

Bioactividad de extractos de *Melia azedarach* L. sobre el taladro del maíz *Sesamia nonagrioides* Lef.

M. RIBA, E. TORRA Y J. MARTÍ

A partir de un extracto metanólico de semillas de *Melia azedarach* se han aislado los compuestos responsables de su actividad biológica como agentes inhibidores de la alimentación y reguladores del desarrollo sobre *Sesamia nonagrioides*. Las pruebas biológicas de actividad se han realizado incorporando cada fracción a la dieta, hojas de maíz o dieta sintética, de larvas de 2.º estadio del insecto.

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa, utilizando un cartucho de fase reversa, ha permitido separar dos componentes con cantidad y pureza suficientes para poder ser analizados con posterioridad mediante técnicas espectroscópicas.

M. RIBA, E. TORRA Y J. MARTÍ. Unidad de Protección de Cultivos Centro UdL-IRTA. Rovira Roure, 177. 25006-Lleida.

Palabras clave: *Sesamia nonagrioides*, *Melia azedarach*, actividad antialimentaria, actividad reguladora del desarrollo, cromatografía líquida de alta resolución.

INTRODUCCIÓN

En el campo de los Aleloquímicos, investigaciones multidisciplinarias sobre fisiología y bioquímica de los insectos y sobre ecología química, en especial estudios de las relaciones planta-insecto, han puesto en evidencia que determinados metabolitos secundarios de algunas plantas podían actuar como inhibidores de la alimentación del insecto, o también inducir cambios en el crecimiento, desarrollo, reproducción, diapausa, y comportamiento general de los mismos (WITTAKER, 1970).

Dentro de este ámbito los productos más prometedores descubiertos hasta ahora se han encontrado en especies de las familias *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Labiatae* y *Canallaceae* (JACOBSON, 1989). De todas ellas destaca la familia de las *Meliaceae*, y más concretamente la especie *Azadirachta indica* A. Juss ("neem"), de la que se ha

obtenido entre otros productos la Azadiractina, uno de los compuestos con mayores perspectivas en el campo de los insecticidas biorracionales (SCHMUTTERER y ASCHER, 1981, 1984 y 1987).

La caracterización de productos naturales con actividad plaguicida, bien con miras a un hipotético empleo directo en la lucha contra plagas, bien para uso como modelos en estudios estructura-actividad, o bien en estudios sobre la viabilidad de implantación en plantas sensibles, por ejemplo utilizando técnicas de ingeniería genética, de genes exógenos capaces de inducir la producción de compuestos útiles para su autodefensa, constituye en conjunto un trabajo apasionante de investigación en este campo (HILLER y otros 1987).

Melia azedarach, de la misma familia *Meliaceae*, es un árbol originario de Asia, que hoy en día se encuentra naturalizado en muchas regiones subtropicales de Asia,

Africa, y también se ha implantado en zonas de climatología cálida de América y sur de Europa. En Lleida se le encuentra como árbol ornamental en muchas calles, plazas y jardines de nuestros pueblos.

Sesamia nonagrioides constituye, junto con *Ostrinia nubilalis*, las dos plagas de lepidópteros más dañinas de los campos de maíz de los países del Area Mediterránea (ANGLADE, 1972). Todos los métodos de lucha ensayados hasta la fecha contra la plaga (métodos culturales, uso de variedades con cierta resistencia a los taladros, tratamientos químicos con plaguicidas sistémicos más o menos selectivos...) han dado resultados irregulares y poco satisfactorios, debido fundamentalmente a la protección que para el insecto supone su régimen endófito.

En nuestro laboratorio se ha iniciado recientemente una línea de investigación dirigida al estudio de los agentes responsables de la bioactividad de extractos de especies botánicas de interés fitosanitario. En este sentido estudios previos sobre extractos de *M. azedarach* mostraron la existencia de una serie de compuestos con fuerte actividad biológica sobre lepidópteros y heterópteros. Este fue el punto de partida del presente trabajo, en el que se ha intentado aislar algunos de estos compuestos presentes en extractos de semillas de dicha planta. Las pruebas de bioactividad se llevaron a cabo sobre larvas de *S. nonagrioides*, insecto ampliamente estudiado en nuestro Centro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cría de *S. nonagrioides*.

La cría del insecto se llevó a cabo en nuestro laboratorio y se iniciaba a partir de puestas sobre las vainas de plantas de maíz. Ante la inminencia de la eclosión, lo que se deducía por observación de la transparencia de la vaina, se procedía a la separación de los huevos del resto de la planta

y se depositaban en cajas de cría junto con una porción de hoja de maíz desinfectada y con una porción de dieta, que servía entre otras cosas como agente humificador. Las cajas se introducían en la cámara de cría y se dejaban en condiciones de desarrollo continuo (16L:8O, 25°C), hasta que las larvas llegaban al 3^{er} estadio. En este estadio se colocaban en cajas mayores, transparentes y permeables al oxígeno y humedad, a las cuales se añadía periódicamente dieta artificial (POITOUT y BUES, 1974) hasta la pupación. En todo el proceso se vigilaba especialmente la aparición de hongos. Una parte de larvas de 2.º estadio se separaban para realizar las pruebas biológicas.

Al pupar las larvas eran sexadas, por observación de orificios genitales. Cuando las pupas adquirían una coloración oscura eran trasladadas, en proporción 2 machos/1 hembra, a las jaulas de reproducción y puesta, que contenían plantas de maíz de unos 20 cm de altura en macetas donde las hembras fecundadas iban a depositar las puestas. Las pupas se depositaban sobre el sustrato de la planta para evitar su desecación. Para alimentar a los adultos se introducía en las jaulas una solución de sacarosa.

Obtención del extracto de semillas de *M. azedarach*

La recolección de frutos de *M. azedarach* se realizó en el mismo Campus de la ETSIA (UdL) durante febrero de 1994 después de su maduración. Se procedía entonces a la extracción manual de las semillas, que posteriormente eran trituradas y secadas en estufa de aire forzado a 40-50°C, durante 48 horas.

