



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Biotecnología Alimentaria

***Acmella radicans* una planta presente en México: obtención de
alcamidas y sus efectos en ácaros de plantas alimenticias**

TESIS DE MAESTRÍA

**Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas**

Presenta:

Ing. Adriana Alvarado Valencia

Director

Dr. Pedro Antonio García Saucedo

Codirectora

Dra. Margarita Vargas Sandoval

Morelia, Michoacán Marzo 2023

Marzo 2023

***Acmella radicans* una planta presente en México: obtención de
alcamidas y sus efectos en ácaros de plantas alimenticias**

TESIS

**Que somete a consideración y aprobación del H. Jurado examinador como
requisito parcial para obtener el grado de:**

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Ing. Adriana Alvarado Valencia

APROBADA:

Dr. Pedro Antonio García Saucedo
Director

Dra. Margarita Vargas Sandoval
Codirectora

Dra. Patricia Ríos Chávez
Sinodal

Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez
Sinodal

Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara
Sinodal Externo

“Sólo es útil el conocimiento que nos hace mejores”

Séneca

**Este trabajo está dedicado a todas las personas que aportaron un granito de arena
en él, sin ellas no existiría, oro y miel para ustedes siempre...**

A ti, que siempre estuviste y estarás, en esta vida y en la otra...

Gracias, Gracias, Gracias...

A mi madre y hermanos, apoyo incondicional...

A mi hijo, mi inspiración cada día...

A todos mis compañeros, amigos y hermanos de laboratorio, mi segunda familia... Ere, Gio, Belén, Cris y Erwin, los mejores siempre, entrañables en mi corazón...

A Pedro García, gracias por todo el apoyo incondicional, por tu consejo y hermosa amistad...gracias por la oportunidad de pertenecer a tu gran equipo de trabajo, siempre en mi corazón estarán...

A mis asesores que sin su consejo y apoyo no hubiera sido posible este proyecto...Dra. Margarita, Dra. Ernestina, Dra. Paty y Dr. Vázquez...

A todos mis maestros que sin ser parte oficial del proyecto siempre tuvieron disposición de aportar al mismo...Mtra. Teresita, Mtro. Atahualpa, Dra. Maribel, Dr. Abad, Mtra. Ana y Mtro. Mendoza...

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"

Al Laboratorio de Síntesis Orgánica de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato y a su gran equipo de trabajo

Al Cinvestav Unidad Irapuato, Guanajuato

Al Instituto de Ecología A.C., Pátzcuaro, Michoacán

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 EL ÁCARO ROJO DE LA PALMA <i>Raoiella indica</i>	5
2.1.1 Morfología de <i>Raoiella indica</i>	6
2.1.2 Acciones fitosanitarias contra <i>Raoiella indica</i>	7
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS Y BIOACTIVIDAD DE PLANTAS	8
2.2.1 Terpenos	9
2.2.2 Fenoles	10
2.2.3 Glicósidos	11
2.2.4 Alcaloides	11
2.3 ALCAMIDAS	12
2.3.1 Biosíntesis de las alcamidas	13
2.3.2 Bioactividad de las alcamidas	14
2.4 <i>Acmella radicans</i>	16
2.4.1 Descripción botánica de <i>Acmella radicans</i>	16
2.4.2 Taxonomía de <i>Acmella radicans</i>	18
2.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	18
2.5.1 Cromatografía de capa fina	19
2.5.2 Cromatografía de líquida de alto rendimiento	20
2.5.3 Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas	21
2.6 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	22
2.7 JUSTIFICACIÓN	23

III HIPÓTESIS	24
IV OBJETIVO GENERAL	24
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	24
V MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 RECOLECTA DE MATERIAL VEGETAL	26
5.2 PROPAGACIÓN DE PLANTA DE <i>Acmella radicans</i>	26
5.3 RECOLECTA DE ÁCARO <i>Raoiella indica</i>	27
5.4 EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Acmella radicans</i>	27
5.5 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ACUOSA PARA BIOENSAYO PREVIO	28
5.6 BIOENSAYO PREVIO DEL EFECTO ACARICIDA	28
5.7 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ACUOSA PARA BIOENSAYO	30
5.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA	30
5.9 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE BIOACTIVIDAD ACARICIDA DE <i>Acmella radicans</i>	31
5.9.1 Separación de los compuestos de la fracción acuosa extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía de capa fina	31
5.9.2 Separación de los compuestos de la fracción etanólica y acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía líquida de alto rendimiento	32
5.9.3 Análisis de los compuestos de la fracción etanólica y acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en resonancia magnética nuclear	33
5.9.4 Separación e identificación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía de gases acoplado	33
5.10 ANÁLISIS DE RESULTADOS	34
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 RECOLECTA DE MATERIAL VEGETAL	35
6.2 PROPAGACIÓN DE PLANTA DE <i>Acmella radicans</i>	36

6.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Acmella radicans</i>	36
6.4 BIOENSAYO PREVIO DEL EFECTO ACARICIDA	37
6.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA	39
6.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE BIOACTIVIDAD ACARICIDA DE <i>Acmella radicans</i>	41
6.6.1 Separación de los compuestos de la fracción acuosa extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía de capa fina	41
6.6.2 Separación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía líquida de alto rendimiento	42
6.6.3 Análisis de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en resonancia magnética nuclear	44
6.6.4 Separación e identificación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de <i>A. radicans</i> en cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas	46
VII CONCLUSIONES	52
VIII LITERATURA CITADA	53
ANEXOS	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Tratamientos propuestos para el bioensayo previo	29
Cuadro 2.- Tratamientos propuestos para bioensayo	31
Cuadro 3.- Rendimiento de los extractos etanólicos de <i>A. radicans</i>	37
Cuadro 4.- Rf de hoja y flor de <i>A. radicans</i> y raíz de <i>H. longipes</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Hembra y macho adultos del ácaro rojo de la palma	7
Figura 2.- Esqueleto molecular básico de las alcanidas	13
Figura 3.- Estructura de la alcanida olefinica	14
Figura 4.- Estructura de la alcanida acetilénica	14
Figura 5.- <i>Acmella radicans</i> var. <i>radicans</i>	18
Figura 6.- Diagrama de flujo de trabajo	26
Figura 7.- Sitios de recolecta de <i>A. radicans</i>	35
Figura 8.- Propagación de <i>A. radicans</i>	36
Figura 9.- Porcentaje de mortalidad de <i>R. indica</i> en bioensayo previo	38
Figura 10.- Porcentaje de mortalidad de <i>R. indica</i> a las 24 h	40
Figura 11.- Porcentaje de mortalidad de <i>R. indica</i> a las 48 h	40
Figura 12.- Porcentaje de mortalidad de <i>R. indica</i> a las 72 h	41
Figura 13.- Cromatograma de fracción acuosa de hoja de <i>A. radicans</i>	43
Figura 14.- Cromatograma del extracto <i>Spilanthes acmella</i>	43
Figura 15.- Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz), fracción acuosa de hoja de <i>A. radicans</i>	44
Figura 16.- Determinación de dos alcanidas por la técnica RMN de la planta <i>A. radicans</i>	45

Figura 17.- Determinación de cuatro alcanidas por la técnica RMN de la planta <i>Spilanthes acmella</i> var. <i>oleracea</i>	45
Figura 18.- Estructura de la alcanida <i>N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida</i>	46
Figura 19.- Espectro de <i>N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida</i>	47
Figura 20.- Estructura de la alcanida <i>N-(2-feniletil)(2Z,4E)-octadienamida</i>	47
Figura 21.- Espectro de <i>N-(2-feniletil)(2Z,4E)-octadienamida</i>	48
Figura 22.- Estructura de la alcanida <i>N-(2-feniletil)non-2(E)-en-6,8-dienamida</i>	48
Figura 23.- Espectro de <i>N-(2-feniletil)non-2(E)-en-6,8-dienamida</i>	49
Figura 24.- Estructura de la alcanida <i>N-(2-feniletil)-cis-2,3-epoxinona-6,8-dienamida</i>	49
Figura 25.- Espectro de <i>N-(2-feniletil)-cis-2,3-epoxinona-6,8-dienamida</i>	50
Figura 26.- Estructura de la alcanida <i>3-fenil-N-(2-feniletil)- 2-propanamida</i>	50
Figura 27.- Espectro de <i>3-fenil-N-(2-feniletil)- 2-propanamida</i>	51
Figura 28.- Abundancia de las alcanidas de hoja de <i>A. radicans</i>	51

RESUMEN

En México la agricultura se basa en el manejo convencional de cultivos, lo que se traduce en síntesis y aplicación de agroquímicos que originan problemas de resistencia de plagas, contaminación ambiental y salud pública. Por ello ha aumentado la tasa de adopción de bioplaguicidas, dando como resultado una creciente investigación y formulación de este tipo de agroinsumos. El género *Acmella* abarca plantas arvenses, algunas de ellas son nativas de México. En estudios realizados con *Acmella radicans* se demostró que sus alcanoides tienen bioactividad sobre plagas de plantas de interés alimenticio, como el ácaro rojo de las palmas (*Raoiella indica*), plaga que causa daños económicos hasta de un 87 % debido a que se alimenta de las hojas de las palmas y vástago de plátanos, tornándolas cloróticas y necróticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto letal de la fracción acuosa del extracto de *A. radicans* sobre *R. indica*. Para la extracción de los compuestos activos, las plantas cultivadas de *A. radicans* se llevaron a sequedad y las hojas fueron separadas, pulverizadas y maceradas con etanol 96° (1:30 p/v). Para evaluar el efecto letal se estableció el siguiente diseño experimental, los ácaros (*R. indica*) se recolectaron de hojas de palma y se colocaron 10 hembras adultas por caja Petri (10 cajas por tratamiento); posteriormente se asperjó el extracto vegetal previamente llevado a sequedad y resuspendido en agua, sobre los ácaros. Se establecieron 5 tratamientos de la fase acuosa con diferente concentración (Ar32, Ar16, Ar8, Ar4 y Ar2 mg/mL respectivamente) con 3 controles, testigo regional (TR), testigo negativo (TN), y testigo absoluto (TA). Los tratamientos se asperjaron a las 0, 24 y 48 h. El conteo de mortalidad de los ácaros se realizó a las 24, 48 y 72 h. Como resultado, se observó el 70 % de mortalidad a las 24 h, para el tratamiento Ar32; el 88 % se registró a las 48 h en el mismo tratamiento; y para las 72 h la mortalidad aumentó a 98 %, superando al testigo regional, teniendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con los controles TA y TN. Se determinó la CL_{50} para las 24 h siendo de 27.98 mg/mL. De acuerdo al estudio GC-MS se caracterizaron 5 alcanoides de la fracción acuosa, siendo las más abundante en hoja, 3-fenil-N-(2-feniletíl)-2-propanamida. Concluyéndose que *A. radicans* puede ser considerada una opción como control de plagas agrícolas.

Palabras clave: biorracional, toxicidad, control biológico, plagas

ABSTRACT

In Mexico, agriculture is based on conventional crop management, which translates into the synthesis and application of agrochemicals that cause pest resistance, environmental contamination, and public health problems. For this reason, the adoption rate of biopesticides has increased, resulting in increasing research and formulation of this type of agro-inputs. The genus *Acmella* includes weeds, some of which are native to Mexico. In studies carried out with *Acmella radicans*, it was shown that its alkaloids have bioactivity on pests of plants of nutritional interest, such as the red mite of the palms (*Raoiella indica*), a pest that causes economic damages of up to 87 % due to the fact that it feeds on the plants. palm leaves and banana stems, turning them chlorotic and necrotic. The objective of this work was to evaluate the lethal effect of the aqueous fraction of the extract of *A. radicans* on *R. indica*. For the extraction of the active compounds, the cultivated *A. radicans* plants were dried and the leaves were separated, pulverized and macerated with 96° ethanol (1:30 w/v). To evaluate the lethal effect, the following experimental design was established: mites (*R. indica*) were collected from palm leaves and 10 adult females were placed per Petri dish (10 boxes per treatment); Subsequently, the plant extract previously dried and resuspended in water was sprayed on the mites. 5 treatments of the aqueous phase were established with different concentrations (Ar32, Ar16, Ar8, Ar4 and Ar2 mg/mL respectively) with 3 controls, regional control (TR), negative control (TN), and absolute control (TA). The treatments were sprayed at 0, 24 and 48 h. The mite mortality count was performed at 24, 48 and 72 h. As a result, 70 % mortality was observed at 24 h, for the Ar32 treatment; 88 % were registered at 48 h in the same treatment; and for 72 h, mortality increased to 98 %, surpassing the regional control, having a significant difference ($p \leq 0.05$) with the TA and TN controls. The LC_{50} for 24 h was determined to be 27.98 mg/mL. According to the GC-MS study, 5 alkaloids of the aqueous fraction were characterized, being the most abundant in the leaf, 3-phenyl-N-(2-phenylethyl)-2-propanamide. Concluding that *A. radicans* can be considered an option as a control of agricultural pests.

I INTRODUCCIÓN

Una problemática en nuestro país es el uso indiscriminado de pesticidas de síntesis química, lo que conlleva que los suelos se vayan degradando y los mantos freáticos estén contaminados por compuestos tóxicos, haya cambio en los ecosistemas por la reducción de organismos controladores de plaga, y en cuanto a la salud pública, el incremento de casos de intoxicación y enfermedades por el mal uso de los agroquímicos.

Se ha sugerido el estudio de compuestos de origen vegetal que sean eficientes para el control de plagas, a su vez que sean amigables con el ambiente, evitando la residualidad en agua y suelo, así como la selectividad con los depredadores naturales, y por consiguiente que no afecten a la salud humana al obtener y consumir productos de campo inocuos.

En este proyecto se estudió a las alcanidas, estos son metabolitos secundarios que se encuentran en la mayoría de las plantas que pertenecen a nueve familias del reino vegetal, entre ellas las Asteraceas. Estos compuestos son elaborados por las plantas como mecanismos de defensa con acción sobre fitófagos; algunos elementos representativos de las Asteraceas que evidencian los efectos de las alcanidas son *Heliopsis longipes* (A. Gray) S. F. Blake, *Spilanthus acmella* L. y *Acmeilla radicans* (Jacq.) R. K. Jansen (**Ramírez-Chávez et al., 2011**).

Algunos autores han reportado que en sus bioensayos realizados con *Heliopsis longipes* y *Spilanthus acmella* mostraron efectividad biológica en insectos y ácaros respectivamente, ellos sugirieron que las plantas evaluadas pueden ser incluidas en la agricultura orgánica como parte de un control integrado de plagas, dado que no generan residualidad tanto en frutos como en el ambiente, además el tipo de alcanidas presentes en ambas especies mostraron selectividad en los organismos depredadores.

Por otro lado, *Raioella indica* Hirst (Acari:Tenuipalpidae) mejor conocido como el ácaro rojo de las palmas, es una plaga agrícola de reciente ingreso a nuestro país que se alimenta del cultivo de diferentes palmas y del vástago del plátano siendo sus hospederos principales, y que puede llegar a causar daños económicos de hasta un 87 % si no se tienen las medidas pertinentes

para su control. El ácaro rojo de las palmas se alimenta de las hojas del cocotero (*Cocos nucifera* L.) o de la planta del plátano (*Musa* spp.) tornándolas amarillentas por la pérdida de clorofila, derivando en clorosis generalizada y posterior necrosis, dando paso a la muerte de las hojas lo que provoca defoliación de la planta hospedera. Se han realizado acciones fitosanitarias contra este ácaro, sin embargo, se ha reportado que no se ha tenido éxito para su control, los acaricidas que han utilizado no han tenido el efecto deseado y se ha generado contaminación en el ambiente, por lo que autores sugieren el estudio de nuevos compuestos de origen vegetal que contribuyan al control de *R. indica*.

En este documento se propuso el estudio de *Acmella radicans* que es una planta arvense presente en nuestro país, que en estudios realizados se ha demostrado que contiene al menos siete alcanidas que pueden tener bioactividad sobre plagas que atacan plantas de interés alimenticio como es la palma del cocotero (**Ríos-Chávez et al., 2003**). Fuera de unos cuantos trabajos, hay poca información científica sobre la actividad biológica de *A. radicans*. La falta de planes de conservación, propagación y su crecimiento rápido de esta especie la hacen atractiva para los estudios de la síntesis de alcanidas y su aplicación alternativa en gran escala para el uso alimenticio y tratamiento de material agrícola como es el control de plagas.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL ÁCARO ROJO DE LA PALMA *Raoiella indica*

Plaga que recientemente entró a nuestro país en el año 2009, a través del Caribe, *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) o comúnmente llamado ácaro rojo de las palmeras, se considera una plaga severa que ataca al cocotero, a la planta del plátano, de igual forma a la palma del dátil y otras especies de palmas (**Peña et al., 2006**). Hirst en 1924 describió por vez primera al ácaro, el cual se diseminó de la India hacia el hemisferio oriental y en el 2004 se detectó en el Caribe donde su dispersión fue muy rápida (**Fletchmann & Etienne, 2004**), para el 2010 se encontraba presente en 33 países alrededor del mundo (**Estrada-Venegas, 2014**). Según la Norma Internacional de Protección Fitosanitaria No. 8 esta plaga se considera de importancia cuarentenaria (**Rengifo et al., 2018**).

Muestras de planta de coco que provenían de la Isla Mujeres indicaron la entrada de este ácaro en México, dando las primeras señales de alerta para su identificación en el estado de Quintana Roo. Debido a la introducción de esta plaga el SENASICA inició una “Campaña de Ácaro Rojo” en este estado en el año de 2010, tomando acciones para su identificación en viveros, hoteles, avenidas donde pudiera establecerse (**Estrada et al., 2012**). En nuestro país se hacen recorridos en la zona de influencia del ácaro rojo de las palmeras para su detección y establecer acciones para su control (**Estrada-Venegas, 2014**). Para el 2018 se registra una distribución de *R. indica* en 190 municipios de los estados de Campeche, Baja California Sur, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán (**SAGARPA-SENASICA, 2018**).

Los huéspedes, la biología y el potencial de daño de esta plaga en plantas es poco conocida debido a que cuando se establece se encuentra con nuevas condiciones ecológicas lo que hace que muestre variantes en su comportamiento y establecimiento en los nuevos hospederos. Sin embargo, se le asocia principalmente con la palma de coco (*Cocos nucifera*) pero también puede afectar a la planta del plátano (*Musa* spp.), en gran variedad de Araceas, y Heliconias (**Estrada-Venegas, 2014**).

