

Ensayos sobre la actividad antialimentaria de un extracto etanólico de hojas de *Daphne gnidium* L. frente a cuatro especies de insectos

M. A. PÉREZ, R. OCETE y M. LARA

A partir de hojas desecadas de la planta *Daphne gnidium* L., perteneciente a la familia Thymeleaceae, se ha obtenido en continuo un extracto etanólico. La actividad antialimentaria de éste frente a larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae), *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae), *Haltica ampelophaga* Guér. (Col., Chrysomelidae) y *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae) ha sido valorada mediante diversos ensayos de selección (choice tests). Estos se realizaron en placas de Petri, en las que se dispusieron discos de hojas pertenecientes a plantas-huésped de las especies fitófagas anteriormente indicadas.

En cada caso, se ha calculado el índice FR_{50} (feeding ratio), que es el cociente entre la superficie total consumida de los discos tratados con el extracto y la correspondiente a los no tratados (discos de control), en el momento que las larvas han consumido el 50 % del control.

M. A. PÉREZ y R. OCETE. Lab. de Zoología Aplicada. Dpto. de Fisiología y Biología Animal. Fac. de Biología. C/ Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.

M. LARA. Estación Experimental Rancho de La Merced, Apto. 589 Jerez de la Frontera (Cádiz).

Palabras clave: Actividad antialimentaria, *Bombyx mori*, *Daphne gnidium*, *Haltica ampelophaga*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis*.

INTRODUCCION

El estudio de determinados compuestos secundarios presentes en las plantas tiene interés, no sólo para establecer líneas filogenéticas, sino también para desvelar su significado ecológico. Algunas de estas sustancias confieren a la especie que los sintetiza una ventaja selectiva frente a determinadas plagas y enfermedades (BELL, 1980).

Dentro del marco del control integrado de plagas, una parte del potencial investigador se encuentra dirigido a valorar la capacidad antialimentaria de determinados extractos vegetales, o de productos purificados de los mismos. Una vez identificada/s la/s materia/s activa/s responsable/s de la in-

hibición de la alimentación, se puede realizar un estudio sobre la viabilidad, tanto económica como técnica, de su síntesis.

El cultivo de ciertas especies vegetales que fueran fuente de determinados insecticidas biorracionales podría constituir una alternativa para aliviar los problemas socioeconómicos de determinadas áreas con excedentes agrícolas.

La planta que se ha utilizado para este trabajo es *Daphne gnidium* L., especie perteneciente a la familia *Thymeleaceae*, conocida vulgarmente por «torvisco». Se trata de una planta arbustiva perennifolia, de ramas erectas que llegan a alcanzar unos 120 cm de longitud. La floración se produce entre los meses de julio y noviembre, ori-

ginando racimos terminales. El fruto es de tipo baya.

El torvisco es frecuente en el área circummediterránea, donde ha sido empleada con diversos fines por la medicina humana y veterinaria. Su elección se basa en los bajos niveles de infestación que exhibe, según nuestras observaciones de campo. Si bien, hemos observado, en la zona de Jerez de la Frontera (Cádiz), la presencia de nidos de *Lobesia botrana* (Schiff.) (Lep., Tortricidae) sobre las inflorescencias e infrutescencias de algunos pies de planta situados en las proximidades de los viñedos, como ocurre en otras zonas dedicadas a la viticultura (NUZZACI y TRIGGIANI, 1982).

De su fitoquímica, cabe destacar la presencia de compuestos flavónicos y cumarínicos en las hojas (CABRERA y GARCÍA-GRANADOS, 1981), además de taninos y resina (PARIS y MOYSE, 1981).

La actividad antibacteriana de sus cumarinas fue puesta de manifiesto por CABREIRA *et al.* (1988).

MATERIAL Y METODOS

La recogida de la parte aérea de la planta se realizó el 7-XI-90, en el término municipal de Dos Hermanas (Sevilla), dentro de las cuadrículas con coordenadas UTM: 30STG3832 y 30STG3833. Su secado se realizó al aire libre.

Para la extracción, se tomó una muestra de 20 g de hojas, que una vez fragmentadas, se introdujeron en un cartucho de papel de filtro, antes de depositarse en el soxhlet. El disolvente empleado fue alcohol etílico de 96°.

La elección del etanol se hizo teniendo en cuenta la polaridad de los compuestos mencionados en el apartado anterior. Además, se realizaron diferentes pruebas de extracción en frío, partiendo de 1 g de muestra, con otros disolventes, como el cloroformo y hexano. En cada caso, una alícuota del filtrado se llevó a cromatografía en capa fina, sobre un soporte de sílica-gel. Como eluyentes se emplearon mezclas de cloro-

formo y etanol, en diferentes proporciones. Posteriormente, se procedió al revelado de las placas con rayos ultravioleta. De esta forma, se comprobó que la máxima fluorescencia azulada, atribuible a la presencia de compuestos cumarínicos, aparecía en el extracto etanólico.