Para la obtención del extracto seguimos la metodología propuesta por WARTHEN y otros (1984), ligeramente modificada por nosotros. Dicha metodología, que se presenta en forma esquemática en la figura 1, consistió en la extracción con metanol del material

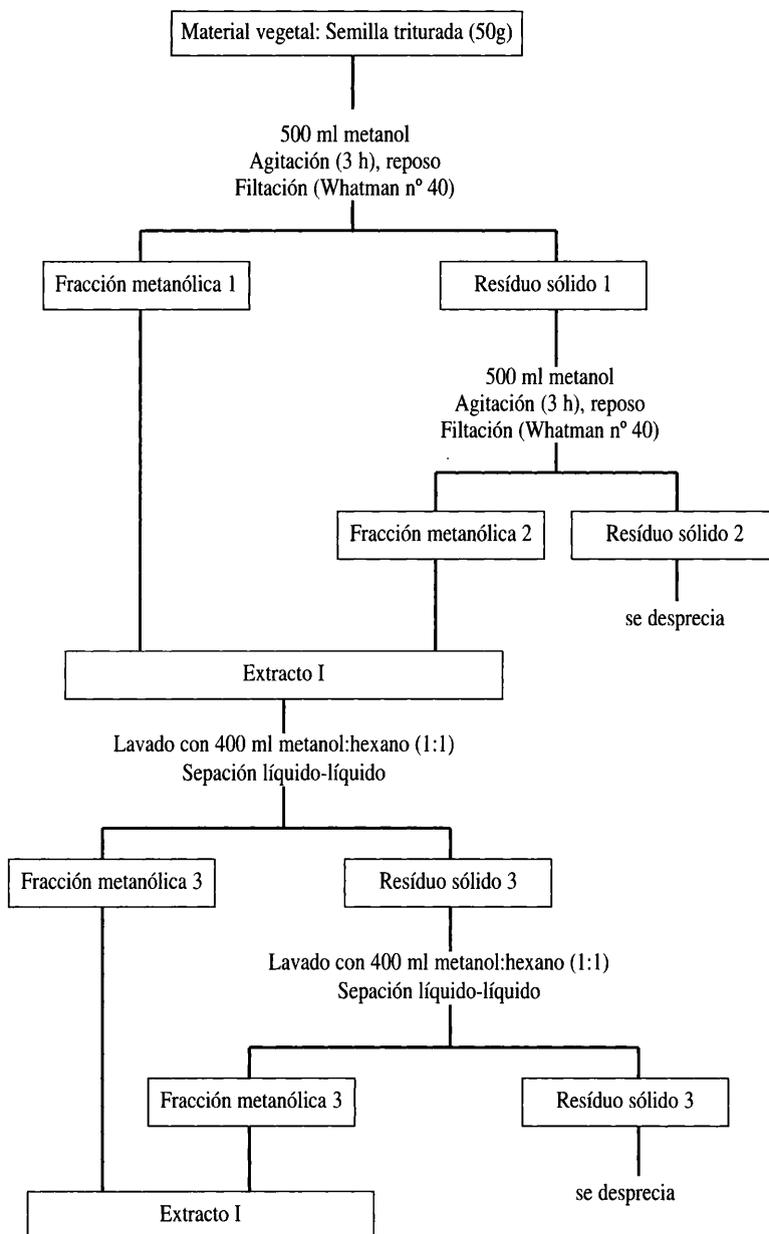


Figura 1.-Obtención del extracto de semillas de *M. azedarach*.

vegetal triturado, para obtener el denominado Extracto I. Este extracto fue deslipificado mediante extracción líquido-líquido con mezcla metanol-hexano, obteniéndose al final el extracto II. En él se concentraba la actividad y fue tomado como producto de partida para la obtención de los principios activos de la planta.

Partiendo de 50 g de material vegetal se consiguieron 0.5 g de Extracto II.

Aislamiento y purificación de los compuestos activos del extracto de *M. azedarach*

Se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a escala semipreparativa. Para ello se empleó un módulo de compresión radial (Waters RCM 25x10 cm), con un cartucho de fase reversa (Prep Nova-Pak® HR C-18, de 6 μ , 60 Å). El registro de todo el proceso cromatográfico se realizó con un detector Diodo-Array, trabajando con una longitud de onda de 220 nm. La fase móvil fue metanol: agua (1:1) o metanol, con un flujo de 6 ml/min.

En la figura 2 se puede observar un esquema del proceso de purificación cromatográfica del extracto II.

La actividad de las diferentes fracciones procedentes de la manipulación del extracto se evaluó mediante bioensayos de la actividad antialimentaria y la actividad reguladora de crecimiento.

Partiendo de 0.4 g de Extracto II se llegó finalmente a obtener: 8 mg. de F24, y 2 mg. de F332, fracciones que contenían los productos responsables de la actividad biológica.

Pruebas biológicas de actividad

Para cada fracción probada se utilizó un mínimo de 30 larvas *S. nonagrioides*. Estas larvas pertenecían a diferentes puestas con la finalidad probar cada producto en una pobla-

ción representativa de las diferentes líneas del laboratorio. Todas las larvas utilizadas eran de 2° estadio.

Como punto de referencia se empleó también Azadiractina (95% de pureza, Sigma n° A-7430), producto de efectividad contrastada en larvas de lepidópteros. Igualmente se utilizaron dos testigos: Uno denominado blanco (no se aplicaba ni disolvente ni producto) y otro denominado testigo (donde se aplicaba el disolvente utilizado).

Para la realización de estas pruebas se llevaron a cabo dos tipos de ensayos diferentes: En uno las larvas se alimentaron con hojas de maíz tratadas y en otro con la dieta artificial tratada. En ambos casos los ensayos se dieron por concluidos cuando la larva llegó al estado adulto.

Los parámetros utilizados para evaluar la actividad de cada tratamiento fueron:

- Evolución del peso medio por larva a lo largo del periodo que duraba el ensayo.
- Incremento relativo de peso medio durante el periodo comprendido entre dos pesadas. Las medidas se efectuaron cada dos días.
- Duración del período desde el 2.º estadio hasta la pupación.
- Mudas anormales.
- Mortalidad acumulada en el período de experiencia.

Alimentación de las larvas con hojas de maíz tratadas

Para cada fracción o producto a probar se tomaron 20 trozos de hoja de maíz (3 x 2 cm..) y se mojaron abundantemente por inversión durante 30 seg. en una solución acuosa del mismo de concentración 10 ppb, en presencia de unas gotas de un tensoactivo no iónico (Etdina-S). Posteriormente con ayuda de pinzas los trozos de hoja se retiraban de la solución y se secaban al aire sobre papel de aluminio, tras lo cual se colocaban por pares en cajitas para la alimentación de las larvas.