R. indica es diseminado por el viento y se transfiere de una planta infestada a una sana, lo que hace que su dispersión sea muy fácil entre cultivos. También se propaga a través de las personas o animales que han tenido contacto con plantas infestadas. Cabe destacar que la hembra de esta especie se le considera la fase infectiva ya que no solo su reproducción es sexual si no también partenogénica arrenotóquica, es decir, los óvulos no fecundados producen solo machos y los fecundados producen hembras (**Kane et al., 2005**). El ácaro hembra oviposita de uno a seis huevecillos diariamente, la fecundidad total de una hembra oscila entre 27 y 162 huevos. Las hembras vírgenes producen una media de 18.4 huevos mientras que las fecundadas ovipositan un promedio de 22 huevecillos. Su ciclo biológico es de alrededor de 33 días (**SENASICA, 2016**).

El ácaro rojo de las palmeras se establece y reproduce en la parte baja de planta, ya sea en el cocotero u otro tipo de palma también así en la planta del plátano, lo hace en pequeñas colonias donde se observan todos los estadios de desarrollo y una gran cantidad de exuvias. Los ácaros se alimentan de las hojas tornándolas amarillentas por la pérdida de clorofila, cuando la población es alta este tipo de clorosis es generalizada, y si es severo el daño se produce necrosis en el tejido vegetal dando paso a la muerte de las hojas lo que provoca defoliación de la planta hospedera (**Rodríguez et al., 2007; Estrada et al., 2012**).

2.1.1 Morfología de *Raoiella indica*

Éste ácaro es de talla pequeña, las hembras son de forma ovalada y de color rojo carmín y pueden presentar manchas oscuras en la parte dorsal, miden 245 μ de longitud y 182 μ de ancho aproximadamente, en el histerosoma tienen pliegues y depresiones, como se observa en la Figura 1b; el cuerpo del macho es de menor tamaño el cual mide entre 220 a 230 μ de longitud por 140 a 150 μ de ancho, tiene forma alargada siendo la parte final de su cuerpo más estrecho, con un edeago largo y afilado (Figura 1a) (**Navia et al., 2005; Marjorie et al., 2006**).

El huevecillo al ser ovipositado por la hembra es adherido a la superficie de la hoja, este presenta un filamento en el extremo libre de su estructura, el cual puede contener una gota de agua en la punta, de longitud de 170 a 210 μ . Los huevecillos tienen una coloración rojo carmín

brillante lisa que conforme se acercan a la eclosión adquieren un tono blanco opaco (Rodríguez et al., 2007).



Figura 1- Hembra y macho adultos del ácaro rojo de la palma. a. Macho adulto de *R. indica*; b. Hembra adulta de *R. indica*. (Foto MVS).

2.1.2 Acciones fitosanitarias contra *Raoiella indica*

Desde la entrada de *R. indica* a nuestro país en el año 2009, el comité de Sanidad Vegetal ha implementado actividades de control y manejo de ésta plaga las cuales están establecidas en la Ley Federal de Sanidad Vegetal, la Norma Internacional de Protección Fitosanitaria No. 8 y las Reglas de Operación del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación vigentes, dichas acciones se encaminaron a la reducción del ácaro y minimizar sus efectos negativos en los diferentes hospederos, esto por medio de la detección oportuna, con el constante monitoreo en plantaciones de coco, plátano y viveros donde se produzca palma de coco y ornamentales, en donde se ha invitado a realizar buenas prácticas fitosanitarias como la poda de hojas basales de la palma, las cuales se incineran o entierran en fosas, también se realiza la aplicación de insumos químicos autorizados por la Cofepris (**Dirección General de Sanidad Vegetal, 2016**).

Dentro del manejo integrado se sumó el control químico en el cual se han utilizado insumos como abamectina (1.8 %) modo de acción: activadores de los canales de cloro, azufre elemental 750 g/L de ingrediente activo (IA), aceite mineral al 80 %, acequinocyl al 15.8 % modo de acción: inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial III, amitraz 21.74 % modo de acción: agonistas de los receptores de la octopamina, spirodiclofen 240 g/L de IA, modo de acción: inhibidores de la Acetil CoA Carboxilasa, spirodiclofen (222 g/L de IA) más abamectina (18 g/L de IA), y etoxazole 110 g/L, modo de acción: interfiere en la actividad normal de la hormona juvenil CHS1 (**SENASICA, 2016**). En las aplicaciones de cada producto químico se cuidó que en cada aspersión se realizara con diferentes ingredientes activos con distinto modo de acción, esto para evitar que el ácaro desarrollara resistencia a estos plaguicidas. Estos tratamientos se hicieron a intervalos de 30 días en cada aplicación (**Rengifo et al., 2018**).

Como resultado de estas aspersiones se encontró que spirodiclofen, siendo un acaricida, no tuvo el efecto esperado sobre *R. indica*, si no lo contrario, se incrementó en gran medida su población; la abamectina (insecticida y acaricida) aplicada si controló este tipo de plaga, sin embargo crea resistencia en las siguientes generaciones; el amitraz (insecticida y acaricida), también controla el desarrollo de los ácaros, sin embargo tienen una residualidad moderada en los suelos, debido a que es absorbido por los mismos contaminándolos y se lixivía lentamente. Por lo anterior **Rengifo et al. (2018)** sugieren la investigación sobre acaricidas orgánicos que no afecten la fauna benéfica, y que no contribuyan a la erosión de los suelos. En otro trabajo realizado por **Correa-Méndez et al. (2018)** reportaron que el control químico del acaro rojo de las palmas promueve que ésta plaga desarrolle resistencia debido a su corto ciclo de vida y al mal uso de los acaricidas sintéticos, lo que acorta la vida útil de los productos químicos.

2.2 METABOLISMO SECUNDARIO Y BIOACTIVIDAD DE PLANTAS

Las plantas son organismos sésiles y por ello están a merced de un ambiente hostil que engloba temperaturas cambiantes, escasez o exceso de agua y ataque de herbívoros y plagas. Las

reacciones químicas que tienen lugar dentro de los organismos vivos constituyen el metabolismo. Éstas además de tener un metabolismo primario, tienen la capacidad de elaborar metabolitos secundarios, construyen este tipo de compuestos para diversas funciones como son adaptación, atracción de polinizadores, y defensa contra fitopatógenos y plagas actuando como pesticidas naturales. Este tipo de metabolitos secundarios de plantas están agrupados en compuestos fenólicos, terpenos, glicósidos y alcaloides, los cuales han sido usados desde la antigüedad por el ser humano para su beneficio (**Ávalos y Pérez-Urria, 2009; González-López et al., 2016; Sharma y Arumugam, 2021**).

2.2.1 Terpenos

El grupo de los terpenos también llamados isoprenoides es el más numeroso, se han caracterizado más de 40 mil moléculas diferentes, aquí se pueden encontrar hormonas de crecimiento como citoquininas, giberelinas y el ácido abscísico, así como pigmentos y/o aceites esenciales siendo los responsables de los sabores y aromas que caracterizan a las plantas (**Ávalos y Pérez-Urria, 2009; González-López et al., 2016; Sharma y Arumugam, 2021**). Este tipo de compuestos se forman a partir de una unidad de cinco átomos de carbono llamada isopreno, conteniendo desde una unidad hasta ocho unidades o más con un arreglo lineal o cíclico. Dentro de este grupo de metabolitos secundarios podemos encontrar a los carotenoides, los cuales son tetraterpenos con función importante para los mamíferos ya que son precursores de la vitamina A.

En las plantas, los terpenos tienen funciones como pigmentos fotosintéticos (carotenoides), acarreadores de electrones (ubiquinona y plastoquinona), reguladores de crecimientos y desarrollo, y forman parte de la membrana celular como elementos estructurales. Estos compuestos son utilizados en la industria por sus distintas aplicaciones como saborizantes, colorantes, aromáticas, antitumorales, antioxidantes, antibióticos, insecticidas, etc. (**González-López et al., 2016**). Estudios ya han reportado la bioactividad de este tipo de compuestos, por lo que se mencionan algunos. **Ruiz-Jiménez et al. (2021)** usaron extracto de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), planta conocida por su alto contenido de azadirachtina sobre *R. indica*,

obteniendo un efecto letal del 90 %. **Pimienta-Barrios et al. (2008)**, mencionan que el ácido abscísico (ABA) (sesquiterpeno) brinda a las plantas tolerancia a varios tipos de estrés ya sea biótico o abiótico, como salinidad, sequía, altas temperaturas y ataques de fitopatógenos.

2.2.2 Fenoles

Este tipo de compuestos son los más abundantes en la naturaleza, encontrándose ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se han identificado hasta 8 mil, los podemos encontrar en las hojas, frutas y verduras que consumimos. Este tipo de metabolitos secundarios otorgan el sabor amargo y astringente a los vegetales, tienen actividad antibacteriana, anticancerígena y antiinflamatoria, protege contra el cáncer, diabetes, hipertensión, asma, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, etc. La función que tienen en las plantas es dar color a las flores, protegiéndolas de los rayos ultravioleta, también contribuyen a la protección contra fitopatógenos, así como daños mecánicos, físicos y químicos, los flavonoides que biosintetizan las plantas les ayuda como antibióticos, pesticidas naturales, participan como señales para la simbiosis con rizobios y atrayentes de polinizadores, finalmente son estructurales celulares para dar estabilidad a las mismas (**Shahidi & Naczki, 2004; Ayora y Gastélum, 2016**).

En el grupo de los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles o fenilpropanoides, contienen un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Dentro de los polifenoles podemos encontrar cumarinas, flavonoides, lignina y taninos (**Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Sharma & Arumugam, 2021**), algunas de estas moléculas ya han sido reportadas que tienen bioactividad sobre organismos, por ejemplo, **Cavalcanti et al., (2010)**, aplicaron aceite esencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) (orégano) que contenía timol y carvacrol, sobre araña de dos puntos (*Tetranychus urticae* Koch) y que tuvo efecto letal en el ácaro plaga. **Castillo-Sánchez et al. (2018)**, usaron extracto etanólico de hojas y semillas de *Brosimum alicastrum* sobre *R. indica*, obteniendo una repelencia del ácaro del 24 %, ellos mencionan que posiblemente este efecto haya sido por el alto contenido de fenoles de esta planta.

2.2.3 Glicósidos

Otro grupo son los glicósidos que hace referencia al enlace glicosídico, éste deriva de la condensación de una molécula de azúcar con otra que contiene un grupo hidroxilo, dentro de este tipo de compuestos se pueden encontrar saponinas, glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiacos y glucosinolatos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Sharma & Arumugam, 2021). Un ejemplo de este tipo de compuestos son las saponinas esteroidales, tienen una estructura formada por una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos unida a un núcleo hidrofílico, se han encontrado en más abundancia en la familia de las Agavaceas. Se ha demostrado que tienen actividad hemolítica, son tóxicos para ciertos organismos como los peces, tienen la propiedad de formar espumas en soluciones acuosas y pueden formar complejos del colesterol (Orestes, 2009).

Por otro lado los glicósidos cianogénicos (compuestos nitrogenados) por si solos no son tóxicos, sin embargo se degradan cuando la planta es prensada, acción que libera sustancias volátiles tóxicas como el cianuro de hidrogeno (HCN), un ejemplo, en semillas de frutos del género *Prunus*, éstas al ser aplastadas se genera un compuesto llamado amigdalina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

2.2.4 Alcaloides

Los alcaloides son moléculas heterocíclicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno (N) en su anillo cíclico dentro de su estructura. En este grupo se han caracterizado más de 15 mil compuestos que tienen en común uno o más átomos de N, son solubles en agua y por último presentan actividad biológica, se encuentran presentes en el 20 % de las plantas vasculares. Se ha demostrado que tienen actividad como relajante muscular, antitusivos, tranquilizantes y analgésicos. Los precursores para su biosíntesis son normalmente los aminoácidos como la histidina, lisina, triptófano, fenilalanina, ornitina y tirosina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009;

Sharma & Arumugam, 2021). En una evaluación realizada por **Zamora-Natera et al. (2008)**, utilizaron extracto crudo de semillas de *Lupinus mexicanus*, planta que contiene alcaloides, sobre hongos fitopatógenos (*Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*), observaron inhibición del crecimiento de los hongos hasta de un 88 %, mientras que para la germinación de las semillas de *Amaranthus hybridus* este tipo de compuestos mostró actividad fitotóxica.

En familias como Annonaceae, Berberidaceae y Menispermaceae, se han estudiado alcaloides bencilisoquinolínicos, los cuales se ha demostrado que tienen bioactividad sobre parásitos en humanos, siendo el alcaloide con mayor actividad la berberina. Una planta que se utiliza de forma tradicional para contrarrestar los efectos de la malaria es *Alburtisia villosa*, de la cual se aislaron tres alcaloides, uno de ellos cycleanina, siendo el más abundante y al cual le atribuyen el efecto antiparasitario (**Osorio et al., 2006**).

De acuerdo a la funcionalidad los alcaloides se subagrupan en clases como acridinas, amidas, aminas, benzyloisoquinolinas, canthinonas, imidazoles, indolquinazolininas, furoquinolinas, quinazolininas, indoles, quinolinas, isoquinolinas, pirrolidinas, piridinas, pirrolizidinas, tropanos, terpenoides, esteroides, péptidos, ciclopéptidos, poliaminas y pseudo-alcaloides. Recientemente se ha considerado otro tipo de compuestos dentro de los alcaloides y éstos son las alcamidinas o aquilamidinas (**Sharma y Arumugam, 2021**).

2.3 ALCAMIDAS

La familia Asteraceae, es una de las nueve familias donde algunos de sus géneros presentan alcamidinas, como el género *Acmella*. Este tipo de compuestos bioactivos son utilizados en la industria como nutraceuticos, como materia prima para cosméticos y en la industria farmacéutica, así como en la agricultura por su acción pesticida.

2.3.1 Biosíntesis de las alcanidas

Estos compuestos son metabolitos secundarios que surgen de la unión de un ácido graso más una amida y han sido identificadas más de 200 alcanidas con estructura química similar entre ellas (Figura 2). Las alcanidas o aquilamidas se forman a partir de dos rutas metabólicas (Ácido Shikímico y Acetil-CoA), y están compuestas por un ácido graso de cadena mediana a larga de ocho a dieciocho carbonos (ácido oleico, linoleico y linolénico), que se une a una amina proveniente de aminoácidos por descarboxilación (**Cortez-Espinosa et al., 2011**), que deriva en una alcanida olefinica o acetilénica; siendo las alcanidas escasas en la naturaleza y considerándose compuestos bioactivos (**Bruneton, 1995**). Las alcanidas olefínicas contienen dobles ligaduras en la cadena (Figura 3), mientras que las acetilénicas tienen por lo menos una triple ligadura acetilénica (Figura 4) (**Molina-Torres et al., 1999**). Tras la condensación de los precursores de las alcanidas dan lugar a nueve compuestos alifáticos y catorce compuestos aromáticos, considerándose restos de aminas con distinta estructura. El aminoácido valina es precursor de las alcanidas del grupo isobutilamidas, mientras que la isoleucina forma al grupo metilbutilamidas, la leucina es precursora del grupo isopentilamida, y por último la fenilalanina y la tirosina son utilizados en el metabolismo secundario de las plantas para la biosíntesis de las alcanidas del grupo fenilpropanoides (**Sharma & Arumugam, 2021**).

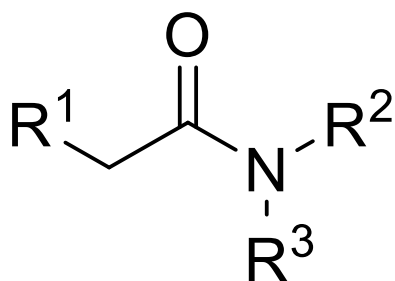


Figura 2.- Esqueleto molecular básico de las alcanidas (R₁=cadena de ácido graso; R₂=residuo derivado del aminoácido; R₃=H/CH₃/OCH₃/OH). (Tomada de **Boonen et al., 2012**).

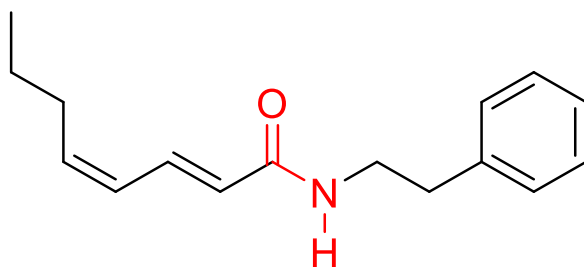


Figura 3.- Estructura de la alcanida olefínica ((2E,4Z)-N-(2-feniletil)-2,4-dien-octanamida) en *A. radicans* (Tomada de **Ramírez-Chávez et al., 2011**).

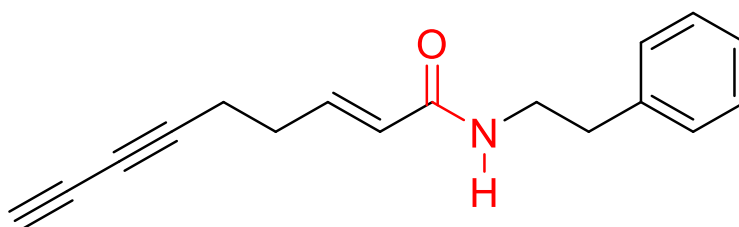


Figura 4.- Estructura de la alcanida acetilénica ((2E)-N-(2-feniletil)-2-en-6,8-diinonamida)) en *A. radicans* (Tomada de **Ramírez-Chávez et al., 2011**).

2.3.2 Bioactividad de las alcanidas

Estos compuestos tienen un efecto organoléptico parecido a la capsaicina (como picante), en la medicina tradicional, las plantas que contienen estos compuestos son utilizadas como anestésicos locales; también, en la agricultura han sido usadas como insecticida, fungicida, molusquicida y antimicrobiana (**Ramírez-Chávez et al., 2000; Molina-Torres y García, 2001; Ramírez-Chávez et al., 2004; González et al., 2011; Beltrán et al., 2015**), también tienen funciones en los tejidos vegetales como estimulador del crecimiento y regenerador (**Ramírez-Chávez et al., 2004; Hernández, 2009**). De forma general las alcanidas han exhibido gran actividad biológica como antioxidante, antiproliferativo, gastroprotector, vasorelajante, diurético, inmunomodulador, antiinflamatorio, antimicrobiano, inhibidor de enzimas, insecticida y larvicida, propiedades por lo que la industria alimentaria, farmacéutica,

cosmética y de la salud han puesto su atención en este tipo de moléculas (**Sharma & Arumugam, 2021**).

Las alcanidas han mostrado acción tóxica y paralizante en insectos (**Hernández-Morales et al., 2012**). En trabajos realizados por **Ríos-Chávez et al., (2003)**, demostraron que la planta *Acmella radicans* var. *radicans* contiene metabolitos secundarios del tipo alcanidas, donde sugirieron que su actividad biológica podría ser potencialmente un pesticida. Por otro lado, **Beltrán et al., (2015)**, realizaron un bioensayo con extracto etanólico de raíces de *Heliopsis longipes* (Asteraceae) el cual aplicaron sobre ninfas del áfido *Bactericera cockerelli* Sulc, obteniendo un resultado del 100 % de mortalidad de este organismo en 24 h, demostrando el efecto insecticida de las alcanidas contenidas en esa planta. **Rabelo et al., (2019)**, en su bioensayo (*in vitro*) realizado sobre el ácaro de la palma, usando extracto etanólico de *Spilanthes acmella* (Asteraceae), planta nativa de Brasil, demostraron la toxicidad, repelencia y reducción de crecimiento poblacional sobre el ácaro, además de la selectividad plaga-depredador.

