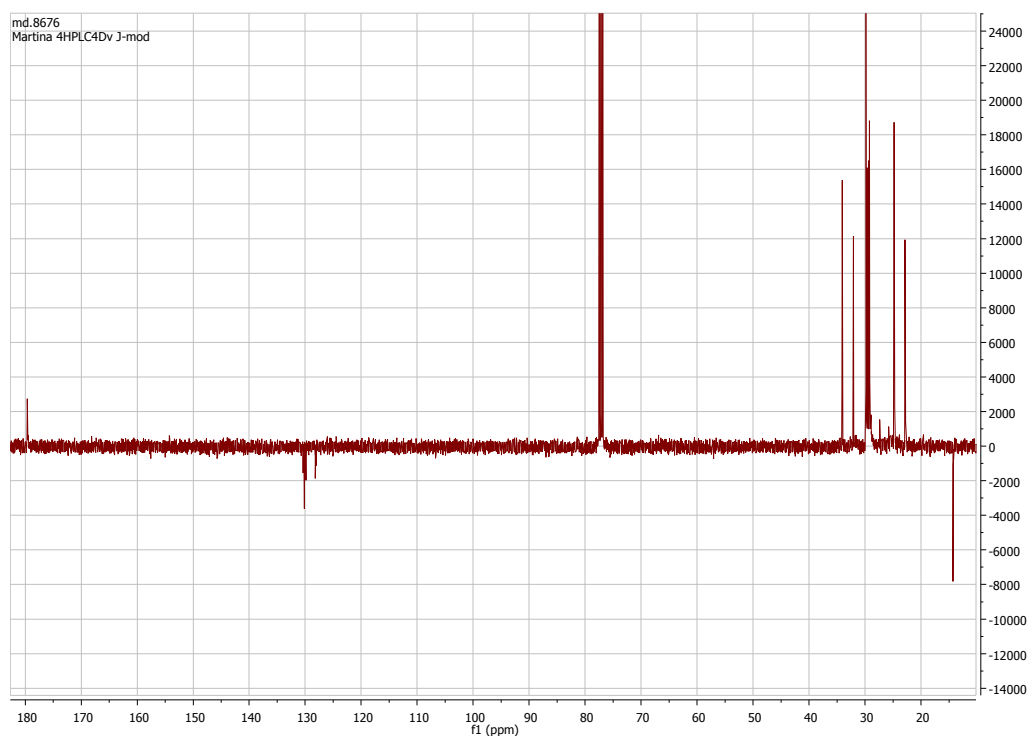
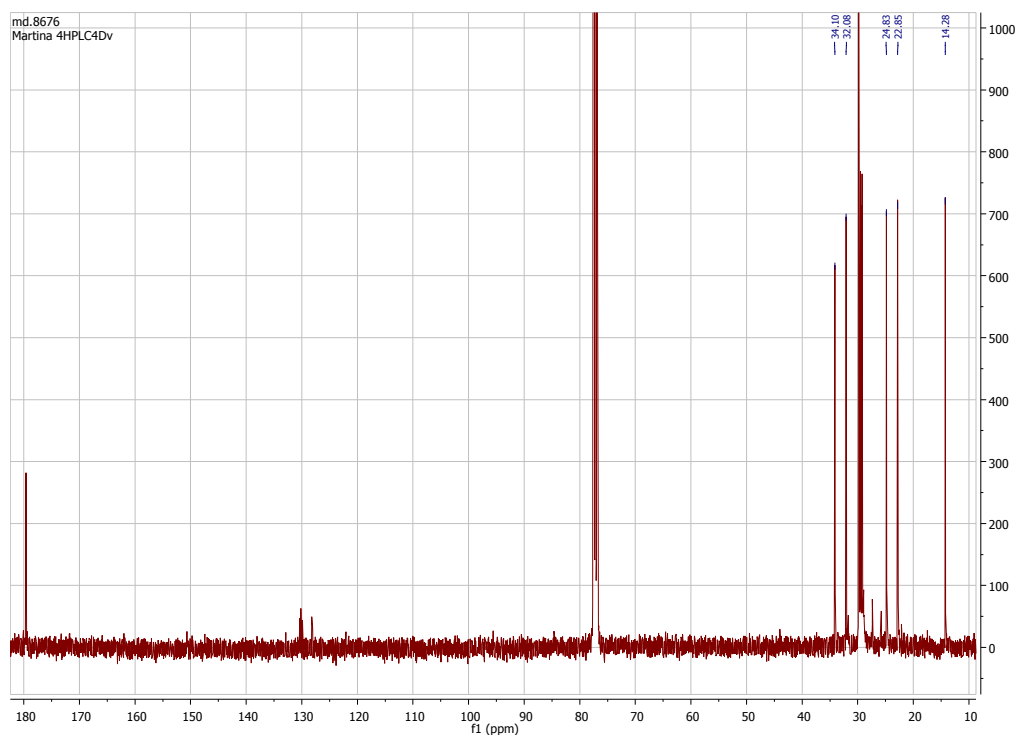
Espectro de masas:

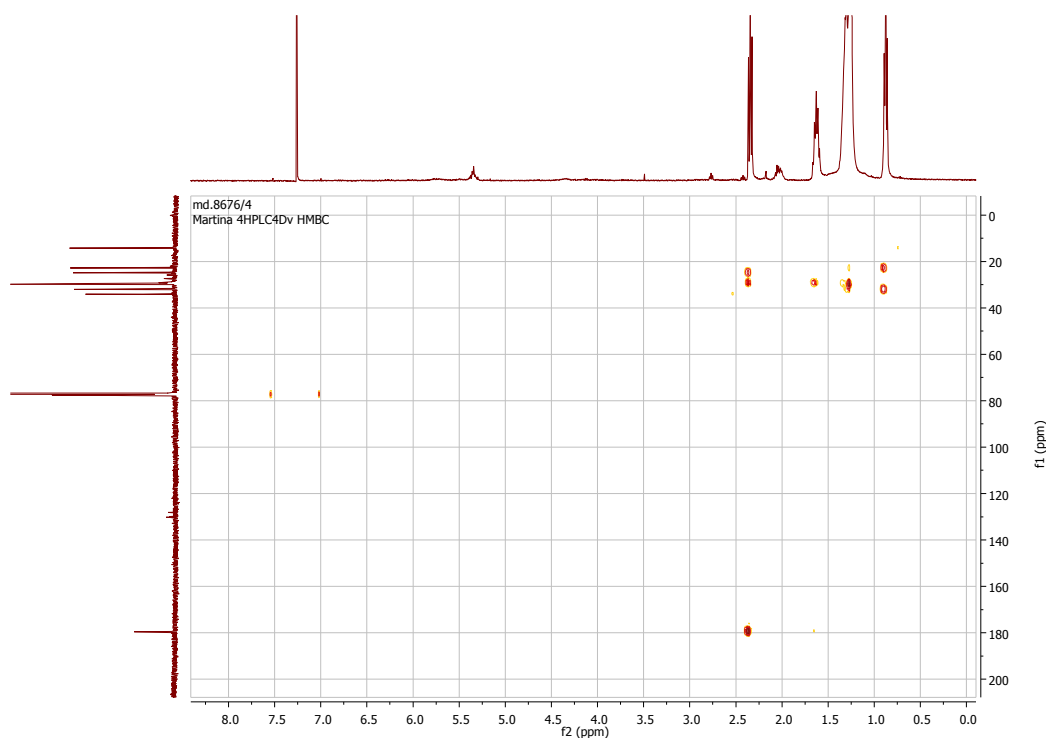
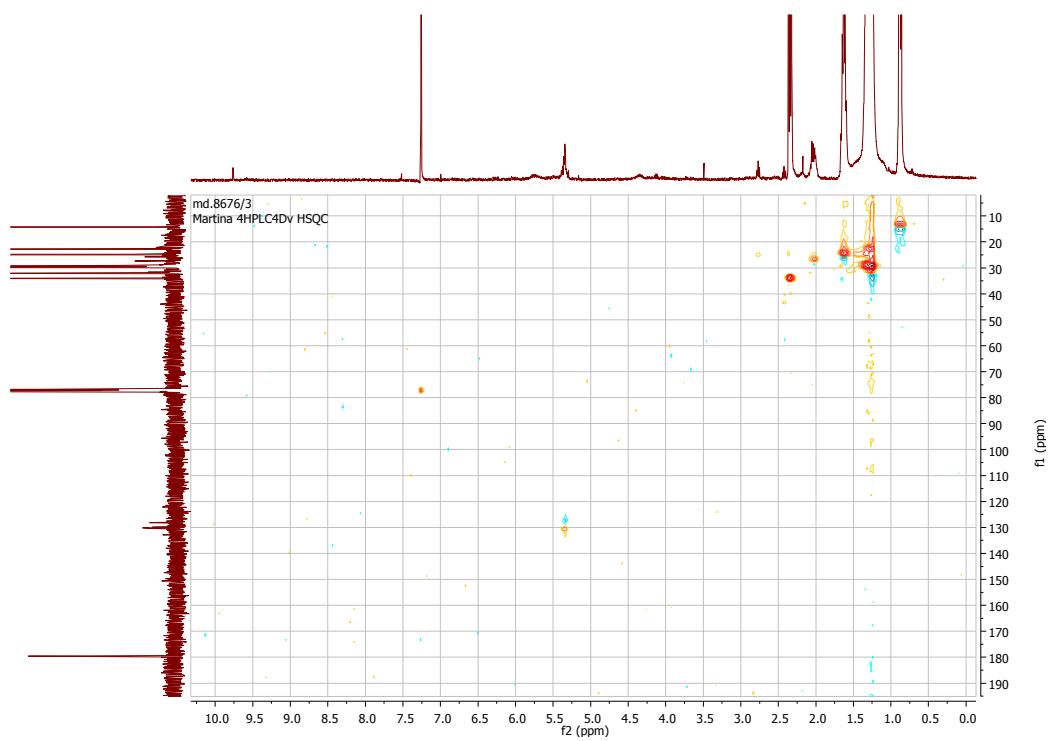


Ácido palmítico (125)

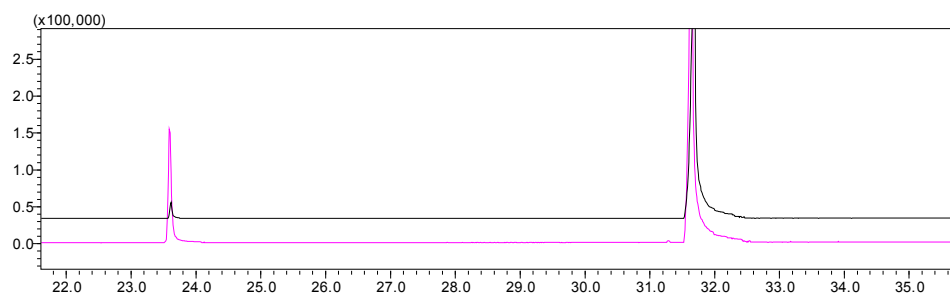


Anexo IV. Datos espectroscópicos de 125

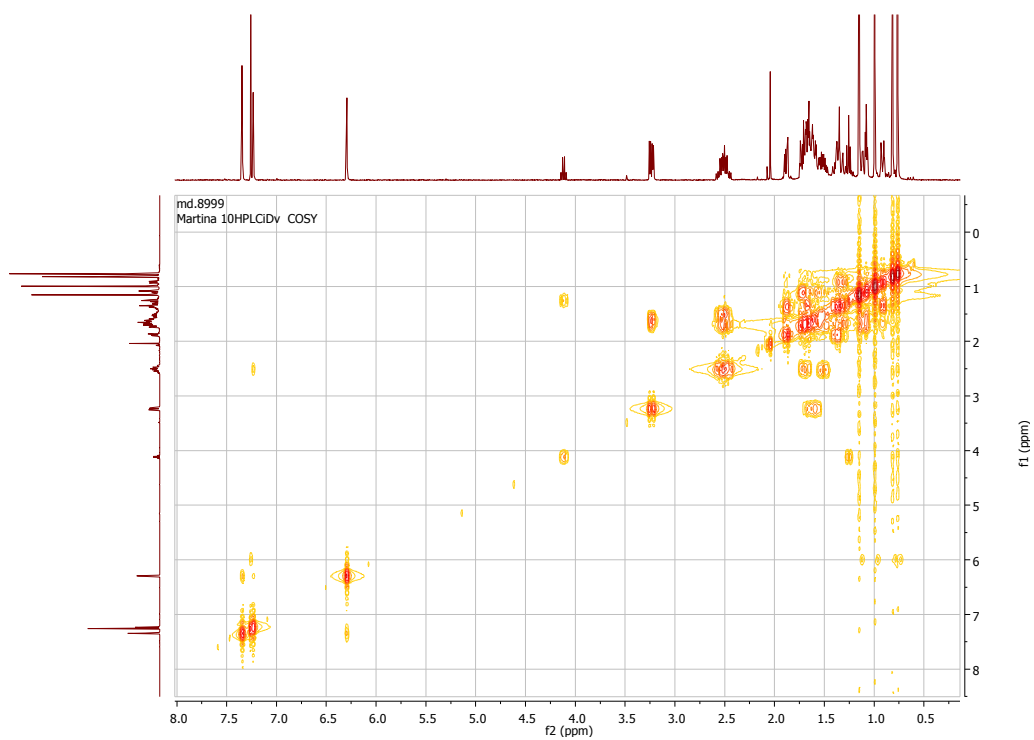
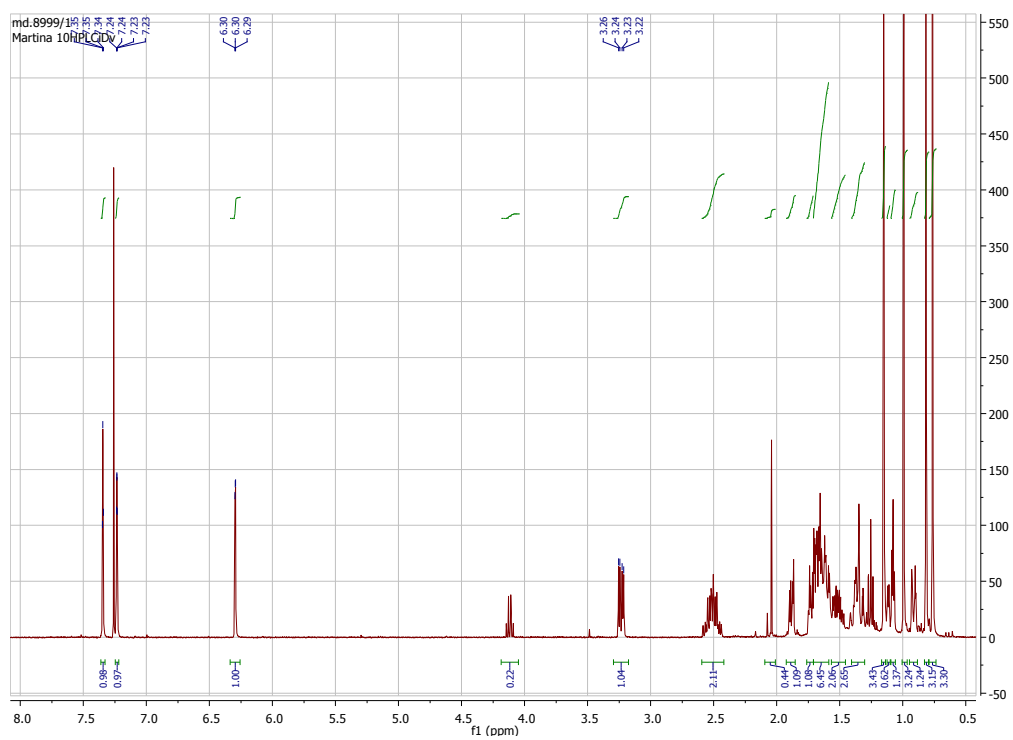




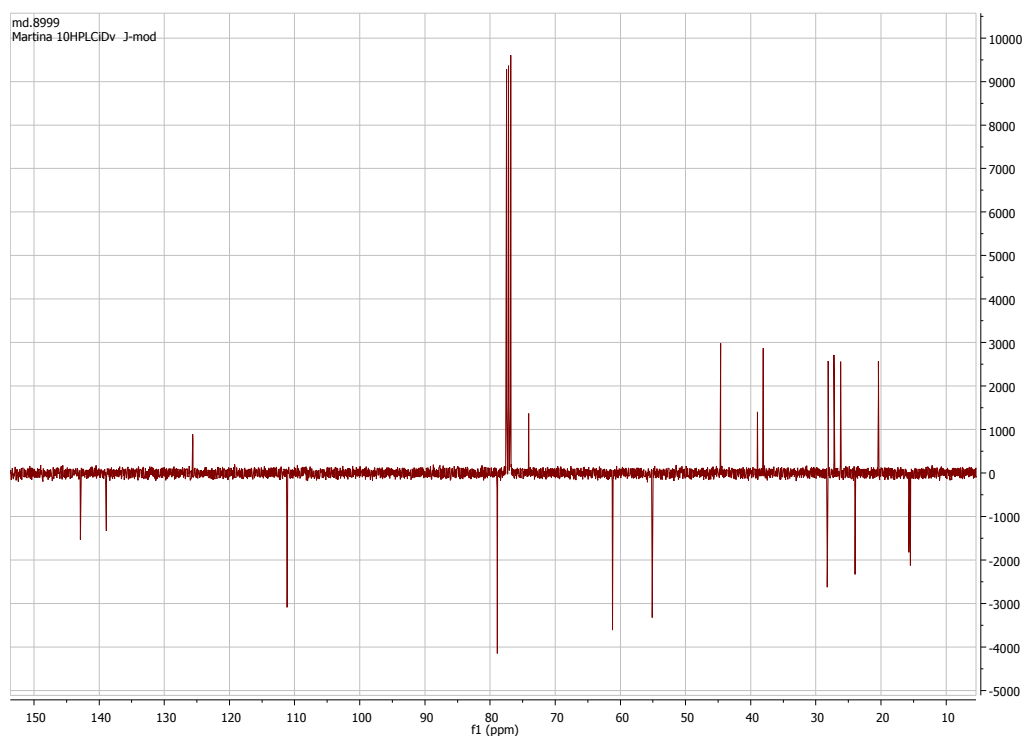
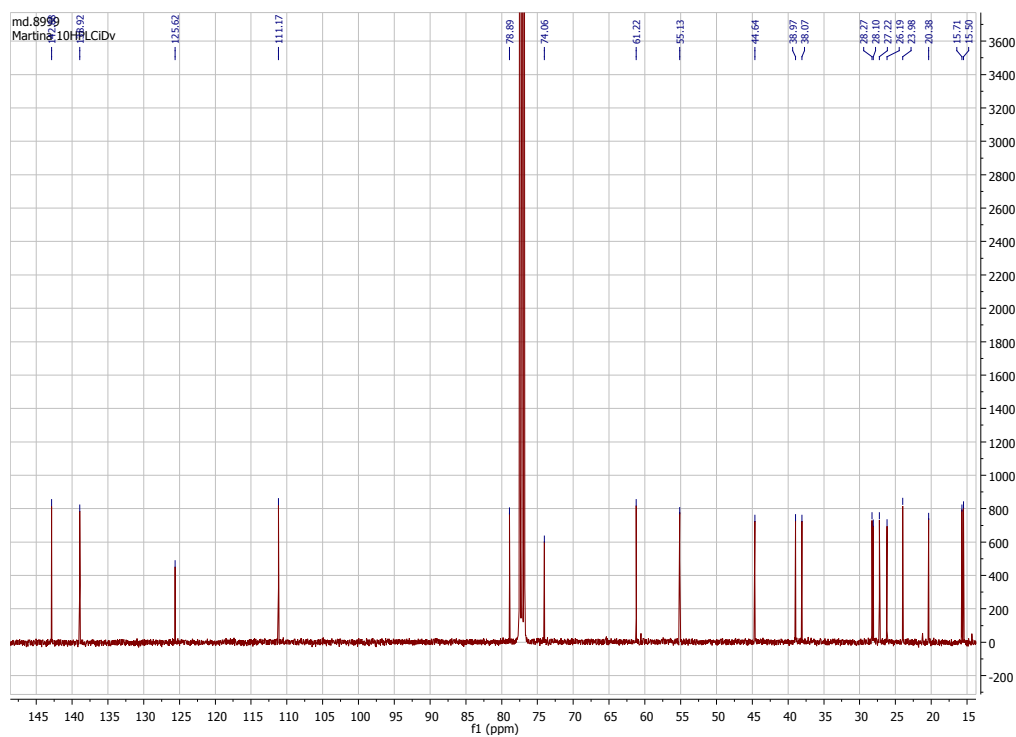
Cromatograma obtenido en GC, de **125** (traza inferior) comparando con ácido palmítico estándar (traza superior):

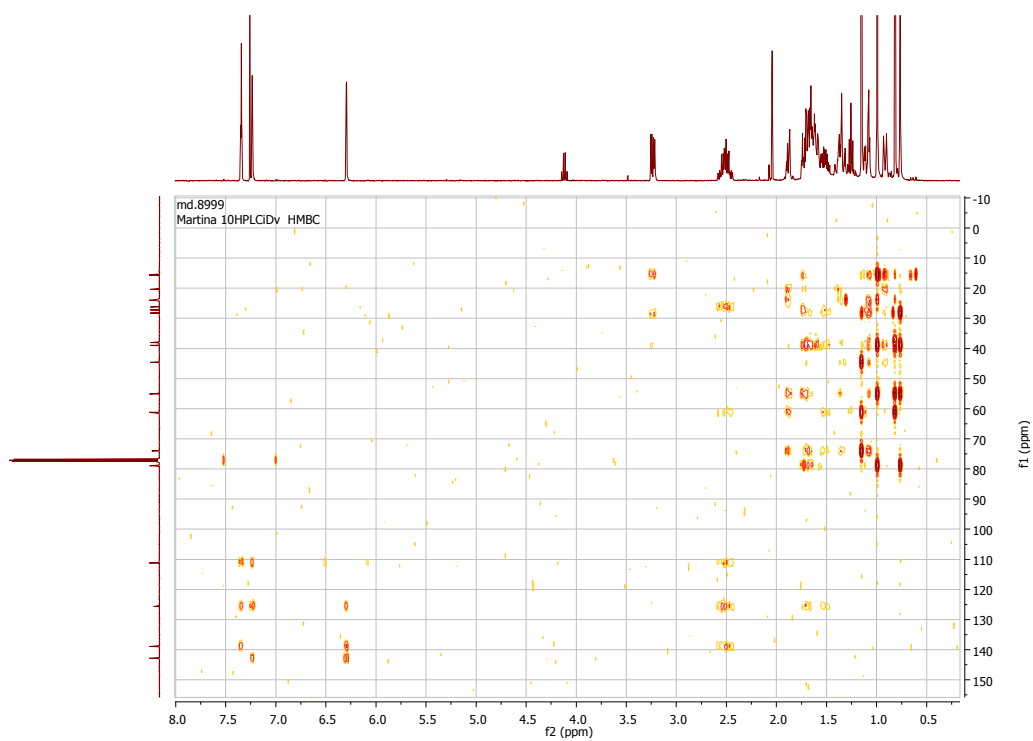
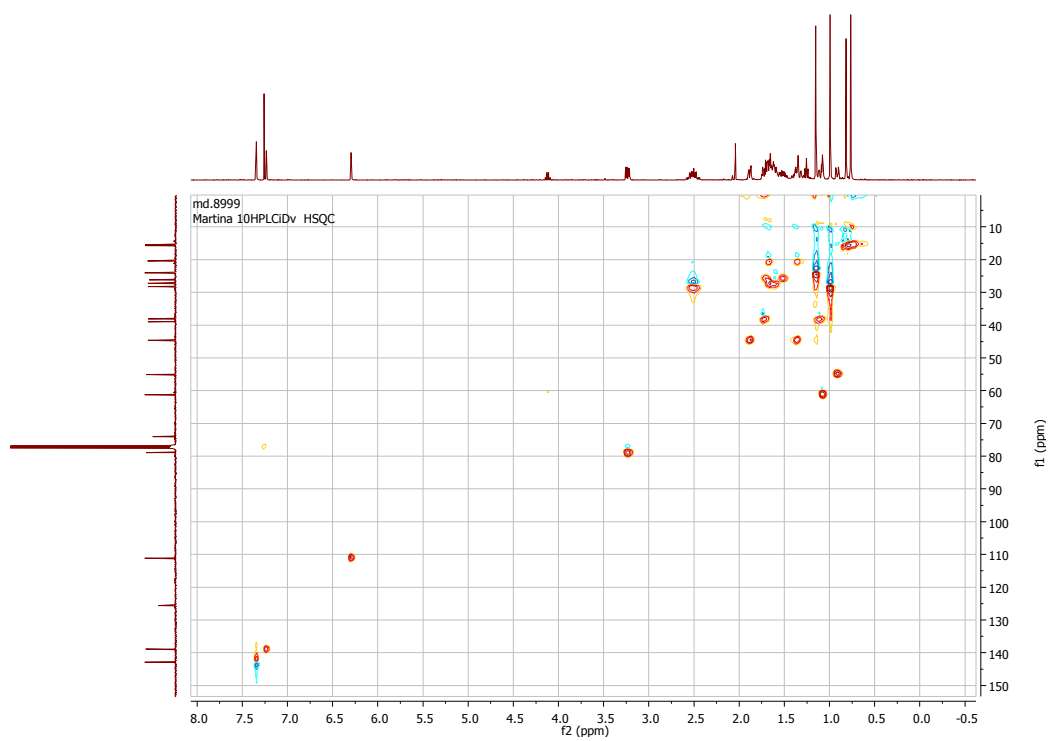