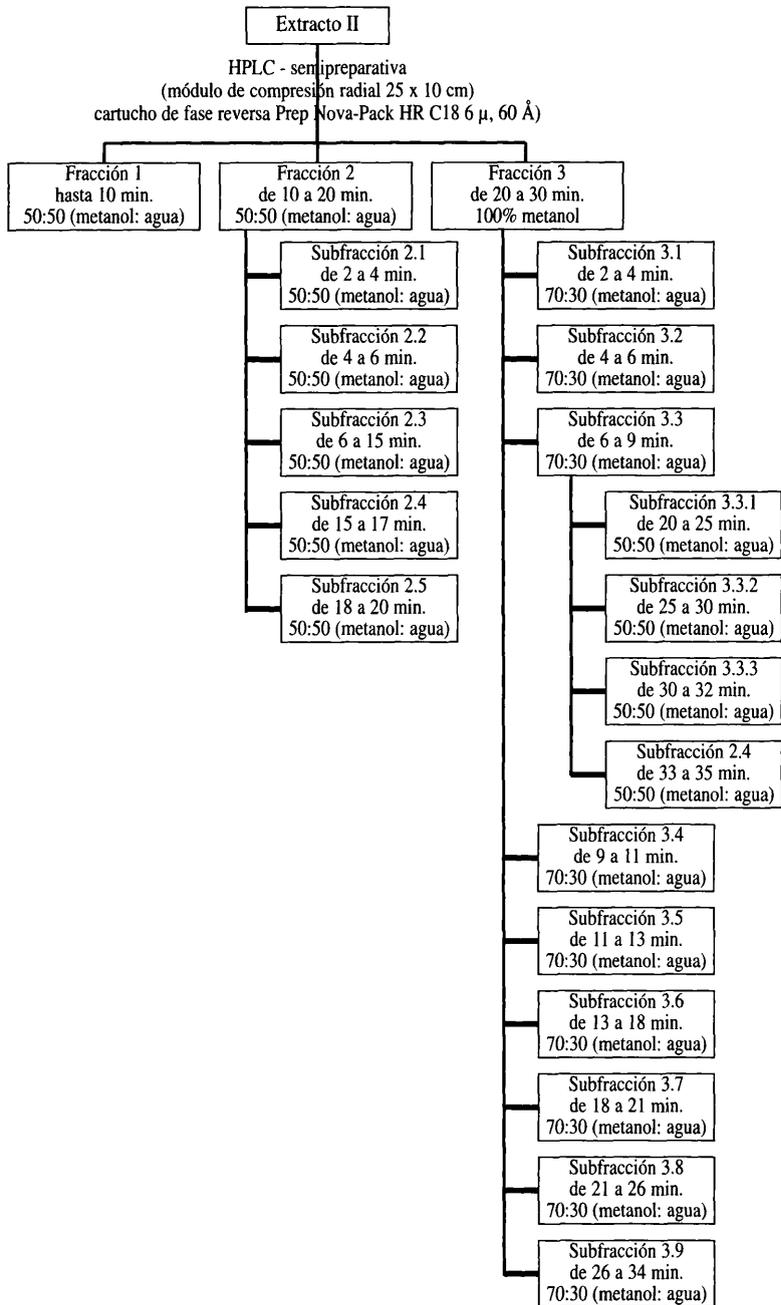


Figura 2.- Purificación cromatográfica del extracto de semillas de *M. azedarach*.

El proceso se repetía cada dos días, momento que era aprovechado para pesar las larvas. A partir del décimo día de tratamiento se sustituyeron las hojas por dieta artificial no tratada.

Alimentación de larvas con dieta artificial tratada

La aportación de cada producto o fracción a probar se realizaba en forma de disolución acetónica añadida como un ingrediente más en la preparación de la dieta artificial. En cada cajita de cría se colocaba una porción de dieta variable según el tamaño de las larvas. La dieta se cambiaba cada dos días, momento en que se aprovechaba para evaluar el peso de los insectos.

El extracto II se utilizó a una concentración de 450 ppm, lo que equivalía a 0.16 g de extracto. Las fracciones resultantes del proceso cromatográfico del extracto F1, F2, F3, así como las subfracciones obtenidas a partir de ellas, fueron utilizadas a una dosis que correspondía a la cantidad equivalente resultante del procesamiento de 0.16 g de extracto II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cromatográfico del extracto y sus fracciones

En la figura 3b se presenta el cromatograma de HPLC, obtenido con la inyección directa del extracto II. Es un cromatograma en el que predominan tanto compuestos muy polares como compuestos muy apolares. A pesar de su complejidad se aprecia la existencia de tres zonas diferenciadas, que recogimos aparte y denominamos F1, F2, y F3.

Las fracciones F2 y F3 fueron activas en pruebas de bioactividad (ver resultados, Figura 8a y Cuadro 3), por lo que se continuó con su estudio, mientras que la fracción mas polar F1 no mostró ninguna actividad en el mismo tipo de pruebas.

En la figura 3b se presenta el cromatograma obtenida con la inyección de la fracción F2 y en el se especifican las distintas subfracciones recogidas: F21, F22, F23, F24, y F25. De todas ellas solo las fracciones F22, F24 y F25 contenían suficiente cantidad de producto para poder efectuar pruebas de actividad anti-alimentaria, las restantes F21 y F23 contenían menos de 0.1 mg. y no fueron probadas.

Las pruebas biológicas realizadas empleando las diferentes subfracciones de F2 indicaron que la actividad se concentraba en la subfracción F24 (resultados, Figura 8b y Cuadro 4).

El cromatograma de esta fracción F24 activa se presenta en la figura 3c, y tal y como puede verse, dicha fracción contenía dos productos, en una relación aproximada de 3:1. Por mas que se procedió a otras purificaciones, en ningún caso se consiguió tener un producto puro, puesto que en todos los intentos se obtenían siempre cromatogramas parecidos. Por todo ello se concluyó que el producto minoritario provenía de la descomposición del compuesto buscado en las condiciones experimentales de operación.

La fracción F3 según indica el cromatograma de la figura 4a, fue dividida en 9 subfracciones, que fueron recogidas por separado y su actividad evaluada según el tipo de pruebas descrito.

La fracción con actividad inhibidora de la alimentación fue ahora la F33 (Figura 8c y Cuadro 5). En la figura 4b se puede ver su cromatograma, que al menos contenía cuatro productos mayoritarios. Al proceder a un nuevo fraccionamiento de la misma conseguimos concentrar la actividad en la F332 (resultados, Cuadro 5).

Pruebas de bioactividad.

Pruebas con hojas de maíz tratadas.