Tras la extracción sólido-líquido en continuo, mediante la acción del rotavapor se obtuvo una masa alquitranosa de color verde muy oscuro. De ella, se tomaron distintas cantidades que se disolvieron, independientemente, en una mezcla que contenía una parte de agua por cuatro de acetona, en el interior de una cubeta de ultrasonidos. De cada una, previa dilución a la mitad en acetona, se tomaron 10 µl con una microjeringa, que fueron uniformemente repartidos por el haz de los cuatro discos vegetales tratados (DT), de 1 cm² de superficie, que se alternaban con otros cuatro de control (DC), sobre los que se extendía, de igual manera, la misma cantidad de acetona.

Cada grupo de ocho discos se encontraba en el interior de una caja de Petri de 8,5 cm de diámetro.

Una vez evaporada la acetona, en el centro de cada caja se colocaron las larvas, y se taparon. Posteriormente, se fueron midiendo las superficies consumidas de los DT y DC, a diferentes tiempos. Con los datos obtenidos en estos tests de selección (choice tests), se calculó el índice FR₅₀ (feeding ratio), que es el cociente entre la superficie total consumida de los DT y la correspondiente a los DC, en el momento en que las larvas han consumido el 50 % del control, como se indica en el artículo de ANTONIOUS y SAITO (1981).

Los discos vegetales fueron cortados mediante un sacabocados, eligiendo aquellas partes del limbo que no contuvieran nervaduras gruesas, tras haber lavado las hojas cuidadosamente, para evitar la presencia de residuos de pesticidas.

Las hojas empleadas pertenecían a las siguientes especies:

Lechuga (*Lactuca sativa*).

Morera (*Morus nigra*).

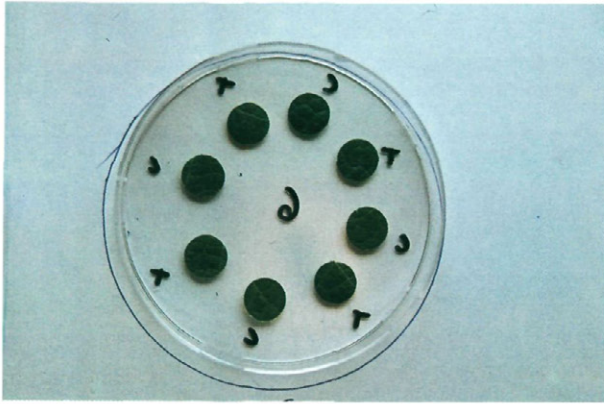


Fig. 1.—Disposición alterna de discos de control y tratados. En el ensayo, cada disco se sitúa sobre su letra correspondiente.



Fig. 2.—Ensayo con larvas de altica (*Halitica ampelophaga* Guér.).

Vid (*Vitis vinifera*), variedad Palomino fino.

Patata (*Solanum tuberosum*), variedad Panda.

En cuanto a las larvas utilizadas, éstas pertenecían a cuatro especies:

a) *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae).

b) *Bombyx mori* L. (Lep. Bombycidae).

c) *Halitica ampelophaga* Guér. (Col., Chrysomelidae).

d) *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae).

a) Para los ensayos con esta especie se emplearon larvas del quinto estadio, recién mudadas, procedentes de un insectario. Las cajas de Petri se introdujeron en una estufa de cultivo a 32° C y 70 % de humedad relativa, en oscuridad total. Como las larvas estaban alimentadas en su proceso de crianza con dieta artificial, se les suministraron hojas de lechuga 1 hora antes de comenzar las pruebas. Este quinto estadio es el que usualmente se emplea en valoraciones de este tipo (BELLES y PIULACHS, 1983; CHIU y ZHANG, 1984 y BELLES *et al.*, 1985).