131

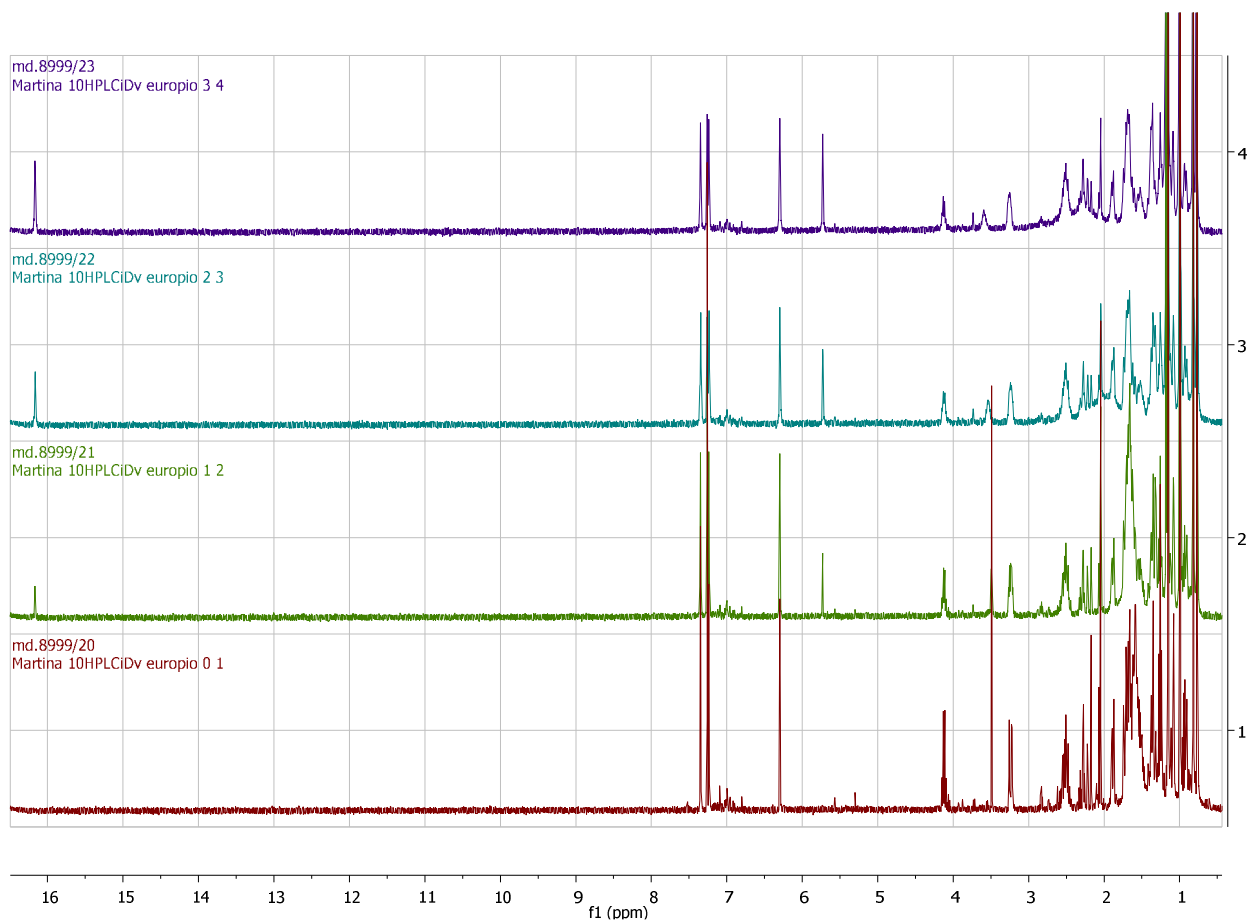


Anexo IV. Datos espectroscópicos de 131

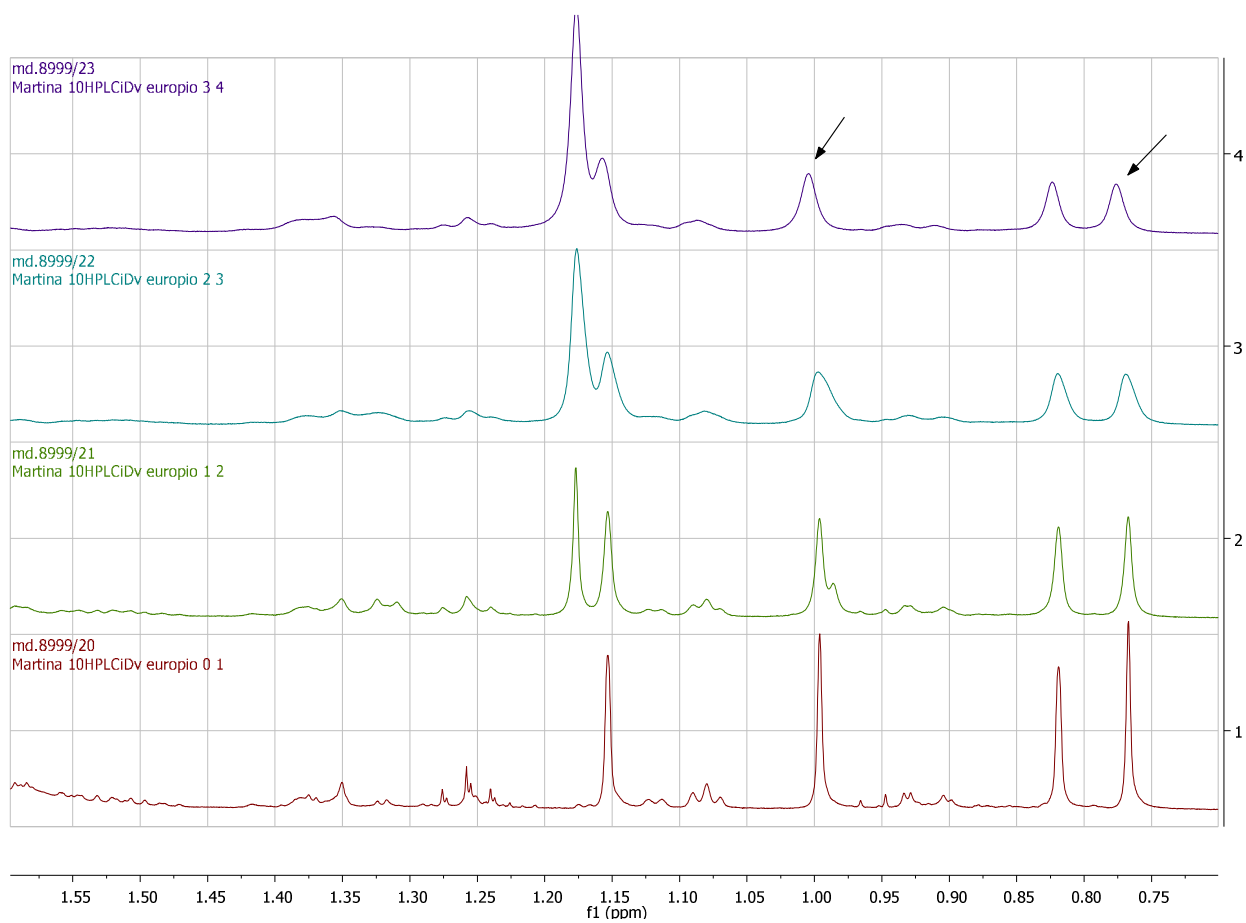




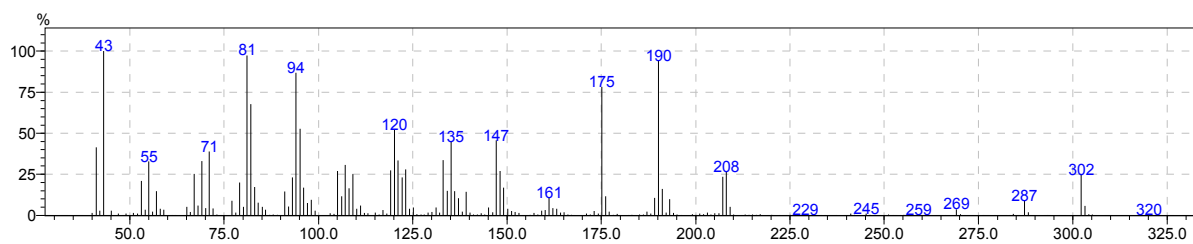
Espectros de ^1H luego del agregado del complejo con Europio, mostrando de abajo hacia arriba concentraciones crecientes del mismo:



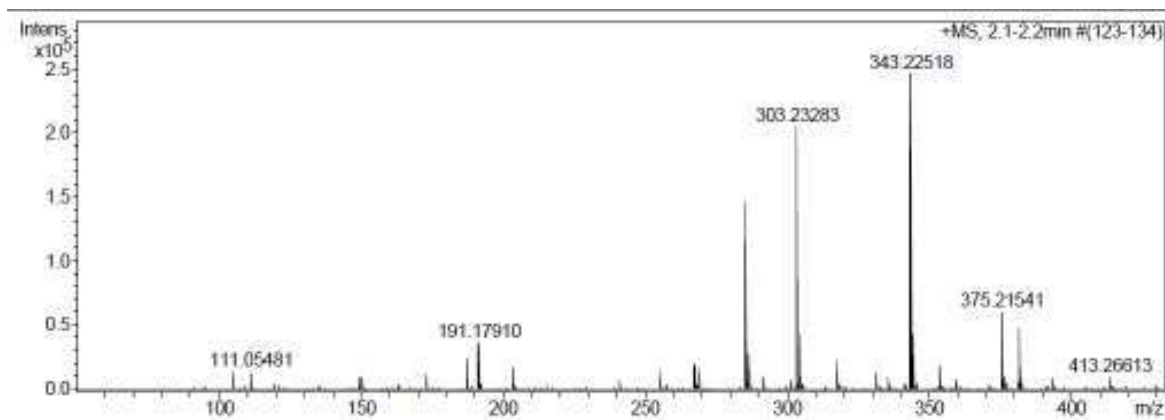
Anexo IV. Datos espectroscópicos de 131



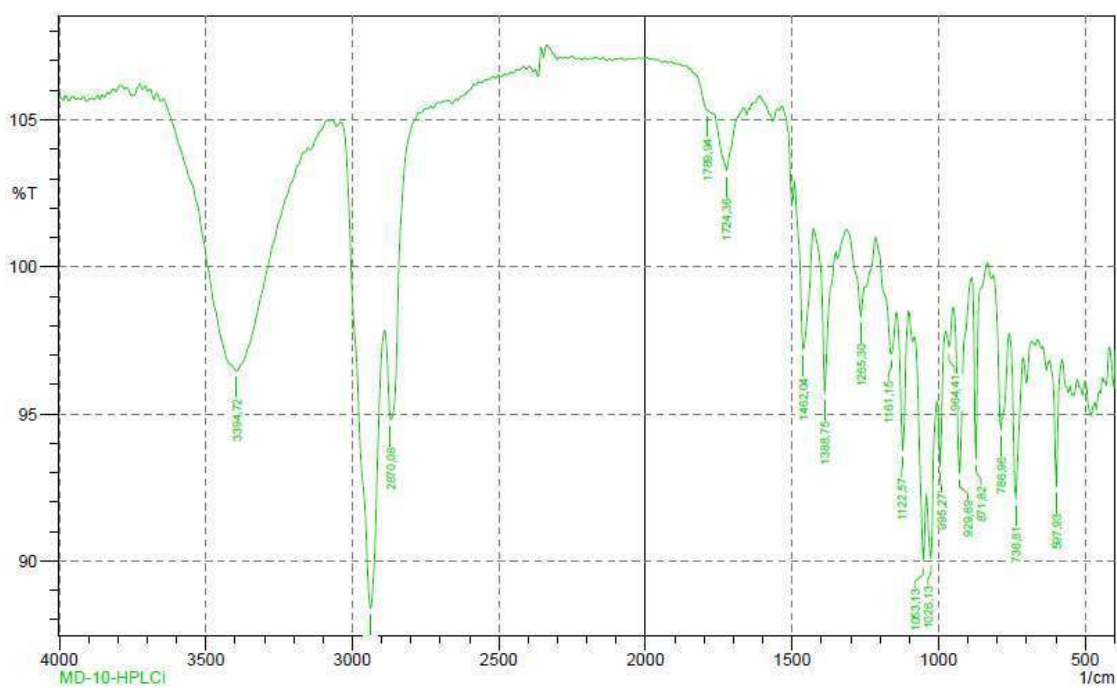
Espectro de masas:



Espectro de masas de alta resolución:



Espectro IR:

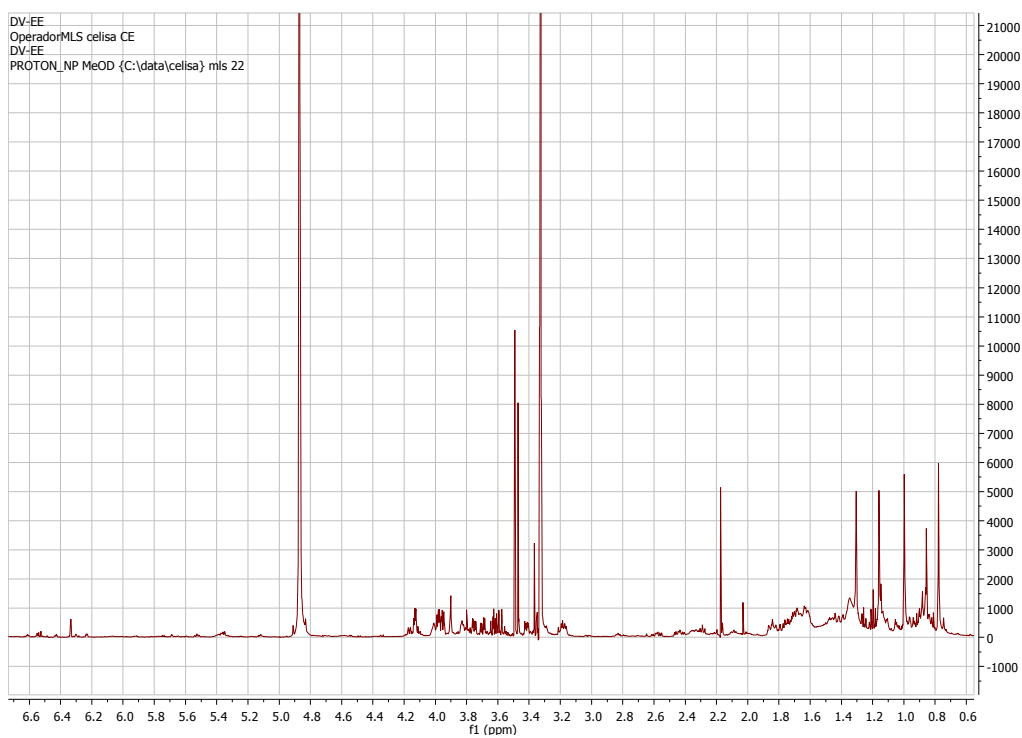


ANEXO V - Espectros ^1H

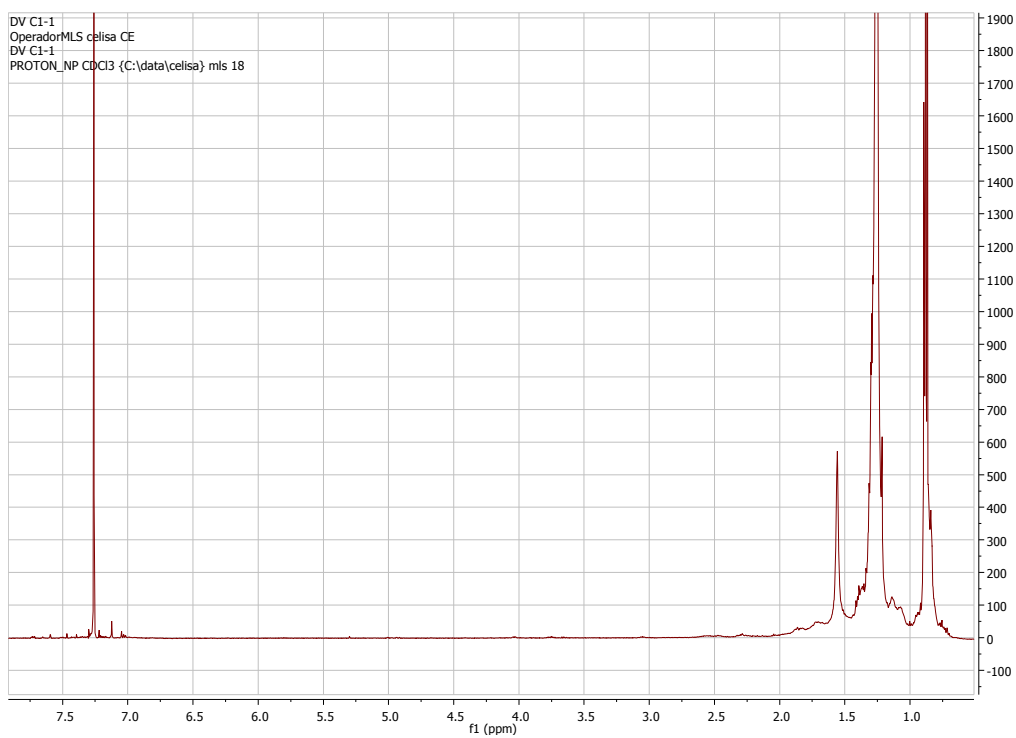
RMN 500 MHz de fracciones de
C1Dv.

(Obtenidas de la separación del extracto bruto
de hojas de *D. viscosa* por cromatografía líquida
a vacío)