En esta prueba pudimos determinar el efecto del extracto II de semillas de *M. azedarach*, sobre larvas *S. nonagrioides*, y

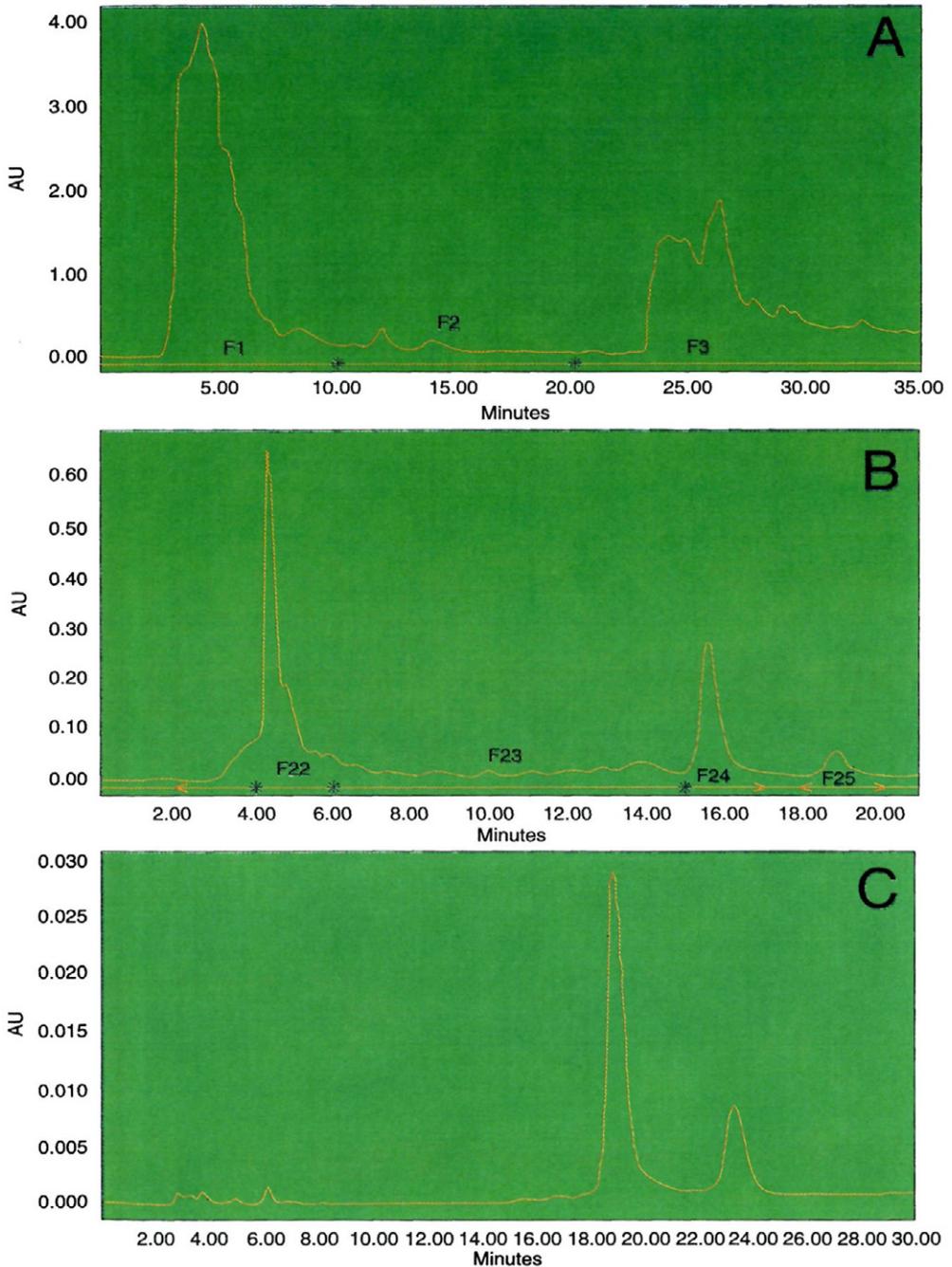


Figura 3.-Cromatogramas HPLC: (A) del extracto II, (B) de la fracción activa F2, (C) de la fracción activa F24. La fase móvil fue 6 ml/min de metanol/agua (50:50), que a partir del minuto 20 se cambiaba a 100 % metanol. El detector trabajaba a λ 220 nm. La fase estacionaria fue un cartucho de cromatografía preparativa de fase reversa C18 . En el eje de abscisas se especifican tiempos de retención y en ordenadas unidades de absorbancia.