De manera similar **Pandey et al. (2007)**, demostraron que las alcanidas contenidas en tres diferentes especies del género *Spilanthes* paralizan y causan la muerte de las larvas del mosquito vector de la malaria (*Anopheles* spp.). **Cruz et al. (2016)**, utilizaron extracto metanólico de *Acmella oleracea* sobre *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor nitens* obteniendo una mortalidad del 100 % con una concentración de 3.1 g/L y 1.6 g/L respectivamente.

Algunos autores mencionan el modo de acción de la afinina así como de (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-9-fenilnona-2,6,8-trienamida y (2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*)-*N*-isobutil-11-(3-trifluorometilfenil)-undeca-2,4,8,10-tetraenamida, compuestos que han demostrado afecta el sistema nervioso central y los canales de sodio en las terminales nerviosas, esto en cucarachas (*Periplaneta americana*) (**Habsah et al., 1989**). En un estudio realizado por **Anholeto et al. (2017)**, donde utilizaron la planta *A. oleracea*, sobre *Amblyomma cajennense*, observaron alteraciones morfológicas en las células del complejo glandular, una mayor vacuolización citoplasmática en las células secretoras y niveles reducidos de polisacáridos, lipoproteínas y glicoproteínas, esenciales para la maduración funcional de los espermatozoides.

2.4 *Acmella radicans*

Dentro del género *Acmella* existen 30 especies de hierbas tropicales que emergen de forma anual o también pueden ser perennes (**Jansen, 1985**). *Acmella radicans* (Jacq.) R. K. Jansen (Asteraceae), es una planta arvense tropical, de vegetación secundaria derivada del bosque caducifolio, con preferencia por hábitat húmedo y orillas de cuerpos de agua. Su proliferación inicia en el mes de septiembre prolongándose hasta enero, siendo su propagación por semilla principalmente (**CONABIO, 2011**).

Está presente en nuestro país y se distribuye desde el noroeste de México (Chiapas, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, y Zacatecas), hasta al norte de Sudamérica, ésta planta fue introducida a Cuba, Curacao, India y Tanzania. Tiene sinonimias como *Sanvitalia longepedunculata* M. E. Jones, *Spilanthus botterii* S. Wats., y *Sapilanthus radicans* Jacq. (**CONABIO, 2011**).

Antes de la llegada de los europeos a Mesoamérica, estas especies vegetales eran usadas en la cocina y la medicina tradicional Nahuatl (**Fisher, 1957**). Algunos de sus nombres comunes son aceitilla, botoncillo y hierba de la muela debido a que se usa de forma tradicional como anestésico para aliviar inflamaciones de las encías (**CONABIO, 2011**).

2.4.1 Descripción botánica de *Acmella radicans*

Acmella radicans var. *radicans* tiene una altura de alrededor de un metro. Su tallo es simple o ramificado, glabro a moderadamente piloso. Sus hojas con peciolo de 0.5 a 4.5 cm de largo, angostamente alado, lámina foliar ovada a lanceolada de 1 a 8 cm de largo por 0.5 a 7 cm de ancho, su ápice agudo u obtuso, base cuneada a redondeada, con tres nervaduras principales de textura membranácea, glabra a esparcidamente pilosa en ambas superficies. Sus inflorescencias son cabezuelas en grupos de 2 a 3 axilares y terminales, solitarias o fasciculadas, casi siempre en grupos de 3, 6 a 11 mm de largo y 5 a 9.5 mm de ancho, numerosas y con forma de panícula, pedúnculos de 1.5 a 6.5 cm de largo; involucro turbinado a cortamente campanulado, las brácteas dispuestas en 2 series, elípticas o lanceolado-ovadas, de 3.5 a 6.5 mm de largo,

receptáculo fusiforme a muy angostamente cónico, de 6 mm de largo, páleas oblongas de 3.5 a 5 mm de largo y 0.5 a 1 mm de ancho, pajizas a color púrpura (Figura 5a y b) (**Rzedowski y Rzedowski, 2008; CONABIO, 2011**).

Las flores son liguladas ausentes, ocasionalmente de 5 a 7, de 2 a 2.5 mm de largo, blancas o blanco-verdosas; flores del disco de 50 a 150, con corolas tubulosas, tetrámeras, de 1.5 a 2.5 mm de largo, blancas o blanco-verdosas, anteras de 0.5 mm de largo. Sus frutos son aquenios de las flores marginales triquetros, angostamente obovados de 2 a 3 mm de largo, negros, márgenes densamente ciliados y corchosos, glabros o pilósulos en las caras, vilano de 1 a 3 cerdas de 0.5 a 1.5 mm de largo o ausente, como se observa en la Figura 5c, d, e y f. Se debe aclarar que es una especie muy variable en cuanto a su descripción (**Rzedowski y Rzedowski, 2008; CONABIO, 2011**).

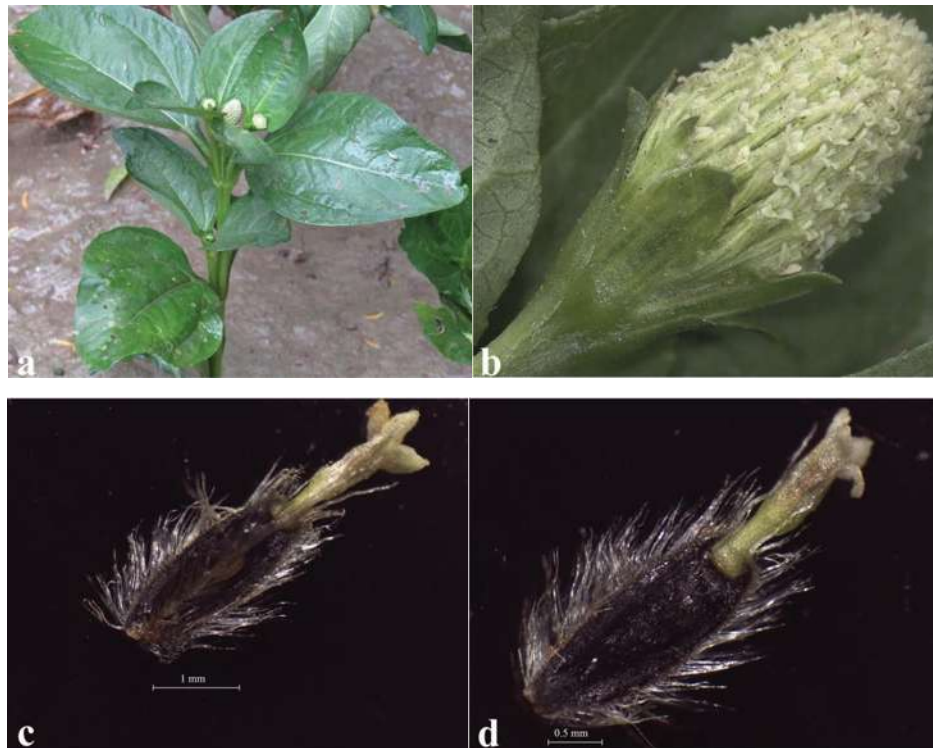




Figura 5.- *Acmella radicans* var. *radicans*. a. Hábito; b. Capitulo; c. Florete marginal; d. Florete interior; e. Cypsela marginal; f. Cypsela interior (Tomada de **Debabrata et al., 2017**).

2.4.2 Taxonomía de *Acmella radicans* (Tomada de CONABIO, 2011)

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermetophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Acmella*

Especie: *A. radicans* (Jacq.) R. K. Jansen

2.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A la cromatografía se le ha descrito como el método físico de separación que ayuda a la caracterización de mezclas complejas, se conjunta de varias técnicas basadas en el principio de retención selectiva a través de una fase móvil (líquido, gas o fluido supercrítico) y una fase

estacionaria (sólido o líquido), con la finalidad de separar los componentes de una muestra, permitiendo identificar y cuantificar dichos componentes. (Pássaro et al., 2016; Corzo, 2019). Para la separación, identificación y cuantificación de las alcanidas se han utilizado diversos métodos, como TLC (cromatografía de capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) y GC-MS (cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas).

2.5.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

TLC (Thin Layer Chromatography) o cromatografía de capa fina es una técnica de análisis químico cualitativo rápida utilizada en Química Orgánica, que ayuda a la separación de los compuestos de una muestra. Su principio consiste en la adsorción entre dos fases, donde la separación de los analitos se realiza de acuerdo con los coeficientes de reparto de las moléculas de la muestra, es decir mediante la diferencia de velocidad a la que son movidos por la fase móvil a través de la fase estacionaria. Los productos de este análisis pueden ser identificados por sus colores o por la fluorescencia, conjuntamente con los valores del factor de retención (R_f), que se determinan con la siguiente fórmula $R_f = D_s/D_f$, donde el factor de retención es igual a la distancia recorrida por la solución entre la distancia recorrida por el solvente. Esta herramienta ayuda a determinar el grado de pureza de los compuestos, identificar y comparar analitos, y permite el seguimiento de una reacción (Pássaro et al., 2016; Corzo, 2019; Vallejo-Rosero et al., 2021).

El gel sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3) son los adsorbentes más utilizados, ambos polares, en el caso del gel sílice, de carácter ácido, se usa para la separación de compuestos lipofílicos como esteroides, terpenoides, alcaloides, aminoácidos, fenoles, ácidos grasos, cetonas y aldehídos. Mientras que la alúmina, de carácter alcalino, se usa para la separación de compuestos como vitaminas liposolubles, aminas, alcaloides e hidrocarburos policíclicos. Las interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente son las responsables del proceso de adsorción, siendo el adsorbente inerte para evitar que actúe como catalizador en reacciones de descomposición. La fase móvil constituida por los eluyentes, va a depender del tipo de compuestos que se quieran separar, teniendo en cuenta la naturaleza

química de la muestra, utilizándose un sistema de solventes de diferentes polaridades cuando una fase móvil pura no separa eficientemente los componentes de la muestra (**Corzo, 2019**).

Mbeunkui et al. (2011) mencionan que por medio de la cromatografía de partición centrífuga obtuvieron una mayor recuperación de alcaloides de extracto de flores de *S. acmella*, en comparación con los métodos TLC y cromatografía de columna. Por otro lado, **Ríos-Chávez et al. (2003)**, ellos utilizaron TLC para la identificación de la afinina de *A. radicans*, determinando un Rf (Factor de retención) de 0.7.

2.5.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica que tiene capacidad de separar y analizar analitos de naturaleza distinta de una mezcla, indicada para compuestos poco volátiles, iónicos y termolábiles; puede aplicarse en farmacéutica, bioquímica, química, industria de los alimentos, medicina clínica, química forense, entre otros. En ella se encuentran la fase móvil y la fase estacionaria, inmiscibles entre sí, y la muestra de interés. Siendo la fase móvil líquida y tiene como función acarrear la muestra a través de la fase estacionaria, esta última puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Su principio consiste en que las diferentes fuerzas química y física que participan entre la mezcla y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes que en ella se encuentran. Los analitos con menor afinidad con la fase estacionaria se moverán con mayor velocidad comparados con aquellos que presentan mayor afinidad a dicha fase (**Suárez y Morales, 2018; Ruiz, 2020**).

El HPLC presenta un amplio rango de aplicabilidad por la disponibilidad de equipos existentes, se obtiene una alta precisión en los resultados, cuenta con diferentes técnicas como la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico o exclusión molecular, se puede modificar con facilidad los gradientes en la fase móvil, las fracciones separadas pueden recolectarse haciendo esta técnica de preparación o purificación de muestras, el tiempo de separación puede ser menor a 30 min por muestra y en análisis cuantitativos existe la reproducibilidad (**Suárez y Morales, 2018; Ruiz, 2020**).

Para la identificación y cuantificación de alcanidas de extractos crudos ha sido muy utilizado el HPLC fase reversa, se ha usado gran gama de combinaciones en los parámetros entre la fase móvil y la tasa de flujo, un ejemplo, el acetonitrilo en combinación con agua en proporciones variables dieron como resultado un tiempo de retención variable entre 4.97 y 64.2 min para la afinina ((2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida). Otras alcanidas identificadas y cuantificadas por este método son (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-undecadiena-8,10-dienamida y (2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*)-*N*-isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenamida (Sharma et al. 2011; Sharma & Arumugam, 2021).

Extractos etanólicos analizados por HPLC demostraron que el contenido de afinina fue bajo (0.99 mg/g) en cultivos de callo de hoja de *S. acmella* comparado con los cultivados *in vitro* (3.29 mg/g) y recolectados de campo (2.70 mg/g) de la misma planta (Singh & Chaturvedi, 2012).

2.5.3 Cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS)

Para la separación de mezclas complejas se utiliza la cromatografía la cual es una técnica analítica que permite la separación de dichas mezclas, esta se basa en la interacción físico-química de los analitos que son llevados a través de una fase estacionaria por una fase móvil. Para el análisis en el cromatógrafo de gases se usa un gas inerte (generalmente helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono dependiendo del detector del equipo) con una fase estacionaria contenida en una columna capilar, donde los compuestos son separados de forma diferencial y eluyen en distintos tiempos, para enseguida ser analizados por el detector. Por otro lado, la espectrometría de masas es una técnica que ayuda a determinar cómo se encuentran distribuidas las moléculas de los compuestos analizados de acuerdo con su masa. Este dispositivo analiza con precisión la composición de distintos elementos químicos e isótopos atómicos, el cual separa los iones de los compuestos en función de la relación masa/carga (m/z) (Varela et al. 2018).

Es de uso común el acoplamiento de un cromatógrafo de gas con un espectrómetro de masa para el análisis de muestras que pueden contener compuestos volátiles o semivolátiles, es un

sistema de alta sensibilidad, con un proceso confiable, de bajo costo en relación con el gasto de reactivos y en un tiempo reducido. Los resultados sirven para la identificación de compuestos los cuales se pueden comparar con los datos que existen en bibliotecas de masas espectrales. Otro beneficio de este sistema es que permite realizar en una sola operación el análisis cualitativo y cuantitativo de una muestra de 1 μ L, y si se dispone de un estándar, se puede obtener el análisis cuantitativo exacto de los compuestos de dicha muestra. En cuanto a las proyecciones de escalamiento de producción, diseño de planta y equipos necesarios, el sistema GC-MS ayuda la determinación del rendimiento de extracción a nivel de laboratorio (Ricaldi y Martínez, 2014; Varela et al. 2018).

Esta técnica cromatográfica GC-MS, es la segunda más empleada para la identificación y cuantificación de fito-constituyentes del género *Spilanthes*. Alto contenido de afinina se ha cuantificado de tallo, hojas, flores y raíz de cultivos *in vitro* y de flores en cultivos de campo, (Ríos-Chávez et al., 2003; Días et al., 2012).

2.6 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear consiste en medir la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias (4 a 900 MHz). A diferencia con las técnicas ultravioleta, visible e infrarroja, los núcleos de los átomos (^1H , ^{31}P , ^{19}F y ^{13}C) son los que intervienen en dicha absorción, lo que ayuda para la dilucidar las estructuras de las especies químicas y a determinarlas cuantitativamente. El espectro de RMN utilizado en conjunto con los espectros de ultravioleta, masa, e infrarrojo, puede ser una herramienta indispensable para la identificación de compuestos puros (Douglas et al., 2008; Laurella, 2016). Permite la optimización de los parámetros para la cuantificación de biomoléculas muy complejas como polisacáridos y glicoproteínas, elucidar la estructura de impurezas, dar seguimiento a la descomposición de un producto, determinar el contenido de solventes residuales y determinar las relaciones molares entre los diferentes productos de una mezcla, este tipo de análisis no requiere la destrucción de la muestra (Garrido et al., 2013).

En cuanto a la preparación de la muestra, se deben tener los materiales adecuados, como tubos para RMN, pipetas, espátulas, etc. limpios y secos, el disolvente elegido no debe de interferir con las señales del analito. La viscosidad de la muestra debe ser baja y homogénea para que haya buena resolución del espectro final. Los disolventes que se emplean dependen de la polaridad de la muestra, si son apolares se usa cloroformo deuterado (CDCl_3) y para muestras polares metanol deuterado (Metanol d_4) o agua deuterada (D_2O) (**Garrido et al., 2013**).

Esta técnica RMN, es elegida debido a que facilita la determinación de la estructura geométrica y la configuración de las alcanidas (**Sharma & Arumugam, 2021**). **Ríos-Chávez et al. (2003)** caracterizaron por este método dos tipos de alcanidas ((*2E*)-*N*-isobutil-2-decamonoenamida y *N*-isobutil decanamida) en el extracto de *A. radicans*. De igual forma **Nakatani & Nagashima (1992)** caracterizaron cuatro alcanidas ((*2E,6Z,8E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida), (*2E*)-*N*-(2-metilbutil)-2-undecena-8,10-dienamida, (*2E,7Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadiena-10,12-dienamida, y (*7Z*)-*N*-isobutil-7-tridecena-10,12-dienamida) de la planta *S. acmella* var. *oleracea*.

2.7 JUSTIFICACIÓN

Basados en la problemática ya descrita, es importante considerar como una alternativa viable a los compuestos del tipo alcanidas presentes en las plantas para el control de ácaros que dañan a los cultivos dando oportunidad a nuevos descubrimientos sobre pesticidas eficientes para el control de plagas.

Se ha demostrado que las alcanidas contenidas en *S. acmella* tienen antecedentes de contar con componentes de interés con capacidad acaricida siendo el punto de partida para proponer alternativas como *A. radicans*, planta presente en nuestro país y considerarla en la agricultura orgánica por sus metabolitos secundarios no residuales que podrían tener actividad acaricida.

III HIPÓTESIS

Acmella radicans contiene componentes que tienen actividad biológica en ácaros plaga de plantas de importancia alimenticia.