Como con *S. littoralis* se hicieron los ensayos iniciales de este trabajo, los tests fueron realizados con dosis de 100, 40 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de extracto sin purificar, inde-

pendientemente. Además, se realizaron dos pruebas adicionales: Se digirieron 100 mg de extracto seco con hexano, el precipitado se lavó con acetona. Ambas fracciones se llevaron a sequedad en rotavapor y se prepararon sendas disoluciones con acetona (FH y FA), de tal forma que la dosis depositada sobre los DT fuera de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en los dos casos, a fin de comparar sus actividades antialimentarias.

b) En el caso de este otro lepidóptero, se emplearon larvas de cuarta edad, recién mudadas, alimentadas desde la eclosión de los huevos con hojas de morera. Los experimentos se realizaron a 27° C y 60 % de humedad relativa, con iluminación natural, con una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Dada la facilidad de mantener poblaciones de esta especie en el laboratorio, es frecuente también su empleo en este tipo de valoraciones (TADA y CHIBA, 1984).

c) Este crisomélido constituye una plaga secundaria de la vid en la actualidad, ya que se encuentra bien controlado con los tratamientos dirigidos contra la piral y lobesia (CORTÉS, 1991) aunque es relativamente frecuente en parras próximas a edificaciones con luz eléctrica (ya que ésta atrae a los imagos), en los alrededores de Jerez de la Frontera.

Para las pruebas se han elegido las larvas del tercer, y último, estadio (preninfa),

que pese a ser las más activas a la hora de alimentarse, cuando sólo se depositan 5 individuos por caja de Petri, el experimento dura excesivamente (entre 10 y 12 horas), y los discos vegetales se desecan demasiado. Debido a ello, se volvió a repetir la prueba con la misma dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de extracto, con 25 ejemplares. Los tests se realizaron en las mismas condiciones del caso anterior, pero en oscuridad total.

d) Este otro crisomélido continúa siendo la principal plaga del cultivo de la patata, y ha sido objeto de varios ensayos para comprobar la capacidad antialimentaria de extractos de *Angelica sylvestris* y *Heracleum sphondylium* (RENOU y ZAGATTI, 1986).

Para las pruebas se tomaron larvas de la tercera edad, muy abundantes en una parcela de Cuzcurrita de Río Tirón (La Rioja).

Las condiciones del experimento fueron 28° C, 65 % de humedad relativa, e iluminación natural, dentro del laboratorio. La dosis empleada fue, igualmente, de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos mediante las pruebas de selección aparecen en el Cuadro 1:

De acuerdo con los datos expuestos, se pueden hacer las siguientes consideraciones:

— La dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ muestra actividad antialimentaria sobre *S. littoralis*, ya que el valor de $\text{FR}_{50} < 0,5$, pero dicho efecto puede estar enmascarado por un rechazo de las larvas, debido a un efecto físico de repelencia, provocado por la elevada concentración de extracto depositada sobre los discos de control.

— La dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no es suficiente para provocar un efecto antialimentario sobre este estadio de *Spodoptera*. Por el contrario, la superficie consumida de los discos tratados supera a la de control en cuatro de las seis repeticiones efectuadas. Habiéndose obtenido valores de FR_{50} muy dispersos.

— Cuando el ensayo se realizó con la FA, se obtuvo un FR_{50} muy inferior al correspondiente a la FH, ya que esta última fracción carece, según esta prueba, de poder inhibitorio de la alimentación sobre *S. littoralis*. Lo cual parece indicar que las sustancias responsables del efecto antialimentario son de naturaleza polar, como los flavonoides, las cumarinas y sus derivados, las resinas y los taninos. Esta cualidad tiene un gran interés porque hace posible que el agua se pueda emplear, en una elevada

Cuadro 1.—Resultados obtenidos en las pruebas de selección

Especie	Discos	N.º larvas /placa	Edad	Dosis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Repeticiones	$\text{FR}_{50} \pm \text{SEM}$	T (horas)
a	Lechuga	5	L ₅	100	6	0,30 \pm 0,09	3,5
a	Lechuga	5	L ₅	40	6	0,41 \pm 0,06	3,5
a	Lechuga	5	L ₅	10	6	1,96 \pm 0,25	3,5
a	Lechuga	5	L ₅	40 (FA)	6	0,38 \pm 0,05	2,5-3,5
a	Lechuga	5	L ₅	40 (FH)	6	0,93 \pm 0,04	2,5-3,5
b	Morera	5	L ₄	40	6	0,21 \pm 0,03	1,5-3,0
c	Vid	5	L ₃	40	6	0,26 \pm 0,03	10-12
c	Vid	25	L ₃	40	6	0,18 \pm 0,01	3,5-5,0
d	Patata	5	L ₃	40	6	0,19 \pm 0,04	1,0-2,0

NOTA:

SEM significa Desviación Estándar de la Media.

T es el tiempo necesario para que se llegue a consumir el 50 % de la superficie de los DC.

FA y FH son las fracciones disueltas en acetona y hexano, respectivamente.

proporción, como componente de la fase disolvente y abaratar los ensayos de campo.