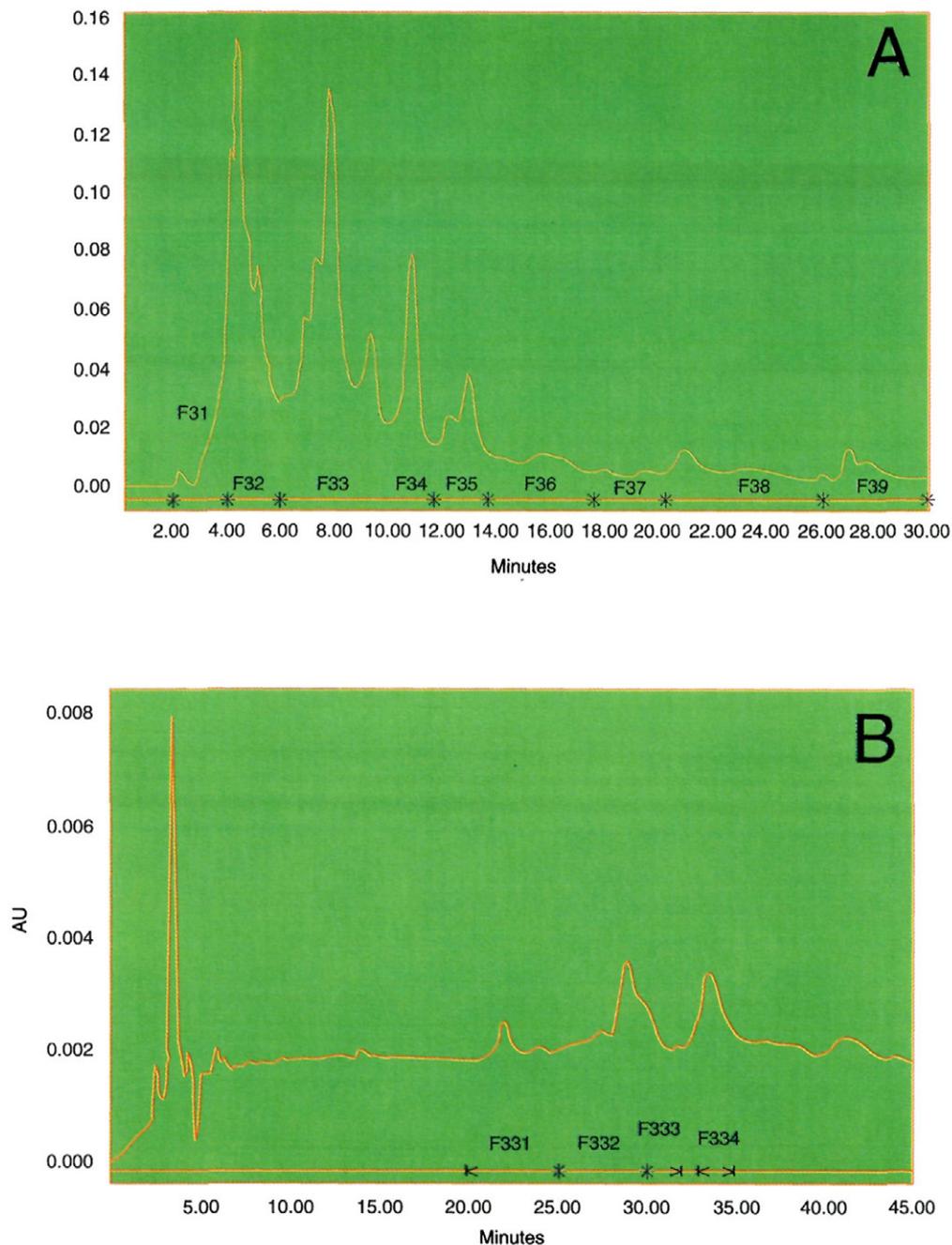


Figura 4.-Cromatogramas HPLC: (A) de la fracción activa F3, (B) de la fracción activa F33. La fase móvil fue de 6 ml/min de metanol:agua (70:30), a partir del minuto 18 se cambió por una fase 100% metanol. El detector trabajaba a una λ de 220 nm. La fase estacionaria fue un cartucho de cromatografía preparativa de fase reversa C18. En el eje de abscisas se especifican tiempos de retención y en el de ordenadas unidades de absorbancia.

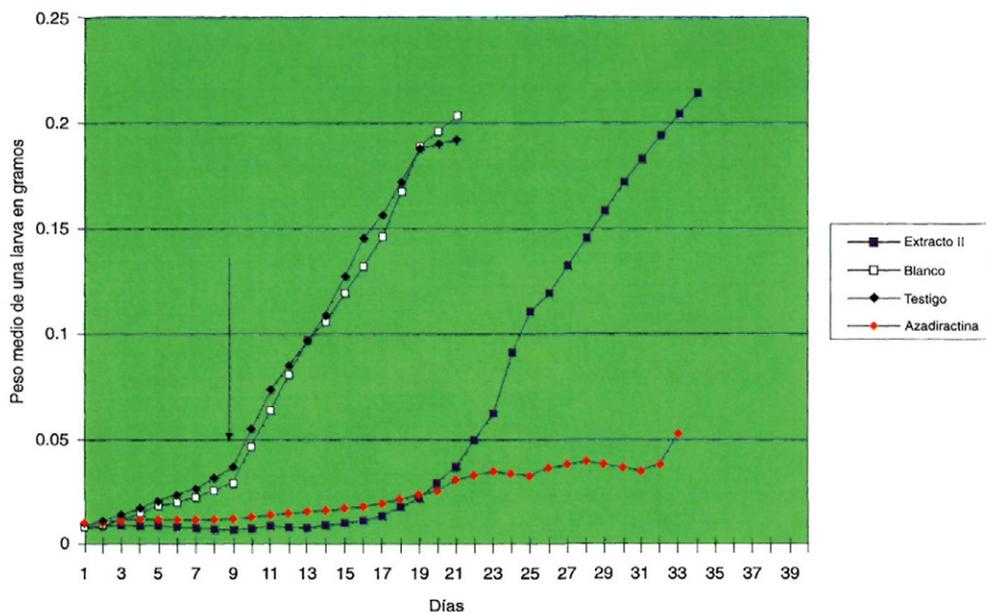


Figura 5.-Evolución del peso medio de una larva *S. nonagrioides* de 2.º estadio, alimentada con hojas de maíz tratadas con extracto II y azadiractina. El tratamiento se realizó durante 11 días, tras lo cual se siguió con dieta normal.

compararlo con el producido por azadiractina, frente a blanco y testigo.

La evolución del valor medio de pesos de larvas de *S. nonagrioides* a lo largo de la experiencia, se puede observar en la figura 5. Según se ve las larvas del ensayo blanco y testigo tienen la misma velocidad de crecimiento, lo que indica que el disolvente utilizado (acetona calidad analítica) no tiene efecto alguno en el comportamiento antialimentario de las larvas *S. nonagrioides*. Por otro lado, la velocidad de crecimiento de las larvas tratadas con azadiractina y con extracto es similar durante el periodo de tratamiento, pero pasado éste una porción de las larvas tratadas con extracto se recuperan y llegan a pupar, cosa que no sucede en el tratamiento con azadiractina, en que mueren todas a los 40 días.

Si se compara las curvas de evolución de larvas no tratadas con las tratadas con extracto, a partir del instante en que se suprime la dieta tóxica, se observa una coincidencia remarkable de las mismas. Ello indicaría que finalizado el tratamiento con extracto, cuando

este se sustituye con dieta normal, las larvas que sobrevivieron pudieron eliminar el efecto de la toxina y presentaron una pupación normal, con un peso equivalente, aunque al tiempo considerablemente superior que el control.

Igualmente se aprecian diferencias significativas respecto de los controles considerando los porcentajes de mortalidad y la duración del desarrollo larvario, tal como se deduce de los datos de Cuadro 1.

En la figura 6 se representa la evolución del incremento relativo de peso medio por larva y día en todo el periodo de la experiencia. De nuevo vemos la similitud entre los testigos que presenta un incremento bastante constante durante la experiencia, exceptuando el incremento notorio al cambiar el régimen alimenticio de las larvas. El extracto II y la azadiractina muestran por contra un claro efecto de fagoderrencia, importante en el experimento con extracto II, donde puede observarse que en los primeros días las larvas no sólo no ganan, sino que incluso pierden peso. Esto puede atribuirse a que la larva pierde su apeti-