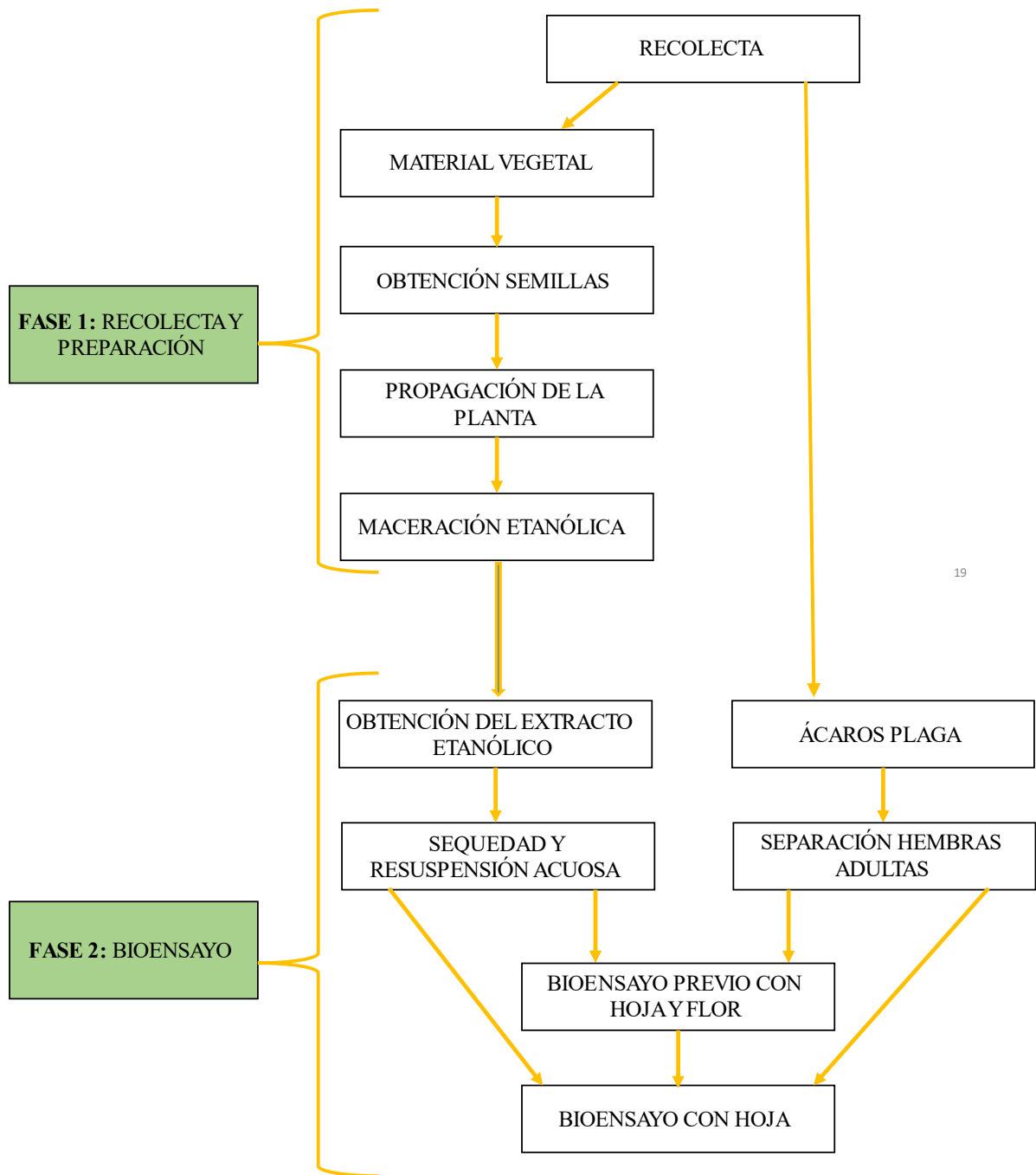
IV OBJETIVO GENERAL

Extraer principios activos de *Acmella radicans* y evaluar sus efectos en ácaros de plantas de importancia alimenticia.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

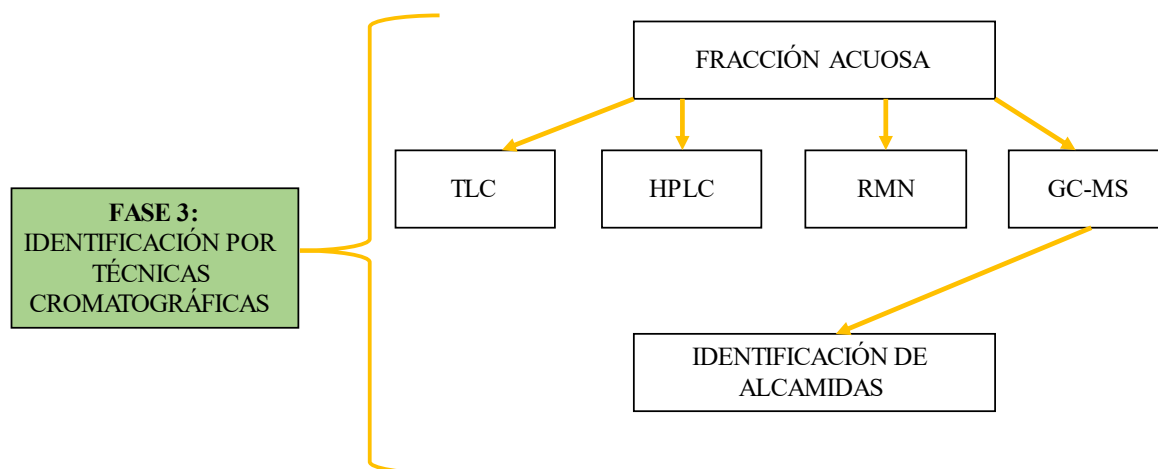
- Ubicar, recolectar y propagar plantas de *Acmella radicans*.
- Establecer un protocolo para la extracción de alcaloides de *Acmella radicans*.
- Evaluar el efecto letal (mortalidad) con la fracción acuosa de alcaloides de *Acmella radicans* sobre *Raoiella indica* y determinar la CL₅₀.
- Identificar las posibles fracciones con bioactividad por técnicas cromatográficas.

V MATERIALES Y MÉTODOS



19

25



31

Figura 6.- Diagrama de flujo de trabajo.

5.1 RECOLECTA DE MATERIAL VEGETAL

La recolecta de las plantas de *A. radicans* se llevó a cabo de acuerdo con lo recomendado por la literatura. Se cortaron y se llevaron al Laboratorio de Bromatología, se lavaron y separaron los órganos de la planta (hojas, flores, tallos y raíz), se colocaron sobre una mesa para el secado a temperatura ambiente durante 7 días aproximadamente, enseguida el material vegetal seco se colocó en contenedores plásticos para su posterior uso. Las semillas se usaron para la propagación de la planta (**Ricker y Rincón, 2013**).

5.2 PROPAGACIÓN DE PLANTA DE *Acmella radicans*

Debido a que la planta de *A. radicans* es anual, se determinó propagarla por semilla con el propósito de tener planta todo el año. Se usó materia orgánica mezclada con suelo andosol (50/50) como sustrato llevado a capacidad de campo. Se realizó la siembra de las semillas en cajas de madera (40 x 25 cm) de forma somera. Se llevaron a invernadero dando riego solo con agua corriente cada tres días.

5.3 RECOLECTA DE ÁCARO *Raoiella indica*

Con la orientación de la Dra. Margarita Vargas Sandoval, se recolectaron ácaros de *R. indica*, de hojas de palma ornamental infestada en el mes de marzo de 2020 en la comunidad de Lombardía, Michoacán, México (19°01'30"N 102°05'39"O). Se observaron las hojas con ayuda de una lupa y se eligieron las que presentaron mayor infestación por la plaga. Se cortó cada foliolo con ayuda de unas tijeras y se metieron en bolsas plásticas ziploc, se colocaron en una bolsa negra posteriormente. Los ácaros se dejaron en las mismas hojas-reservorios, se metieron a refrigeración a 4 °C para su conservación y posterior uso en bioensayos.

5.4 EXTRACCIÓN ETANÓLICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Acmella radicans*

Debido a la variabilidad que reportan diferentes autores (**Ríos-Chávez et al., 2003; Cortez-Espinosa et al., 2011; González et al., 2011; Beltrán et al., 2015**), fue importante establecer un protocolo para la extracción de las alcanidas, proponiendo diferentes tiempos de maceración.

La extracción etanólica (EE) se realizó a partir de diferentes órganos de *A. radicans* (flores, hojas, tallos y raíz) todos deshidratados y pulverizados en mortero, el polvo se colocó en frascos plásticos oscuros con etanol absoluto como solvente en una proporción de 1:30 p/v, se sometieron a sonicación por 10 min. La mezcla se dejó por 3 y 7 días a temperatura ambiente (3 repeticiones por cada tiempo y por órgano) sobre un oscilador orbital. Pasado los días establecidos, se filtró el extracto crudo a través de un papel filtro, se determinó su rendimiento colocando 3 mL de cada frasco en un tubo de ensaye y se dejó a sequedad dentro de un horno de convección a 50 °C durante cuatro días hasta obtener peso constante.

5.5 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ACUOSA PARA BIOENSAYO PREVIO

Para la obtención de la fracción acuosa que se utilizó en el bioensayo previo, se llevaron a sequedad 200 mL de EE de *A. radicans* de hoja y flor por separado en rotavapor (45 °C, 60 rpm), se resuspendió la biomasa en 20 mL de agua destilada, se calculó la concentración siendo de 727 mg / 20 mL para hoja y 1011 mg / 20 mL para flor, a partir de estas fracciones se calcularon y tomaron las concentraciones para los tratamientos.

5.6 BIOENSAYO PREVIO DEL EFECTO ACARICIDA

Con la finalidad de elegir un órgano en específico de la planta de *A. radicans* para el bioensayo, se consultó diferentes trabajos (Stashenko et al., 1996; Ríos-Chávez et al., 2003; Crouch et al., 2005; Singh & Chaturvedi, 2012; Simas et al., 2013; Castro et al., 2014; Rabelo et al., 2019) en los que se encontró que utilizaron mayormente la hoja de la planta, por lo que se decidió realizar un bioensayo previo para evaluar el efecto acaricida de los compuestos contenidos tanto en hoja como en flor.

Para este bioensayo previo se utilizó la fracción acuosa de hoja y flor de *A. radicans*, se realizaron cuatro tratamientos a diferentes concentraciones: 16, 8, 4, y 2 mg/mL respectivamente de hoja y flor combinados (HF16, HF8, HF4 y HF2); dos tratamientos de hoja y flor sin combinar con una concentración de 16 mg/mL cada uno (H16 y F16) y con tres variantes en tiempo de aplicación (0, 24 y 48 h). Los datos obtenidos fueron comparados con un testigo regional marca Bovitraz^{MR} al 12.5 %, siendo ingrediente activo la amidina amitraz (TR), un testigo negativo alcohol al 96° y agua (TN), y un testigo absoluto agua (TA), como se observa en el Cuadro 1. Cada tratamiento contó con diez repeticiones, y en cada repetición se colocaron (caja Petri) 10 hembras adultas de los ácaros *R. indica*, para este procedimiento se usó un estereoscopio y pinceles de cerda fina (00).

Enseguida se asperjaron las cajas Petri con los ácaros, con los tratamientos propuestos con ayuda de aspersores manuales, dos disparos (0.116 mL por disparo) por caja a una distancia de

10 cm, según los tiempos de aplicación. Los parámetros evaluados fueron mortalidad (conteo a las 24 h, 48 h y 72 h), considerándose muertos los ácaros que no consiguieron caminar una distancia superior al tamaño de su cuerpo cuando se estimularon con un pincel (**Rodríguez et al., 2011; Rodríguez-Montero et al., 2020**).

Cuadro 1.- Tratamientos propuestos para el bioensayo previo.

Tratamiento	+IA	Concentración en Solución	Concentración por Aplicación
*HF16	Extracto A. <i>radicans</i>	16 mg/mL	3.712 mg
HF8	Extracto A. <i>radicans</i>	8 mg/mL	1.856 mg
HF4	Extracto A. <i>radicans</i>	4 mg/mL	0.928 mg
HF2	Extracto A. <i>radicans</i>	2 mg/mL	0.464 mg
*H	Extracto A. <i>radicans</i>	16 mg/mL	3.712 mg
*F	Extracto A. <i>radicans</i>	16 mg/mL	3.712 mg
TR	Amitraz 12.5 %	1.7 µL/mL	0.0493 mg
TN	Etanol 96°+Agua destilada	1µL/mL	232.00 µL
TA	Agua destilada	-	-

*HF=hoja y flor, H=hoja, F=flor

+IA=Ingrediente Activo

5.7 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN ACUOSA PARA BIOENSAYO

Para la obtención de la fracción acuosa que se utilizó en el bioensayo, se llevaron a sequedad 200 mL de EE de *A. radicans* de hoja en rotavapor (45 °C, 60 rpm), se resuspendió la biomasa en 20 mL de agua destilada, se calculó la concentración (1009 mg / 20 mL), a partir de esta fracción se calcularon y tomaron las concentraciones para los tratamientos del bioensayo.

5.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA

Se realizaron cinco tratamientos a diferentes concentraciones de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans*: 32, 16, 8, 4, y 2 mg/mL respectivamente (Ar32, Ar16, Ar8, Ar4 y Ar2); con tres variantes en tiempo de aplicación 0, 24 y 48 h. Los datos obtenidos fueron comparados con un testigo regional marca Bovitraz^{MR} al 12.5 %, siendo ingrediente activo la amidina amitraz (TR), un testigo negativo alcohol al 96° y agua destilada (TN), y un testigo absoluto agua destilada (TA), como se observa en el Cuadro 2. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones, se colocaron en cada caja Petri 10 hembras adultas de los ácaros *R. indica*, para este procedimiento se usó un estereoscopio y pincel de cerda fina (00). Enseguida se asperjaron las cajas Petri con los ácaros, con los tratamientos propuestos con ayuda de aspersores manuales, dos disparos (0.116 mL por disparo) por caja a una distancia de 10 cm, según los tiempos de aplicación.

El parámetro evaluado fue el efecto letal (mortalidad) (conteo a las 24, 48 y 72 h), considerándose muertos los ácaros que no consiguieron caminar una distancia superior al tamaño de su cuerpo cuando se estimularon con un pincel (**Rodríguez et al., 2011; Rodríguez-Montero et al., 2020**). La determinación de la concentración media letal (Cl₅₀) se realizó con la cinética de la mortalidad utilizando el análisis Probit, la Cl₅₀ es una medida que ayuda a evaluar el efecto tóxico de sustancias al medio ambiente, parámetro que significa que al exponerse los organismos a al compuesto tóxico muere el 50 % de ellos en un tiempo determinado (**Vázquez-Villegas et al., 2018**).

Cuadro 2.- Tratamientos propuestos para bioensayo.

Tratamiento	+IA	Concentración en Solución	Concentración por Aplicación
*Ar32	Extracto A. <i>radicans</i>	32 mg/mL	7.424 mg
Ar16	Extracto A. <i>radicans</i>	16 mg/mL	3.712 mg
Ar8	Extracto A. <i>radicans</i>	8 mg/mL	1.856 mg
Ar4	Extracto A. <i>radicans</i>	4 mg/mL	0.928 mg
Ar2	Extracto H. <i>longipes</i>	2 mg/mL	0.464 mg
TR	Amitraz 12.5 %	1.7 µL/mL	0.0493 mg
TN	Etanol 96°+Agua destilada	1µL/mL	232.00 µL
TA	Agua destilada	-	-

*Ar=*Acmella radicans*, +IA=Ingrediente Activo

5.9 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE BIOACTIVIDAD ACARICIDA DE *Acmella radicans*

5.9.1 Separación de los compuestos de la fracción acuosa extraídos de *A. radicans* en cromatografía de capa fina

Con la finalidad de realizar la separación de los compuestos de las fracciones acuosas de hoja y flor de *A. radicans* y raíz de *H. longipes*, e identificar las posibles fracciones de los extractos,

se utilizó el método de TLC según metodología modificada de **Ríos-Chávez et al., (2003)**. Primero se cortaron placas de gel sílice (TLC Sílica gel 60 F254) de 5 x 10 cm, se marcó con lápiz la línea de inicio y el frente, con ayuda de tubos capilares se tomó muestra de los extractos fase acuosa de hoja y flor de *A. radicans* y raíz de *H. longipes* como referente, dichas muestras se puntearon sobre el gel sílice (6 veces), se tomó la placa y se colocó dentro de una cámara de cristal que contenía el sistema de solventes hexano:acetato de etilo en proporción 72 / 28 %, para la revelación de las franjas obtenidas se colocaron dentro de una cámara de yodo por cinco minutos, ya reveladas se señalaron con lápiz y se calculó el R_f con la fórmula $R_f = D_s/D_f$, donde el factor de retención es igual a la distancia recorrida por la solución entre la distancia recorrida por el solvente.

5.9.2 Separación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en cromatografía líquida de alto rendimiento

El siguiente proceso se realizó en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Debido a que se observaron fracciones interesantes en la TLC realizada, se sugirió utilizar el método de HPLC (**Rabelo et al., 2019**) para la separación e identificación de los posibles compuestos de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* con actividad acaricida. Se tomaron 50 mL de EE de hoja de *A. radicans*, se llevó a sequedad en un rotavapor (IKA RV10), se resuspendió con 120 mL de agua grado HPLC, quedando con una concentración de 8.48 mg / mL, enseguida se filtró con acrodiscos, se tomó 1.18 mL el cual se aforó hasta 10 mL con agua grado HPLC quedando a una concentración de 1 mg / mL. Para los dos viales que se utilizaron, se tomó 1.5 mL de cada dilución y se colocaron dentro de los carriles 1 y 2 del HPLC.

Los viales mencionados se colocaron dentro de los carriles 1 y 2 del HPLC (Agilent Technologies, Modelo 1260 Infinity, detector de diodo, C18), previamente se sonicaron los

solventes por 20 minutos en ultrasonido (BRANSON 1510), agua (M TEDIA Water HPLC, CAS 7732-18-5) y metanol (M TEDIA Methyl Alcohol HPLC/Spectro, CAS UN1230). Enseguida se establecieron las siguientes condiciones para realizar la cromatografía, 10 µL de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans*, por 15 min, con un flujo 1.3 mL / min, con sistema de solventes metanol:agua en un gradiente 40 / 60 %.

5.9.3 Análisis de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en resonancia magnética nuclear

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Síntesis Orgánica las cuales se llevaron al Laboratorio Nacional de Resonancia Magnética Nuclear, ambos laboratorios pertenecientes a la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Debido a que se observaron fracciones interesantes en la TLC realizada, se sugirió utilizar el método de RMN (**Ríos-Chávez et al., 2003**) para la identificación de los posibles compuestos de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* con actividad acaricida. Se tomó una muestra de 50 mL de EE de hoja, se llevó a sequedad en rotavapor, se resuspendió la biomasa con 30 mL de agua destilada, se tomaron 5 mL, se colocaron en otro matraz para llevar a sequedad, se colocó en bomba de vacío para extraer restos de agua, con ayuda de una pipeta Pasteur se introdujo una alícuota de agua deuterada (Deuterium oxide, 99.9 atom % D, Aldrich Chemistry), se colocó la mezcla dentro de un tubo para RMN y se aforó hasta alcanzar los 4 mL, para su posterior análisis.