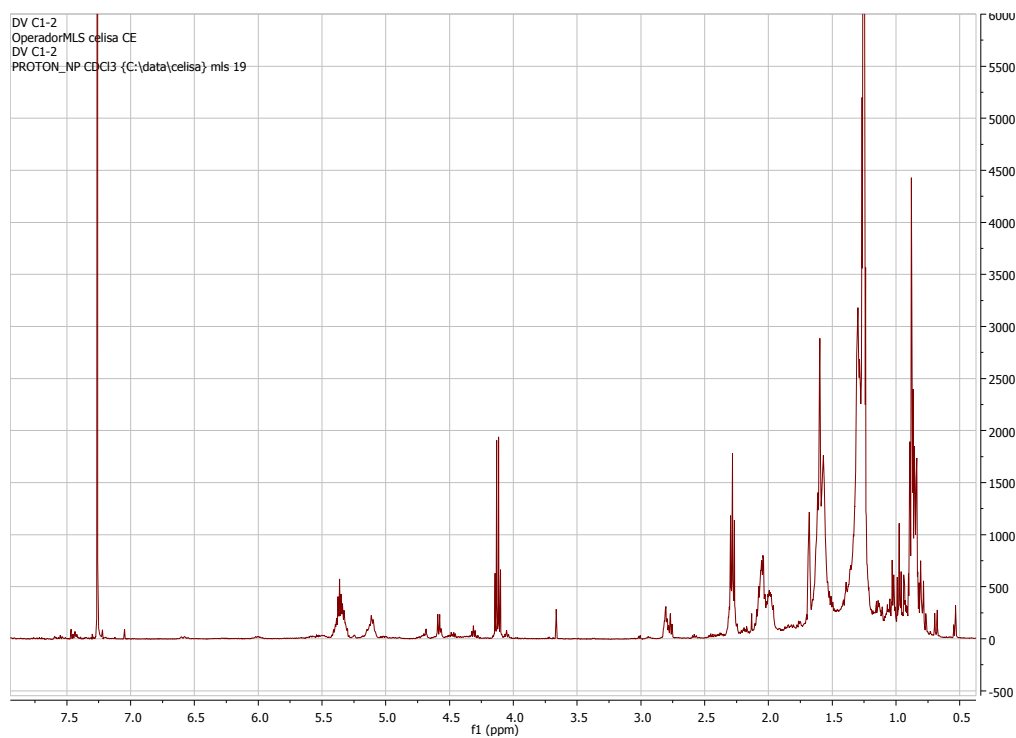
Extracto etanólico bruto de hojas



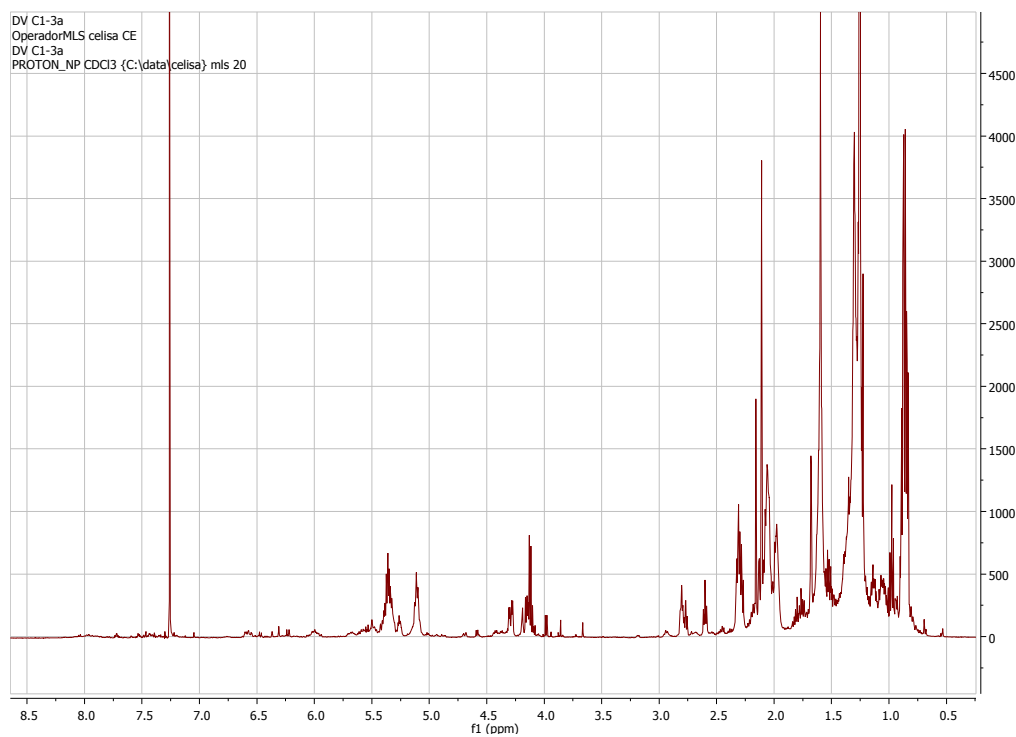
^{13}C 1Dv



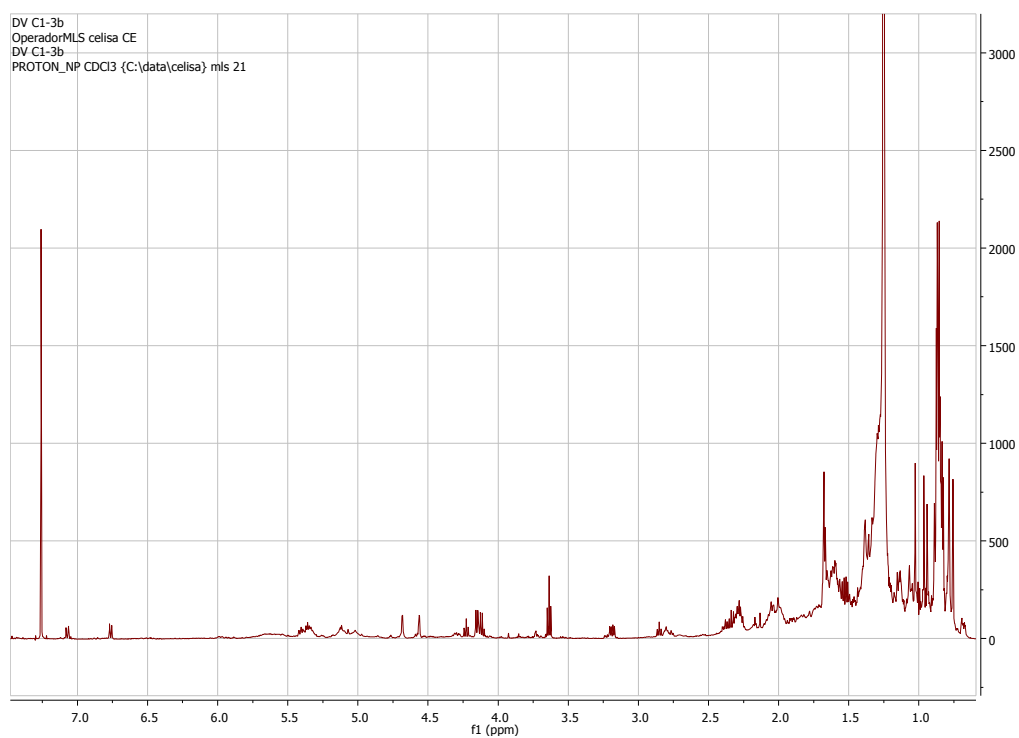
2C1Dv



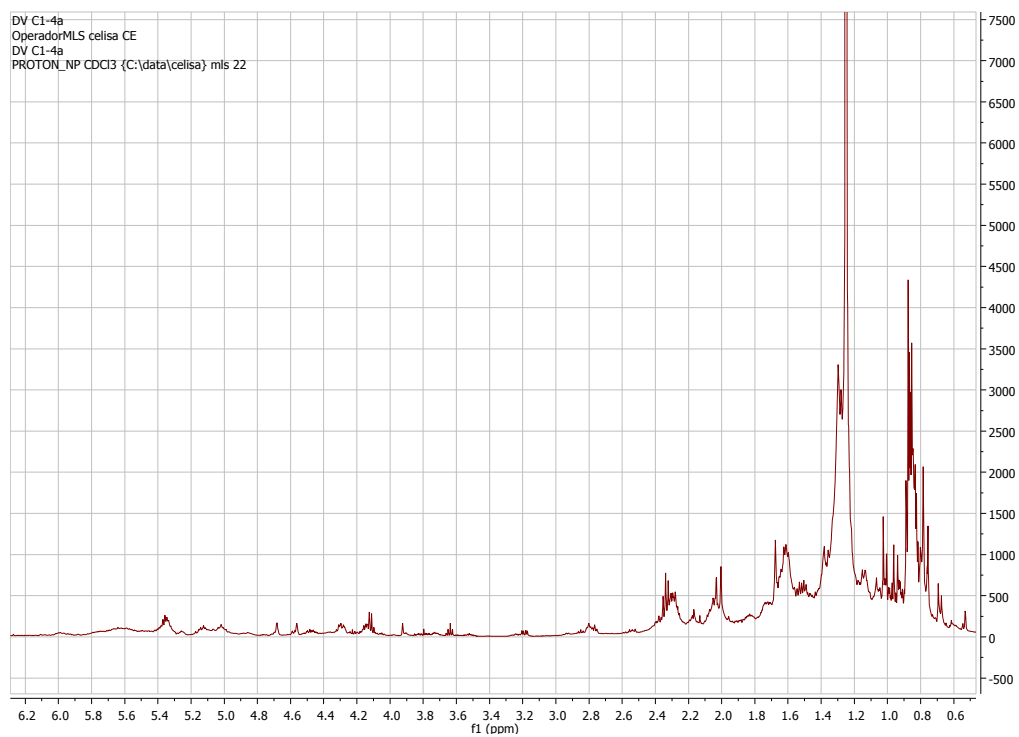
3aC1Dv



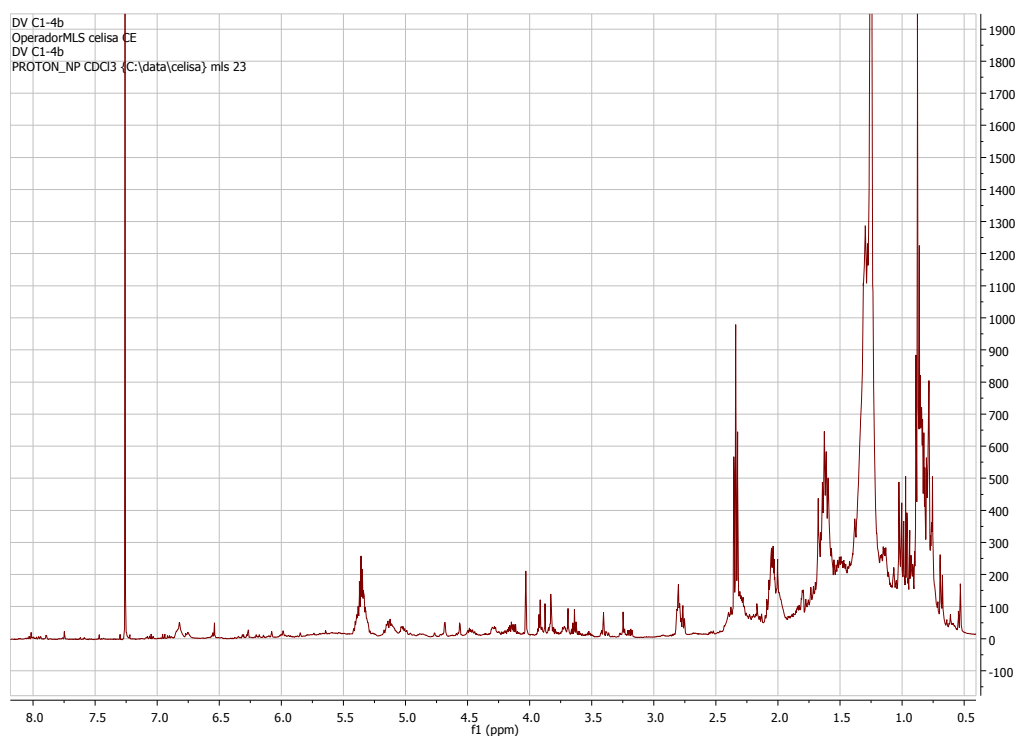
3bC1Dv



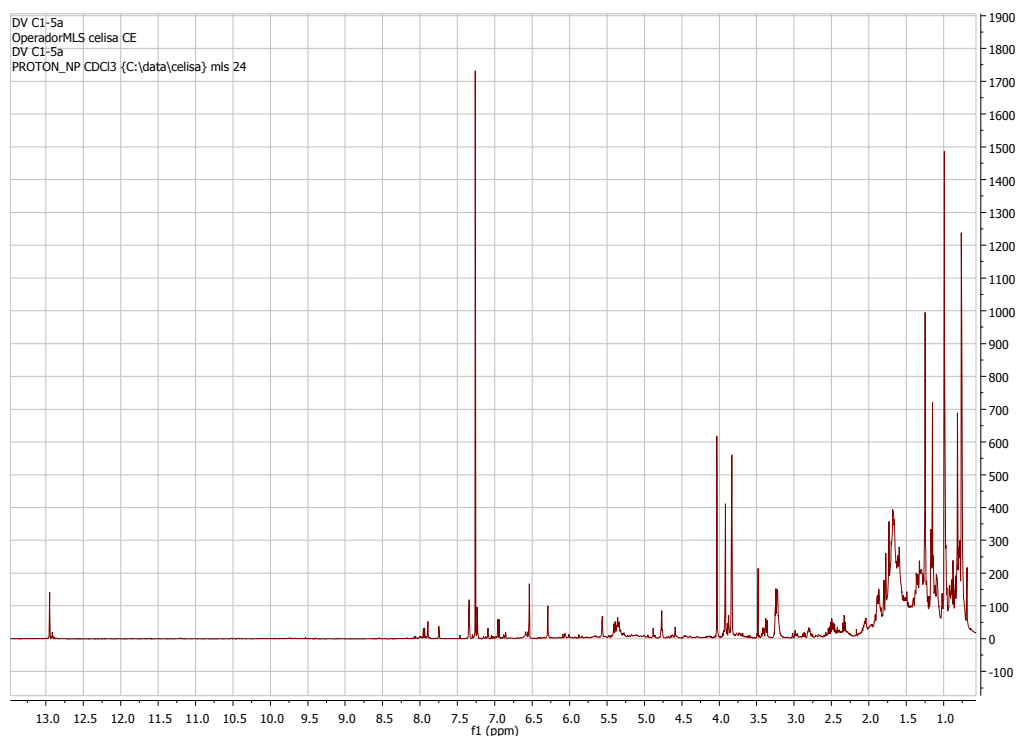
4aC1Dv



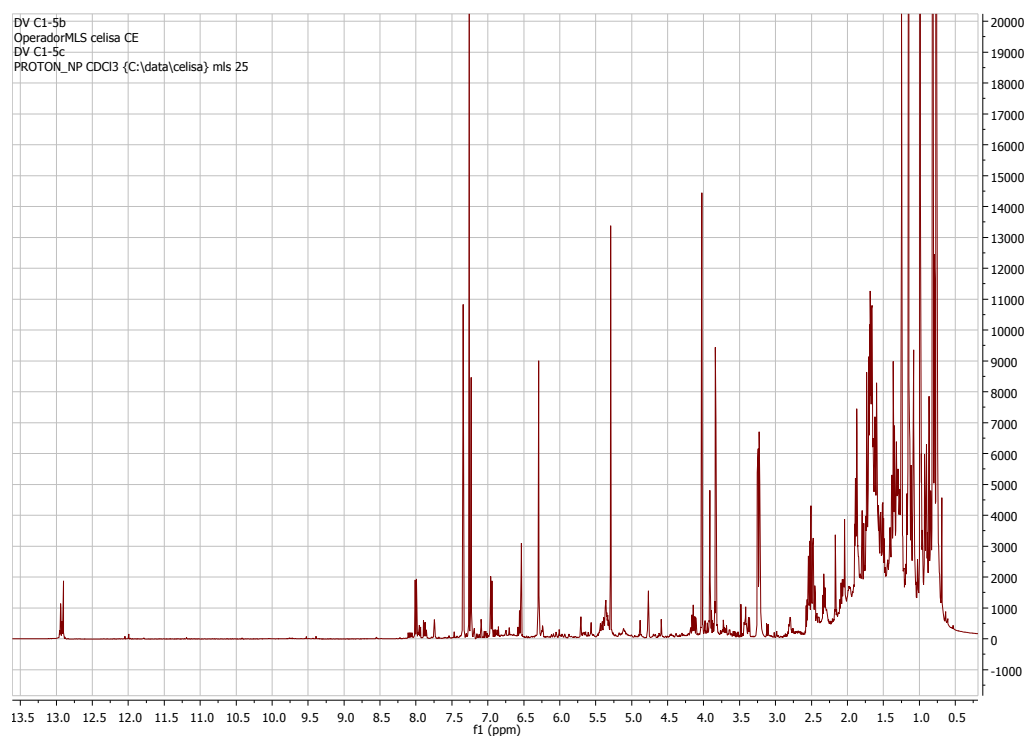
4bC1Dv



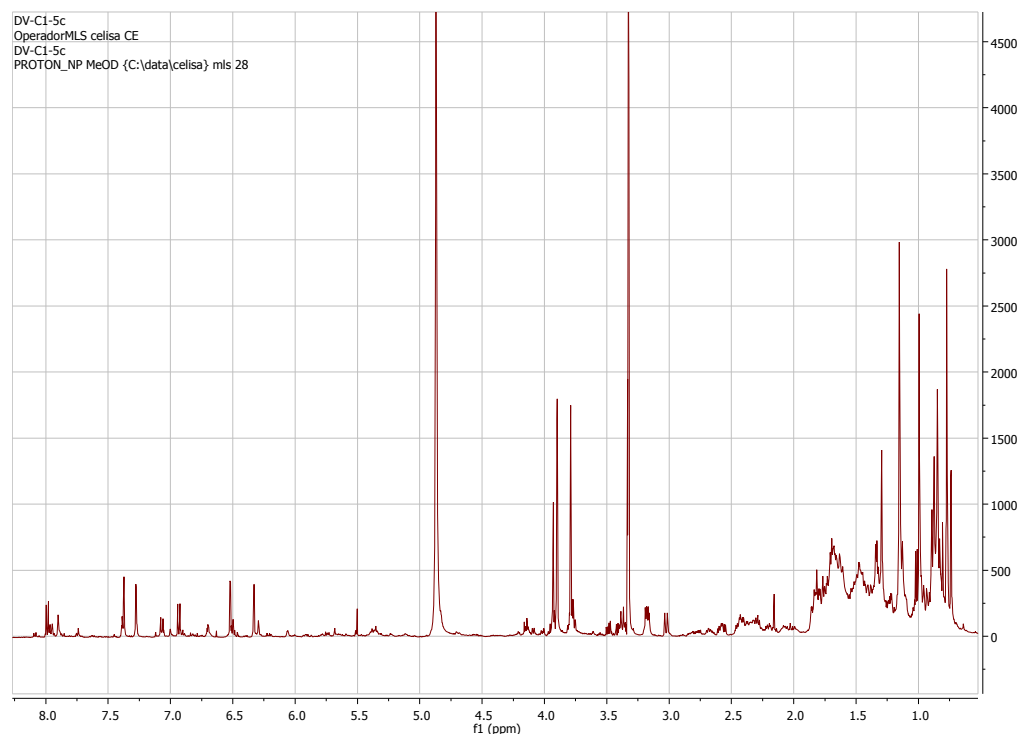
5aC1Dv



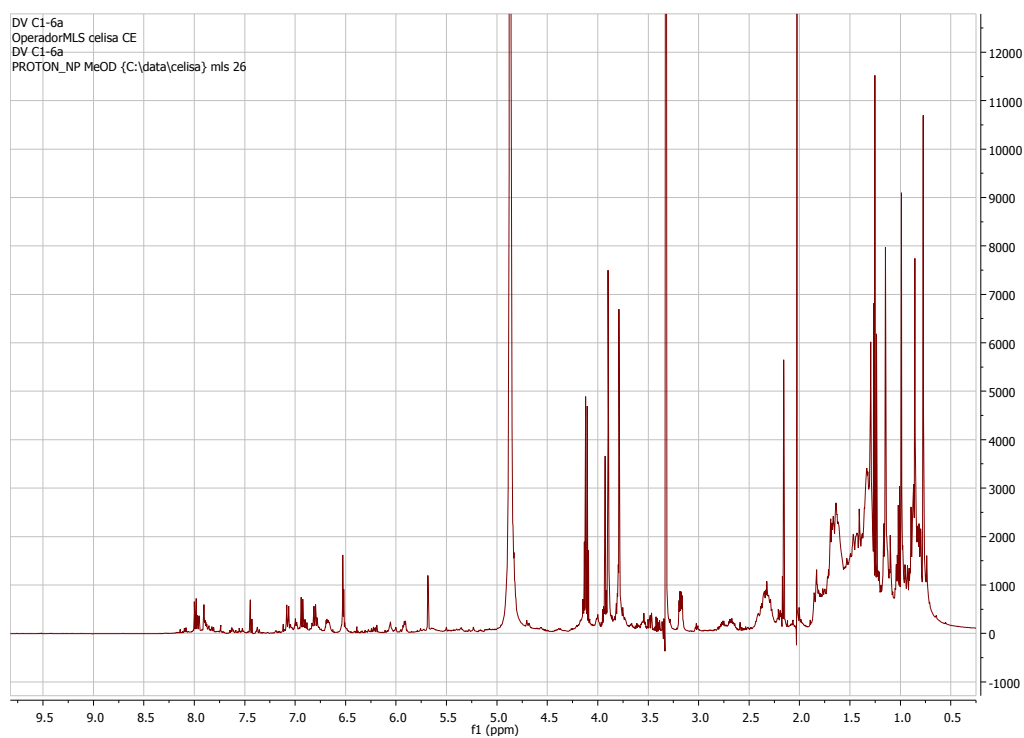
5bC1 Dv



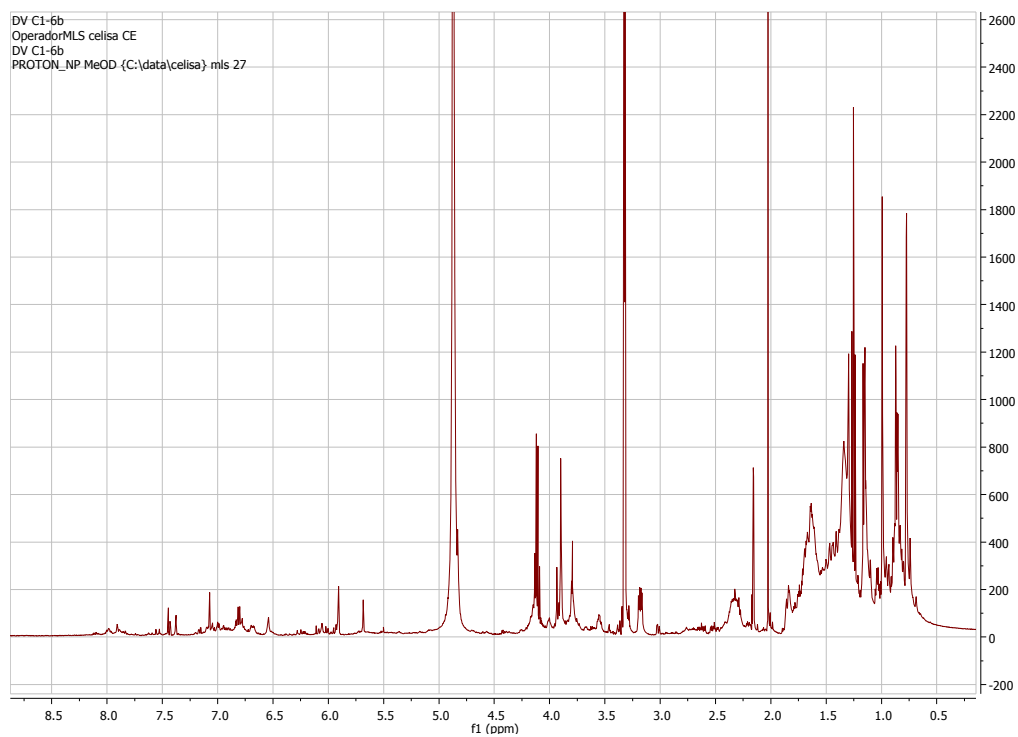
5cC1 Dv



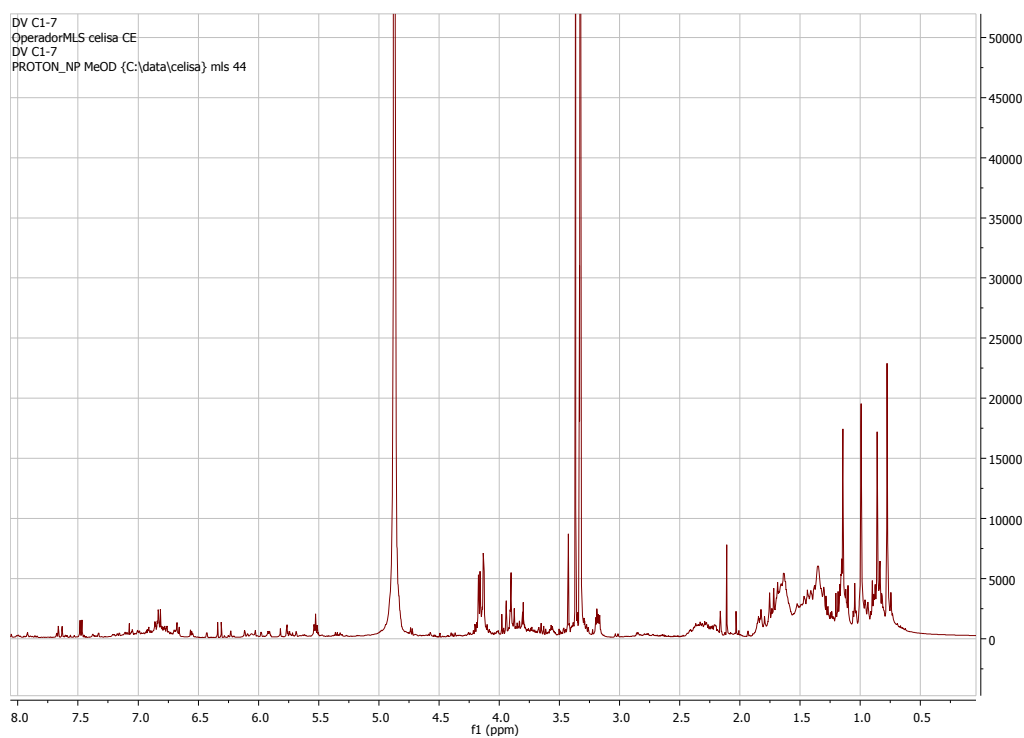
6aC1 Dv



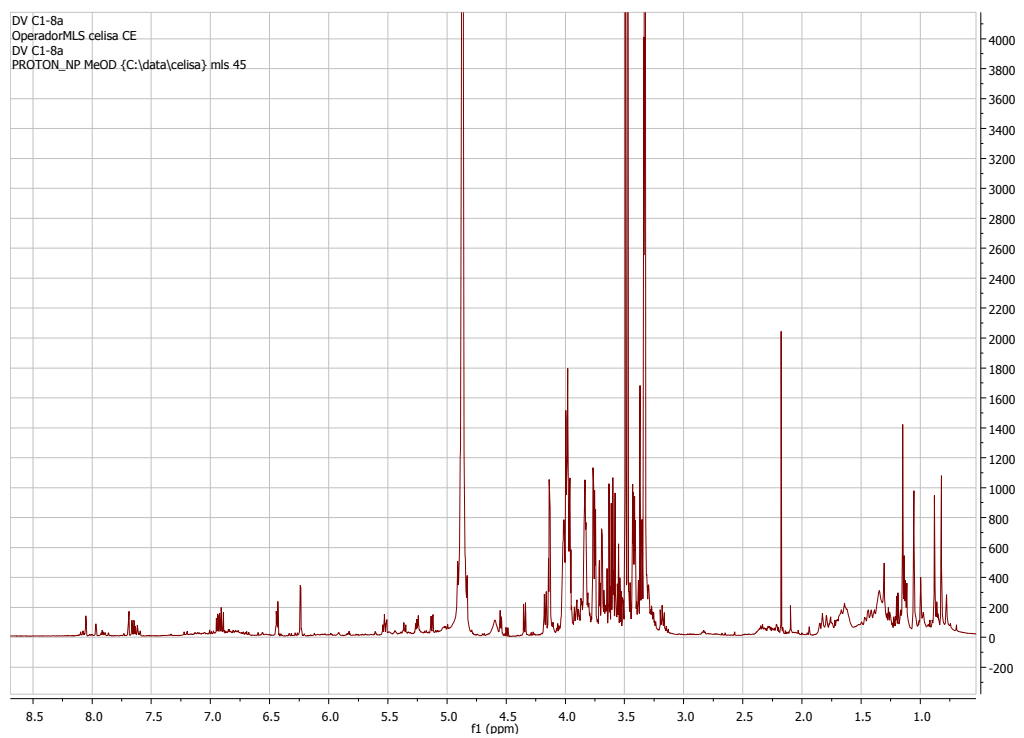
6bC1 Dv



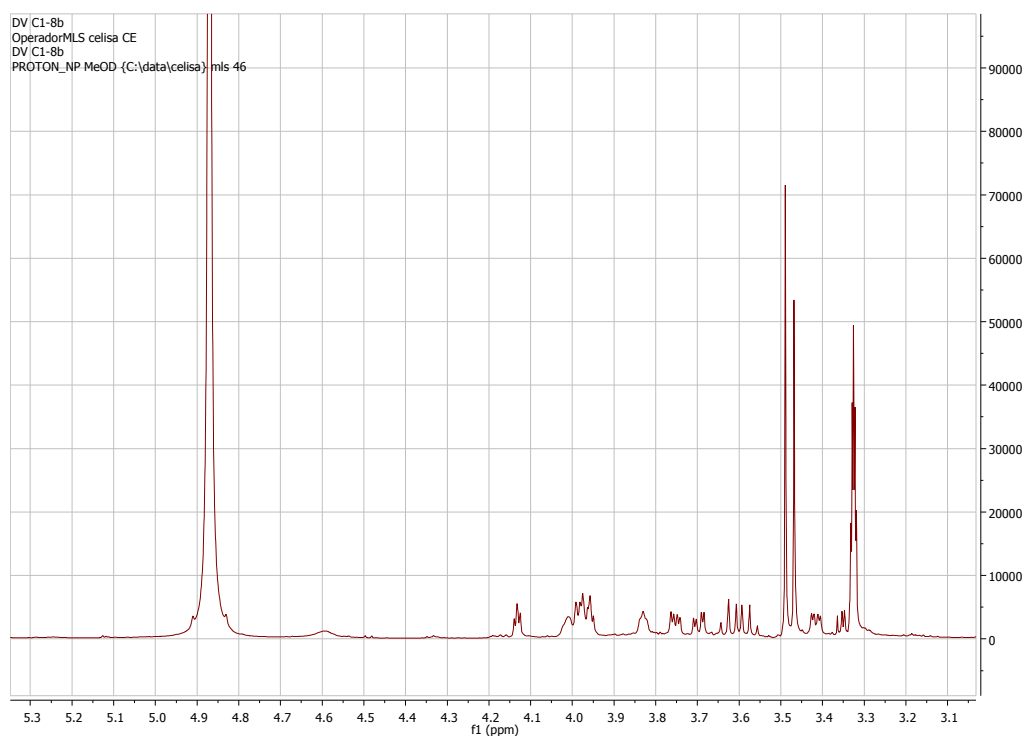
7C1 Dv



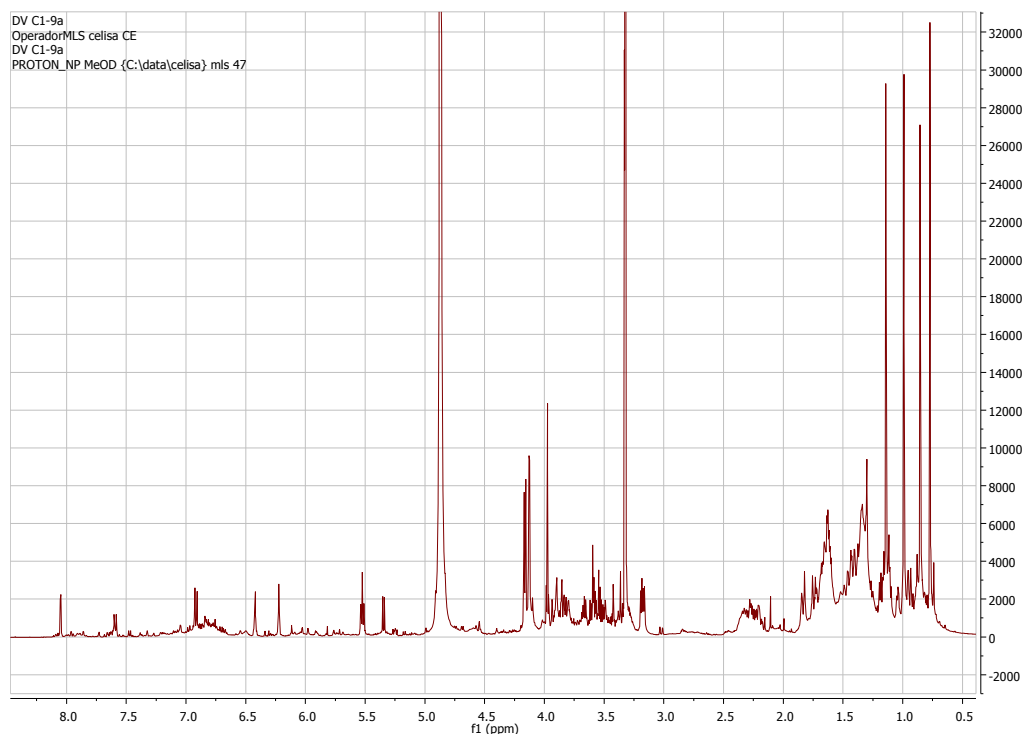
8aC1 Dv



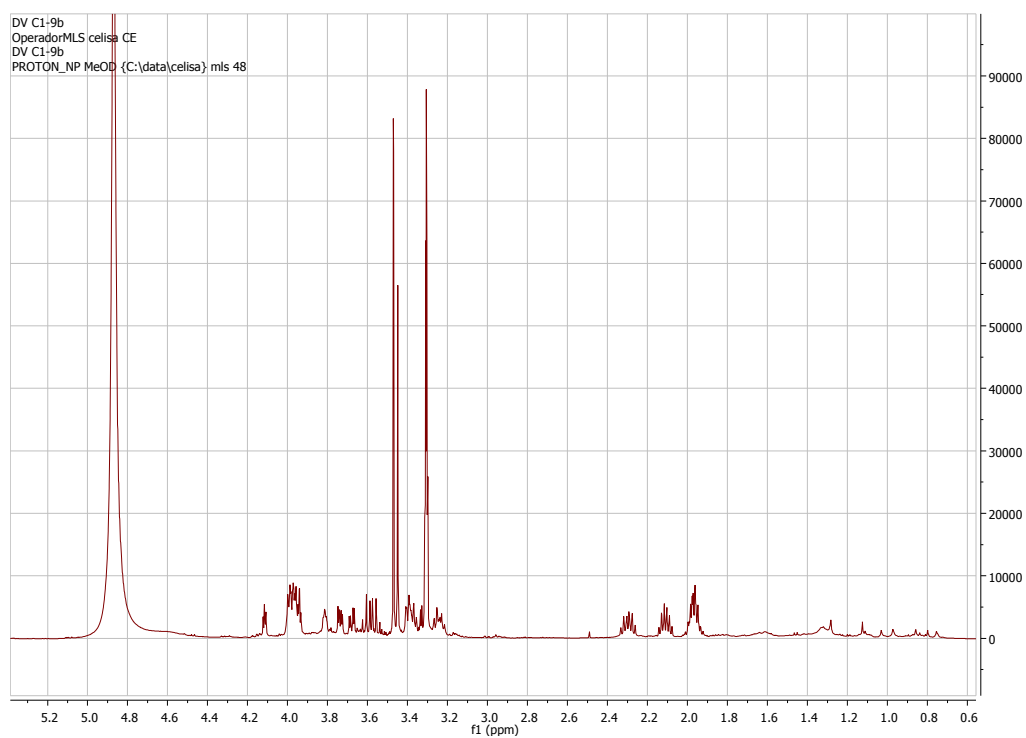
8bC1 Dv



9aC1 Dv



9bC1 Dv



ANEXO VI- Trabajos publicados

Limonoids from *Melia azedarach* with Deterrent Activity against Insects

Martina Díaz^{1,2,3}, Lucía Castillo¹, Carmen Elisa Díaz², Azucena González-Coloma³ and Carmen Rossini^{1,*}

¹Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

²Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, La Laguna, Tenerife, Spain; ³Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Abstract: The ethanolic extract of ripe fruits of *Melia azedarach* (Meliaceae) and its subfractions were tested against four insect species, portraying important agricultural pests. Five limonoids were isolated: two tirucallane type triterpenoids never isolated before from this species (21 α -methylmelianodiol, 21 β -ethylmelianodiol), as well as three ring C-seco limonoids previously reported on this tree (1-*O*-detigloyl-1-*O*-cinnamoylochinolal, 1-*O*-detigloyl-1-*O*-benzoylochinolal and ohchinolal). The complete NMR data of these natural products are reported here. Different patterns of activity were found among the products tested against the different pest models, emphasizing the value of testing potential biocontrol products against different insect targets.

Keywords: 21 α -methylmelianodiol, 21 β -ethylmelianodiol, *Epilachna paenulata*, *Melia azedarach*, *Myzus persicae*, ohchinolal, *Rhopalosiphum padi*, *Spodoptera littoralis*.

INTRODUCTION

Melia azedarach L. (Meliaceae), distributed in several template regions of the Earth, is native from Asia and Australia but has been naturalized in Africa, Europe and the Americas [1]. Numerous compounds, including sterols, terpenoids, protolimonoids and limonoids, have been isolated from barks and fruits of this species, especially from Asian specimens [2]. The use of this species for ornamental, as well as for medicinal purposes has been previously reviewed [3-6]. Besides, the species has been widely studied for its anti-insect properties. These activities comprise feeding and oviposition deterrence, reduction of growth rate and toxicity against different species of Lepidoptera [7], Coleoptera [7] and Diptera [8]; not only from crude extracts, but also from some of its pure constituents. The aim of this work was to do a phytochemical and an anti-insect study of the ethanolic extract of fruits of *M. azedarach* from Uruguay, as well as to isolate compounds from such extract. We here report on the deterrent activity of four isolated compounds against four insect species. The insects selected to evaluate the biological activity are model pests which comprise different feeding modes (chewing and sucking) and diet breadth (specialists and generalists) [9]. The four species, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Epilachna paenulata* (Coleoptera: Coccinellidae), *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae), are important agricultural pests, either in conventional or organic production. Although crude extracts of this plant have already been tested against the two chewing insects [10, 11] and against *M. persicae* [12, 13], no previous reports

exist involving their effect on the aphid *R. padi*, or the effect of the isolated compounds against the four insects tested.

MATERIALS AND METHODS

General Experimental Procedures

Optical rotations were recorded on a Krüss P8000-P8100-T digital polarimeter. NMR spectra were recorded in CDCl₃ using a Bruker DPX-400 Advance Spectrometer (400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C) for **1** and **2**. In the cases of **3**, **4** and **5**, their spectra were recorded on a Bruker Advance-400 and on an AMX-500 (400 and 500 MHz for ¹H, 100, 125 and 150 MHz for ¹³C), also in CDCl₃. Mass spectra (HRESIMS) were obtained on a Bruker micrOTOF-Q II mass spectrometer. Preparative HPLC was performed on a Shimadzu LC-20AT Prominence system equipped with a SPD-M20A Prominence diode array detector and normal phase columns. In the cases of **1** and **2**, a Macherey Nagel Nucleosil-100 column (7 μ m, 250 x 16 mm) was utilized using as mobile phase a mixed solvent system of CH₂Cl₂/EtOAc at a flow rate of 8 mL/min. In the cases of **3**, **4** and **5**, a Beckman ultrasphere 5 μ m, 250 x 10 mm Si column was utilized with a mixed solvent system of CH₂Cl₂/EtOAc and hexane/EtOAc at a flow rate of 8 mL/min. Flash chromatography and liquid chromatography were carried out on MN Kieselgel 60 M (0.04-0.063 mm/230-400 mesh). Fractions were monitored by TLC performed on aluminum plates precoated with Silica gel 60 G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), and spots were visualized by heating after spraying with Oleum reagent [H₂O/acetic acid/sulfuric acid, 16:80:4] or Vanillin reagent [1 g of vanillin in sulfuric acid/ethanol, 1:9] [14]. For comparison purposes of the R_f of fractions on TLC, limonin extracted from grapefruit seeds (provided by the National Institute of Agricultural Research of Uruguay) was used.

*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, Montevideo CP 11800, Uruguay; Tel: +598 2 9242535; Fax: +598 29241906; E-mail: crossini@fq.edu.uy

Plant Material

The ripe fruits of *M. azedarach* were collected in Montevideo, Uruguay, in July 2008. The plant was identified by E. Alonso- Paz (Organic Chemistry Department, Botany Section. Facultad de Química, Montevideo, Uruguay). They were dried during 48 – 72 h at 40° C before extraction.

Extraction and Isolation

The dried fruits (716 g) were ground and extracted with boiling hexane (1300 mL, x3) before ethanolic maceration (1300 mL EtOH, room temperature, 24h, x3). Ethanolic extract (EE fruits) was vacuum-concentrated and dissolved in methanol/water (95:5), to be sequentially partitioned with hexane and then with ethyl acetate. The EtOAc extract (8.8 g) was subjected to flash chromatography eluted with EtOAc to yield 8 fractions. Fractions 2 and 3 were joined on the basis of their TLC profiles to yield a mixture (4.3 g) that was subjected to another flash chromatography eluted with CHCl₃/ACN from 6:1 to 6:2 to yield 14 fractions (F1 - F14). Fractions 4 to 7 contained TLC spots of similar R_f of limonin and the color of which was comparable to the limonin color (with vanillin). Therefore, a mixture of these fractions (hereafter, “limonoids extract”) was tested in its deterrent capacity. Fraction 4 [F4 (0.57 g)] was subjected to flash chromatography eluted with hexane/EtOAc from 95:5 to 4:6 to yield 14 subfractions. Subfraction 9-10 (0.13 g) was separated on a Beckman HPLC normal phase column to yield **3** (1 mg), **4** (< 1 mg) and **5** (< 1 mg). Fractions 5 to 7 were joined [F5-7, 1.14 g] and subjected to flash chromatography eluted with hexane/EtOAc from 95:5 to EtOAc 100% to yield 16 subfractions. Subfractions 8 (59 mg) and 9 (150 mg) were separated on a Macherey Nagel HPLC normal phase column to yield **1** (27 mg), **2** (3.7 mg), **5** (5 mg) and an equimolar mixture of **5** and **3** (6 mg). The relative amounts in this mixture -hereafter “5+3”- were determined by the relative intensities of the H-signal of the C28 aldehyde group in **3** and **5**).

INSECTS

Chewing Insects