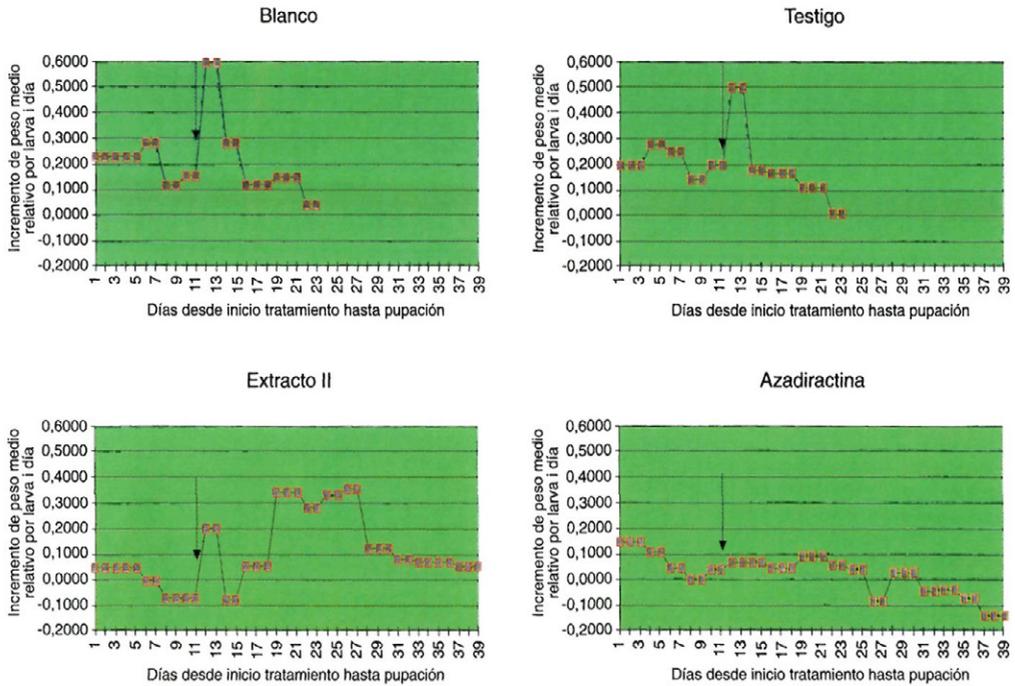


Figura 6.-Evolución de incremento relativo de peso medio por larva y día en la experiencia con hojas de maíz tratadas . La flecha indica periodo final de tratamiento e inicio de alimentación normal.

to, deja de comer, produce pocos excrementos y probablemente experimenta una pérdida de energía en la producción de biomasa para intentar la desintoxicación, tal como ha sido descrito para otros lepidópteros como *Heliotis virescens* (BARLEY y KLOCKE, 1987) o *Ostrinia nubilalis* (ARNALSON y otros, 1985), entre otros.

Otro hecho observable es que en el caso de la Azadiractina no se ve ningún cambio al acabar el tratamiento, la dosis de tóxico ingerida ha sido lo suficientemente elevada para provocar la muerte de todas las larvas a los 42 días. Con el extracto II en cambio, si bien se aprecia un porcentaje de mortalidad significativo, las larvas que sobreviven terminan desintoxi-

Cuadro 1.- Porcentaje de mortalidad y duración del desarrollo de larvas de *S. nonagrioides* de 2º estadio alimentadas con hojas de maíz tratadas con extracto II y azadiractina. (FT), porcentaje acumulado al final del tratamiento; (FP) porcentaje acumulado hasta la pupación; ET, error típico; (n), número de medidas contabilizadas en el análisis. Para cada ensayo las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p < 0.05$). El número de larvas al inicio de cada ensayo fue de 30.

Tratamiento	% de mortalidad		Duración del desarrollo (Días) Media±ET (n)
	(FT)	(HP)	
blanco	0	0	23±0.15 a (29)
testigo	0	0	23±0.18 a (29)
extracto II	3	77	45±5.2 b (7)
azadiractina	33	100	42

Cuadro 2.- porcentajes de mortalidad y duración de desarrollo de larvas *S. nonagrioides* de 2° estadio alimentadas con dieta artificial y con hojas tratadas con extracto II. (FP), porcentaje de mortalidad acumulada hasta la pupación; ET, error típico; (n), número de medidas contabilizadas en el análisis. Para cada ensayo las medias seguidas por una misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p < 0.05$).

Tratamiento	% de mortalidad	Duración del desarrollo (Días)
	(HP)	Media±ET (n)
blanco hojas	0	23.2±0.15 a (21)
blanco dieta	13	23.7±0.85 a (26)
extracto II hojas	77	45.4±5.2 b (7)
extracto II dieta	86	61.5±0.87 c (4)

cándose, recuperan el peso normal y presentan una muda normal, aunque con un período de desarrollo más largo que los testigos.

Refiriéndonos a la mortalidad (figura 7), también pueden apreciarse diferencias notorias entre ambos tóxicos. Durante el tratamiento el extracto produce una mortalidad del 65% y la azadiractina solo un 5 %, sin embargo la Azadiractina produjo una mortalidad escalonada tanto durante como después del tratamiento, llegando al 100% de mortalidad; por contra con extracto II, la mortalidad disminuye notablemente tras el tratamiento, siendo solo de un 10 %. La mayoría de las larvas morían ante la imposibilidad de desprenderse

del exubio, unas pocas, en caso de tratamientos con azadiractina, morían al poco tiempo de adquirir coloraciones negras.

Pruebas con dieta artificial tratada

Comparación de tratamientos en hojas y en dieta

Para comparar la actividad del extracto II en aplicaciones a dieta artificial o en hojas podemos observar los datos del cuadro 2. Como puede verse no existen diferencias en la velocidad de crecimiento de las larvas una

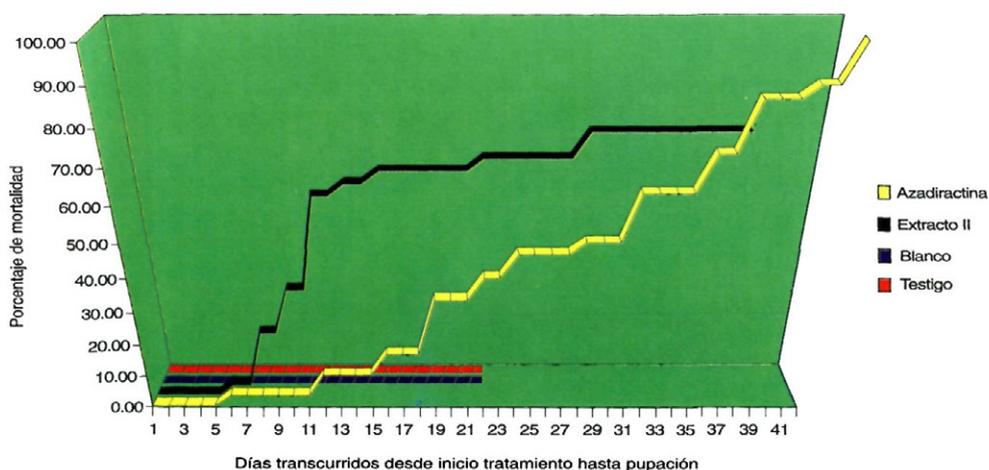


Figura 7.-Evolución de la mortalidad de las larvas *S. nonagrioides* alimentadas con hojas de maíz tratadas con extracto II y azadiractina.