5.9.4 Separación e identificación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas

El siguiente proceso se realizó en el Cinvestav Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Con la finalidad de identificar los compuestos de tipo alcaloides con la posible actividad acaricida, se sometió a análisis por medio de GC-MS (**Ramírez-Chávez et al., 2011**) la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* utilizada en el bioensayo. Se inyectó un microlitro de la fracción acuosa en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 5975, equipado con una columna capilar de sílice fundida DB1MS de 60 m x 250 μm (I.D.), 0.25 μm de espesor de película DB1MS (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, EUA), conectada a un 5975C de Agilent Technologies detector de espectrofotómetro de masas cuadrupolo. Se utilizó una relación de inyección 1:100. La temperatura del puerto de inyección se ajustó a 230 °C. La temperatura del horno se programó de 70 a 300 °C, a 5 °C /min y la línea de transferencia se calentó a 230 °C. La fuente de iones se fijó a 150°C y el cuadrupolo a 230°C.

El gas portador de helio tenía un caudal de 1.0 mL/min y una presión de cabeza de columna de 12 psi. El espectrómetro de masas se operó en el modo de impacto de electrones (EI) a 70 eV escaneando el rango 33-300 m/z en un ciclo de 3^s, en un modo de adquisición de escaneo completo. La identificación de compuestos volátiles se logró comparando los tiempos de retención de GC y los espectros de masas con los de los compuestos estándar puros, cuando estaban disponibles. Los espectros de masas se compararon con el Wiley (G1035B; Rev D.02.00; Agilent Technologies Santa Clara CA EE. UU.) y Nist (Nist Mass Spectral Search Program; versión 2.0f, Nist Data Center Gaithersburg, MD, EE. UU) bibliotecas de referencia del banco espectral. Los datos de las áreas de pico GC obtenidos se utilizaron como un enfoque para estimar el contenido relativo de cada componente.

5.10 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis estadístico se hizo una matriz con los datos obtenidos en el programa Excel, y la matriz de datos fue sometida a análisis ANOVA y Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa JMP 11.0.0. Para la determinación de la CL₅₀ se realizó el análisis Probit.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RECOLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Se recolectó planta de *Acmella radicans* en etapa de floración en el mes de noviembre de 2019 en zonas de Michoacán, México (19°31'00"N 102°25'00"O). Un ejemplar del espécimen vegetal fue depositado en el Instituto de Ecología A.C., Pátzcuaro, Michoacán, México, bajo el número de catálogo 271228.

Las plantas se ubicaron sobre caminos, jardines, cuerpos de agua, canales y sotobosque, los sitios presentaron diversidad de suelos y vegetación secundaria, con alturas similares entre 1600 a 1640 msnm; en la Figura 7 se muestra la procedencia de las recolectas y una imagen del aspecto general de la planta, misma que fue identificada por comparación con lo descrito por la literatura, el material vegetal se llevó a laboratorio de bromatología y se realizó el proceso descrito en el punto 5.1.

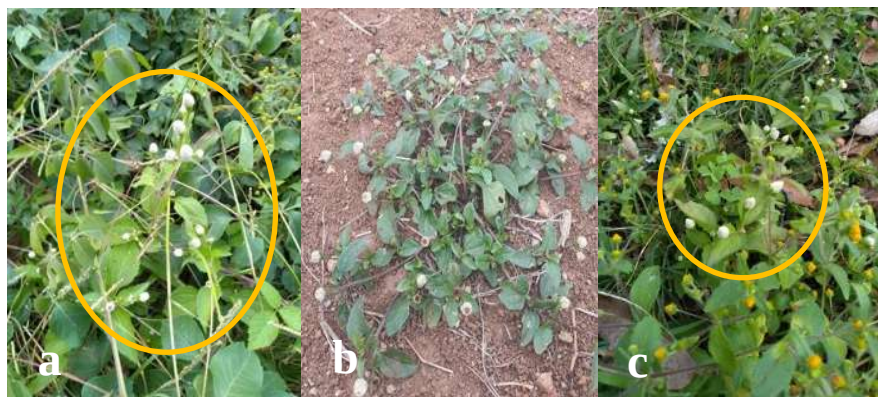


Figura 7.- Sitios de recolecta de *A. radicans*. a Peribán de Ramos (19.52253, -102.41978), b San Francisco Peribán (19.55651, -102.39816), y c Uruapan (19.41167, -102.04493).

6.2 PROPAGACIÓN DE PLANTA DE *Acmella radicans*

La emergencia de las primeras plántulas se observó a los 7 días después de la siembra (dds) estimándose un porcentaje de germinación inicial del 70 %, a los 21 dds las plantas se desarrollaron de forma rápida, como se aprecia en la Figura 8. Se realizó la cosecha al momento que presentaron floración (120 días), las plantas cosechadas se llevaron al laboratorio de bromatología para el proceso descrito en el apartado 5.1.

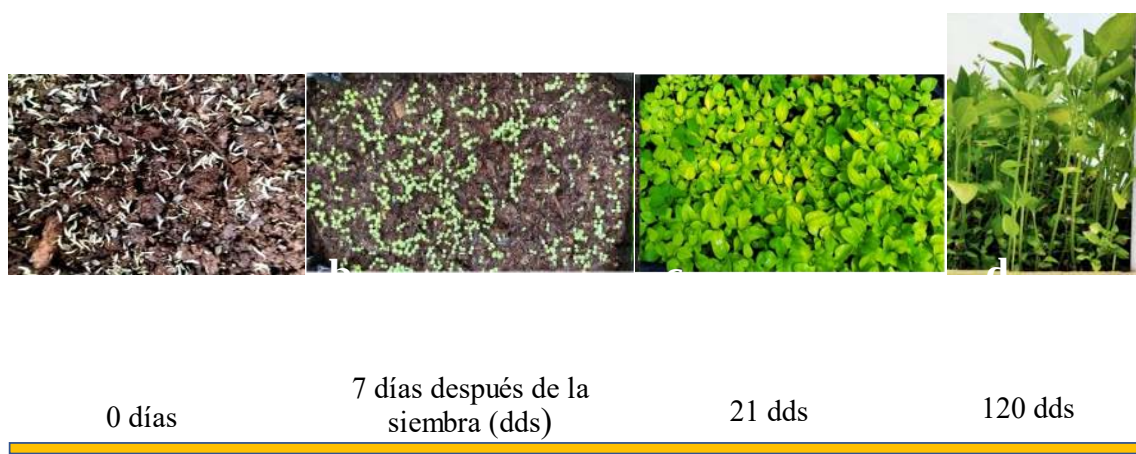


Figura 8.- Propagación de *A. radicans*. a Siembra semilla, b germinación, c desarrollo vegetativo, y d floración.

6.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Acmella radicans*

En la obtención de extracto etanólico, se estableció el protocolo siguiendo los pasos descritos en el punto 5.4. En este caso se utilizó flor, hoja, tallo y raíz de *A. radicans*, dando como resultado los rendimientos que se observan en el Cuadro 3. **Basurto (2018)** reportó un rendimiento del extracto etanólico de hojas de diferentes especies de *Rubus* de 0.6 a 12 mg/g.,

contrario a lo que reportó **Rabelo et al., (2019)** del extracto etanólico de la parte aérea de la planta *S. acmella*, ellos obtuvieron un rendimiento de 125 mg/g.

Cuadro 3.- Rendimiento de los extractos etanólicos de *A. radicans*.

Órgano	Días de Macerado	Rendimiento mg/mL
Hoja	3	2.03
Flor	3	1.94
Tallo	3	2.24
Raíz	3	0.81
Hoja	7	2.30
Flor	7	2.46
Tallo	7	1.46
Raíz	7	0.93

6.4 BIOENSAYO PREVIO DEL EFECTO ACARICIDA

Para la evaluación del efecto acaricida en el bioensayo previo se utilizó el diseño experimental descrito en el apartado 5.6. De acuerdo con los resultados, se observó que para las 24 h el tratamiento de hoja a una concentración de 16 mg/mL (H) tuvo una mortalidad superior al testigo regional (TR) (42 y 35 % respectivamente); para las 48 h tanto el tratamiento H como F (16 mg/mL) tuvieron una mortalidad de 65 %, mientras del testigo regional la mortalidad ascendió a 66 %; por último para las 72 h, la mortalidad en el tratamiento H alcanzó el 86 %, y el testigo regional tuvo una mortalidad final de 83 %, siendo estos tratamiento significativamente diferentes al testigo negativo (TN) y absoluto (TA) como se observa en la Figura 9.

Los resultados descritos dieron la pauta para elegir órgano a utilizar en el resto del trabajo a las hojas de *A. radicans*, debido a su eficiente efecto acaricida. **Rabelo et al. (2019)** mencionan que la parte aérea de la planta *S. acmella* produce diversos compuestos bioactivos con propiedades biológicas. Mientras que **Cortez-Espinosa et al. (2011)** comentan que en la parte aérea de *A. radicans* han encontrado mayoritariamente alcanidas más que en la raíz, teniendo actividad biológica.

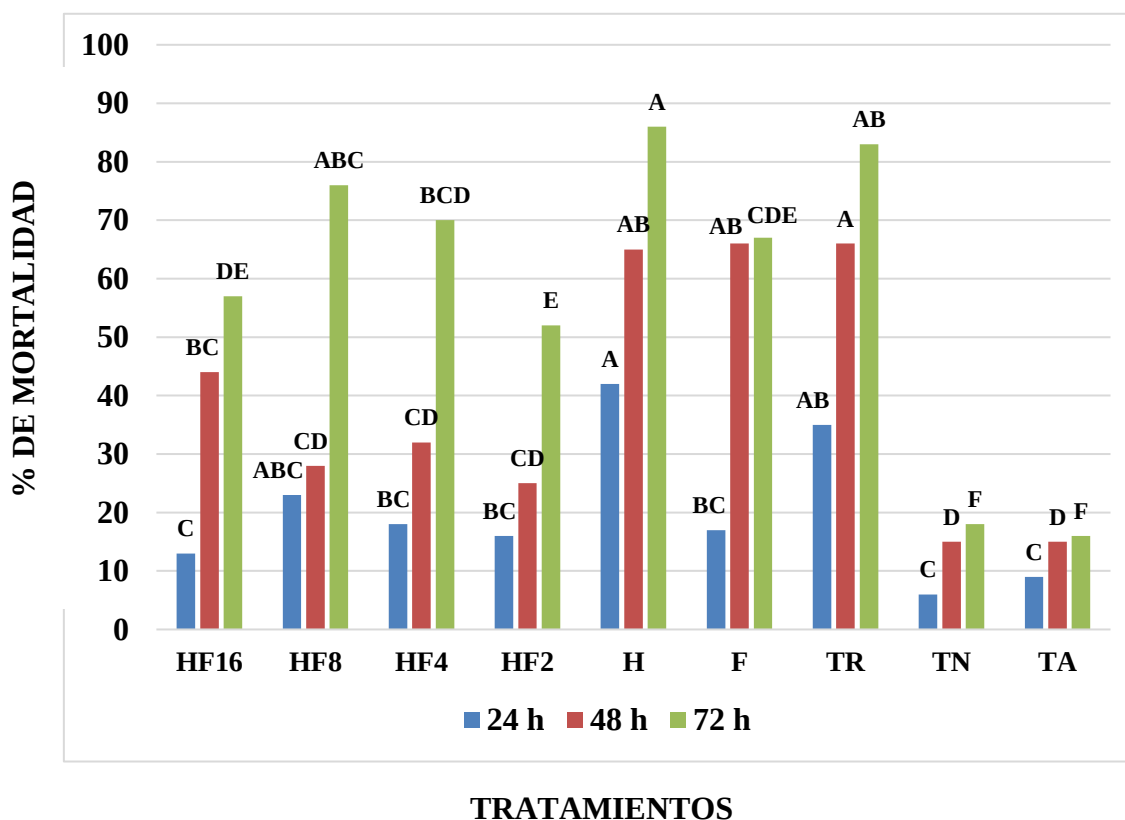


Figura 9.- Porcentaje de mortalidad de *R. indica* en bioensayo previo (Tukey $p \leq 0.05$). En la gráfica se puede observar que a los diferentes tiempos evaluados el efecto la fracción acuosa de hoja a una concentración de 16 mg/mL sobre los ácaros, tuvo la mejor respuesta en comparación a flor y los diferentes controles. **Nota:** las literales sobre las barras indican diferencia estadística entre tratamientos.

6.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA

El bioensayo de la actividad acaricida sobre el ácaro rojo de palma, se llevó a cabo como se describe en el apartado 5.8. De acuerdo con los resultados, se observó que para las 24 h el tratamiento de 32 mg/mL (Ar32) tuvo una mortalidad de *R. indica* estadísticamente mayor que el testigo regional (70 y 36 % respectivamente) y el resto de los controles (Figura 10), así mismo a las 48 h se observó que el tratamiento Ar32 tuvo una mortalidad del 88 %, manteniendo diferencia significativa con el testigo regional y el resto de los testigos (Figura 11).

Por último, para las 72 h, los tratamientos Ar32, Ar16, Ar8 y Ar4, fueron estadísticamente iguales al testigo regional (Figura 12), todos ellos siendo significativamente diferentes al testigo negativo (TN) y testigo absoluto (TA). Con los resultados de este ensayo se logró obtener la CL_{50} para las 24 h (27.98 mg/mL), 48 h (2.61 mg/mL) y 72 h (2.08 mg/mL).

Lo anterior concuerda parcialmente con lo reportado por **Rabelo et al. (2019)**, quienes usaron extracto etanólico de *Spilanthes acmella* sobre *R. indica*, mostrando toxicidad y repelencia, teniendo un 99 % de mortalidad con una CL_{50} de 8.88 mg/mL, mientras que 0.45 mg/mL a 1.34 mg/mL fueron suficientes para repeler al ácaro plaga hasta por 48 h. Por otro lado, **Castro et al. (2014)** reportaron que el extracto hexánico de *Acmella oleracea* sobre *Rhipicephalus microplus* fue letal, con una mortalidad de 95 % a una CL_{50} de 79.7 mg/mL.

Acmella radicans es una planta arvense con aplicaciones terapéuticas y agronómicas. Hasta el momento con los resultados del presente trabajo se sugiere la presencia de compuestos de tipo alcanidas que tienen actividad contra *R. indica*.

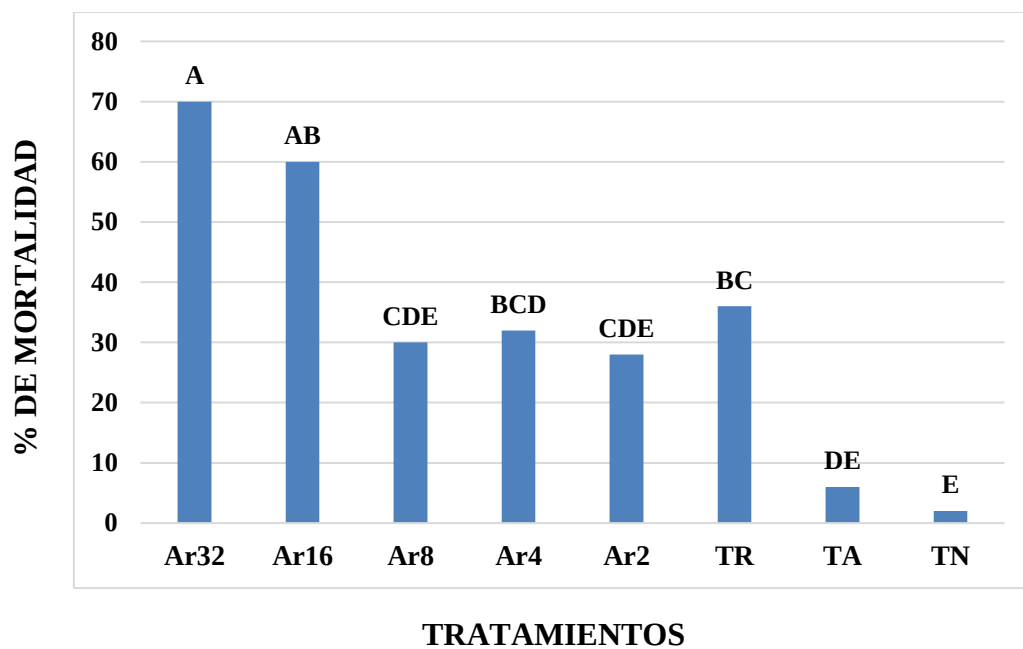


Figura 10.- Porcentaje de mortalidad de *R. indica* a las 24 h (Tukey $p \leq 0.05$). **Nota:** las literales sobre las barras indican diferencia estadística entre tratamientos.

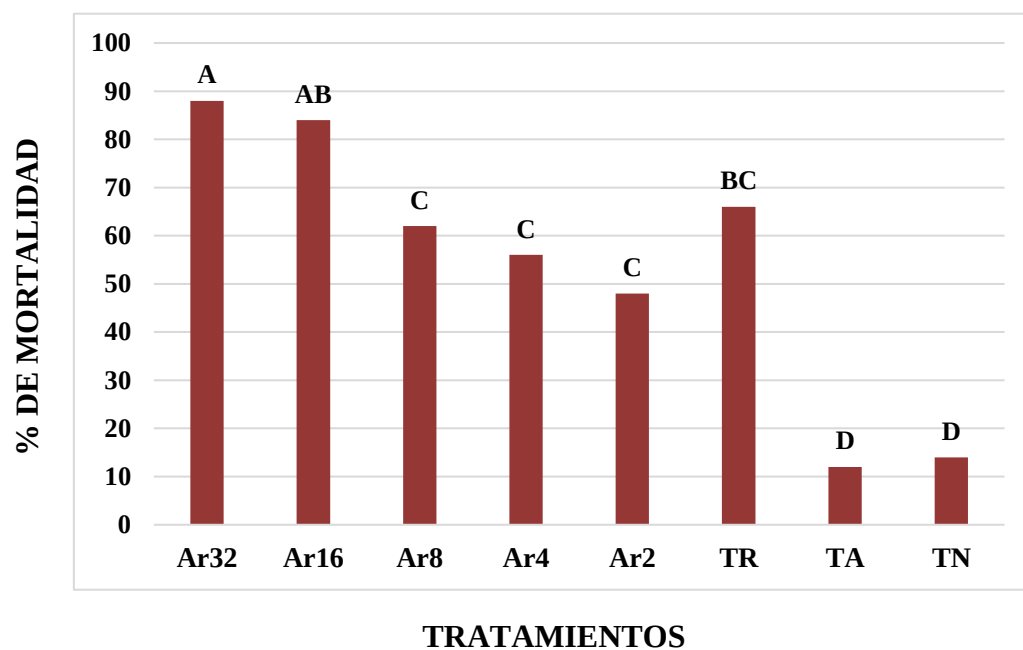


Figura 11.- Porcentaje de mortalidad de *R. indica* a las 48 h (Tukey $p \leq 0.05$). **Nota:** las literales sobre las barras indican diferencia estadística entre tratamientos.