Epilachna paenulata Germar (Coleoptera: Coccinellidae) is an oligophagous insect specialized in Cucurbitaceae. Adults were maintained on squash (*Cucurbita pepo* L.) under controlled conditions of temperature (20 ± 2 °C) and photophase (14L:10D) [15].

Spodoptera littoralis Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) is a generalist species. The laboratory colony was kept on an artificial diet [16] at 25 ± 1 °C, > 70% relative humidity, with a photoperiod of (16L:8D) in a growth chamber.

Sucking Insects

Rhopalosiphum padi L. (Hemiptera: Aphididae) is a grass specialist species. These aphids were reared on *Hordeum vulgare* L. foliage and maintained at 20 ± 1 °C, > 70% relative humidity, and with a photoperiod of (16L:8D) in a growth chamber [9].

Myzus persicae Sulzer (Hemiptera: Aphididae) is a generalist species. These aphids were reared on bell pepper

foliage (*Capsicum annuum* L.) at 25 ± 1 °C, > 70% relative humidity, with a photoperiod of (16L:8D) in a growth chamber [9].

Insects' Bioassays

Tests against chewing insects (*E. paenulata* and *S. littoralis*): The antifeedant (phagodeterrent) activity was evaluated in choice-bioassays in Petri dishes (9 cm × 1 cm) lined at the bottom with a layer of agar (2%). Insects were offered four leaf discs (1 cm²) of the appropriate host plant (*C. pepo* for *E. paenulata* and *C. annuum* for *S. littoralis*). Two of the discs (T) were coated with 100 µg of the extract or 50 µg of pure compounds (10 µL of a 10% or 5% MeOH solution respectively), and the other two (C) were treated with 10 µL of MeOH. Insects were tested individually as adults for *E. paenulata* (10-15 replicates per extract) and as larvae for *S. littoralis* (5-6 replicates per extract). To measure deterrent activity, a visual score of area consumed (0, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5 or 100%) was assigned for all discs within the plate, and a preference index (PI) was determined for each replicate using the formula PI = (C - T)/(C + T), where C and T are the amounts consumed for the control and treatment of the leaves respectively [17].

Tests against sucking insects (*M. persicae* and *R. padi*): The activity against aphid settling was tested in choice experiments as described elsewhere [18]. The extracts were tested in plastic boxes (3 × 3 × 1.5 cm) lined at the bottom with 2% agar (20 replicates per extract). Two leaf pieces (ca. 1 cm²) cut from the appropriate host plant (*C. annuum* and *H. vulgare* for *M. persicae* and *R. padi*, respectively) were placed on the agar and treated either with the extract at 100 µg/cm² (in the case of pure compounds a 50 µg/cm² dose was used) or the same amount of solvent (MeOH). Ten aphids were placed in the box and the percentage of aphids settled on each surface was recorded after 24 hours of exposure. A PI was also calculated for each replicate as PI = [(%C - %T)/(%C + %T)], where %T and %C are the percentages of aphids settled on the treated and control leaf pieces, respectively.

Statistical Procedures

Bioassay data were analyzed by Wilcoxon Rank tests [19]. Antisettling activity determination was based on the number of aphids settled on the leaf treated with solvent (control) compared to the number settled on the leaf treated with the substance tested (treatment). Replicates with fewer than five aphids settled in total (on both leaves) were not considered. Antifeedant (deterrent) activity determination was based on the proportions of the consumption of the leaf treated with solvent (control) compared to the proportions of the consumption of the leaf treated with the substance tested (treatment).

Comparisons among results from different bioassays were analyzed by Mann Whitney and Kruskal Wallis tests [19].

PHYSICAL AND SPECTROSCOPIC DATA

21α-methylmelianodiol (1) [α]_D²¹ -97.5° (c 0.3800, CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR data: see Tables 1 and 2;

Table 1. ¹H Chemical Shifts for Isolated 1–5 (δ in ppm, J in Hz)

Number	1 ^b	2 ^b	3 ^a	4 ^a	5 ^a
1	1.45 (m)	1.47 (m)	5.14 (t, 2.6)	5.26 (t, 3)	5.08 (t, 3)
	1.98 (m)	1.97 (m)	-	-	-
2	2.24 (dt, 14.2, 3.7)	2.24 (dt, 14.0, 3.4)	2.31 (m)	2.1-2.3 (m)	2.1-2.3 (m)
	2.76 (td, 14.6, 5.6)	2.74 (td, 14.5, 5.6)	-	-	-
3	-	-	3.78 (dt, 3.0)	3.81 (m)	3.75 (dt, 9.5, 2.5)
5	1.72 (m)	1.70 (m)	3.71 (d, 12.1)	3.81 (m)	3.65 (d, 12.5)
6	2.06-2.13 (m)	2.06-2.13 (m)	5.28 (dd, 2.7, 12.2)	5.30 (dd, 2.7, 12.2)	5.26 (dd, 2.7, 12.1)
7	5.315 (q, 3.2)	5.3 (q, 2.8)	4.05 (d, 2.7)	4.07 (d, 2.7)	4.03 (d, 2.7)
9	2.3 (m)	2.3 (m)	2.90 (dd, 2.7, 8.8)	2.93 (dd, 4.7, 7.1)	2.84 (dd, 3.2, 8.5)
11	1.57 (m)	1.58 (m)	2.31 (m)	2.30 (m)	2.3 (m)
12	1.55 (m)	1.33 (m)	-	-	-
	1.74 (m)	-	-	-	-
15	1.50 (m)	1.51 (m)	5.56 (td, 2.6, 8.2)	5.51 (m)	5.48 (m)
16	1.94 (m)	1.88 (m)	2.1 (m)	2.1 (m)	2.1 (m)
	1.31 (m)	-	2.3 (m)	2.3 (m)	2.3 (m)
17	1.78 (m)	2.05 (m)	3.63 (dd, 8.5, 1.5)	3.61 (d, 8.7)	3.65 (d, 8.5)
18	0.85 (s)	0.83 (s)	1.65 (d, 2.0)	1.64 (d, 1.5)	1.65 (d, 1.5)
19	1.01 (s)	1.01 (s)	1.10 (s)	1.13 (s)	1.08 (s)
20	2.16 (m)	1.96 (m)	-	-	-
21	4.78 (d, 3.6)	4.8 (d, 3.2)	7.19 (s)	7.12 (s)	7.25 (s)
22	1.94 (m)	1.90 (m)	6.24 (dd, 1, 0.5)	6.11 (d, 1.0)	6.29 (d, 1.3)
	1.74 (m)	-	-	-	-
23	4.22 (ddd, 10.5, 4.8, 1.7)	4.43 (m)	7.30 (m)	7.18 (t, 1.5)	7.33 (t, 1.6)
24	3.25 (dd, 9.9, 1.5)	3.17 (dd, 8.2, 2.0)	-	-	-
26	1.26 (s)	1.25 (s)	-	-	-
27	1.30 (s)	1.25 (s)	-	-	-
28	1.12 (s)	1.11	9.76 (s)	9.80 (s)	9.74 (s)
29	1.04 (s)	1.04	1.01 (s)	1.04 (s)	1.00 (s)
30	1.01 (s)	1.01	1.43 (s)	1.43 (s)	1.41 (s)
	3.34 (s) O-Me	1.22 (s) -O-CH ₂ -Me	3.18 (s) OMe	2.85 (s) OMe	6.94 (dd, 7.1, 1.4) 3'
	-	3.7, 3.4 -O-CH ₂ -Me	1.99 (s) OCOMe	2.0 (s) OCOMe	1.86 (d, 7.1) 4'
	-	-	6.51 (d, 15.9) 2' 7.74 (d, 16.0) 3' 7.58 (m) 5' 7.43 (m) 6' 7.43 (m) 7' 7.43 (m) 8' 7.58 (m) 9'	7.49 (m) 3' 7' 8.09 (m) 4' 6' 7.63 (t, 7.4) 5'	1.94 (s) 5'

^a In CDCl₃, 500 MHz. ^b In CDCl₃, 400 MHz.

Table 2. ^{13}C Chemical Shifts for Isolated 1–5 (In CDCl_3 , δ in ppm, 100-150 MHz)

Number	1	2	3	4	5
1	38.65	38.7	73.12	73.3	72.73
2	35.25	35.25	28.76	28.92	30.51
3	217.05	217	75.31	75.12	75.3
4	48.03	48.04	49.31	49.27	49.28
5	52.5	52.5	35.28	35.07	35.24
6	24.5	24.51	69.16	69.11	68.98
7	118.31	118	86.26	86.29	86.15
8	145.7	145	47.32	47.2	47.26
9	48.45	48.45	39.86	39.99	39.79
10	35.07	35.08	42.28	42.54	42.38
11	17.93	17.9	30.48	30.88	28.57
12	31.67	31.2	172.63 (COOMe)	172.46 (COOMe)	172.66 (COOMe)
13	43.75	43.6	135.94	136.25	135.95
14	51.12	50.9	146.21	145.9	146.25
15	33.9	34.34	87.8	87.89	87.84
16	27.56	27.48	41.29	41.29	41.4
17	50.45	45.1	49.81	49.75	49.82
18	22.7	23.4	13.26	13.34	13.25
19	12.9	12.89	17.24	16.99	17.17
20	47.86	46.38	127.03	127.07	127.18
21	109.14	103.54	139.02	138.81	139.13
22	34.48	31.8	110.82	110.72	110.86
23	76.91	78	143.21	143.1	143.21
24	75.53	76.8	-	-	-
25	73.24	73.1	-	-	-
26	26.53	26.53	-	-	-
27	26.62	26.41	-	-	-
28	24.65	24.64	207.1	207.02	207.07
29	21.73	21.7	14.09	14.19	13.25
30	27.44	27.53	17.29	17.99	17.23
	55.8 O-Me	O-CH ₂ -63.9	51.87 COOMe	51.48 COOMe	51.78 COOMe
	-	CH ₃ 15.35	21.14 OCOMe	21.12 OCOMe	21.11 OCOMe
	-	-	170.62 OCOMe 165.66 1' 117.75 2' 146.27 3' 134.40 4' 128.56 5' 129.24 6' 130.93 7' 129.24 8' 128.56 9'	170.54 OCOMe 165.32 1' 130.2 2' 129.8 3' 7' 128.87 4' 6' 133.7 5'	170.0 OCOMe 166.4 1' 128.8 2' 138.8 3' 14.86 4' 12.41 5'

HRESIMS m/z 525.35925 $[M + Na^+]$ (calcd for $C_{31}H_{50}O_5Na$, 525.35505).

21 β -ethylmelianodiol (2) $[\alpha]_D^{21}$ -39.1° (c 0.1735, $CHCl_3$); 1H and ^{13}C NMR data: see Tables 1 and 2.

1-*O*-Detigloyl-1-*O*-cinnamoylochinolal (3) $[\alpha]_D^{21}$ +61.5° (c 0.4735, $CHCl_3$); 1H and ^{13}C NMR data see Tables 1 and 2; HRESIMS m/z 683.28435 $[M + Na^+]$ (calcd for $C_{38}H_{44}O_{10}Na$, 683.28267).

1-*O*-Detigloyl-1-*O*-benzoylochinolal (4) 1H and ^{13}C NMR data see Tables 1 and 2.

Ohchinolal (5) 1H and ^{13}C NMR data see Tables 1 and 2.

RESULTS AND DISCUSSION

By a series of flash chromatography procedures and subsequent purification steps by preparative HPLC, an ethanolic extract of fruits of *M. azedarach* yielded two tirucallane-type triterpenoids never isolated from this species (**1** and **2**), along with three ring C-seco limonoids previously reported on this tree (**3** - **5**) (Fig. 1) [20, 21].