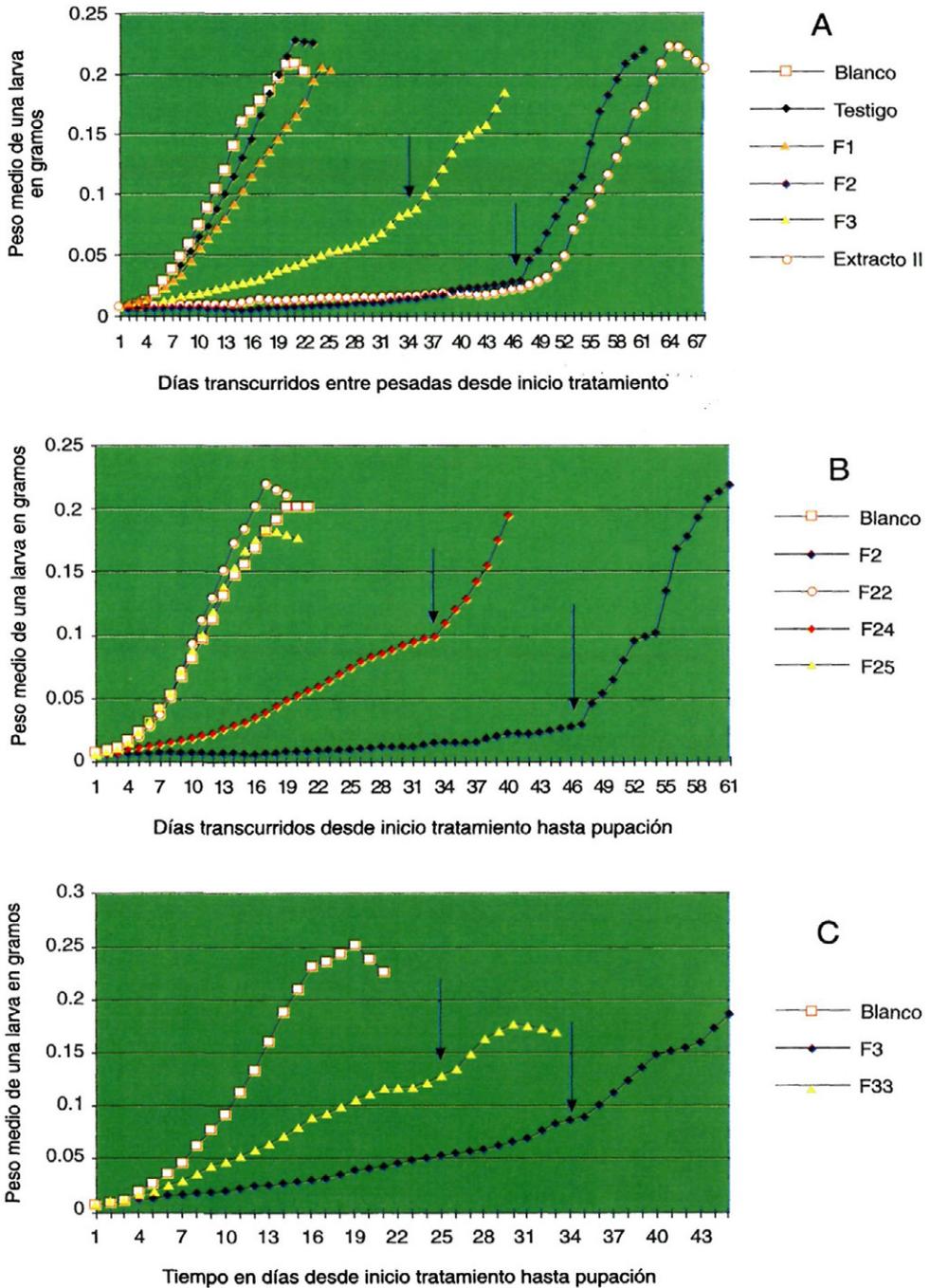


Figura 8.-Evolución del peso medio de larvas *S. nonagrioides* de 2.º estadio: (A) alimentadas con dieta tratada con extracto II y sus fracciones cromatográficas F1, F2 y F3, (B) alimentadas con F2 y sus subfracciones cromatográficas F24, F25 y F26 y (C) alimentadas con F3 y las sus subfracciones cromatográficas F33 y F332.

Cuadro 3.- Datos de mortalidad y duración del desarrollo obtenidos al alimentar larvas de *S. nonagrioides* de 2° estadio con dieta tratada con extracto de *M. azedarach* y las fracciones cromatográficas del mismo. (FT), porcentaje acumulado de mortalidad al final del tratamiento; (HP), porcentaje acumulado de mortalidad hasta la pupación; ET, error típico; (n), número de medidas contabilizadas en el análisis. Para cada ensayo las medias seguidas por una misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p < 0.05$).

Tratamiento	% de mortalidad		Duración del desarrollo (Días) Media±ET (n)
	(FT)	(HP)	
blanco	13	13	23.7±0.8 a (26)
testigo	16	16	31.8±1.3 b (25)
extracto II	66	86	66.4±4.5 d (5)
F1	26	26	31.5±1.1 b (21)
F2	76	83	61.5±0.8 d (4)
F3	36	46	47.2±1.6 c (16)

vez acabado uno u otro tratamiento, tampoco se vislumbran diferencias en los porcentajes de mortalidad, y aunque si aparecen al considerar la duración del período larvario, éstas son debidas, probablemente a la distinta duración del tratamiento en ambos casos, 11 días en la experiencia en la que se alimenta a larvas con hojas tratadas y 42 días en experiencia en que se aplica el tratamiento con la dieta.

Bioactividad de las fracciones del extracto II: F1, F2 y F3

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 8a y en el cuadro 3. De la misma se deduce que las fracciones F2 y F3 conjuntamente con el extracto II muestran mayor actividad inhibitoria de la alimentación que los controles. La velocidad de crecimiento de las larvas tratadas con F2 no difiere significativamente del tratamiento con extracto, mientras que los tratamientos con F3 presenta un comportamiento intermedio entre ambas y los controles. Esto mismo se evidencia en los datos de la tabla 3, donde de nuevo dichas fracciones son significativamente superiores al blanco, en datos de mortalidad global y también en datos de duración del periodo de desarrollo. El comporta-

miento de las larvas tratadas con F1 no difiere del que experimentan los testigos.

Bioactividad de las subfracciones de F2

Como ya se ha indicado solo pudo evaluarse la actividad de las subfracciones F22, F24 y F25. El cuadro 4 y la figura 8b compendian los resultados obtenidos. Como puede verse nuevamente, las fracciones que presentan diferencias significativas con el blanco son F2 y F24, tanto en la evolución de peso medio de larvas en el tratamiento, como en datos de mortalidad o de tiempos de desarrollo larval. Con ello debe concluirse que la actividad biológica se ha concentrado en F22. Esta fracción se vio era lo suficientemente pura para proceder a su análisis espectroscópico.