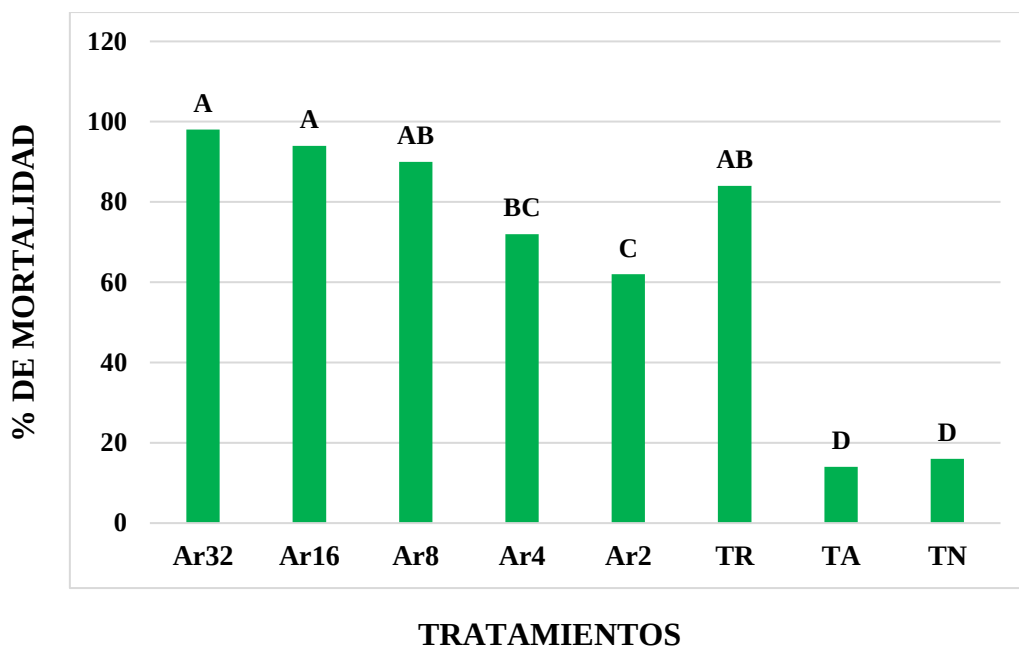


Figura 12.- Porcentaje de mortalidad de *R. indica* a las 72 h (Tukey $p \leq 0.05$). **Nota:** las literales sobre las barras indican diferencia estadística entre tratamientos.

6.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE BIOACTIVIDAD ACARICIDA DE *Acmella radicans*

6.6.1 Separación de los compuestos de la fracción acuosa extraídos de *A. radicans* en cromatografía de capa fina

Para una evaluación previa de la presencia de alcaloides se realizó la separación de los compuestos acuosos extraídos de *A. radicans*, se hizo conforme a la metodología descrita. Los resultados mostraron diferente número de franjas de acuerdo con el extracto del órgano que se comparó en la cromatografía de capa fina. A manera de tener un comparativo o “estándar” de una alcaloide, se utilizó el extracto acuoso de raíz de *H. longipes*, dado que su principal compuesto es la afinina. Como se muestra en el Cuadro 4, la hoja tuvo mayor número de bandeo (13 bandas) en comparación a la flor (6 bandas). En lo referente a la semejanza con el extracto

de *H. longipes* y lo reportado con **Ríos-Chávez et al. (2003)** quienes determinaron que la afinina, alcaloide mayoritaria en algunas especies de Asteraceas, tiene un Rf de 0.7, ellos utilizaron un sistema de solventes hexano:acetato de etilo (2:1), de forma interesante se puede observar tanto en hoja como en flor y en raíz coincide una misma franja (0.83) lo que sugiere la presencia de afinina en los tres extractos, en este trabajo se usó un sistema de solventes hexano:acetato de etilo (72:28 %).

Cuadro 4.- Rf de hoja y flor de *A. radicans* y raíz de *H. longipes*.

Hoja	Flor	Raíz
0.90	0.90	
	0.87	
0.83	0.83	0.83
0.68		
0.66		
0.56		
0.52	0.52	
0.44	0.49	
0.41		
0.38	0.38	0.38
0.32		0.34
0.28		0.28
0.19		
0.07		

6.6.2 Separación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en cromatografía líquida de alto rendimiento

Para este proceso se siguieron los pasos descritos en el apartado 5.9.2. El cromatograma resultante del análisis por HPLC de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* mostró la presencia de compuestos dentro de los primeros 13 minutos de corrida como se observa en las Figuras 13. De forma interesante se observa en el cromatograma un pico en el tiempo de

retención de 6.182 con lo que nos sugiere la presencia de afinina o espilantol de acuerdo con lo reportado por **Rabelo et al. (2019)** en su trabajo, ellos determinaron la presencia de esta alcaloide de la planta *S. acmella* (Figura 14) teniendo un tiempo de retención en el minuto 6 $\pm$.

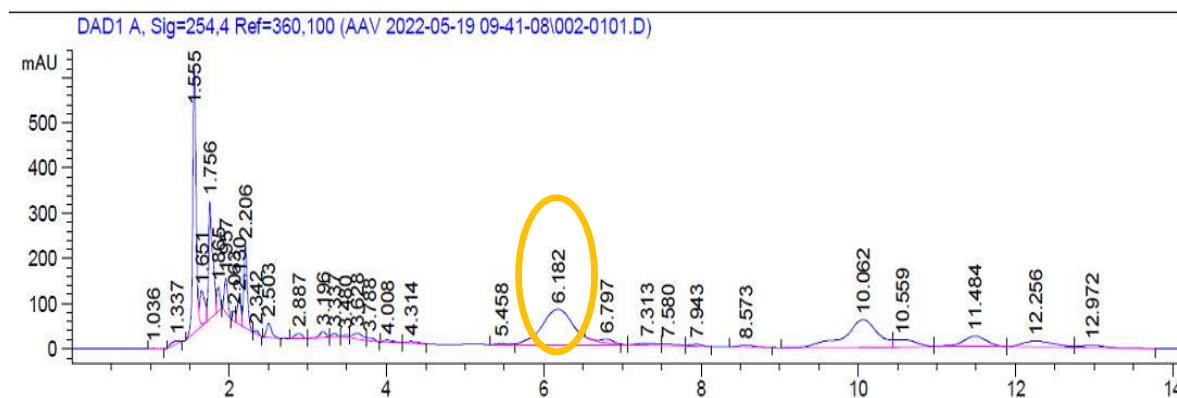


Figura 13.- Cromatograma de fracción acuosa de hoja de *A. radicans*.

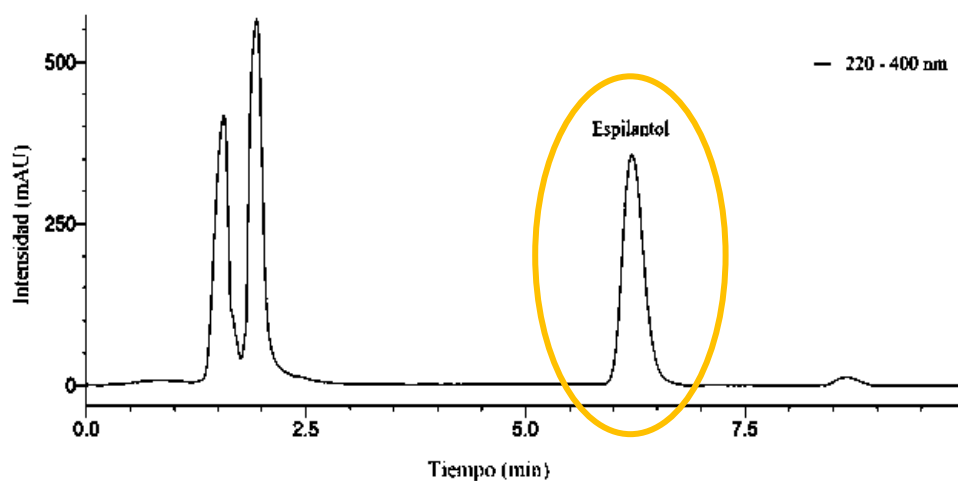


Figura 14.- Cromatograma del extracto *Spilanthes acmella* determinado por **Rabelo et al. (2019)**.

6.6.3 Análisis de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en resonancia magnética nuclear

Para este tipo de análisis se realizó con la metodología descrita en el apartado 5.9.3. El espectro obtenido en el equipo de RMN mostró indicios de compuestos tipo alcanidas por los grupos detectados por este método, como son alquinos ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}=\text{}$), alquenos ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) y su grupo funcional (NH) en la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* como se observa en la Figura 15. Dicho espectro se puede comparar con los resultados descritos por **Ríos-Chávez et al. (2003)** donde identificaron dos alcanidas *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida y *N*-isobutil decamida (Figura 16), en tanto **Nakatani & Nagashima (1992)** en su trabajo identificaron por RMN cuatro alcanidas *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (1), (2*E*)-*N*-(2-metilbutil)-2-undecena-8,10-dienamida (2), (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadiena-10,12-dienamida (3), y (7*Z*)-*N*-isobutil-7-tridecena-10,12-dienamida (4) (Figura 17), donde se observan los rangos en ppm (partes por millón) que van de 0.0 a 8.0 de las alcanidas identificadas por los autores, con lo que se sugiere la presencia de estos compuestos en el extracto de *A. radicans* propuesto en este trabajo.

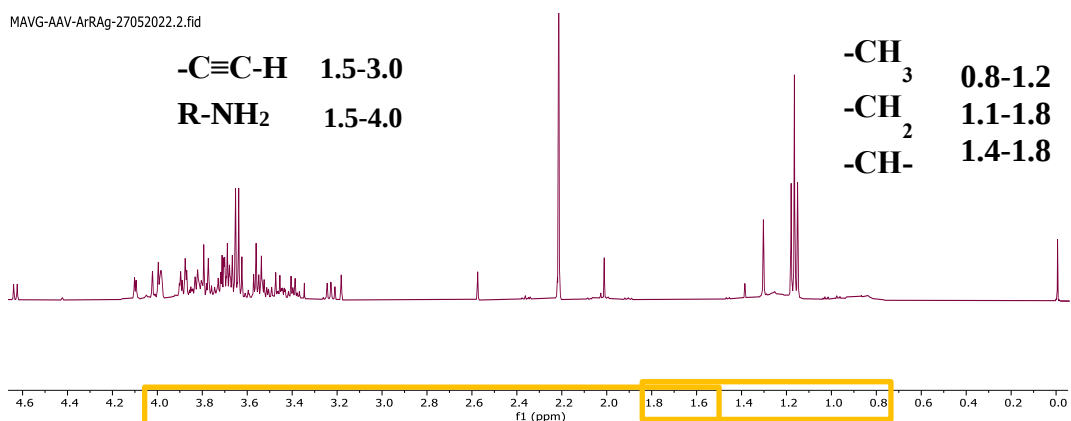


Figura 15.- Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz), fracción acuosa de hoja de *A. radicans*.

**¹H NMR SPECTRAL DATA FOR *N*-ISOBUTYL-2*E*-
DECAMONOENAMIDE AND *N*-ISOBUTYLDECAMIDE FROM *ACMELLA*
*RADICANS***

H Number	<i>N</i> -Isobutyl-2 <i>E</i> -decamonoenamide, δ ppm	<i>N</i> -Isobutyl-decamide, δ ppm
2	5.72 d (15.0)	2.15 t (7.5)
3	6.85 m	1.30 s (7.5, 7.5)
4	2.16 dd (15.0, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
5	1.30 s (7.5, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
6	1.30 s (7.5, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
7	1.30 s (7.5, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
8	1.30 s (7.5, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
9	1.30 s (7.5, 7.5)	1.30 s (7.5, 7.5)
10	0.91 t (7.5)	0.91 t (7.5)
1'	3.17 t (6.5, 6.5)	3.17 t (6.5, 6.5)
2'	1.80 m	1.80 m
3'	0.93 d (7.0)	0.93 d (7.0)
4'	0.93 d (7.0)	0.93 d (7.0)

Coupling constants (J in Hz) are given in parentheses.

Figura 16.- Determinación de dos alcamidas por **Ríos-Chávez et al. (2003)** por la técnica RMN de la planta *A. radicans*.; en los recuadros se pueden apreciar los rangos en ppm de las alcamidas identificadas por los autores.

Table I. ¹H-NMR Spectral Data for Compounds **1–4**
(δ-values, at 400 MHz, in CDCl₃, TMS as internal standard)

No.	1	2	3	4
H-2	5.79 br. d (15)	5.77 br. d (15)	5.78 br. d (15)	2.17 t (7)
3	6.83 dt (15; 7)	6.80 dt (15; 7)	6.80 dt (15; 7)	1.63 m
4	2.23–2.35 m	2.20 m	2.19 br. dt (7; 7)	1.37 m
5	2.23–2.35 m	1.57 n	1.55 tt (7; 7)	1.37 m
6	5.26 dt (11; 7)	1.57 n	2.07 br. dt (7; 7)	2.04 br. dt (7; 7)
7	5.97 dd (11; 11)	2.27 n	5.48 dt (10; 7)	5.51 dt (10; 7)
8	6.29 br. dd (11; 15)		5.42 dt (10; 7)	5.39 dt (10; 7)
9	5.70 dc (15; 7)		2.99 br. d (7)	3.00 br. d (7)
10	1.78 c (7)			
11		1.96 br. s		
13			1.98 br. s	1.98 br. s
1' _a	3.15 cd (7; 6)	3.14 ldd (14; 7; 6)	3.15 ld (7; 7)	3.08 ld (7; 7)
1' _b		3.27 ldd (14; 7; 6)		
2'	1.78 m	1.57 n	1.80 qq (7; 7; 7)	1.76 qq (7; 7; 7)
3' _a	0.93 c (7)	1.17 ldq (14; 7; 7)	0.93 d (7)	0.93 d (7)
3' _b		1.41 ldq (14; 7; 7)		
4'	0.93 c (7)	0.91 (7)	0.93 d (7)	0.93 d (7)
5'		0.91 d (7)		
H-N	5.47 br. s	5.38 br. s	5.45 br. s	5.46 br. s

Figura 17.- Determinación de cuatro alcamidas por **Nakatani & Nagashima (1992)** por la técnica RMN de la planta *Spilanthes acmella* var. *oleracea*; en los recuadros se pueden

apreciar los rangos en ppm de las alcanidas identificadas por los autores.

6.6.4 Separación e identificación de los compuestos de la fracción acuosa de hoja extraídos de *A. radicans* en cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas

La separación e identificación por GC-MS de los compuestos de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* mostró la presencia de cinco alcanidas: alcanida 1 (A1), *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (Figura 18 y 19); alcanida 2 (A2), *N*-(2-feniletil)(2*Z*,4*E*)-octadienamida (Figura 20 y 21); alcanida 3 (A3), *N*-(2-feniletil)non-2(*E*)-en-6,8-dienamida (Figura 22 y 23); alcanida 4 (A4), *N*-(2-feniletil)-cis-2,3-epoxinona-6,8-dienamida (Figura 24 y 25); y alcanida 5 (A5), 3-fenil-*N*-(2-feniletil)-2-propanamida (Figura 26 y 27), como se pueden apreciar en sus respectivos espectros y estructuras. Es importante resaltar que la alcanida 1, es la estructura de la afinina, molécula que se esperaba encontrar por los resultados mostrados en la TLC y HPLC. Reportes de trabajos de otros autores (**González et al., 2011; Hernández-Morales et al., 2012; Castro et al., 2014; Beltrán et al., 2015; Rabelo et al., 2019**) señalan que la afinina tiene alta bioactividad, por ello en cada ensayo que se realizó para la búsqueda de alcanidas, se trataba de localizar a dicho compuesto, sin embargo y de forma interesante, al calcular la abundancia (con la fórmula $Y = 3 \times 10^7 (X) + 1 \times 10^6$), la alcanida A5 fue la que se encontró con mayor presencia en la fracción acuosa (Figura 28). Se sugiere que las alcanidas identificadas podrían ser las responsables de la mortalidad de *R. indica*. en este proyecto.

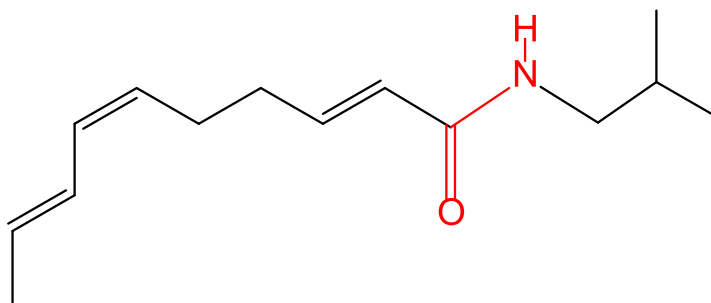


Figura 18. – Estructura de la alcanida *N*-isobutil-2(*E*),6(*Z*),8(*E*)-decatrienamida (A1).

Peso molecular 221.34.

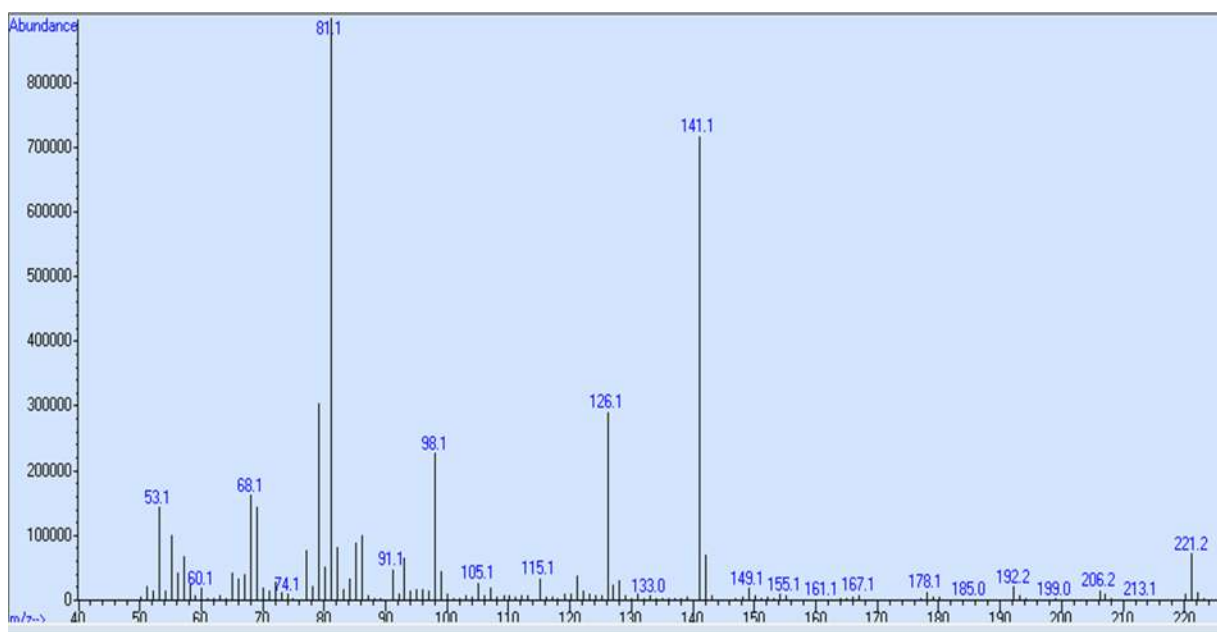


Figura 19.- Espectro de *N-isobutil-2(E),6(Z),8(E)-decatrienamida* (A1) alcamida de hoja de *A. radicans*.