Compound **1** had a $[M + Na^+]$ peak at m/z 525.35925 in HRESIMS, corresponding to the molecular formula $C_{31}H_{50}O_5Na$. The NMR data showed that **1** was 21 α -methylmelianodiol (Tables 1 and 2). 21 α -methylmelianodiol and 21 β -methylmelianodiol were firstly isolated from the cortex of *Cedrela sinensis* (Meliaceae) [22], without report on the stereochemistry of C-24. The stereochemistry of this C in **1** and its β analog was determined when they were isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* (Rutaceae)

[20], by comparison to the stereochemistry of melianodiol and 24-epimelianodiol [21]. In NOE experiments of compound **1**, irradiation of H-18 (δ_H 0.85) gave an enhancement of the H-20 signal at δ_H 2.16, indicating that the side chain at C-17 and the methyl 18 (α) are to the same side of the major skeleton, and therefore C-20 must have the (*S*) configuration. Furthermore, irradiation of the H-21 resonance at δ_H 4.78 gave an enhancement of the H-17 signal at δ_H 1.78, and did not give any enhancement of the H-23 signal at δ_H 4.22, suggesting that the methoxyl group at C-21 is α oriented in **1**. Moreover, the chemical shift values of the C-17 (δ_C 50.45), C-21 (δ_C 109.14) and C-22 (δ_C 34.48) resembled those of the epimer of melianodiol with the methoxyl group at C-21 α oriented [21], in accordance to our observations. Finally, irradiation of the H-23 resonance at δ_H 4.22 gave an enhancement of the H-20 signal at δ_H 2.16 and the H-24 signal at δ_H 3.25, revealing that C-24 has the (*S*) configuration. All in all, during this work we have isolated for the first time from the fruits of *M. azedarach* the limonoid 21 α -methylmelianodiol (**1**).

Compound **2** had a $[M + Na^+]$ peak at m/z 539.3707 in HRESIMS, corresponding to the molecular formula $C_{32}H_{52}O_5Na$. The NMR data of **1** and **2** showed broad similarities (Tables 1 and 2), being the major differences the presence of an ethoxyl group instead of a methoxyl on C-21, as well as the chemical shift values of the C-17 (δ_C 45.1), C-21 (δ_C 103.54) and C-22 (δ_C 31.8), which resembled those of the epimer of melianodiol with the methoxyl group at C-21, β oriented [20]. Thus, the structure of **2** was determined to be 21 β -ethylmelianodiol (**2**). In view of the use of ethanol and

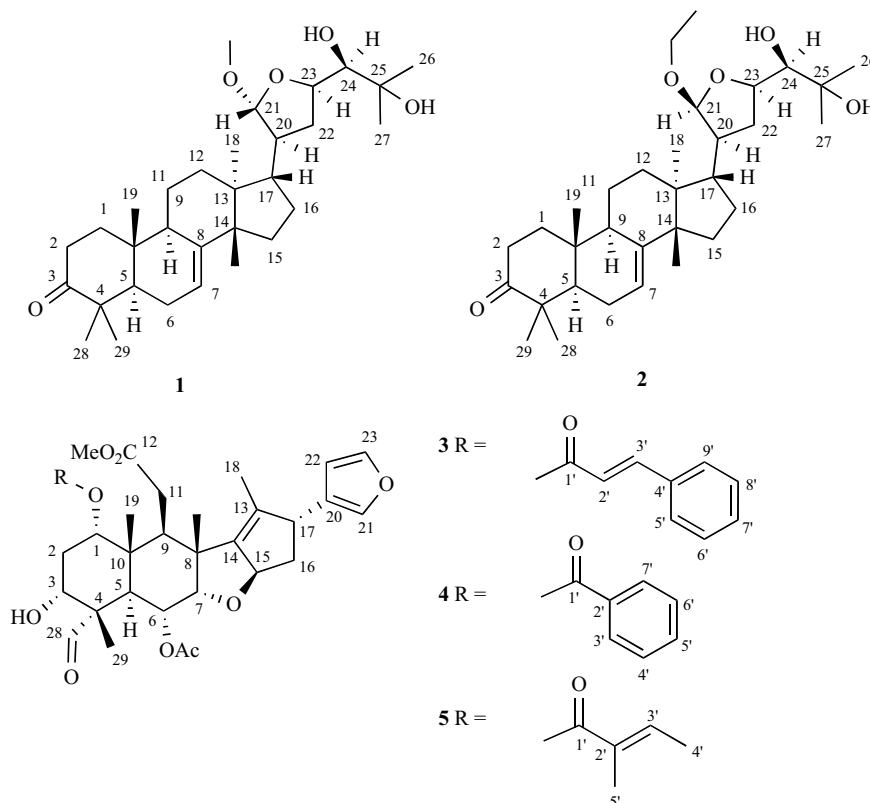


Fig. (1). Limonoids isolated from the fruits of *M. azedarach* from Uruguay.

ethyl acetate during the extraction procedures of this compounds, the difference in the configuration of C-21, and the fact that the spatial configuration of **2** seems to be more stable than **1**; we cannot exclude the possibility that **2** might be an artifact of the ethoxylation of **1**. Indeed, both configurations at C21 were previously reported in natural products, as in the case of 21 α -methylmelianodiol and 21 β -methylmelianodiol from the fruits of *Poncirus trifoliata* [20].

Compounds **3-5** were identified as 1-*O*-detigloyl-1-*O*-cinnamoylochinol [23], 1-*O*-detigloyl-1-*O*-benzoylochinol [23] and ohchinol [24] respectively, by the analysis of their spectroscopic data. Full ^1H and ^{13}C NMR data are provided in Tables 1 and 2. These three limonoids have already been isolated from ripe fruits of *M. azedarach* collected in Curitiba, Brazil [23]. The chemical shifts of C-4, C-8, C-10 and C-16 for **3** are reported here for the first time (Table 2).

The ethanolic crude extract of fruits of *M. azedarach* (EE fruits) showed deterrent activity against both generalists (*S. littoralis* and *M. persicae*) but were inactive against both specialists (*E. paenulata* and *R. padi*; Table 3). Interestingly, this pattern seems to be opposite to previous findings where susceptibility of generalist was shown to be lower than for specialists [9].

For the generalists tested here, previous studies reported insecticide activity of the whole extracts from fruits on *S. littoralis* larvae [11, 25]. For this insect, methanolic extracts exhibited larvicidal effects when ingested at lower concentrations than the ones used in this study [11]. Besides, when larvae were kept on diets enriched in *M. azedarach* methanolic extracts, sublethal effects were also reported. These effects included neuroendocrinal unbalance (the juvenile hormone titers, as well as the corpus allatum size were affected) and physiological consequences (the hemolymph protein content varied) [25]. Our findings complement these studies since a strong antifeedant effect was detected -at higher doses- on *S. littoralis* larvae (Table 3). In the case of

M. persicae, contrary to our findings (Table 3), previous works report on the inactivity of *M. azedarach* fruit extracts against this generalist aphid [12, 13]. This apparent dissimilarity might arise from the different methods of extract obtaining, or from the differences in bioassays design, as well as doses applied.

Concerning the chewing specialist tested here, in previous works, ethanolic crude extracts of ripe fruits from other geographic origins, have demonstrated to be deterrent against adults and larvae of *E. paenulata* [10]. In such study the extract was tested at higher dosages (400 and 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for adults and larvae respectively) than the ones tested here (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for adults), which might be the reason of the differences found (*E. paenulata* adults were not deterred at the doses tested in the present work Table 3). We choose to test the extracts at 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ because this amount was the one found to have similar effects to other botanicals (nicotine and rotenone) when this bioassay was standardized [9]. In the case of *R. padi*, an organism that, to our knowledge was not tested before for its susceptibility to *M. azedarach* products, no activity was found for the crude extract.

Contrary to the complete fruit extract from which it was isolated, the limonoids extract demonstrated activity against the four species tested (Table 3). Indeed for the specialists, the fruit extract was not active, and in the case of *E. paenulata*, this extract showed, at the tested dose, total deterrence (Table 3). This improved activity after purification can also be visualized in the case of the generalists, for which there is a tendency of stronger activity, although the differences were not significant ($p = 0.07$ for *S. littoralis*; and $p = 0.20$ for *M. persicae*; Mann-Whitney test; Table 3).

During the purification of active compounds from the limonoids extract, 14 subfractions were obtained. Among them, F4-F7 revealed by TLC to contain compounds with similar R_f to limonin. From the less polar fraction (F4), **3**, **4** and **5** were isolated afterwards; and from the joint of F5 to F7, **1**, **2** and **5**. Besides, from this later joined fraction,

Table 3. Activity of Crude Extract, Limonoids Extract, and Isolated Compounds against the Four Insect Models Tested

Extract/Compound ^a	Insect Species			
	Preference Index (PI $\pm$ ES)			
	<i>M. Persicae</i>	<i>R. Padi</i>	<i>S. Littoralis</i>	<i>E. Paenulata</i>
EE fruits	0.26 $\pm$ 0.12*	0.07 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.11*	0.33 $\pm$ 0.31
Limonoids extract	0.47 $\pm$ 0.11*	0.19 $\pm$ 0.07*	1.00 $\pm$ 0.00*	0.98 $\pm$ 0.02*
F 4	0.11 $\pm$ 0.10	0.02 $\pm$ 0.11	0.69 $\pm$ 0.14*	0.51 $\pm$ 0.24*
1	-0.22 $\pm$ 0.13	0.09 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.20	0.08 $\pm$ 0.42
3	0.21 $\pm$ 0.13	-0.06 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 0.11*
5	-0.21 $\pm$ 0.16	0.13 $\pm$ 0.13	0.93 $\pm$ 0.07*	0.73 $\pm$ 0.18*
5+3	-0.07 $\pm$ 0.14	0.14 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.04*	1.0 $\pm$ 0.0*

^aEE fruits, limonoids extracts and F4 were tested at 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; **1**, **3**, **5** and the mixture **5+3** at 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. *Denotes significant difference between C and T (deterrent, $p < 0.05$, Wilcoxon 2 tail rank test).

an equimolar mixture of **5** and **3** was also obtained ("5+3"). The activity of these products is shown in Table 3 (pure compounds and the mixture of **5** and **3** were tested at 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). While **F4** showed deterrence against both chewing insects, the two aphids were not susceptible to this fraction. Bioassays with the pure compounds **1**, **3** and **5**, revealed the loss of the activity (compared to the limonoids extract) against aphids when these three compounds were tested on their own. On the other hand, some of these products retained their effect against the chewing insects, as in the case of **5** and the equimolar mixture of **5** and **3**. In the case of **3**, only the specialist was deterred in its feeding by this pure compound. However, the effect on the generalist was recovered when the mixture of **5** and **3** was tested. Such mixture demonstrated total deterrence against the specialist, suggesting that these compounds (**3** and **5**) might be synergic on their effect against *E. paenulata*. Further, the limonoids extract revealed a greater activity against the four insect species tested, than the products isolated from it. Therefore, the synergistic effect among **1-5** seems to be a general pattern in regard to their antifeedant activity.

Other limonoids isolated from the fruits of this tree (meliartenin and its interchangeable isomer, 12-hydroxyamoorastatin; and toosendanin) were tested on their antifeedant capacity against 3rd-instar larvae of *E. paenulata* [26]. These limonoids deterred the larvae at similar doses than azadirachtin. Our findings supplement the ones found in this previous work, as structurally different limonoids were tested against other instar (adults) of the same species.

On a side note, many isolated limonoids, containing the rest tigloyl as side chain, have proved to be cytotoxic [27-29] as well deterrent against some pests [30], in line with our findings that **5** was the only compound that showed activity against more than one of the insect species when tested on its own. Additionally, there are also reports of active limonoids against insects with the cinnamoyl side chain on their structure [31, 32] which may be indicating that it is probably the cinnamoyl rest of **3**, which makes it active against *E. paenulata*. **3-5** correspond to the C- *seco* limonoids class, which is considered the most active group of limonoids [33] and occurs only in the Meliaceae, belonging to the tribe Melieae (restricted to the genus *Azadirachta* and *Melia*) [33]. However, **1-2** are protolimonoids, a class of limonoids to which meliantriol and melianone belong (isolated from *Azadirachta indica*), which revealed according to previous studies, activity against a Lepidoptera [34] and a Coleoptera [35] respectively.

The antifeedant activity of limonoids has been extensively studied, in particular focusing on azadirachtin [36, 37]. Although, this limonoid reached the market due mainly to its insecticide properties as an insect growth regulator [36], nowadays, it is the only commercially available pesticide with antifeedant activity [37]. As it is well known, azadirachtin-based products are obtained from the Neem seeds from cultivated trees. In the same way, the Chinaberry tree may be in the future a great source of anti-insect products; particularly considering its great capacity of biomass production [38]. Consequently, agronomic evaluation studies at this point are of great importance as previously suggested [39].

To sum up, the occurrence of 21 α -methylmelianodiol and 21 β -ethylmelianodiol is reported here for the first time in *M. azedarach* fruits. Further, three limonoids (**1**, **3** and **5**) have been tested for the first time against four different insect species (used as models), exhibiting different patterns of activity which may be depending on the substituents on the major skeleton. More studies are still needed in order to clarify this issue, as they have been done with other limonoids [40-45]. As a general pattern, products tested here were more active against *S. littoralis*, which as a lepidoptera was expected to have greater susceptibility than the other insect detectors chosen for this study [36]. Finally, when active, mixtures showed better antifeedant activity than isolated compounds, probably due to synergistic effects among limonoids as shown in other studies [46].

ABBREVIATIONS

NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
CDCl ₃	=	Deuterated chloroform
HRESIMS	=	High resolution electron spray ionization mass spectra
HPLC	=	High performance liquid chromatography
CH ₂ Cl ₂	=	Dichloromethane
EtOAc	=	Ethyl acetate
Si	=	Silica
TLC	=	Thin layer chromatography
R _f	=	Retention factor
EtOH	=	Ethyl alcohol
CHCl ₃	=	Chloroform
ACN	=	Acetonitrile
NOE	=	Nuclear Overhauser Effect

CONFLICT OF INTEREST

Declared none.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Faculty of Chemistry (FQ), Uruguayan Technological Laboratory (LATU), CSIC-UR, Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA) (grant PNUD- URU/06/004). Facundo Ibáñez and Roberto Zoppolo from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Uruguay) provided de limonin standard. Eduardo Alonso-Paz identified de vegetal material. We also acknowledge Dr. Ricardo Guillermo Álvarez (Instituto Universitario de Bio-Organica 'Antonio González', Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain), and Dr. Gustavo Seoane and Horacio Pesaroglo (Departamento de Química Orgánica; Universidad de la República, Uruguay) for their contributions with the NMR experiments.

REFERENCES

- [1] Nakatani, M.; Huang, R.C.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Tadera, K.; Naoki, H. Three new antifeeding meliacarpinins from Chinese *Melia azedarach* Linn. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 11731-11736.

- [2] Tan, Q.G.; Li, X.N.; Chen, H.; Feng, T.; Cai, X.H.; Luo, X.D. Sterols and terpenoids from *Melia azedarach*. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 693-697.
- [3] Chinese Pharmacopeia Committee. In: *Chinese Pharmacopeia*, Chemical Industry Press: Beijing, **2005**; Vol. 3, pp. 248.
- [4] Everist, S.L. Poisonous Plants of Australia. In: Everist, S.L., Ed. Angus and Robertson: Sydney, **1974**; pp. 368.
- [5] Hurst, E. Poisonous Plants of New South Wales. In: Works, S.P., Ed. Sydney, **1942**; pp. 214.
- [6] Watt, J.M.; Breyer-Brandwick, M.G. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2nd ed.; Livingstone, London, **1962**.
- [7] Carpinella, M.C.; Defagó, M.T.; Valladares, G.; Palacios, S.M.; Rai, M.; Maria Cecilia, C. Role of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects. In: *Advances in Phytomedicine*, Elsevier: **2006**; Vol. Volume 3, pp. 81-123.
- [8] Coria, C.; Almiron, W.; Valladares, G.; Carpinella, C.; Luduena, F.; Defago, M.; Palacios, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour. Technol.*, **2008**, *99*, 3066-3070.
- [9] Castillo, L.; Gonzalez-Coloma, A.; Gonzalez, A.; Diaz, M.; Alonso-Paz, E.; Bassagoda, M.J.; Rossini, C. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Ind. Crops Prod.*, **2009**, *29*, 235-240.
- [10] Carpinella, M.C.; Defago, M.T.; Valladares, G.; Palacios, S.M. Anti-feedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 369-374.
- [11] Salam, A.L.A.; Ahmed, A.A.I. Evaluation of using the extract of chinaberry fruits, *Melia azedarach* L. in the control of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* in Egypt. *International conference on pests in agriculture*, 6-8 January 1997, at le Corum, Montpellier, France. Volume 3. **1997**, 1159-1162.
- [12] Carrizo, P.; Pelicano, A.; Caffarini, P. Evaluation of cetonc extracts from paradise, eucalyptus and castor oil trees on *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo*, **2004**, *36*, 47-52.
- [13] Singh, M.P.; Khuman, M.S.; Salam, J.S. Efficacy of certain plant extracts against *Myzus persicae* Sulz. (Homoptera: Aphididae) on cabbage in Manipur. *Ind. J. Plant Protect.*, **1995**, *23*, 139-141.
- [14] Handbook, M. *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*. E. Merck: Darmstadt, Germany, **1980**.
- [15] Camarano, S.; Gonzalez, A.; Rossini, C. Chemical defense of the ladybird beetle *Epilachna paenulata*. *Chemoecology*, **2006**, *16*, 179-184.
- [16] Poitout, S.; Bues, R. Rearing larvae of twentyeight species of Noctuidae and two species of Arctiidae (Lepidoptera) on a simple artificial diet breeding peculiarities according to the different species. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, **1974**, *6*, 431-441.
- [17] Bellomo, A.; Camarano, S.; Rossini, C.; Gonzalez, D. Enantiospecific synthesis and insect feeding activity of sulfur-containing cyclitols. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 44-51.
- [18] Gutiérrez, C.; Fereres, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; González-Coloma, A. Behavioral and sub-lethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *J. Chem. Ecol.*, **1997**, *23*, 1641-1650.
- [19] Lowry, R. VassarStats Web Site for Statistical Computation. **1998-2009**, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> Access Date: August 24, 2011.
- [20] Xu, G.; Kim, J.; Kim, S.Y.; Ryu, J.; Kim, Y.; Jung, S.; Kim, M.; Lee, S. Terpenoids and coumarins isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, *56*, 839-842.
- [21] Puripattavong, J.; Weber, S.; Brecht, V.; Frahm, A. W. Phytochemical investigation of *Aglaia andamanica*. *Planta Medica* **2000**, *66*, (8), 740-745.
- [22] Mitsui, K.; Saito, H.; Yamamura, R.; Fukaya, H.; Hitotsuyanagi, Y.; Takeya, K. Apotirucallane and tirucallane triterpenoids from *Cedrela sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, *55*, 1442-1447.
- [23] Zhou, H.L.; Hamazaki, A.; Fontana, J.D.; Takahashi, H.; Esumi, T.; Wandscheer, C.B.; Tsujimoto, H.; Fukuyama, Y. New ring C-seco limonoids from Brazilian *Melia azedarach* and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1544-1547.
- [24] Fukuyama, Y.; Miura, I.; Ochi, M. Bitter limonoids from the fruit of *Melia azedarach* L. var. japonica Makino. *Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 1139-1142.
- [25] Schmidt, G.H.; Rembold, H.; Ahmed, A.A.I.; Breuer, M. Effect of *Melia azedarach* fruit extract on juvenile hormone titer and protein content in the hemolymph of two species of noctuid lepidopteran larvae [Insecta: Lepidoptera: Noctuidae]. *Phytoparasitica*, **1998**, *26*, 283-291.
- [26] Carpinella, C.; Ferrayoli, C.; Valladares, G.; Defago, M.; Palacios, S. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, *66*, 1731-1736.
- [27] Itokawa, H.; Qiao, Z.S.; Hirobe, C.; Takeya, K. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43*, 1171-1175.
- [28] Ntalli, N.G.; Cottiglia, F.; Bueno, C.A.; Alche, L. E.; Leonti, M.; Vargiu, S.; Bifulco, E.; Menkissoglu-Spiroudi, U.; Caboni, P. Cytotoxic tirucallane triterpenoids from *Melia azedarach* fruits. *Molecules*, **2010**, *15*, 5866-5877.
- [29] Takeya, K.; Qiao, Z.S.; Hirobe, C.; Itokawa, H. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, **1996**, *42*, 709-712.
- [30] Nakatani, M.; Huang, R.C.; Okamura, H.; Iwagawa, T. The structure of a new antifeeding meliacarpinin from chine *Melia azedarach* L. *Chem. Lett.*, **1993**, *12*, 2125-2128.
- [31] Bohnenstengel, F.I.; Wray, V.; Witte, L.; Srivastava, R.P.; Proksch, P. Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 977-982.
- [32] Nakatani, M.; Arikawa, S.; Okamura, H.; Iwagawa, T. Isolation of a new insect antifeeding azadirachtin derivative from Okinawan *Melia azedarach* Linn. *Heterocycles*, **1994**, *38*, 327-331.
- [33] Champagne, D.E.; Koul, O.; Isman, M.B.; Scudder, G.G.E.; Towers, G.H.N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 377-394.
- [34] Lavie, D.; Jain, M.K.; Shpan-Gabrielith, S.R. A locust phagorepellent from two *Melia* species. *Chem. Commun.*, **1967**, *18*, 910-911.
- [35] Kraus, W.; Grimminger, W. 23-(R,S)-hydroxytoonacilide and 21-(R,S)-hydroxytoonacilide, two new b-seco-tetranortriterpenoids for deterring insects from *Toona ciliata* Mj Roem var. Australis (Meliaceae). *N.J. Chem.*, **1980**, *4*, 651-655.
- [36] Mordue, A.J.; Morgan, E.D.; Nisbet, A.J.; Lawrence, I.G.; Kostas, I.; Sarjeet, S.G. Azadirachtin, a Natural Product in Insect Control. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier: Amsterdam, **2005**; pp 117-135.
- [37] Morgan, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 4096-4105.
- [38] Toky, O.P.; Riddell-Black, D.; Harris, P.J.C.; Vasudevan, P.; Davies, P.A. Biomass production in short rotation effluent-irrigated plantations in North-West India. *J. Sci. Ind. Res.*, **2011**, *70*, 601-609.
- [39] Carpinella, M.C.; Defagó, M.T.; Valladares, G.; Palacios, S.M. Role of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects. In: *Advances in Phytomedicine*, Elsevier: **2006**; Vol. 3, pp. 81-123.
- [40] delaPuente, M.L.; Grossman, R.B.; Ley, S.V.; Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M. Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica* .20. Synthesis of biologically active, simple analogues of azadirachtin, containing the hydroxytetrahydrofuran carboxylate hemiketal moiety. *J. Chem. Soc.-Perk. Transact. 1*, **1996**, *13*, 1517-1521.
- [41] delaPuente, M.L.; Ley, S.V.; Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M. Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica* .21. Synthesis of model compounds of azadirachtin using a decalin framework as a functional group scaffolding. *J. Chem. Soc.-Perk. Transact. 1*, **1996**, *13*, 1523-1529.
- [42] Ley, S.V.; Anderson, J.C.; Blaney, W.M.; Morgan, E.D.; Sheppard, R.N.; Simmonds, M. S.J.; Slawin, A.M. Z.; Smith, S.C.; Williams, D.J.; Wood, A. Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta-Indica* .2. Characterization and structure-activity-relationships of some novel rearranged azadirachtins. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9231-9246.
- [43] Fernandez-Mateos, A.; Silvo, A.I.R.; Gonzalez, R.R.; Simmonds, A.S.J. A brief and stereoselective synthesis of limonoid models, with antifeedant activity against *Locusts migratoria*. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 7809-7816.
- [44] Ley, S.V.; Anderson, J.C.; Blaney, W.M.; Jones, P.S.; Lidert, Z.; Morgan, E.D.; Robinson, N.G.; Santafianos, D.; Simmonds, M.S.J.;

- Toogood, P.L. Insect Antifeedants from *Azadirachta Indica* .5. Chemical modification and structure-activity-relationships of azadirachtin and some related limonoids. *Tetrahedron*, **1989**, 45, 5175-5192.
- [45] Ruberto, G.; Renda, A.; Tringali, C.; Napoli, E.M.; Simmonds, M.S.J. Citrus limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6766-6774.
- [46] Koul, O.; Multani, J.S.; Singh, G.; Daniewski, W.M.; Berlozecki, S. 6b-hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its potentiation effects with some non-azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2937-2942.

