

Utilización de análogos fluorados de la feromona sexual de *Sesamia nonagrioides* Lef. como inhibidores de su actividad biológica

A. SANS, M. PRADOS, M. EIZAGUIRRE, C. LÓPEZ y M. RIBA

Se ha estudiado el papel, como inhibidores de la acción feromonal, de determinados fluoroderivados, análogos estructurales del acetato de (Z)-11-hexadecenilo, componente principal de la feromona sexual del noctuido *Sesamia nonagrioides* Lef. Dichos compuestos fueron los análogos fluoroacetato (mono, di y trifluoroacetato de (Z)-11-hexadecenilo) y la trifluorometilcetona análoga [(Z)-1,1,1-trifluoro-14-nonadecen-2-ona]. La acción inhibitoria fue evaluada a partir de los resultados de actividad electrofisiológica (pruebas de electroantenograma, EAG), de estudios de comportamiento en pruebas de túnel de viento y de pruebas de capturas en campo. Los acetatos fluorados, especialmente el mono y el trifluoroacetato, se mostraron como buenos inhibidores de la acción atrayente de la feromona en los tres tipos de pruebas realizadas, mientras que la trifluorometilcetona análoga mostró una actividad mucho menor.

A. SANS, M. PRADOS, M. EIZAGUIRRE, C. LÓPEZ y M. RIBA: Área de Protección de Cultivos. Centro UdL-IRTA. Rovira Roure, 177. 25198 LLEIDA.

Palabras clave: *Sesamia nonagrioides*, inhibición, feromona sexual, análogos fluorados, pruebas de campo, tunel de viento, EAG.

INTRODUCCIÓN

El uso de análogos estructuralmente relacionados con la molécula de la feromona constituye una herramienta muy útil en el estudio sobre los mecanismos que gobiernan los procesos de percepción y catabolismo de la feromona sexual y, en general, sobre estudios teóricos de la relación estructura-actividad (PRESTWICH, 1987). Por otro lado, los análogos estructurales de las moléculas de feromona se pueden utilizar para modificar las respuestas de comportamiento y/o electrofisiológicas de insectos mediante diferentes mecanismos de acción. Pueden actuar como antagonistas, bloqueando el acceso de la feromona al receptor. También pueden actuar como agonistas, mimetizando la acción de la feromona, pero produciendo una respuesta modificada. Finalmente, un análo-

go estructural puede ser activo inhibiendo la actividad catabólica de las esterasas de las *sensilla*. Desde este punto de vista, un inhibidor podría ser un compuesto de estructura muy relacionada con la de la feromona, con idéntica capacidad de acceso e interacción con alguna de las proteínas de las *sensilla*. El problema se presentaría al no poder darse el mecanismo de degradación posterior, con lo que tendríamos el centro de recepción completamente y permanentemente bloqueado y, de esta forma, el insecto sería incapaz de orientarse hacia la fuente emisora de feromona (PRESTWICH, 1987). De esta forma, los análogos estructurales son prometedores candidatos en experiencias de confusión sexual, especialmente cuando la feromona es inestable (TAMAKI, 1988). Un tipo interesante de análogos son los que resultan de la sustitución de átomos de hidrógeno por

átomos de flúor, ya que estéricamente son muy similares a la molécula original, pero no así electrónicamente, debido a la mayor electronegatividad del átomo de flúor.

La feromona sexual del noctuido *Sesamia nonagrioides* Lef., plaga importante del maíz en toda el área mediterránea, fue descrita por primera vez por SRENG *et al.* (1985) como una mezcla del acetato de (Z)-11-hexadecenilo (I) y (Z)-11-hexadecenol (II) en relación 90:10. Posteriormente, MAZOMENOS (1989) identificó dos componentes minoritarios adicionales, (Z)-11-hexadecenal (III) y acetato de dodecilo (IV) encontrando una mezcla feromonal 69:8:8:15 (I:II:III:IV). Recientemente, se ha encontrado que la composición más activa de estos cuatro componentes es la que guarda una relación 77:8:10:5 (I:II:III:IV) (SANS *et al.*, 1997).