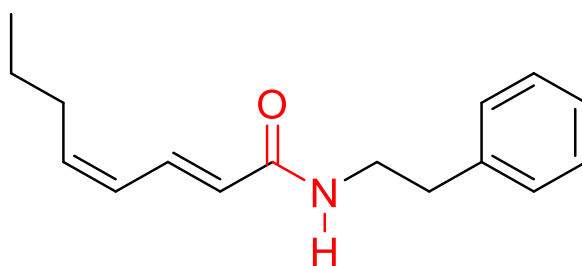


Figura 20. – Estructura de la alcamida *N-(2-feniletíl)(2Z,4E)-octadienamida* (A2). Peso molecular 243.34.

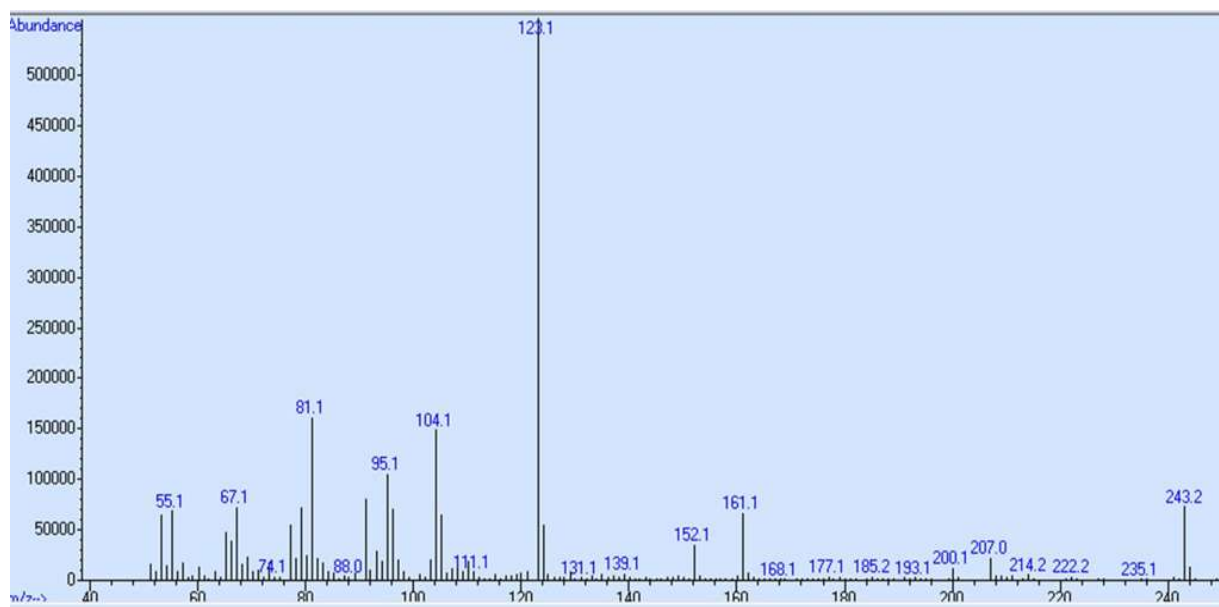


Figura 21.- Espectro de *N*-(2-feniletil)(2*Z*,4*E*)-octadienamida (A2) alcamida de hoja de *A. radicans*.

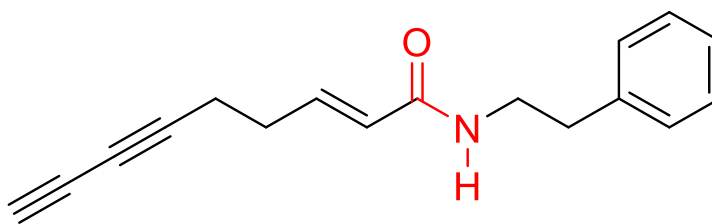


Figura 22. – Estructura de la alcamida *N*-(2-feniletil)non-2(*E*)-en-6,8-dienamida (A3).
Peso molecular 251.32.

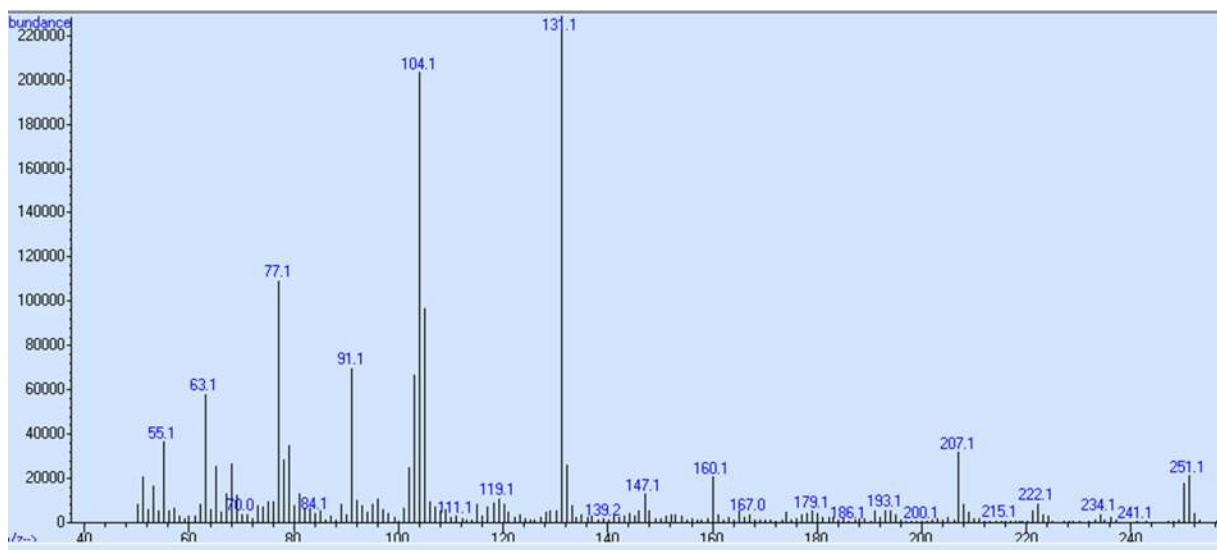


Figura 23.- Espectro de *N*-(2-feniletil)non-2(*E*)-en-6,8-dienamida (A3) alcamida de hoja de *A. radicans*.

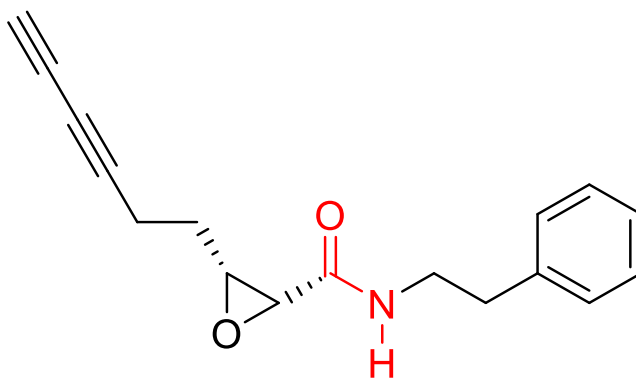


Figura 24. – Estructura de la alcamida *N*-(2-feniletil)-cis-2,3-epoxinona-6,8-dienamida (A4). Peso molecular 267.32.

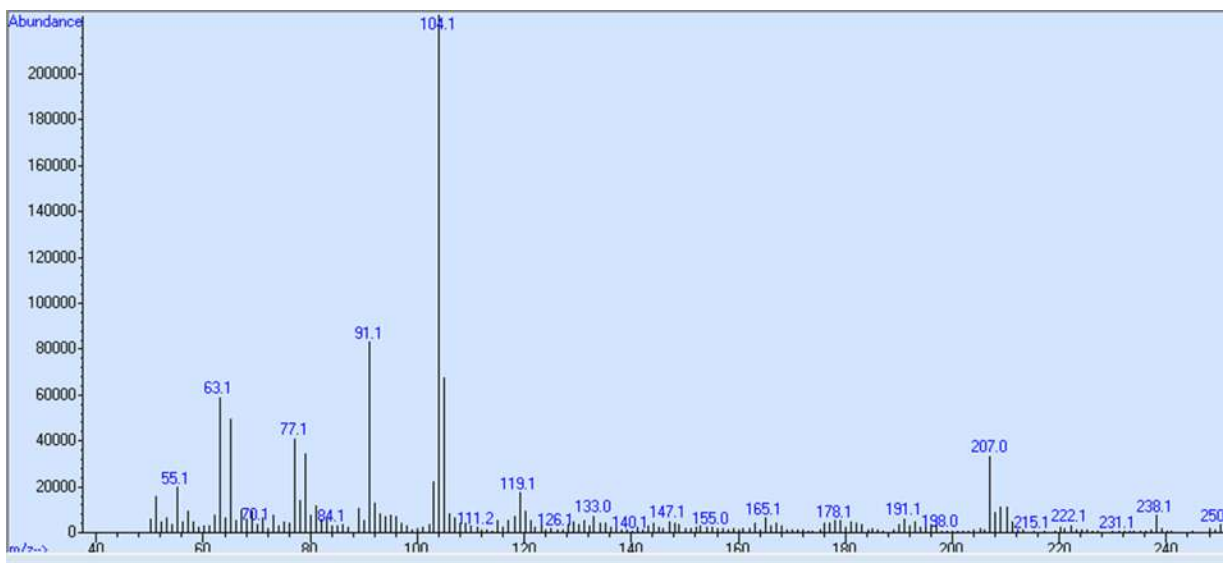


Figura 25.- Espectro de *N*-(2-feniletíl)-*cis*-2,3-epoxinona-6,8-dienamida (A4) alcalamida de hoja de *A. radicans*.

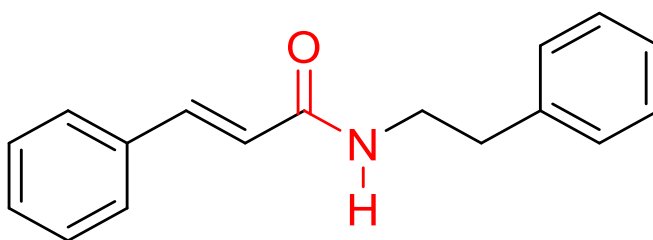


Figura 26. – Estructura de la alcalamida 3-fenil-*N*-(2-feniletíl)-2-propanamida (A5). Peso molecular 251.32.

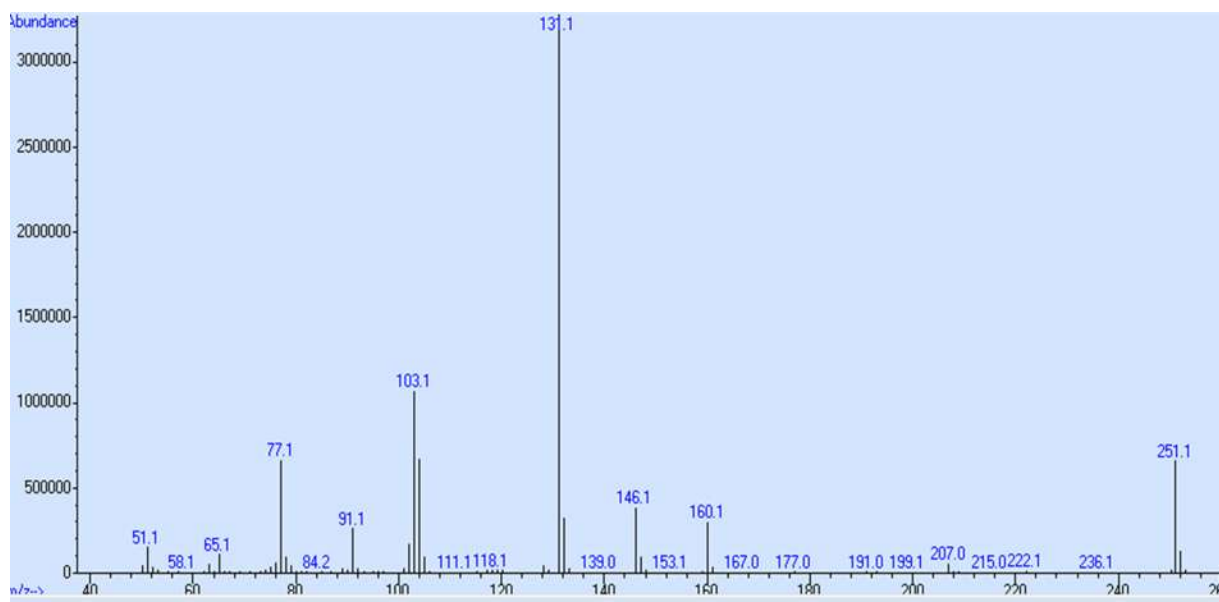


Figura 27.- Espectro de, **3-fenil-*N*-(2-feniletil)-2-propanamida** (A5) alcalamida de hoja de *A. radicans*.

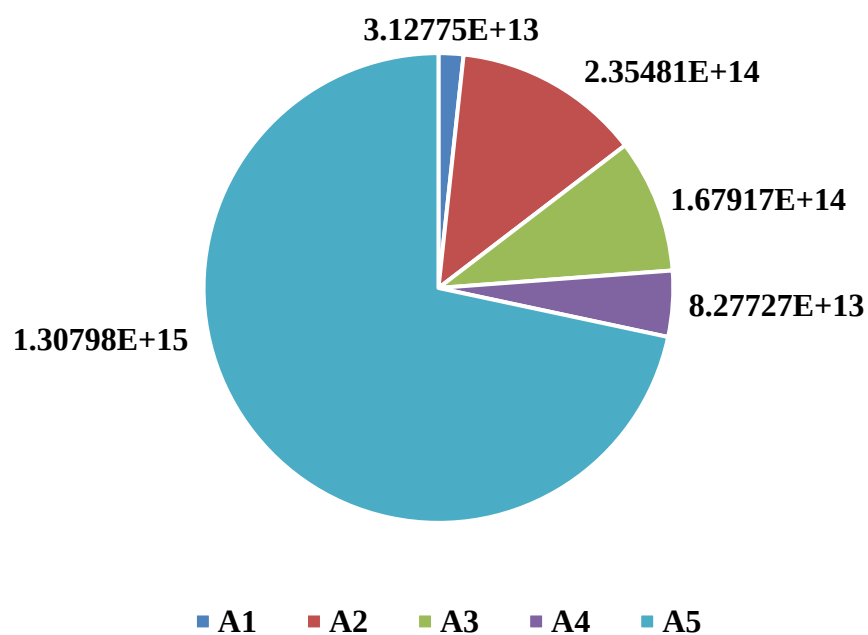


Figura 28.- Abundancia (μg/mL) de las alcalamidas de hoja de *A. radicans* fracción acuosa, identificadas por GC-MS, siendo la más abundante **3-fenil-*N*-(2-feniletil)-2-propanamida** (A5).

VII CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo de extracción de los metabolitos secundarios de hoja de *A. radicans*, con duración de 7 días en maceración etanólica activa.

Se evaluó la bioactividad de la fracción acuosa de hoja de *A. radicans* sobre *R. indica*, presentando un porcentaje de mortalidad de 70 % a las 24 h, para el tratamiento Ar32 (32 mg/mL); el 88 % se registró a las 48 h en el mismo tratamiento; y para las 72 h la mortalidad aumentó a 98 %, superando al testigo regional (TR), teniendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con los controles TA y TN. Se obtuvo la Cl_{50} para las 24 h siendo de 27.98 mg/mL, para las 48 h fue de 2.61 mg/mL, mientras que para las 72 h fue de 2.08 mg/mL.

De acuerdo con los resultados cromatográficos se comprobó la presencia de cinco alcaloides en hoja de *A. radicans*, siendo la más abundante, 3-fenil-N-(2-feniletíl)-2-propanamida. Por lo anterior, este tipo de Asteraceas pueden ser consideradas para una agricultura integral para el control de ácaros plaga.

VIII LITERATURA CITADA

- Anholeto, L.A., de Oliveira, P.R., Rodrigues, R.A.F., Yamane, L.T., de Carvalho Castro, K.N., Ferreira, A.R.F., & Camargo-Mathias, M.I. (2017). Toxic action of *Acmella oleracea* extract on the male reproductive system of *Amblyomma cajennense* ticks. *Vet. Parasitol.* 244, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.031>
- Ávalos, G.A. y Pérez-Urria, C.E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Rev. Reduca, Serie Fisiología Vegetal.* 2(3), 119-145.
- Ayora, T.T.R. y Gastélum, M.E. (2016). Fenoles y polifenoles. Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. CIATEJ. 145 pp.
- Basurto, G.A. (2018). Relación entre polifenoles y actividad antibacteriana (contra fitopatógenos) de extractos polares en *Rubus* spp., silvestres y en invernadero. Tesis de Maestría. México. Consultada el 10 de febrero de 2023, <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://bibliotecavirtual.dg>
- Beltrán B.M., Cerna, C.E., Delgado, O.J.C., y Ochoa, F.Y.M. (2015). Evaluación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S. F. Blake sobre ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc.)(Hemiptera:Triozidae). *Rev. Investigación y Ciencia.* Aguascalientes, Méx. No. 66, 12-15.
- Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., De Tre, G., & De Spiegeleer, B. (2012). Alkamid database: chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J. Ethnopharmacol.* 142, 563–590. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.038>
- Bruneton, J. (1995). *Pharmacognocny, phytochemistry, medicinal plants.* Lavoisier Tec and Doc. Paris.
- Castillo-Sánchez, L.E., Ruz-Febles, N.M., Alvarado-Canché, A.R., Canul-Solís, J.R., López-Cobá, E., & CamposNavarrete, M.J. (2018) Ethanolic extracts of *Brosimum alicastrum* and *Plectranthus amboinicus* for the control of *Raoiella indica*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6, 625-628.
- Castro, K.N.C., Lima, D.F.; Vasconcelos, L.C., Leite, J.R.S.A., Santos, R.C., Paz Neto, A.A., & Costa-Júnior, L.M. (2014). Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. *Rev. Parasitol Res.* 113:3697-3701. DOI: 10.1007/s00436-

- Cavalcanti, S.C.H., dos S. Niculau, E., Blank, A.F., Câmara, C.A.G., Araujo, I.N., & Alves, P.B. (2010) Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology*, 101, 829-932.
- Correa-Médez, A.; Osorio-Osorio, R; Hernández-Hernández, L.U.; Cruz-Lázaro, E. de la; Márquez-Quiroz, C.; y Salinas-Hernández, R.M. (2018). Control químico del ácaro rojo de las palmas *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae). *Notas Científicas. Ecosistemas y recursos agropecuarios. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*. 5(14), 319-326.
- Cortez-Espinosa, N.; Aviña-Verduzco, J.A.; Ramírez-Chávez, E.; Molina-Torres, J.; & Ríos-Chávez, P. (2011). Valine and phenylalanine as precursors in the biosynthesis of alkanamides in *Acmella radicans*. *Rev. Natural Product Communications*. 6(6), 857-861.
- Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en química orgánica, Cromatografía. Serie Didáctica No. 44. Fac. de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. 55 pp.
- Crouch, N.R., Langlois, A., Mulholl, D.A., & Nair, J.J. (2005). A novel alkylamide from the leaves of *Acmella caulirhiza* (Asteraceae), a traditional surface analgesic. *South Afr. J. Bot.* 71 (2), 228–230.
- Cruz, P.B., Barbosa, A.F., Zeringota, V., Melo, D.R., Novato, T., Fidelis, Q.C., Fabri, R.L., Carvalho, M.G., Daemon, E., & Monteiro, C.M.O. (2016). Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 228, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.026>
- Debabrata, M., Anirban, S., & Sudhansu, S.S. (2017). *Acmella radicans* (Asteraceae), an american weed new to eastern India. *Rev. Nelumbo*. 49(1), 54-57.
- Días, A.M.A., Santos, P., Seabra, I.J., Júnior, R.N.C., Braga, M.E.M., & De-Sousa, H.C. (2012). Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. *J. Supercrit. Fluids* 61, 62–70.
- Dirección General de Sanidad Vegetal. (2016). Manual operativo de la campaña contra el ácaro rojo de las palmas. SAGARPA. México. 9 pp.