Received: October 17, 2011

Revised: November 10, 2011

Accepted: November 28, 2011

Bioactive Natural Products from Sapindaceae Deterrent and Toxic Metabolites Against Insects

Martina Díaz and Carmen Rossini

*Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República,
Uruguay*

1. Introduction

The Sapindaceae (soapberry family) is a family of flowering plants with about 2000 species occurring from temperate to tropical regions throughout the world. Members of this family have been widely studied for their pharmacological activities; being *Paullinia* and *Dodonaea* good examples of genera containing species with these properties. Besides, the family includes many species with economically valuable tropical fruits, and wood (Rodríguez 1958), as well as many genera with reported anti-insect activity.

Antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic properties are the pharmacological activities most commonly described for this family (Sofidiya et al. 2008; Simpson et al. 2010; Veeramani et al. 2010; Muthukumran et al. 2011). These activities are in some cases accounted for isolated phenolic compounds such as prenylated flavonoids (Niu et al. 2010), but in many cases, it is still unknown which are the active principles. Indeed, there are many studies of complex mixtures (crude aqueous or ethanolic extracts) from different species in which several other pharmacological activities have been described without characterization of the active compounds [e.g. antimigrane (Arulmozhi et al. 2005), anti-ulcerogenic (Dharmani et al. 2005), antimalarial (Waako et al. 2005), anti-microbial (Getie et al. 2003)].

Phytochemical studies on Sapindaceae species are abundant and various kinds of natural products have been isolated and elucidated. Examples of these are flavonoids from *Dodonaea* spp. (Getie et al. 2002; Wollenweber & Roitman 2007) and *Koelreuteria* spp. (Mahmoud et al. 2001), linear triterpenes from *Cupaniopsis* spp. (Bousserouel et al. 2005) and caffeine, xanthenes and cathequines from *Paullinia* spp. (Benlekehal et al. 2001; Sousa et al. 2009). All these compounds are naturally occurring in almost every plant family, however, the Sapindaceae do produce an unusual group of secondary metabolites: the cyanolipids (Avato et al. 2005). Eventhough these compounds exhibit a potential health hazard for humans and animals, for the plants, cyanolipids may have a protective physiological role. However, not many investigations have been developed involving the study of the ecological interactions among the plants producing them and other sympatric organisms. On the other hand, the toxicity of these cyanocompounds might be a potential source of pesticides. Indeed, not only cyanocompounds, but also a wide range of species of Sapindaceae have been tested on their anti-insect activity. Several extracts, fractions or pure compounds of different phenological stages, have been tested against diverse species of lepidopterans, dipterans and coleopterans of major importance in agriculture as well as in veterinary and medical applications. Examples of this include the larvicidal activity of *Magonia pubescens* against *Aedes aegypti*

(Diptera: Culicidae) (Arruda et al. 2003a,b); the toxicity of *Sapindus* spp. against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (Zidan et al. 1993; Rahman et al. 2007); and the toxicity of *Dodonaea* spp. against *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) (Abdel et al. 1995; El-Din & El-Gengaihi 2000; Deepa & Remadevi 2007; Malarvannan et al. 2008). The activity against different pest models of extracts from various South American species within the Sapindaceae was recently described. These species included *Allophylus edulis*, *Dodonaea viscosa* and *Serjania meridionalis*, from which isolated metabolites with anti-insect capacities have not yet been described (Castillo et al. 2009). This chapter will examine the available information on extracts and secondary metabolites from Sapindaceae focused on their defensive role for the plant against herbivory; and consequently this appraisal will also present a compilation of potential anti-insect agents from Sapindaceae.

2. Sapindaceae: its anti-insect potential

Anti-insect activity has been described in at least 15 of the 202 genera (Anonymous 2011) belonging to this family. Among these findings, the cases in which the bioactive compounds were isolated represent the least. It has been in general tested the activity of aqueous or ethanolic extracts from different organs and from plants of different phenological stages against a variety of insect targets using different bioassay designs. As a consequence, different modes of action have been described. Extracts have revealed to be potentially deterrent agents, growth inhibitors and even toxic agents against different genera of insects. The following appraisal comprises the main Sapindaceae genera from which extracts or isolated compounds with anti-insect activity have been described.

2.1 *Sapindus*

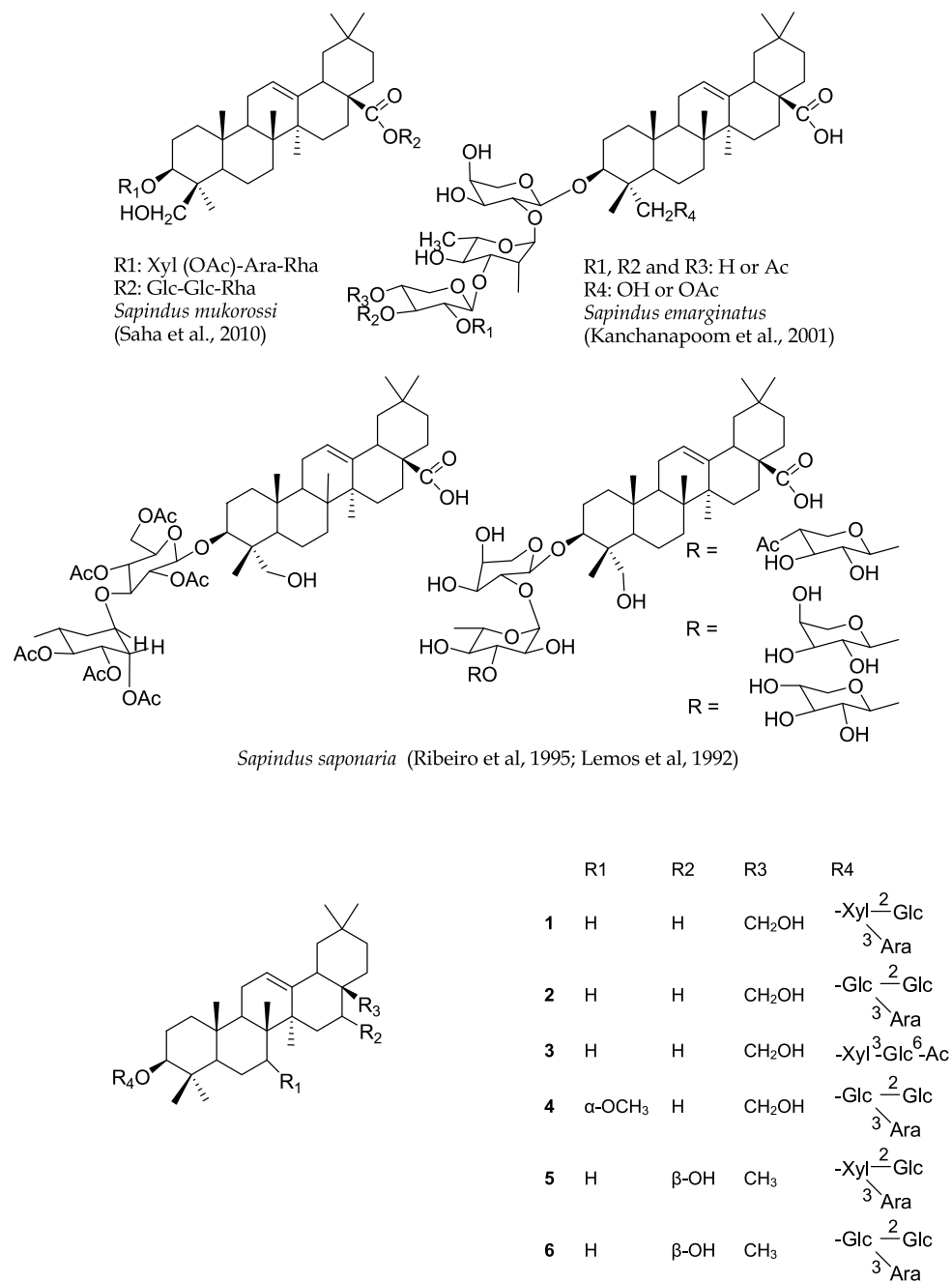
A vast number of species showing great potential as anti-insect agents belong to this genus. *Sapindus saponaria*, a tree widely distributed in Central and South America, is also frequently used as ornamental (Lorenzi 2004). Brazilian people commonly prepare homemade soap from this tree; and use its seeds to make handicrafts. Its wood is broadly used in construction. Its fruits and roots are popularly used as painkillers, astringents, expectorants and diuretics (Ferreira Barreto et al. 2006). Besides, its medicinal potential as healing and anti thrombotic agents has been studied. Research on that area has revealed that flavonoids in the leaf extracts are responsible for those activities (Meyer Albiero et al. 2002). On the other hand, much research has been devoted to the anti-insect capacity of extracts from different organs of this plant. Boiça Junior et al (2005), on their search for activity against larvae of the cabbage pest *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) investigated eighteen plant species from a variety of families, finding that aqueous leaf extract of *S. saponaria* was one of the most active products. The extract produced 100 % of mortality in tests where the larvae were offered cabbage foliage disks coated with the extracts to be evaluated as a sole food (Boiça Junior et al. 2005). In another study, the aqueous fruit extract of this tree showed deterrent properties against another cabbage pest, *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera: Pieridae). In this case the activity was comparable to that showed by aqueous extracts of the neem tree, *Azadirachta indica*, the newest botanical pesticide in the market (Isman et al. 1996; Medeiros et al. 2007). The aqueous seeds' extracts were evaluated against another lepidopteran, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), showing strong effect on larvae development and midgut trypsin activity (dos Santos et al. 2008). Not only against lepidopterans has this tree revealed anti-insect potential, but also against other insect orders.

For instance, a saponin extract from fruits from this species showed toxicity against adults of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Porrás & Lopez-Avila 2009); and complete ethanolic extracts from fruits have shown larvicidal and morphological alterations effects on the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Ferreira Barreto et al. 2006). Some other saponins presenting other kinds of biological activity, isolated from the fruits of this species, are shown in Figure 1 (Lemos et al. 1992; Ribeiro et al. 1995).

Sapindus emarginatus, another tree from this genus, widely distributed in India, has also demonstrated larvicidal activity of its fruit extract against three important vector mosquitoes: *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (Koodalingam et al. 2009). Later, this group has also investigated the impact of the extracts on the activity of mosquito phosphatases and esterases to gain an insight into the extent of disturbance in metabolic homeostasis inflicted upon exposure to the extract (Koodalingam et al. 2011). Previous reports on this species have shown that the pericarps contain triterpene saponins (Figure 1), which are commonly used as antifertility, antipruritic and anti-inflammatory agents in traditional Indian and Thai medicine (Jain 1976; Kanchanapoom et al. 2001). Perhaps, anti insect activity may be due to saponins in this plant similarly to the case of *Sapindus saponaria* (Porrás et al. 2009).

Activity of members of this genus against other insect orders, further than dipterans and lepidopterans, has also been evaluated, including coleoptera and lice. That is the case of the extract from *Sapindus trifolius* fruit cortex which showed activity against the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Mukherjee & Joseph 2000). In this case, weight gain was significantly reduced when larvae were fed on diets including the extract at different doses; and females topically treated -upon emergence- with the extract laid fewer viable eggs. (Mukherjee & Joseph 2001). Another ethanolic fruit extracts, in this case from *Sapindus mukorossi*, also showed anti coleopteran activity against another pest of stored grains, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and also against *Pediculus humanus* (Phthiraptera: Pediculidae) (Rahman et al. 2007). Finally, from the methanolic extract of fruits of this species triterpenic saponins (Figure 1) have also been isolated and these natural products demonstrated their potential as growth regulators and antifeedants against *Spodoptera littura* (Lepidoptera: Noctuidae), both as glycosides and as free genines (Saha et al. 2009). In this particular study, it was verified that upon hydrolysis of the saponins, the growth regulatory activity was improved, whereas very little difference was found in regard to the antifeedant activity.

All in all, the genus *Sapindus* contains a variety of species which have been studied on their activity for some insects from different orders. In spite of the fact that not many reports do exist on the action of isolated compounds, the previous ethnobotanical uses of *Sapindus* spp. and the isolation of some active saponins from this genus, may suggest that this group of secondary metabolites might be related to the anti-insect activity. Saponins -glycosides of sapogenins containing a monosaccharide or a polysaccharide unit- reduce the surface tension becoming biological detergents. They are widely distributed secondary plant metabolites, found among almost 100 plant families (Bruneton 1995). Being effective defences for some insects (Plasman et al. 2001; Prieto et al. 2007), saponins have been implied in mechanisms of plant resistance against potential herbivores (Nielsen et al. 2010). The genus *Sapindus*, rich in this kind of compounds, may therefore be promissory raw material to develop plant pest control products. Further information can be found at recent works reviewing saponins from *Sapindus* spp. and their activity (Pelegrini et al. 2008; Sharma et al. 2011).

Fig. 1. Saponins isolated from *Sapindus* and *Nephelium* spp.

2.2 *Dodonaea*

From this genus, there are two species to which almost all research has been devoted: *Dodonaea angustifolia* and *Dodonaea viscosa*. These two species are considered by some taxonomists to be synonymous, while others recognize *D. angustifolia* as a sub-species of *D. viscosa* (cited in Omosa et al. 2010). *D. angustifolia* is widely distributed in Australia, Africa, Asia and South America; and it has been employed until present days in traditional medicine all over the world. It is traditionally used as analgesic, laxative, antipyretic, and to treat rheumatism, eczema, and skin ailments (Malarvannan et al. 2009; Omosa et al. 2010). *Dodonaea viscosa* is a shrub, rarely a small tree, widely distributed in tropical and subtropical areas of both hemispheres. It is used in folk medicine as a febrifuge, a diaphoretic drug, and also for the treatment of rheumatism, gout, inflammations, swelling and pain (Niu et al. 2010).

Anti-insect activity has been described for extracts from both plant species mostly against lepidopterans (Malarvannan & Subashini 2007; Malarvannan et al. 2008; 2009; Sharaby et al. 2009). For instance, extracts of leaves of *D. angustifolia* (obtained with hexane, petroleum ether, chloroform, acetone and water) were tested in field bioassays, showing to be effective biocontrol agents for the larvae of *Earias vitella* (Lepidoptera: Noctuidae) (Malarvannan et al. 2007). Besides, those extracts also showed ovicidal activity against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Malarvannan 2003). However, while in the case of extracts from different organs (fruits, leaves and twigs) of *D. viscosa* coming from Uruguay, none of these products proved to be active against the polyphagous *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Castillo et al. 2009), insects from other orders were deterred by *D. viscosa* extracts. Interestingly, while extracts from leaves and twigs exhibited good activity against aphids (*Rhopalosiphum padi* and *Myzus persicae*) and a coleopteran (*Epilachna paenulata*), they were innocuous to beneficial insects (*Apis mellifera*) (Castillo et al. 2009). This selectivity makes *D. viscosa* a good candidate from which to develop botanical pesticides. Another independent study also showed a strong contact activity of the seed extracts against the coleopteran, *S. oryzae* (Zhao et al. 2006).

D. angustifolia is known to contain essential oils, flavonoids, terpenoids, phenols, coumarins, sterols and unidentified alcohols (Malarvannan et al. 2008). Meanwhile several flavonoids, diterpenoid acids and saponins have been isolated from *D. viscosa* (Niu et al. 2010). However, the chemical basis for the pesticide and antifeedant activities remains unclear as tests on individual compounds have not been performed. Nevertheless, a series of clerodane diterpenoids (Figure 2) and prenylated flavonoids (Figure 3) were isolated from the aerial parts of *D. viscosa* from China, having them not shown larvicidal activity against two mosquito species tested (Niu et al. 2010), however the authors stated that previous studies showed activity of these clerodanes against two lepidopterans (*Plutella xylostella* and *Pieris rapae*) and against the coleopteran *Sitophilus oryzae*.

At the same time, an investigation on this family of compounds from *D. angustifolia* from Kenya showed that the extracts from the leaf surface of this plant is composed mainly by clerodanes (Figure 2) and also by methylated flavones and flavonols (Figure 3) (Omosa et al.). Clerodanes isolated from *D. viscosa* and *D. angustifolia* belong to the *neo*-clerodane group. As it is well known, these secondary metabolites have a structure based on the carbon skeleton and absolute stereochemistry of clerodin (Klein Gebbinck et al. 2002) isolated first from *Clerodendron infortunatum* (Lamiaceae) (Banerjee 1936). This large group of plant secondary metabolites have been described mainly from Lamiaceae and Asteraceae, and they have exhibited a wide range of anti-insect properties as it has been reviewed

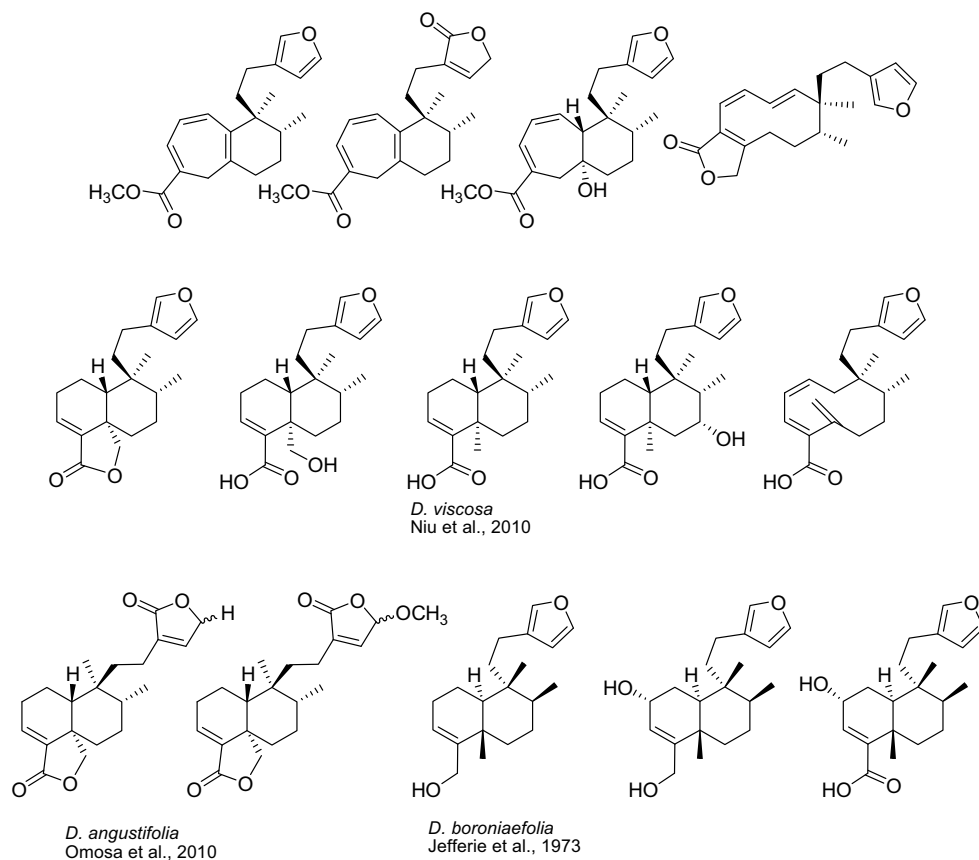


Fig. 2. Clerodanes from *Dodonaea* spp. Structures shown were isolated from *D. viscosa* (Niu et al. 2010) with the exception of the indicated ones.

previously (Klein Gebbinck et al. 2002; Sosa & Tonn 2008). Worth to be noticed, an earlier work by Jefferies et al. (1973) reported the occurrence of various diterpenes in another species, *Dodonaea boroniaefolia*, of the opposite configuration in the main skeleton (Figure 3), that is *ent*-clerodanes.

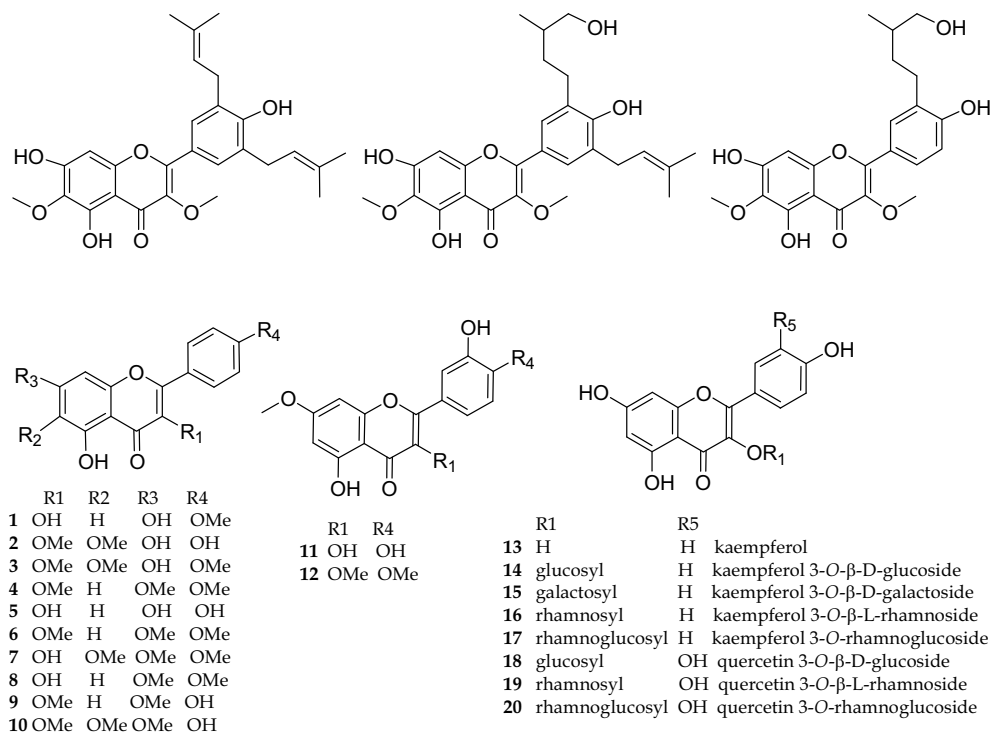


Fig. 3. Flavonoids from *Dodonaea* spp. (Niu et al. 2010; Omosa et al. 2010; Teffo et al. 2010).

2.3 *Magonia* and *Paullinia* species

Paullinia spp. is one of the few purine alkaloid-containing genera used to prepare stimulant drinks worldwide (Weckerle et al. 2003). *Paullinia clavigera* grows in primary forests and shores of the South American Amazonic aquatic ecosystems, and it has been studied mostly in Perú for the control of different insect pests (cited in Pérez et al. 2010). The toxicity of aqueous extracts of lianas from this species against larvae of *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) (Pérez & Iannacone 2004) and afterwards the mortality and repellence of such extracts against larvae of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) (Pérez & Iannacone 2006) were tested. Besides, the activity of aqueous extracts against *Eupalamides cyparissias* (Lepidoptera: Castniidae), and the activity of hydroalcoholic extracts against *Tuthillia cognata* (Hemiptera: Psyllidae) (Pérez et al. 2008) were also reported, showing the potential of this vegetal species as a biocontrol agent against different insect orders. However, it is still unclear which compounds are responsible for the anti-insect effects of *P. clavigera*. Flavonoids, phenols, triterpenes and saponins were detected in a phytochemical study in extracts from the stem cortex of *P. clavigera*. (Pérez et al. 2010); and other species from the same genus (*P. cururu*) contain saponins, tannins and polyphenols (Wilbert & Haiek 1991).

Magonia pubescens, widely distributed in the Brazilian Cerrado, is commonly used in the construction industry. It has been mostly studied for its larvicidal activity against *A. aegypti* (Arruda et al. 2003; da Silva et al. 2003; Rodrigues et al. 2006). In this case, one of the most active fractions from the ethanolic extract of stem barks was shown to be rich in tannins, and specially in a proanthocyanidin (catequic tannin which structure is shown in Figure 4) (Silva et al. 2004). Tannins are largely distributed in nature, usually being the active principles of plants used in traditional medicine. Condensed tannins have a great ability to interact with metallic ions and macromolecules and to form soluble complexes with electron-donor groups such as the ones found in alkaloids and proteins. That may be one of the reasons explaining their toxicity against different organisms, including insects, fungi and bacteria. Morphological alterations caused by this active fraction on the epithelium of the midgut of larvae of *A. aegypti* resembled the ones recorded for tannic acid (Rey et al. 1999). In a side note, it is worth to notice that this vegetal species has also demonstrated potential on its ethanolic extract of stem barks, as acaricide against the larvae of the common cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) sanguineus* (Acari: Ixodidae) (Fernandes et al. 2008).