— La dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ parece mostrar una cierta actividad antialimentaria sobre *Spodoptera*. Este efecto es mucho más satisfactorio en el caso de los restantes insectos.

Lógicamente, este estudio preliminar debe ser completado con el empleo de diferentes dosis sobre éstas y otras especies de artrópodos fitófagos. Además, deberán ensayarse diferentes extractos, tomando como base la misma planta y especies próximas fácilmente cultivables, como es el caso de *Daphne laureola* L.

También, se han de realizar pruebas individualizadas con las sustancias purificadas

de naturaleza polar anteriormente citadas, y con combinaciones de las mismas, por si se diera algún efecto de tipo sinérgico. De acuerdo con los resultados obtenidos, se han de evaluar los pros y los contras de su empleo frente al de los extractos no purificados, en las parcelas de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos hacer patente nuestro agradecimiento a la Dra. Ayuso del Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Fac. de Farmacia de Sevilla, así como a los Dres. Bellés, Camps, Coll y al biólogo D. J. Lloira del Centro de Investigación y Desarrollo (CSIC) de Barcelona.

ABSTRACT

PÉREZ, M. A., OCETE, R. y LARA, M., 1992: Ensayos sobre la actividad antialimentaria de un extracto etanólico de hojas de *Daphne gnidium* L. frente a cuatro especies de insectos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 18 (2): 435-440.

From dried leaves of *Daphne gnidium* L. plant, belonging to Thymeleaceae family, has been obtained an ethylic extract. The antifeedant activity of the former on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae), *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae), *Haltica ampelophaga* Guér. (Col., Chrysomelidae) y *Leptinotarsa decemlineata* (Col., Chrysomelidae) has been evaluated by various choice tests. These were done on Petri plates on which were placed discs of leaves belonging to host-plants of those species previously indicated.

In each case, the FR_{50} (feeding ratio) has been calculated which is the result of the division of the total surface consumed of the discs treated with the extract by that corresponding to those untreated (control discs), at the moment when the larvae had consumed fifty per cent of the control.

Key words: *Bombyx mori*, *Daphne gnidium*, *Haltica ampelophaga*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis*.

REFERENCIAS

- ANTONIOUS, A. G.; SAITO, T., 1981: Mode of action of antifeed compounds in the larvae of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lep., Noctuidae). I. Antifeeding activities of chlordimeform and some plants diterpenes. *Appl. Ent. Zool.*, 16(4): 328-334.
- BELL, E. A., 1980: The possible significance of secondary compounds in plants, en Secondary plant products. *Encyclop. Plant. Physiol.*, 8: 11-21. Ed. Springer-Verlag. Berlín.
- BELLES, X.; PIULACHS, M. D., 1981: Actividad fagorepелente de acetato de trifenilestano sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidóptera, Noctuidae). *Acta I Congr. Ibérico de Entomología*, 1: 101-105.
- BELLES, X.; CAMPS, F.; COLL, J.; PIULACHS, M. D., 1985: Insect antifeedant activity of clerodane against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidóptera). *J. Chem. Ecol.*, 11: 1439-1445.
- CABRERA, E.; GARCÍA-GRANADOS, A., 1981: Fitoquímica de Thymeleaceae (III): Componentes cumarínicos y flavónicos en hojas de *Daphne gnidium* L. *An. Quim.*, 77: 31-34.
- CABRERA, E.; GARCÍA-GRANADOS, A.; MAQUEDA, M., 1988: Antibacterial activity of coumarins isolated from *Daphne gnidium* L. *Microbios Letters*, 37: 153-159.
- CHIU, S. F.; ZHANG, Y. G., 1984: Effects of some plant material of Melicaceae on fifth instar larvae

- of *Spodoptera litura* as feeding inhibitors. *Neem Newsletter*, **1**(3): 23-24.
- CORTÉS, J. A., 1991: Ficha fitosanitaria de *Altica* (*Halitica ampelophaga* Guér.). *Viticultural/Enología Profesional*, **15**.
- NUZZACI, G.; TRIGGIANI, O., 1982: Note sulla biocenosi in Puglia della *Lobesia botrana* (Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae) infeudata a *Daphne gnidium* L. *Entomológica*, **XVII**: 47-52.
- PARIS, R.; MOYSE, H., 1981: *Matière médicale*. (II): 450-451. Ed. Masson. Paris.
- RENOU, M.; ZAGATTI, P., 1986: L'avenir des médiateurs chimiques dans la lutte contre les insectes. *Phytoma*, **375**: 13-17.
- TADA, M.; CHIBA, K., 1984: Novel plant growth inhibitors and insect antifeedant from *Chrysanthemum coronarium*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**(5): 1367-1369.