- Douglas, A.S., James, F.H., y Stanley, R.C. (2008). Principios de análisis instrumental. Sexta Edición. CENGAGE Learning. 1063 pp.
- Estrada, V.E., Acuña, S.J., Chaires, G.M., y Equihua, M. A. (2012). *Raoiella indica* plaga de importancia cuarentenaria en México y el Caribe y sus efectos. Colegio de Postgraduados, Sociedad Mexicana de Entomología. 60-67 pp.
- Estrada-Venegas, E.G. (2014). Estatus de *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) a cinco años de su arribo a México. Rev. Entomología Mexicana. Vol. 1, 2-12.
- Fisher, T.R. (1957). Taxonomy of the genus *Heliopsis* (Compositae). Ohio Journal of Science. Vol. 57, 171-191.
- Fletchmann, C.H.W. & Etienn, J. (2004). The red palm mite, *Raoiella indica* Hirst, a threat to palms in the Americas (Acari: Prostigmata: Tenuipalpidae). Syst. Appl. Acarol. 9, 109-110.
- Garrido, R., Vélez, H., y Vérez, V. (2013). Resonancia magnética nuclear: nuevas aplicaciones en la cuantificación y la evaluación de intermediarios de vacunas basadas en polisacáridos. VacciMonitor. 22(1), 35-42.
- González, M. S., Flores, L.M.L., Benavides, M. A., y Alberto, O.A. (2011). Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Rev. Mexicana de Fitopatología. 29(2), 146-153.
- González-López, A.M., Quiñones-Aguilar, E.E., y Rincón-Enríquez, G. (2016). Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. CIATEJ. 145 pp.
- Habsah, A.K., Muhamad, B.Z., Abdul A.K., & Mohd, S.A. (1989). Toxicity and Electrophysiological Effects of *Spilanthes acmella* Murr. Extracts on *Periplaneta americana* L. Rev. Pestic. Sci. 25, 329-335.
- Hernández, C. M. (2009). Evaluación del efecto de la afinina presente en extracos de *Heliopsis longipes* en la recuperación de ápices de vainilla sometidos a tratamientos con crioprotectores. Tesis de maestría. Univ. Veracruzana, Unidad de Ciencias Químicas, México.

- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J.L., Gómez-Luna, B.E., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, Ma. Del R., Martínez-Soto, G., y Molina-Torres, J. (2012). Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del Estado de Guanajuato. Rev. Ra Ximhai, Univ. Autónoma Indígena de México. 8(3), 111-118.
- Hirst, S. (1924). On some new species of red spider Ann. And Magazine of Natural History Serv Vol. 14, 522-527.
- Jansen, R. (1985). The systematics of *Acmella*, Asteraceae, Heliantheae. In: Anderson, C. Ed. Systematic botany monographs. Ann Arbor, MI: The American Society of Plant Taxonomy. 1-35.
- Kane, E.C., Ochoa, R., Mathurin, G., & Erbe, E.F. (2005). *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae): An islang-hopping mite pest in the Caribbean.
- Laurella, S.L. (2016). Resonancia magnética nuclear, una herramienta para la elucidación de estructuras. Libros de Cátedra. Universidad Nacional de la Plata. 179 pp.
- Marjorie, A.H., Peña, J., & Nguyen, R. (2006). Red palm mite, *Raoiella indica* Hirst (Arachnida: Acari: Tenuipalpidae. Entomology and Nematology Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 5 pp.
- Mbeunkui, F., Grace, M.H., Lategan, C., Smith, P.J., Raskin, I., & Lila, M.A. (2011). Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthus acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. J. Chromatogr. B 879, 1886–1892. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.013>
- Molina-Torres, J.; García-Chávez, A. & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of natural alkamides traditionally used in Mesoamérica: affinin and capsaicin. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 64, 241-248.
- Molina-Torres, J. y García, A. Ch. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. Avance y Perspectiva Vol. 20, 377-387.
- Nakatani, N & Nagashima, M. (1992). Pungent alkamides from *Spilanthus acmella* L. var. Oleracea Clarke. Biosci. Biotech. Biochem. Osaka, Japón. 56(5),759-762.

- Navia, D., Medonca, S.R., y Flechtman, W.C. (2005). *Raoiella indica* Hirst (Prostigmata: Tenuipalpidae), o ácaro vermelho das palmeiras - uma ameaça para as Américas. Embrapa: Recursos genéticos y de biotecnología. Brasília, Brasil. Documento 146, 37 pp.
- Orestes, G.de L.J. (2009). Los glicósidos esteroidales. Aislamiento y elucidación estructural. Ed. Feijóo, Cuba. 50 pp.
- Osorio, D.E.J., Montoya, P.G.L., y Arango, A.G.J. (2006). Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica. Colombia. 13(1), 61-84.
- Pandey, V., Agrawal, V., & Raghavendra, K. (2007). Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). Parasitol. Vol.102, 171-174.
- Pássaro, C.P.C., Rivera, C.M.N., Román, M.A.P., Cardona, L.M.B., Muñoz, L.M.E., Gómez, D.D., Quiceno, J.M.R., y Rojas, L.C.B. (2016). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. SENA. SENNOVA. GIGACA. 50 pp.
- Peña, J.E., Mannion, C.M., Howard, F.W., & Hoy, M.A. (2006). *Raoiella indica* (Prostigmata: Tenuipalpidae): The red palm mite: A potential invasive pest of palms and bananas and other tropical crops of Florida. University of Florida IFAS Extension. 5 pp.
- Pimienta-Barrios, E., Muñoz-Urias, A., Ramírez-Hernández, B., y Méndez-Morán, L. (2008) Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara: Guadalajara. 331 pp.
- Rabelo, C. C., Clezia, C.D.S., Viteri-Jumbo, L., Guedes de Sena, J. F., Neoob de Carvalho, K. C., Marques, K.C., Sousa de Brito, E., Sheila de Queiroz, A.S., y Vieira, A.T. (2019). Bioactividad de *Spilanthes acmella* (Asteraceae) a *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) y selectividad al depredador *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae). Rev. De Protección Vegetal. Brasil. Vol. 34, No. 1.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdéz, L., Virgen-Calleros, G., y Molina-Torres, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. Rev. Agrociencia. 34(2), 207-215.
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., & Molina-Torres, J. (2004). Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in

- Arabidopsis*. Rev. Plant Physiology. 134(3), 1058- 1068.
- Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., & Ríos-Chávez, P. (2011). Natural distribution and alkaloids production in *Acmella radicans*. Emir. J. Food Agric. 23(3), 275-282.
- Rengifo, M. L., Rello, E.R., Quiroz-Rocha, G.A., y Navarrete-Heredia, J.L. (2018). Control de *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) en el estado de Quintana Roo. Rev. E-Cuba. No. 10, 1-11.
- Ricaldi, S.J.O. y Martínez, M.A. (2014). Cromatografía de gases-espectrometría de masas de compuestos fitobioactivos del aceite esencial de *Satureja incana*. Rev. Apunt. Cient. Soc. 4(2), 280-287.
- Ricker, M. y Rincón, A. (2013). Manual para realizar las colectas botánicas del inventario nacional forestal y de suelos. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 32 pp.
- Ríos-Chávez, P., Ramírez-Chávez, E., Armenta-Salinas, C., & Molina-Torres, J. (2003). *Acmella radicans* var. *radicans*: in vitro culture establishment and alkaloid content. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. Vol. 39, 37-41.
- Rodríguez, H., Montoya, A., y Ramos, M. (2007). *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae): una amenaza para Cuba. Rev. Protección Vegetal. 22(3), 142-153.
- Rodríguez, H., Ramos, M., Pino, O., y Díaz, B. (2011). Toxicidad del extracto crudo de maíz sobre *Panonychus citri* (McGregor) en condiciones de laboratorio. Rev. Protección Vegetal. 26(2), 105-110.
- Rodríguez-Montero, L., Berrocal-Jiménez, A., Campos-Rodríguez, R., y Madriz-Martínez, M. (2020). Determinación de la actividad biocida de extractos vegetales para el combate de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Tecnología en Marcha. 33(3), 117-129.
- Ruíz-Jiménez, K.Z., Osorio-Osorio, R., Hernández-Hernández, L.U., Ochoa-Flores, A.A., Silva-Vázquez, R., & Méndez-Zamora, G. (2021). Acaricidal activity of plant extracts against the red palm mite *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae). Rev. de la Sociedad Entomológica Argentina 80(1), 33-39.
- Ruiz, M.L.B. (2020). Guía de laboratorio: Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y Cromatografía de gases (CG). Universidad Simón Bolívar. 8 pp.
- Rzedowski, J. y de Rzedowski, G.C. (2008). Compositae. Tribu Heliantheae I. En: Rzedowski,

- G.C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 157. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- SAGARPA-SENASICA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2018). Estrategia operativa de la campaña contra ácaro rojo de las palmas. 5pp.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2015). Ficha Técnica No. 14. Ácaro Rojo de las Palmas *Raoiella indica* Hirst. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria LANREF-CP. 24 pp.
- Shahidi, F. & Naczki, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, Florida, US. 575 pp.
- Sharma, R. & Arumugam, N. (2021). N-alcamides of *Spilanthes* (syn. *Acmella*): structure, purification, characterization, biological activities and applications-a review. Rev. Future Foods. Vol.3. 22 pp. DOI: 10.1016/j.fufo.2021.100022
- Sharma, V., Boonen, J., Chauhan, N.S., Thakur, M., De Spiegeleer, B., & Dixit, V.K. (2011). *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. Phytomedicine 18, 1161–1169.
- Simas, N.K., Dellamora, E.C.L., Schripsema, J., Lage, C.L.S., Filho, A.M.O., Wessjo-hann, L., Porzel, A., & Kuster, R.M., (2013). Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. Phytochem. Lett. 6, 67–72
- Singh, M. & Chaturvedi, R. (2012). Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. Ind. Crops Prod. 36, 321–328.
- Stashenko, E.E., Puertas, M.A., & Combariza, M.Y. (1996). Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. J. Chromatogr. A 752, 223–232.
- Suárez, D.O. y Morales, Y.H. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Rev. Semilleros: Formación Investigativa. 4(1), 1-8.

- Vallejo-Rosero, Y., Barrios-Correa, L., y Anaya-Gil, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de Química*. 35(2), 19-25.
<http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/23788>
- Varela, M.D.A., González, C.M.A., Ramírez, V.E., Castellanos, C.I.C., y Velandia, C.J.R. (2018). Aplicaciones y generalidades de un equipo GCMS-TQ8040 de Shimadzu. 1a Ed. Universidad EAN, Bogotá, Colombia. 101 pp.
- Vázquez-Villegas, P.T., Meza-Gordillo, R., Gutiérrez-Micell, F.A., Ruíz-Valdiviezo, V.M., Villalobos-Maldonado, J.J., Montes-Molina, J.A. y Fernández-Toledo, A.A.J. (2018). Determinación de Cl50 y CE50 de endosulfán lactona y diazinón en lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). *Agroproductividad*. 11(4), 105-111.
- Zamora-Natera, F., García-López, P., Ruíz-López, M., y Salcedo-Pérez, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Rev. Agrociencia*. 42, 185-192.
<http://www.siafeson.com/simarp.php/boletin/mensual/3/2016> SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2016). Boletín mensual marzo 2016. Informe de avances del sistema de información y monitoreo del ácaro rojo de las palmas (SIMARP). Consultado el 22 de junio de 2021.
www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/acmellaradicans/fichas/ficha.htm. Heike Vibrans (ed.). (2011). Malezas de México. Consultado el 22 de junio de 2021.

ANEXOS

9.1 FICHAS TÉCNICAS

Bovitraz^{M.R.} al 12.5%



**Garrapaticida, sarnicida y piojicida,
Concentrado emulsionable, Amidina**

Descripción:

Bovitraz^{M.R.} Garrapaticida, piojicida y sarnicida para baño de inmersión y/o aspersión, en bovinos, ovinos, porcinos y caninos, de excelente efecto derribe, buen poder residual (7 a 9 días), que afecta el potencial reproductivo de las garrapatas. De baja toxicidad: Categoría toxicológica 4 (ligeramente tóxico-banda verde)

Fórmula:

Concentrado emulsionable

Amitraz (Amidina):

N'-(2,4-dimetil-fenil)-N-(((2,4-dimetil-fenil)imino)metil)-N-metil metanimidamida.....	12.50%
Equivalente a.....	125.0 g I.A./L
Excipientes, solventes y emulsificantes, c.b.p. No más de.....	87.50%
Total.....	100.00%

Indicaciones:

Garrapatas: *Boophilus microplus*, *Ixodes holocyclus*, *Boophilus decoloratus*, *Haemaphysalis* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp., *Amblyoma americanum*, *Dermacentor* spp., *Amblyoma cajennense*, *Otobius megnini*, *Ixodes ricinus*.

Acaros: *Psoroptes* spp., *Demodex canis*, *Sarcoptes scabiei*, *Chorioptes bovis*, *Dermanyssus gallinae*, *Ornithonyssus sylviarum*.

Piojos: *Linognathus vitulli*, *Haematopinus eurysteris*, *Linognathus ovillus*, *Solenopotes capillatus*, *Damalinia bovis*, *Haematopinus suis*, *Damalinia ovis*, *Melophagus ovinus*

Dosis y Forma de aplicación:

Aspersión:

En bovinos, ovinos, porcinos y caninos se utilizan 2 ml de Bovitraz por litro de agua para controlar garrapatas. No se requiere usar hidróxido de calcio. En bovinos se aconseja usar de 3 a 5 litros de mezcla por animal (dependiendo del tamaño) usando toda la preparación.

Para sarnas en cerdos utilizar de 2 a 4 ml de Bovitraz por litro de agua.

Para sarna Demodésica en perros usar en baños de aspersión o inmersión de 2 a 4 ml de Bovitraz por litro de agua dos veces por semana hasta por siete semanas si fuese necesario.

Para sarna Soróptica se recomienda realizar limpieza profunda en las orejas y aplicar tratamiento local diluyendo una gota de Bovitraz en 5 ml de aceite mineral y aplicar dos gotas en cada oreja dos veces por semana por dos semanas.

Inmersión:

Primero que nada se aconseja cubrir el tanque garrapaticida que se va a llenar.

En el tanque de inmersión Bovitraz se debe usar a un pH (grado de acidez o alcalinidad) alcalino de 12 a 14, esto lo logramos agregando hidróxido de calcio.



Science For A Better Life

Carga: Agregar 6 kg de hidróxido de calcio + 1 litro 600 ml de Bovitraz por cada 1000 litros de agua.

Recarga: Agregar 12 kg de hidróxido de calcio + 3 litros 200 ml de Bovitraz por cada 1000 litros de agua. Es aconsejable tanto con la cal como con el Bovitraz hacer pre-mezclas en cubetas antes de agregar al baño garrapaticida.

Debido al poder residual de **Bovitraz^{M.R.}** los intervalos de baño recomendados son de cada 14 a 21 días, dependiendo del tipo de garrapata, grado de infestación y época del año.

Debido a que Bovitraz no es un producto sistémico el período de retiro en leche y carne es de cero días.

Contraindicaciones:

Está contraindicado para su uso en caballos y gatos. Evitar su uso en cachorros menores de 4 semanas. En perros de razas toy (miniatura) Chihuahua, Poodle, Yorkshire, Collie, y Pastores, así como perros cruzados con éstas razas son más comunes los efectos de intoxicación, somnolencia o sedativos en Sistema Nervioso Central.

En caso de intoxicación administrar tratamiento analéptico respiratorio de sosten hasta que el paciente recobre sus constantes fisiológicas.

Protección Ambiental:

Al cambiar el líquido del baño evite la contaminación de ríos, embalses, aguajes, presas y otras fuentes de agua. Los baños de inmersión cargados con **Bovitraz^{M.R.}** se inactivan a un pH menor de 10 en 48 horas. Si se desea acelerar su inactivación se recomienda añadir sustancias que acidifiquen el baño como el ácido cítrico o el ácido acético. Un baño de inmersión cargado con Bovitraz con un pH de 7 se inactiva en 48 horas y con un pH de 6 se inactiva en 2 horas.

Es tóxico para peces, reptiles y abejas.



Periodo de retiro:

Bovitraz^{M.R.} no tiene periodo de retiro, por lo que la carne y leche de los animales tratados puede ser consumida el mismo día del tratamiento.

Presentación:

Frascos de 100 ml y 1lt.
Garrafa de 10 lt.

"Información propiedad de Bayer de México S.A. de C.V."



Science For A Better Life

9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

9.2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA

9.2.1.1 ANOVA Bioensayo

24h					
Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	
Modelo	7	191.6	27.3714	13.5168	
Error	32	64.8	2.025		Prob > F
C. Total	39	256.4		<.0001	

48 h					
Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	
Modelo	7	283.375	40.4821	43.181	
Error	32	30	0.9375		Prob > F
C. Total	39	313.375		<.0001	

72 h					
Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	
Modelo	7	398.175	56.8821	54.8262	
Error	32	33.2	1.0375		Prob > F
C. Total	39	431.375		<.0001	

9.2.1.3 Determinación CL₅₀

F1	
CL50 24 h	27.9875402
CL50 48 h	2.61568646
CL50 72 h	2.08648279