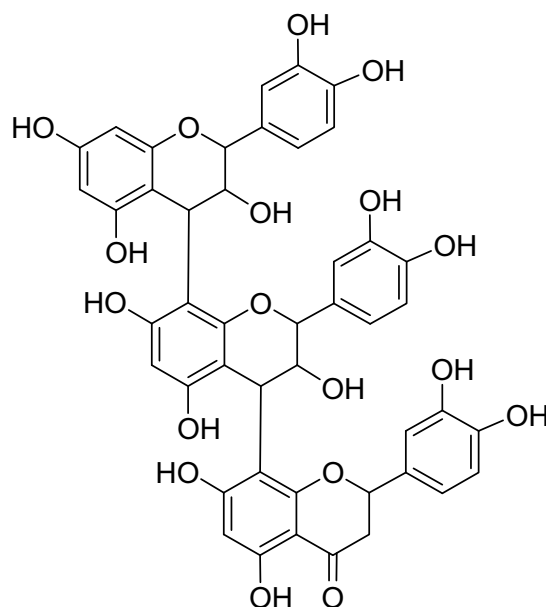


Fig. 4. Catequic tannin with larvicidal activity against *A. aegypti* isolated from *Magonia pubescens* (Silva et al. 2004).

2.4 Miscellaneous

Talisia esculenta, locally known as pitomba occurs in northern and northeastern Brazil. Its fruits are edible to humans and birds which disperse the seeds. However, popular information also mentions that chickens die after ingesting the fruit (cited in Macedo et al.

2002). *Koelreuteria paniculata* is popularly grown as an ornamental tree in temperate regions all across the world (Kamala-Kannan et al. 2009). From these two species of Sapindaceae, lectins have been isolated from their seeds (Macedo et al. 2002; Macedo et al. 2003). Lectins from *T. esculenta* inhibited larval growth of two bruchids (*Callobroschus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) (Macedo et al. 2002). And in the case of *K. paniculata*, lectins not only showed insecticide activity against *C. maculatus* but also against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Macedo et al. 2003). Plant lectins are a large group of proteins defined as "plant proteins that possess at least one non-catalytic domain that binds reversibly to a specific mono- or oligosaccharide" (Peumans & Van Damme 1995). Plant lectines have been implied in many ecological roles, being their action as defences against insects one of the latest described (Murdock & Shade 2002; Van Damme et al. 2008). Their mechanisms of action as anti-insect agents are yet poorly understood, with many emerging hypotheses proposed (Van Damme et al. 2008). According to Macedo et al. (2003), the action of *K. paniculata* lectins on *C. maculatus* and *A. kuehniella* larvae may involve (1) *binding to glycoconjugates on the surface of epithelial cells along the digestive tract*, (2) *binding to glycosylated digestive enzymes, thereby inhibiting their activity*, and (3) *binding to the chitin component of the peritrophic membrane (or equivalent structures) in the insect midgut*. Finally, regarding *T. esculenta*, its aqueous seeds extracts were studied on its effect on *S. frugiperda* larvae which development was negatively affected, but the activity of the midgut trypsin was not inhibited (dos Santos et al. 2008).

The red maple, *Acer rubrum*, is another Sapindaceae from which bioactive compounds have been isolated. This prominent maple occurs in hardwood forests, being avoided by several potential sympatric consumers [for instance, larvae of *Malacossoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae), and the North American beavers, *Castor canadensis*] (Abou-Zaid et al. 2001). The main constituents of an aqueous leaf extract have been phytochemically characterized as ellagic acid, gallate derivatives (structures 1-7 in Figure 5) and glycosides of flavonoids (quercetin and structures 13-20 in Figure 3). When these compounds were tested by themselves against *M. disstria* larvae, it was found that all gallate derivatives exhibited deterrent activity, but not the flavonoids. Among gallate derivatives, compounds 2 and 4-7 in Figure 5 were the five most active compounds. Perhaps in this case, the feeding deterrence effect of the extracts may be traced to the galloyl moiety in its secondary metabolites.

Blighia sapida, commonly known as Ackee, is an evergreen tree, native from West African wild forests. In the late 18th century, the plant was introduced in Jamaica, where nowadays its fruit has been adopted as the national fruit (cited in Gaillard et al. 2011). Its bark is used as fish poison and also in folk medicine in the treatment of malaria, ulcers, back aches and headaches (Kayode 2006). The plant contains triterpenic and steroidal saponins, alkaloids, polyphenols and aminoacidic secondary metabolites (Mazzola et al. 2011). By ingestion, the unripe fruits can cause vomiting and circulatory collapse in humans due to the presence of hypoglycin-A (seeds and flesh) and hypoglycin-B (seeds) (Figure 6) (Hassall et al. 1954; Hassall & Reyle 1955; Gaillard et al. 2011). Acetone and ethanolic extracts of the fruits showed repellent properties against stored-product pests, namely, *C. maculatus*, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae), and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) (Khan & Gumbs 2003). Furthermore, ethanol, acetone, hexane, methanol, chloroform, and water extracts from the seeds were evaluated on their repellence against *T. castaneum*, demonstrating the aqueous extract to be the most active (Khan et al. 2002).

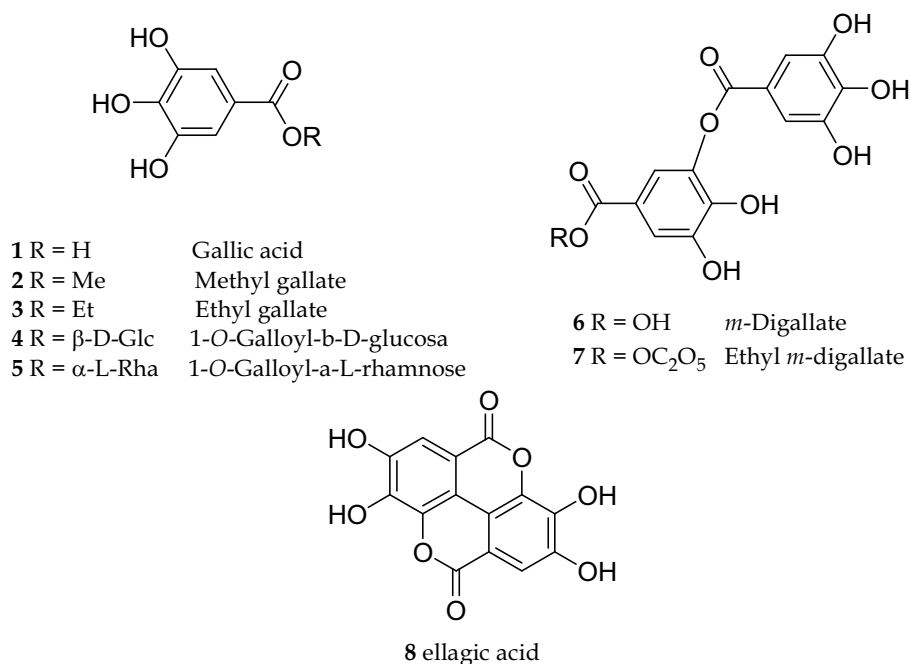


Fig. 5. Ellagic acid and gallate derivatives isolated from *A. rubrum*. (Abou-Zaid et al. 2001).

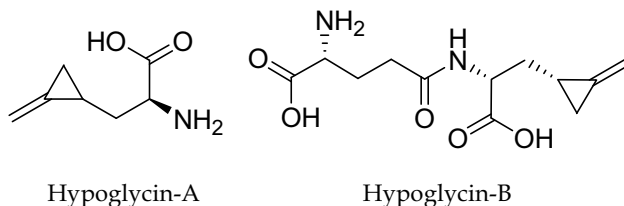


Fig. 6. Hypoglycins isolated from the fruits of *B. sapida*.

Serjania lethalis is another species that has been studied in its anti-insect activity. The ethanolic stem bark extract showed larvicidal activity against *A. aegypti* (Rodrigues et al. 2006). In this study the active compounds were not identified. However, the presence in this species of tannins, flavonoids and of saponins (serjanosides) has been reported (Teixeira et al. 1984; de Sousa Araújo et al. 2008). *S. meridionalis*, a species phytochemically not described, exhibited deterrent activity against *E. paenulata* and *M. persicae* (Hemiptera: Aphididae) when its ethanolic leaf extracts were assayed. Disappointingly, this extract was also toxic against beneficial insects (honey bees) (Castillo et al. 2009).

From the genus *Nephelium*, the species *N. lappaceum* is commonly known for its edible fruit “rambutan”. It is native from Southeast Asia where the fruits are an important commercial crop (Palanisamy et al. 2008). These fruits have shown potential on its ethanol seed extract, against *S. oryzae*, revealing to reduce esterase and glutathione-S-transferase activities from such insect (Bullangpoti et al. 2004). *N. maingayi*, native from Malaysia and Indonesia, has

also edible fruits and it has not been studied in its anti-insect activity. However, six saponins, namely, nepheliosides **1-6** (Figure 1) were isolated from a chloroform extract of its bark exhibiting cytotoxic activity when evaluated against a panel of human cancer cell lines (Ito et al. 2004).

3. Cyanocompounds

As stated, Sapindaceae are rich –in their seeds– in toxic cyanolipids (Figure 8), e.g. fatty acid esters of α - and γ - hydroxynitriles (Mikolajczak 1977; Seigler 1991). Although, some works report the occurrence of cyanolipids also in members of the Hippocastanaceae (Mikolajczak 1977; Bjarnholt & Møller 2008) and the Boraginaceae (Mikolajczak et al. 1969; Seigler et al. 1970), it appears that later investigations have confirmed that these metabolites are characteristic only of the Sapindaceae (Seigler 1976; Avato et al. 2005). The cyanolipids are usually extracted in the seed oils where the amounts vary broadly within the species (Dinesh & Hasan; Selmar et al. 1990; Hasan et al. 1994; Ucciani et al. 1994; Hasan & Roomi 1996; Sarita et al. 2002; Avato et al. 2005; Avato et al. 2006), ranging from only 3% in *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Guarana) (Avato et al. 2003), to 58% in *Schleichera trijuga* (Mikolajczak & Smith 1971).

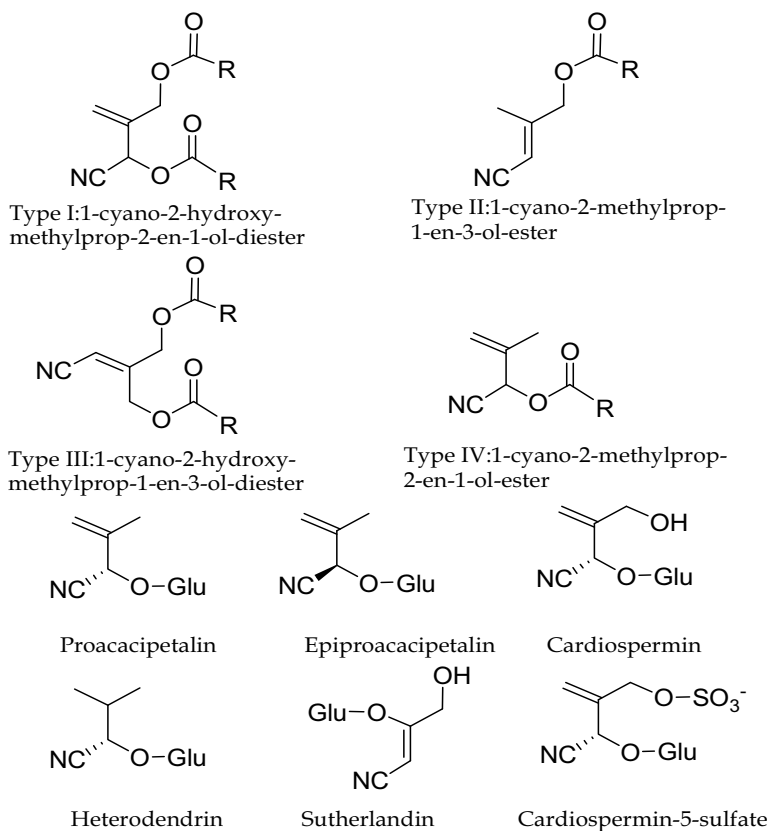


Fig. 8. Cyanolipids and glucosinolates from Sapindaceae.

Cyanolipids present in Sapindaceae belong to four types (Figure 8) which do not occur in all species. Although there is some controversy in the literature, it seems that each species has only one or two types of cyanolipids, but not all of them. The fatty acid moieties in cyanolipids vary within the species. In most of the studies, cyanolipids are esterified mostly by only one or two fatty acids. Eicosanoic acid (20:0) and eicosenoic acid (20:1 *n*-9) are present in high proportion in many species (Aichholz et al. 1997). In the genus *Paullinia*, the rare fatty acids paullinic acid (Z-13-eicosenoic acid) and cis-vaccenic acid (Z-11-octadecenoic acid) are ubiquitous constituents (Seigler 1974; Spitzer 1995; Spitzer 1996; Lago et al. 2000; Avato et al. 2003). Other fatty acids found go from dodecanoic (12:0) to docosanoic acids (22:0) (Mikolajczak et al. 1970a; 1970b; 1971; Aichholz et al. 1997; Avato et al. 2003).

Besides lipid derivatives, other cyanocompounds (the corresponding glycosides and salts) have also been isolated from aerial parts (Seigler et al. 1974; Bjarnholt et al. 2008) or roots of different species (Kumar et al. 2011). For example, cardiospermin (Figure 8) has been isolated from some species -and has been shown to be the responsible of the anxiolytic effects of ethanolic root extract from *Cardiospermum halicacabum* (Kumar et al. 2011); and in the particular case of *Cardiospermum grandiflorum* the corresponding sulphate-containing cyanogenic glucoside of cardiospermin was described (Hubel & Nahrstedt 1979).

Only cyanolipids of the type I and IV are cyanogenetic (Avato et al. 2005). Therefore cyanolipids do not work for all species as defensive compounds producing HCN. When HCN can be formed, its production works similarly to the one from glycosinolates, with a previous step of hydrolysis of the ester moieties catalyzed by estearases (Figure 9) (Wink et al. 1997). Cyanolipids can effectively work as plant defences, as it has been shown that their enzymatic breakdown produces the α -hydroxynitriles, from which HCN is released in a similar way than the one from glycosinolates (Wink et al. 1997). Moreover, it has been shown that *in vivo* HCN is produced upon wounding by herbivores (Selmar et al. 1990). Besides, as any plant defence, these defensive metabolites have been overcome in their original function by herbivores. In that sense it is well known that some Heteroptera (*Leptocoriscus* and *Jadera* spp.) not only are specialists on Sapindaceae, but are also able to sequester cyanolipids as such from their food plants, and biotransform them to the glycosylated derivatives (Braekman et al. 1982; Aldrich et al. 1990). Moreover, such acquisition of cyanocompounds from their host renders these gregarious, aposematic insects unpalatable to a variety of predators (Aldrich et al. 1990).

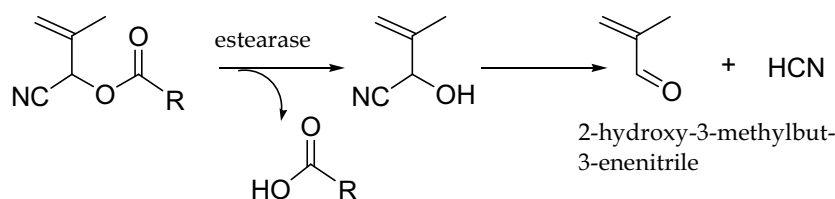


Fig. 9. Hydrolysis of cyanolipids to produce HCN (Wink et al. 1997).

Cyanolipids have been investigated in their potential as control agents for insects. In that sense, insect repellent and insecticidal properties of some of these products have been described. For instance, when adults of the red flour beetles, *Tribolium castaneum*, were exposed to seed oils from two species of *Cardiospermum* (*C. canescens* and *C. belicacabum*), the beetles preferred the arena zones where no oil was applied (Khan et al. 1983). However this repellency effect seems not to be a general pattern as in a pitfall trap bioassay, oils reach in

cyanolipids stimulated aggregation in the cases of the saw toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis*, and of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Mikolajczak et al. 1984). In this later work, when tested separately the four classes of cyanolipids (Figure 8) lost their repellent activity, suggesting synergism among them for this action. When the effect of cyanolipids was tested in a contact bioassay, only the ones belonging to classes I and IV showed a paralyzing effect against the saw toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis*. Even though one may be tempted to correlate this effect with the capacity of producing HCN by the pure compound tested, the conclusion is not again a general one since these cyanolipids did not have any effect on three other beetles (Mikolajczak et al. 1984). Finally, the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, was affected in its metamorphosis when cyanolipids of the classes II and IV were incorporated in its diet (Mikolajczak et al. 1984). On the whole, even though non-glycoside cyanogens were described in Sapindaceae as early as in the 1920` (cited by Mikolajczak et al. 1969), not many studies have been carried out in regard of either their ecological role as plant defences, or their potential as biopesticides. Although in the last case one can envision that cyanolipids of the classes I and IV will not be selective –because HCN is generated–, there is a chance that cyanolipids of the classes II and III may have some interest in this regard.

4. Conclusion

The family Sapindaceae includes many edible species, e.g. ackee, rambutan, longan and lychee (fruits from *Blighia sapida*, *Litchi chinensis*, *Nephelium lappaceum*, *Dimocarpus longan* respectively), which are widely consumed mainly in Asia and Australia (Diczbalis 2008; Vichitrananda & Somsri 2008; Diczbalis et al. 2010). Nevertheless, some species in this family produce in different phenological stages (including fruits in some cases) bioactive compounds with medicinal or toxicological properties. With reference to insect toxicity, up to now most of the studies carried out have found activity against species in the orders Lepidoptera and Diptera (mosquitoes). However, these results may be an artefact of the biotest itself, as much of the research focuses on chewing armyworms and borers of economical significance, and on mosquitoes as important vectors of human diseases. In addition, products from Sapindaceae have revealed differential activity on insect targets from different orders, and even from the same order (Mikolajczak et al. 1984; Khan et al. 2002; Castillo et al. 2009); and have demonstrated selectivity when their activity was checked against beneficial insects while some other products have not (Castillo et al. 2009). These findings emphasise the need for widening the spectrum of biotesters used in the tests.

The Sapindaceae are well characterized for the presence in their seeds of toxic cyanolipids, and the occurrence of this group of secondary metabolites seems to be restricted to this family. However, it is difficult to foresee that the Sapindaceae will find their way into the development of botanicals based on their unique cyanogens due to the intrinsic general toxicity of these compounds.

This family takes its name from the soapberry tree *Sapindus saponaria* (Emanuel & Benkeblia 2011), mostly known for being rich in saponins. Those chemical constituents provide its extracts with tensioactive properties, having been widely used not only as a source of soap but also for the application of its biological effects in medicine as well as in pest control. Indeed, the tensioactivity has been a property that has found application in pest control as shown by the fact that soaps are probably among the oldest insecticides in use (Silva et al. 2007).

Many other bioactive compounds belonging to different chemical groups have also been isolated from members of this family. For instance, from species studied for their anti insect activity, it has been reported the occurrence of clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids (*Dodonaea* spp.); flavonols, phenols and triterpenes (*Paullinia* spp.); tannins (*M. pubescens*); lectins (*Talisia esculenta*); gallic acid, gallates and derivatives (*Acer rubrum*). Being confirmed in some cases that those compounds are the responsible for the activities found. Among these secondary metabolites, probably the ones with the strongest potential as anti-insect agents are the clerodanes. Eventhough the main sources of these diterpenes are species from Asteraceae and Lamiaceae, the Sapindaceae are showing to be also a good resource of them. So far, different studies have shown the antifeedant capability of clerodanes against many insects, including species from Lepidoptera, Coleoptera, and Orthoptera (Klein Gebbinck et al. 2002; Sosa et al. 2008).

All in all, the family Sapindaceae, which members are widely distributed in every continent and have been used since early days for different purposes –taking advantage of their medicinal and toxicological properties–, seems to be a promissory source of bioactive compounds to be used as biological control agents. However more extensive studies, not only on more species not yet prospected, but also concerning more diverse targets are still needed.

5. Acknowledgments

We acknowledge financial support from the following agencies: OPCW (research grant L/ICA/ICB/111817/06); TWAS (research grant N° 05-318); and LATU (Laboratorio Tecnológico de Uruguay), Facultad de Química (Universidad de la República) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) for doctoral fellowships to MD. Finally, we would like to thank the editors of this book for their kind invitation to participate in this endeavour.

6. References

- Abdel, A., Shadia & Omer, E. A. (1995). Bio-evaluation of *Dodonaea viscosa* L. Jacq. extracts on the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) as indicated by life table parameters. *Annals of Agricultural Science (Cairo)* Vol. 40, 2, pp. 891-900
- Abou-Zaid, M. M., Helson, B. V., Nozzolillo, C. & Arnason, J. T. (2001). Ethyl m-digallate from red maple, *Acer rubrum* L., as the major resistance factor to forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* Hbn. *Journal of Chemical Ecology* Vol. 27, 12, pp. 2517-2527
- Aichholz, R., Spitzer, V. & Lorbeer, E. (1997). Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from sapindaceae seed oils with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* Vol. 787, 1-2, pp. 181-194
- Aldrich, J. R., Carroll, S. P., Lusby, W. R., Thompson, M. J., Kochansky, J. P. & Waters, R. M. (1990). Sapindaceae, cyanolipids, and bugs. *Journal of Chemical Ecology* Vol. 16, 1, pp. 199-210
- Anonymous (2011). Germplasm Resources Information Network - (GRIN) National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. In: USDA, ARS, *National*

- Genetic Resources Program, 11 July 2011, Available from: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?999>
- Arruda, W., Cavasin Oliveira, G. M. & Garcia da Silva, I. (2003a). Morphological alterations of *Aedes aegypti* larvae exposed to *Magonia pubescens* extract. *Entomologia y Vectores* Vol. 10, 1, pp. 47-60
- Arruda, W., Oliveira, G. M. C. & da Silva, I. G. (2003b). Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Vol. 36, 1, pp. 17-25
- Arulmozhi, D. K., Veeranjanyulu, A., Bodhankar, S. L. & Arora, S. K. (2005). Pharmacological studies of the aqueous extract of *Sapindus trifoliatus* on central nervous system: possible antimigraine mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 97, 3, pp. 491-496
- Avato, P., Pesante, M. A., Fanizzi, F. P. & Santos, C. A. D. (2003). Seed oil composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Lipids* Vol. 38, 7, pp. 773-780
- Avato, P., Rosito, I., Papadia, P. & Fanizzi, F. P. (2005). Cyanolipid-rich seed oils from *Allophylus natalensis* and *A. dregeanus*. *Lipids* Vol. 40, 10, pp. 1051-1056
- Avato, P., Rosito, I., Papadia, P. & Fanizzi, F. P. (2006). Characterization of seed oil components from *Nephelium lappaceum* L. *Natural Product Communications* Vol. 1, 9, pp. 751-755
- Banerjee, H. N. (1936). Clerodin from *Clerodendron infortunatum*. *Science and Culture* Vol. 2, pp. 163
- Benlekehal, H., Clotteau, M., Dornier, M. & Reynes, M. (2001). An Amazonian product particularly rich in caffeine: the seed of guarana [*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke]. *Fruits (Paris)* Vol. 56, 6, pp. 423-435
- Bjarnholt, N. & Møller, B. L. (2008). Hydroxynitrile glucosides. *Phytochemistry* Vol. 69, 10, pp. 1947-1961
- Boiça Junior, A. L., Medeiros, C. A. M., Torres, A. L. & Chagas Filho, N. R. (2005). Effect of plant aqueous extracts on the development of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), on collard greens. *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo* Vol. 72, 1, pp. 45-50
- Bousserouel, H., Litaudon, M., Morleo, B., Martin, M. T., Thoison, O., Nosjean, O., Boutin, J. A., Renard, P. & Sevenet, T. (2005). New biologically active linear triterpenes from the bark of three Newcaledonian *Cupaniopsis* species. *Tetrahedron* Vol. 61, 4, pp. 845-851
- Braekman, J. C., Daloze, D. & Pasteels, J. M. (1982). Cyanogenic and other glucosides in a neo-guinean bug *Leptocoris isolata*: Possible precursors in its host-plant. *Biochemical Systematics and Ecology* Vol. 10, 4, pp. 355-364
- Bruneton, J. (1995). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris, Lavoisier Publishing: 538-544
- Bullangpoti, V., Visetson, S., Milne, J. & Pornbanlualap, S. (2004). Effects of Mangosteen's peels and rambutan's seeds on toxicity, esterase and glutathione-S-transferase in rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Kasetsart Journal, Natural Sciences* Vol. 38, 5, Supplement, pp. 84-89
- Castillo, L., Gonzalez-Coloma, A., Gonzalez, A., Diaz, M., Alonso-Paz, E., Bassagoda, M. J. & Rossini, C. (2009). Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Industrial Crops and Products* Vol. 29, 1, pp. 235-240