Bioactividad de las subfracciones de F3

La segunda fracción activa del extracto (F3) mostraba al menos 9 productos que fueron recogidos y probados siguiendo la misma metodología. De la observación de resultados de cuadro 5 y la gráfica de la figura 8c se deduce que todas las subfracciones probadas mostraron actividad nula, excep-

Cuadro 4.- Mortalidad larvaria y duración de desarrollo de larvas *S. nonagrioides* de 2° estadio alimentadas con dieta tratada con F2 y sus subfracciones cromatográficas. (FT), porcentaje acumulado de mortalidad al final del tratamiento; (HP) porcentaje acumulado de mortalidad hasta la pupación; ET, error típico; (n), número de medidas contabilizadas en el análisis. Para cada ensayo las medias seguidas por una misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p<0.05$).

Tratamiento	% de mortalidad		Duración del desarrollo (Días) Media±ET (n)
	(FT)	(HP)	
blanco	13	13	23.7±0.8 a (26)
F2	76	83	61.5 ± 0.8 c (4)
F22	0	0	22.8± 0.5 a (28)
F24	10	17	46.2±3 b (23)
F25	3	3	25.1±0.7 a (29)

Cuadro 5.- Mortalidad larvaria y duración del desarrollo de larvas *S. nonagrioides* de 2° estadio alimentadas con dieta tratada con F3 y sus subfracciones cromatográficas. (HP) porcentaje de mortalidad acumulada hasta pupación; ET, error típico; (n), número de medidas contabilizadas en el análisis. Para cada ensayo las medias seguidas por una misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD, $p<0.05$).

Tratamiento	% de mortalidad	Duración del desarrollo (Días) Media±ET (n)
	(HP)	
blanco	13	23.7 + 0.85 a (26)
F3	46	47.1+0.47 d (16)
F31	13	23.4 + 0.45 a (26)
F32	6	23.4 + 0.54 a (28)
F33	3	33.4 + 0.85 c (29)
F34	10	23.6 + 0.46 a (27)
F35	3	23.6 + 0.49 a (29)
F37	3	24.3 + 0.82 a (29)
F38	3	24.9 + 0.85 a (29)
F39	6	22.8 + 0.47 a (28)
F332	10	26.5 + 0.32 b (27)
F333	6	23.3 + 0.18 a (28)
F334	16	22.9 + 0.39 a (25)
F335	16	23.1 + 0.25 a (25)

tuando la subfracción F33. Parece, pues, que es en esta subfracción donde se ha concentrado la actividad.

Bioactividad de las subfracciones de F33

El cromatograma de F33 mostraba aun un conjunto de al menos cuatro productos mayoritarios. La bioactividad de los mismos una vez separados se deduce a partir de los datos de la tabla 5. De su estudio se deriva la apreciación de diferencias significativas entre blanco y la fracción F332 en la duración del periodo larvario. Las restantes subfracciones no muestran ninguna actividad, con lo que se concluye que es este producto el responsable principal de la actividad de F33.

En la figura 8c se describe la evolución del peso medio de las larvas tratadas con la fracción F332 comparativamente con F33 y F3. Si bien la bioactividad de F332 continua siendo superior al blanco, en cada etapa del proceso separativo se esta perdiendo efectividad. La explicación de esta pérdida de actividad hay que buscarla en alguna de estas causas, no excluyentes entre si: Una probable degradación química de los productos en su manipulación, una pérdida física como

consecuencia de una recuperación deficiente en cada etapa cromatográfica, y la existencia de alguna hipotética sinergia, que lógicamente se perdería en el proceso cromatográfico.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de semillas de *M. azedarach* presenta una fuerte actividad antialimentaria para las larvas de *S. nonagrioides*. Este efecto se manifiesta tanto con la incorporación del producto en dieta artificial, como con su aplicación en hojas.

- El efecto anti-alimentario del extracto es comparable con el de la azadiractina. Sin embargo, hay que señalar que una parte de las larvas tratadas con extracto se recuperan al interrumpir el tratamiento, y las tratadas con la misma dosis de Azadiractina no pueden hacerlo muriendo todas ellas antes de llegar a pupar.

- Existen al menos dos productos en el extracto responsables de la actividad antialimentaria, estos productos han sido aislados por cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa, utilizando pruebas biológicas de actividad antialimentaria como indicador.

ABSTRACT

RIBA, M.; E. TORRA Y J. MARTÍ, 1996: Bioactividad de extractos de *Melia azedarach* L. sobre el taladro del maíz *Sesamia nonagrioides* Lef. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22 (2): 261-276.

A systematic investigation of methanolic extracts of the seeds of *Melia azedarach*, has been carried out to isolate the main compounds, biologically active as feeding inhibitors and as insect growth regulators, for the Mediterranean Corn Borer, *Sesamia nonagrioides*. Biological activity of each fraction was evaluated by presenting it to the 2^o instar larvae of the insect into its feeding diet, maize leaves or synthetic diet.

A high performance liquid chromatographic reversed phase procedure has been developed whereby the two main active products of the extract could be isolated in amount enough to be later analyzed using spectroscopic techniques.

Key words: *Melia azedarach*, *Sesamia nonagrioides*, antifeedant activity, insect growth regulator activity, high performance liquid chromatography.

REFERENCIAS

- ANGLADE, P., 1972. Les sesamias. En: *Entomologie appliquée a l'agriculture. Lépidoptères*, Vol. II. Balachousky, Ed. Masson. París.
- ARNASON, J. T.; PHILOGEN, B. J. R.; DONSKOV, N.; HUDON, M.; MCDUGALL, C.; FORTIER, G.; MORAND, P.; GARDNER D.; LAMBERT, J.; MORRIS, C. AND NOZZOLILLO, C., 1985. Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **38**: 29-34.
- HILLER, V. A.; GALEHOUSE, A. H. AND BOULDER O., 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. **300**: 160-163.
- JACOBSON, M., 1989. Botanical pesticides: Past, present and future. pp: 1-10 en *Insecticides of plant origin*. Arnason J. T. Philogene B.J.R. and Morand P. (Eds.). *Am. Chem. Soc. ACS Symp. Ser.* n° 387.
- POITOUT, S. AND BUES, R., 1974 *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **6**: 431-41.
- SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K. R. S., y REMBOLD, H. (Eds), 1981. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). Proc. 1st Int. Neem Conf. German Agency for Thechnical Cooperation. Eschborn (Federal Republic of Germany).
- SCHMUTTERER, H., y ASCHER, K. R. S. (Eds), 1984 y 1987. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Proc. 2nd and 3rd Int. Neem Confs. German Agency for Thechnical Cooperation. Eschborn (Federal Republic of Germany).
- WARTHEN, J. D.; STOKES, J. B.; JACOBSON, M., AND KOZEMPEL, M. P., 1984. Estimation of azadirachtin content in neem extracts and formulations. *J. Liquid Chrom.* **7**: 591-598.
- WITTAKER, R. H., 1970. *Chemical Ecology*. pp: 43. Sondheimer E. and Simeone J. B. Eds. Academic Press. New York.

(Aceptado para su publicación: 12 febrero 1996)