- da Silva, I. G., Guimaraes, V. P., Lima, C. G., da Silva, H. H. G., Elias, C. N., Mady, C. M., da Mota e Silva, V. V., de Paiva Nery, A., da Rocha, K. R., Rocha, C. & Isac, E. (2003). Larvicide and toxic effect of the ethanol crude extract of the stem coat of *Magonia pubescens* towards *Aedes aegypti* in laboratory. *Revista de Patologia Tropical* Vol. 32, 1, pp. 73-86
- de Sousa Araújo, T. A., Alencar, N. L., de Amorim, E. L. C. & de Albuquerque, U. P. (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 120, 1, pp. 72-80
- Deepa, B. & Remadevi, O. K. (2007). Contact toxicity of the leaf extracts of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) to *Spodoptera litura* (Fab.). *Hexapoda* Vol. 14, 1, pp. 66-67
- Dharmani, P., Mishra, P. K., Maurya, R., Chauhan, V. S. & Palit, G. (2005). *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 99, 3, pp. 361-366
- Diczbalis, Y., Nicholls, B., Groves, I. & Lake, K. (2010). Sapindaceae production and research in Australia. *Acta Horticulturae* Vol. 863, pp. 49-58
- Diczbalis, Y. A. (2008). Nutrition management of tropical fruits grown in north Queensland, Australia. *Acta Horticulturae* Vol. 772, pp. 375-379
- Dinesh, K. & Hasan, S. Q. Cyanolipids in sapindaceous seed oils. *Asian Journal of Chemistry* Vol. 23, 6, pp. 2589-2591
- dos Santos, W. L., Freire, M. D. M., Bogorni, P. C., Vendramim, J. D. & Macedo, M. L. R. (2008). Effect of the aqueous extracts of the seeds of *Talisia esculenta* and *Sapindus saponaria* on fall armyworm. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol. 51, 2, pp. 373-383
- El-Din, M. M. & El-Gengaihi, S. E. (2000). Joint action of some botanical extracts against the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* Vol. 10, 1/2, pp. 51-56
- Emanuel, M. A. & Benkeblia, N. (2011). Processing of ackee fruit (*Blighia sapida* L.): present and future perspectives. *Acta Horticulturae* Vol. 894, pp. 211-213
- Fernandes, F. F., D'Alessandro, W. B. & Freitas, E. P. S. (2008). Toxicity of extract of *Magonia pubescens* (Sapindales : Sapindaceae) St. Hil. to control the Brown Dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari : Ixodidae). *Neotropical Entomology* Vol. 37, 2, pp. 205-208
- Ferreira Barreto, C., Cavasin, G. M., Garcia da Silva, H. H. & Garcia da Silva, I. (2006). Study of the morphohistological modifications in larvae of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submitted to the pure ethanolic extract of *Sapindus saponaria* Lin. (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical* Vol. 35, 1, pp. 37-57
- Gaillard, Y., Carlier, J., Berscht, M., Mazoyer, C., Bevalot, F., Guitton, J. & Fanton, L. (2011). Fatal intoxication due to ackee (*Blighia sapida*) in Suriname and French Guyana. GC-MS detection and quantification of hypoglycin-A. *Forensic Science International* Vol. 206, 1-3, pp. e103-e107
- Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R., Hohne, C., Huschka, C., Schmidtke, M., Abate, A. & Neubert, R. H. H. (2003). Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia* Vol. 74, 1-2, pp. 139-143

- Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R. & Neubert, R. H. H. (2002). Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae). *Pharmazie* Vol. 57, 5, pp. 320-322
- Hasan, S. Q. & Roomi, Y. A. (1996). Cyanolipids in *Sapindus trifoliatus* seed oil. *Journal of the Oil Technologists' Association of India* Vol. 28, 1, pp. 23, 25
- Hasan, S. Q., Roomi, Y. A. & Chitra, N. (1994). Reinvestigation of seed oil of *Sapindus saponaria* for its cyanolipid content. *Journal of the Oil Technologists' Association of India* Vol. 26, 3, pp. 77-79
- Hassall, C. H. & Reyle, K. (1955). Hypoglycin-A and Hypoglycin-B, two biologically active polypeptides from *Blighia sapida*. *Biochemical Journal* Vol. 60, 1-4, pp. 334-339
- Hassall, C. H., Reyle, K. & Feng, P. (1954). Hypoglycin A,B: Biologically active polypeptides from *Blighia sapida*. *Nature* Vol. 173, 4399, pp. 356-357
- Hubel, W. & Nahrstedt, A. (1979). Cardiospermisulfate - sulfur-containing cyanogenic glucoside from *Cardiospermum grandiflorum*. *Tetrahedron Letters* Vol. 20, 45, pp. 4395-4396
- Isman, M., Matsuura, H., MacKinnon, S., Durst, T., Towers, G. & Arnason, J. (1996). Phytochemistry of the Meliaceae. *Recent Advances on Phytochemistry* Vol. 30, pp. 155-178
- Ito, A., Chai, H. B., Kardono, L. B. S., Setowati, F. M., Afriastini, J. J., Riswan, S., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Swanson, S. M. & Kinghorn, A. D. (2004). Saponins from the bark of *Nephelium maingayi*. *Journal of Natural Products* Vol. 67, 2, pp. 201-205
- Jain, S. C. (1976). Isolation of flavonoids from soapnut, *Sapindus emarginatus* Vahl. *Indian Journal of Pharmacy* Vol. 38, 6, pp. 141-142
- Jefferie, P. R., Knox, J. R. & Scaf, B. (1973). Structure elucidation of some ent-clerodane diterpenes from *Dodonaea boroniaefolia* and *Cyanostegia angustifolia*. *Australian Journal of Chemistry* Vol. 26, 10, pp. 2199-2211
- Kamala-Kannan, S., Park, S. M., Oh, B. T., Kim, H. M. & Lee, K. J. (2009). First report of aster yellows phytoplasma in Goldenrain tree (*Koelreuteria paniculata*) in Korea. *Journal of Phytopathology* Vol. 158, 3, pp. 197-199
- Kanchanapoom, T., Kasai, R. & Yamasaki, K. (2001). Acetylated triterpene saponins from the Thai medicinal plant, *Sapindus emarginatus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* Vol. 49, 9, pp. 1195-1197
- Kayode, J. (2006). Conservation of indigenous medicinal botanicals in Ekiti State, Nigeria. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* Vol. 7, 9, pp. 713-718
- Khan, A. & Gumbs, F. A. (2003). Repellent effect of ackee (*Blighia sapida* Koenig) component fruit parts against stored-product insect pests. *Tropical Agriculture* Vol. 80, 1, pp. 19-27
- Khan, A., Gumbs, F. A. & Persad, A. (2002). Pesticidal bioactivity of ackee (*Blighia sapida* Koenig) against three stored-product insect pests. *Tropical Agriculture* Vol. 79, 4, pp. 217-223
- Khan, M. W. Y., Ahmad, F., Ahmad, I. & Osman, S. M. (1983). Nonedible Seed Oils as Insect Repellent. *Journal of the American Oil Chemists Society* Vol. 60, 5, pp. 949-950
- Klein Gebbinck, E. A., Jansen, B. J. M. & de Groot, A. (2002). Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* Vol. 61, 7, pp. 737-770

- Koodalingam, A., Mullainadhan, P. & Arumugam, M. (2009). Antimosquito activity of aqueous kernel extract of soapnut *Sapindus emarginatus*: impact on various developmental stages of three vector mosquito species and nontarget aquatic insects. *Parasitology Research* Vol. 105, 5, pp. 1425-1434
- Koodalingam, A., Mullainadhan, P. & Arumugam, M. (2011). Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* Vol. 118, 1, pp. 27-36
- Kumar, R., Murugananthan, G., Nandakumar, K. & Talwar, S. (2011). Isolation of anxiolytic principle from ethanolic root extract of *Cardiospermum halicacabum*. *Phytomedicine* Vol. 18, 2-3, pp. 219-223
- Lago, R. C. A., Simoni, M. d. L. P. S. C. & Pinto, A. d. C. (2000). On the occurrence of cyanolipids in *Paullinia carpopodea* Cambess and *P. cupana* Kunth seed oils. *Acta Amazonica* Vol. 30, 1, pp. 101-105
- Lemos, T. L. G., Mendes, A. L., Sousa, M. P. & Braz-Filho, R. (1992). New saponin from *Sapindus saponaria*. *Fitoterapia* Vol. 63, 6, pp. 515-517
- Lorenzi, H. (2004). Arvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arvoreas nativas do Brasil. Piracicaba: Plantarum
- Macedo, M. L. R., Damico, D. C. S., Freire, M. D., Toyama, M. H., Marangoni, S. & Novello, J. C. (2003). Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelerutera paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 51, 10, pp. 2980-2986
- Macedo, M. L. R., Freire, M. D. M., Novello, J. C. & Marangoni, S. (2002). *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera : Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1571, 2, pp. 83-88
- Mahmoud, I., Moharram, F. A., Marzouk, M. S., Soliman, H. S. M. & El-Dib, R. A. (2001). Two new flavonol glycosides from leaves of *Koelerutera paniculata*. *Pharmazie* Vol. 56, 7, pp. 580-582
- Malarvannan, S., Giridharan, R., Sekar, S., Prabavathy, V. R. & Nair, S. (2009). Ovicidal activity of crude extracts of few traditional plants against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Journal of Biopesticides* Vol. 2, 1, pp. 64-71
- Malarvannan, S., Kumar, S. S., Prabavathy, V. R. & Sudha, N. (2008). Individual and synergistic effects of leaf powder of few medicinal plants against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Asian Journal of Experimental Sciences* Vol. 22, 1, pp. 79-88
- Malarvannan, S., Sekar, S., Prabavathy, V. R. & Sudha, N. (2008). Individual and synergistic efficacy of leaf powder of *Argemone mexicana* against tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fab, (Noctuidae: Lepidoptera). *Emerging trends of researches in insect pest management and environmental safety, Volume I* Vol., pp. 155-164
- Malarvannan, S. & Subashini, H. D. (2007). Efficacy of *Dodonaea angustifolia* crude extracts against spotted bollworm, *Earias vitella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomology* Vol. 4, 3, pp. 243-247
- Mazzola, E. P., Parkinson, A., Kennelly, E. J., Coxon, B., Einbond, L. S. & Freedberg, D. I. (2011). Utility of coupled-HSQC experiments in the intact structural elucidation of

- three complex saponins from *Blighia sapida*. *Carbohydrate Research* Vol. 346, 6, pp. 759-768
- Medeiros, C. A. M., Boica Junior, A. L. & Angelini, M. R. (2007). Sub-lethal effect of aqueous vegetals extracts of *Azadirachta indica* A. Juss. and *Sapindus saponaria* L. against the biology of *Ascia monuste orseis* at kale. *Boletim de Sanidad Vegetal, Plagas* Vol. 33, 1, pp. 27-34
- Meyer Albiero, A. L., Aboin Sertié, J. A. & Bacchi, E. M. (2002). Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 82, 1, pp. 41-44
- Mikolajczak, K. L. (1977). Cyanolipids. *Progress in the chemistry of fats and other lipids* Vol. 15, 2, pp. 97-130
- Mikolajczak, K. L., Madrigal, R. V., Smith, C. R. & Reed, D. K. (1984). Insecticidal effects of cyanolipids on three species of stored product insects, European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae, and Striped Cucumber Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) *Journal of Economic Entomology* Vol. 77, 5, pp. 1144-1148
- Mikolajczak, K. L., Seigler, D. S., Smith Jr, C. R., Wolff, I. A. & Bates, R. B. (1969). A cyanogenetic lipid from *Cordia verbenacea* DC. Seed oil. 4 Vol. 6, 617-619,
- Mikolajczak, K. L. & Smith, C. R. (1971). Cyanolipids of kusum (*Schleichera trijuga*) seed oil. *Lipids* Vol. 6, 5, pp. 349-&
- Mikolajczak, K. L., Smith, C. R. & Tjarks, L. W. (1970). Cyanolipids of *Cardiospermum halicacabum* L and other sapindaceous seed oils. *Lipids* Vol. 5, 10, pp. 812-&
- Mikolajczak, K. L., Smith, C. R. & Tjarks, L. W. (1970). Cyanolipids of *Koelreuteria paniculata* Laxm. seed oil. *Lipids* Vol. 5, 8, pp. 672-&
- Mukherjee, S. N. & Joseph, M. (2000). Medicinal plant extracts influence insect growth and reproduction: A case study. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* Vol. 22-23, 4A-1A, pp. 154-158
- Mukherjee, S. N. & Joseph, M. (2001). Medicinal plant extracts influence insect growth and reproduction: a case study. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* Vol. 22/23, 4A/1A, pp. 154-158
- Murdock, L. L. & Shade, R. E. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* Vol. 50, pp. 6605-6611
- Muthukumran, P., Begumand, V. H. & Kalaiarasan, P. (2011). Antidiabetic activity of *Dodonaea viscosa* (L) leaf extracts. *International Journal of PharmTech Research* Vol. 3, 1, pp. 136-139
- Nielsen, N. J., Nielsen, J. & Staerk, D. (2010). New resistance-correlated saponins from the insect-resistant crucifer *Barbarea vulgaris*. *Journal of Agrulture and Food Chemistry* Vol. 58, pp. 5509-5514
- Niu, H. M., Zeng, D. Q., Long, C. L., Peng, Y. H., Wang, Y. H., Luo, J. F., Wang, H. S., Shi, Y. N., Tang, G. H. & Zhao, F. W. (2010). Clerodane diterpenoids and prenylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Journal of Asian Natural Products Research* Vol. 12, 1, pp. 7-14
- Omosa, L. K., Midiwo, J. O., Derese, S., Yenesew, A., Peter, M. G. & Heydenreich, M. (2010). neo-Clerodane diterpenoids from the leaf exudate of *Dodonaea angustifolia*. *Phytochemistry Letters* Vol. 3, 4, pp. 217-220
- Palanisamy, U., Cheng, H. M., Masilamani, T., Subramaniam, T., Ling, L. T. & Radhakrishnan, A. K. (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry* Vol. 109, 1, pp. 54-63

- Pelegrini, D. D., Tsuzuki, J. K., Amado, C. A. B., Cortez, D. A. G. & Ferreira, I. C. P. (2008). Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy* Vol. 27, 6, pp. 922-927
- Pérez, D. & Iannacone, J. (2004). Insecticidal effect of *Paullinia clavigera* var. *bullata* simpson (Sapindaceae) and *Tradescantia zebrina* Hort. ex Bosse (Commelinaceae) in the control of *Anopheles benarrochi* Gabaldon, main vector of malaria in ucajali, Peru *Ecología Aplicada* Vol. 3, pp. 64-72
- Pérez, D., Iannacone, J. & Pinedo, H. (2010). Toxicological effect from the stem cortex of the amazonic plant soapberry *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) upon three arthropods. *Ciencia E Investigacion Agraria* Vol. 37, 3, pp. 133-143
- Pérez, D., Iannacone, J. & Tueros, A. (2008). Toxicity of *Paullinia clavigera* schldtl. (Sapindaceae) and *Chondrodendron tomentosum* ruiz et pav. (Menispermaceae) on jumping lice of camu camu *Tuthillia cognata* (Hemiptera: Psyllidae). *Gayana Botanica* Vol. 65, 2, pp. 145-152
- Pérez, D. D. & Iannacone, O. J. (2006). Effectiveness of botanical extracts from ten plants on mortality and larval repellency of *Rhynchophorus palmarum* L., an insect pest of the Peach palm *Bactris gasipaes* Kunth in Amazonian Peru. *Agricultura Tecnica* Vol. 66, 1, pp. 21-30
- Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* Vol. 109, pp. 347-352
- Plasman, V., Plehiers, M., Braekman, J., Daloze, D., De Biseau, J. & Pasteels, J. (2001). Chemical defense in *Platyphora kollari* Baly and *Leptinotarsa behrensi* Harold (Coleoptera: Chrysomelidae). Hypotheses on the origin and evolution of leaf beetles toxins. *Chemoecology* Vol. 11, pp. 107-112
- Porras, M. F. & Lopez-Avila, A. (2009). Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana De Entomologia* Vol. 35, 1, pp. 7-11
- Prieto, J. M., Schaffner, U., Barker, A., Braca, A., Siciliano, T. & Boevé, J. L. (2007). Sequestration of furostanol saponins by *Monophadnus* sawfly larvae. *Journal of Chemical Ecology* Vol. 33, 513-524,
- Rahman, S. S., Rahman, M. M., Begum, S. A., Khan, M. M. R. & Bhuiyan, M. M. H. (2007). Investigation of *Sapindus mukorossi* extracts for repellency, insecticidal activity and plant growth regulatory effect. *Journal of Applied Sciences Research* Vol., February, pp. 95-101
- Rey, D., Pautou, M.-P. & Meyran, J.-C. (1999). Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* Vol. 73, 2, pp. 173-181
- Ribeiro, A., Zani, C. L., Alves, T. M. D., Mendes, N. M., Hamburger, M. & Hostettmann, K. (1995). Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. *International Journal of Pharmacognosy* Vol. 33, 3, pp. 177-180
- Rodrigues, A. M. S., De Paula, J. E., Degallier, N., Molez, J. F. & Espindola, L. S. (2006). Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association* Vol. 22, 2, pp. 314-317
- Rodriguez, E. M. (1958). The wood of Argentine Sapindaceae. Structure, characteristics, and applications. *Rev Fac Agron Y Vet [Buenos Aires]* Vol. 14, (2), pp. 271-305

- Saha, S., Walia, S., Kumar, J., Dhingra, S. & Parmar, B. S. (2009). Screening for feeding deterrent and insect growth regulatory activity of triterpenic saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 58, 1, pp. 434-440
- Sarita, R., Geeta, N., Srivastava, V. K., Hasan, S. N. & Hasan, S. Q. (2002). Cyanolipids in *Sapindus obovatus* seed oil and reinvestigation of the seed oil of *Heliotropium indicum*, *H. eichwaldi* and *D. viscosa*. *Journal of the Oil Technologists' Association of India* Vol. 34, 2, pp. 69-71
- Seigler, D. (1974). Determination of cyanolipids in seed oils of the Sapindaceae by means of their NMR spectra. *Phytochemistry* Vol. 13, 5, pp. 841-843
- Seigler, D. S. (1976). Cyanolipids in *Cordia verbenacea*: A correction. *Biochemical Systematics and Ecology* Vol. 4, 4, pp. 235-236
- Seigler, D. S. (1991). Cyanide and cyanogenic glycosides. In: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Rosenthal, G. A. & Berenbaum, M. R., pp. Academic Press San Diego, California
- Seigler, D. S., Eggerding, C. & Butterfield, C. (1974). A new cyanogenic glycoside from *Cardiospermum hirsutum*. *Phytochemistry* Vol. 13, 10, pp. 2330-2332
- Seigler, D. S., Mikolajczak, K. L., Smith Jr, C. R. & Wolff, I. A. (1970). Structure and reactions of a cyanogenetic lipid from *Cordia verbenacea* DC. seed oil. *Chemistry and Physics of Lipids* Vol. 4, pp. 147-161
- Selmar, D., Grochowski, S. & Seigler, D. S. (1990). Cyanogenic lipids: Utilization during seedling development of *Ungnadia speciosa*. *Plant Physiology* Vol. 93, 2, pp. 631-636
- Sharaby, A., Abdel-Rahman, H. & Moawad, S. (2009). Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Saudi Journal of Biological Sciences* Vol. 16, 1, pp. 1-9
- Sharma, A., Sati, S. C., Sati, O. P., Sati, D. M. & Kothiyal, S. K. (2011). Chemical constituents and Bioactivities of genus *Sapindus*. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* Vol. 2, 2, pp. 403-409
- Silva, H. H. G. d., Silva, I. G. d., dos Santos, R. M. G., Rodrigues Filho, E. & Elias, C. N. (2004). Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Vol. 37, 5, pp. 396-9
- Silva, T. M. S., Da Silva, T. G., Martins, R. M., Maia, G. L. A., Cabral, A. G. S., Camara, C. A., Agra, M. F. & Barbosa, J. M. (2007). Molluscicidal activities of six species of Bignoniaceae from north-eastern Brazil, as measured against *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* Vol. 101, 4, pp. 359-365
- Simpson, B., Claudie, D., Smith, N., Wang, J. P., McKinnon, R. & Semple, S. (2010). Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Dodonaea polyandra*, a Kaanju traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 132, 1, pp. 340-343
- Sofidiya, M. O., Jimoh, F. O., Aliero, A. A., Afolayan, A. J., Odukoya, O. A. & Familoni, O. B. (2008). Antioxidant and antibacterial properties of *Lecaniodiscus cupanioides*. *Research Journal of Microbiology* Vol. 3, 2, pp. 91-98
- Sosa, M. E. & Tonn, C. E. (2008). Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemical reviews* Vol. 7, 1, pp. 3-24

- Sousa, S. A., Alves, S. F., de Paula, J. A. M., Fiuza, T. S., Paula, J. R. & Bara, M. T. F. (2009). Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) by high performance liquid chromatography. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* Vol. 20, 6, pp. 866-870
- Spitzer, V. (1995). GLC-MS analysis of the fatty-acids of the seed oil, triglycerides, and cyanolipid of *Paullinia elegans* (Sapindaceae): A rich source of cis-13-eicosenoic acid (paullinic acid). *Journal of High Resolution Chromatography* Vol. 18, 7, pp. 413-416
- Spitzer, V. (1996). Fatty acid composition of some seed oils of the Sapindaceae. *Phytochemistry* Vol. 42, 5, pp. 1357-1360
- Teffo, L. S., Aderogba, M. A. & Eloff, J. N. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany* Vol. 76, 1, pp. 25-29
- Teixeira, J. R. M., Lapa, A. J., Souccar, C. & Valle, J. R. (1984). Timbós: ichthyotoxic plants used by brazilian indians. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 10, 3, pp. 311-318
- Ucciani, E., Mallet, J. F. & Zahra, J. P. (1994). Cyanolipids and fattyacids of *Sapindus trifoliatus* (Sapindaceae) seed oil. *Fat Science Technology* Vol. 96, 2, pp. 69-71
- Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., Peumans, W. J. & Jean-Claude Kader and Michel, D. (2008). Plant Lectins. In: *Advances in Botanical Research*, pp. 107-209 Academic Press
- Veeramani, C., Pushpavalli, G. & Pugalendi, K. V. (2010). In vivo antioxidant and hypolipidemic effect of *Cardiospermum halicacabum* leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* Vol. 21, 2, pp. 107-125
- Vichitranda, S. & Somsri, S. (2008). Tropical fruit production in Thailand. *Acta Horticulturae* Vol. 787, pp. 33-46
- Waako, P. J., Gumede, B., Smith, P. & Folb, P. I. (2005). The in vitro and in vivo antimalarial activity of *Cardiospermum halicacabum* L. and *Momordica foetida* Schumch. et Thonn. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 99, 1, pp. 137-143
- Weckerle, C. S., Stutz, M. A. & Baumann, T. W. (2003). Purine alkaloids in *Paullinia*. *Phytochemistry* Vol. 64, 3, pp. 735-742
- Wilbert, W. & Haiek, G. (1991). Phytochemical screening of a Warao pharmacopoeia employed to treat gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 34, 1, pp. 7-11
- Wink, M., Dey, P. M. & Harborne, J. B. (1997). Special nitrogen metabolism. In: *Plant Biochemistry*, pp. 439-486 Academic Press London
- Wollenweber, E. & Roitman, J. N. (2007). New reports on surface flavonoids from *Chamaebatiaria* (Rosaceae), *Dodonaea* (Sapindaceae), *Elsholtzia* (Lamiaceae), and *Silphium* (Asteraceae). *Natural Product Communications* Vol. 2, 4, pp. 385-389
- Zhao, H., Qin, X. & Yang, M. (2006). Preliminary study contact toxicity of extracts from *Dodonaea viscosa* seed against *Sitophilus oryzae*. *Journal of Yunnan Agricultural University* Vol. 22, 6, pp. 942-944
- Zidan, Z. H., Gomaa, A. A., Afifi, F. A., Fam, E. Z. & Ahmed, S. M. S. (1993). Bioresidual activity of certain plant extracts on some stored grain insects, in relation to seed viability. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences* Vol. 1, 1, pp. 113-123