En este trabajo se estudia el papel, como inhibidores de la acción feromonal, de determinados fluoroderivados, análogos estructurales del acetato de (Z)-11-hexadecenilo, componente principal de la feromona sexual de este noctuido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos

Las larvas de *S. nonagrioides* se criaron en laboratorio utilizando una dieta artificial (EIZAGUIRRE y ALBAJES, 1992). Las pupas se sexaron y se mantuvieron en una cámara climática con un fotoperíodo 16:8 (luz/oscuridad) a 25 ± 2 °C.

Compuestos análogos

Los tres primeros compuestos análogos evaluados son los acetatos fluorados análogos del componente principal de la feromona sexual de *S. nonagrioides*. Estos son el monofluoroacetato de (Z)-11-hexadecenilo (Z11-16:FAC), el difluoroacetato (Z11-16:F2AC) y el trifluoroacetato (Z11-16:F3AC). El cuarto

compuesto análogo probado es la trifluorometil cetona análoga, correspondiente a la sustitución del grupo acetato por un grupo trifluoropropanona (Z11-16:TFFP).

Pruebas de inhibición en electroantenografía (EAG)

En estos ensayos los machos de 1-2 días de edad se mantuvieron en cápsulas Petri de 10 cm d.i. \times 2 cm de altura en presencia de diferentes cantidades de compuestos análogos (1, 10, 100 y 1000 μ g) con objeto de presaturar los receptores de la antena. Los productos se disolvieron en 100 μ l de hexano y se depositaron sobre una pieza de papel de filtro de 2 \times 2 cm. El disolvente se evaporó antes de la ubicación de los papeles en la cápsula Petri. Como control se utilizó una pieza similar de papel tratado con hexano solo. Los insectos fueron expuestos a los vapores durante 2 h en la oscuridad. Después de este periodo, los insectos se trasladaron a otra cápsula limpia y, después de 5 min de acondicionamiento a la luz, se les amputó las antenas y se determinó la actividad electroantenográfica en un instrumento EAG similar al descrito por GUERRERO *et al.* (1986).

Las deflecciones EAG se midieron aplicando, a través de una pipeta Pasteur, 10 in-sufladas de 10 μ g del complejo feromonal sobre la antena a intervalos de 10 s, para asegurar la recuperación total de los receptores de la antena. Para cada concentración se utilizaron 8 insectos, y los valores de inhibición se calcularon como el porcentaje de disminución relativa de la respuesta EAG media de machos tratados en relación al valor medio exhibido por los insectos control. Los resultados se analizaron estadísticamente según el test de Student ($P < 0,05$).

Pruebas de inhibición en campo

La evaluación de la actividad inhibidora de los análogos en campo se realizó de dos maneras diferentes: colocando el posible

producto inhibitor en el mismo difusor de feromona en la trampa, o bien, separado de ésta en varios difusores rodeando la trampa de feromona.

En ambos casos se utilizó una relación feromona-análogo de 1:10, empleando 0,2 mg de feromona en las trampas. Así, cuando los análogos se colocaron en el mismo difusor de feromona, los cebos se prepararon disolviendo 0,2 mg de feromona y 2 mg de los compuestos a probar en 1 ml de hexano y transfiriéndolo a un vial de polietileno cilíndrico (3 × 1,1 cm d.i.). El disolvente se evaporó, y los viales cerrados se utilizaron como difusores. Cuando los análogos se colocaron separados de la feromona, la cantidad total de análogo por trampa (2 mg) se distribuyó en 6 viales (0,33 mg/vial), que se colocaron alrededor de la trampa con alambres separados unos 20 cm del difusor de feromona.

En ambos casos, las trampas, del tipo botella de agua, se colgaron a una altura de unos 1,5 m alrededor del campo de maíz y separadas unos 30 m entre ellas. Se colocaron en un diseño lineal de bloques al azar y fueron revisadas y rotadas cada semana. Para cada formulación se utilizaron 3 trampas y el número de capturas se analizó estadísticamente según el test de Student ($P < 0,05$).

Pruebas de inhibición en túnel de viento

El túnel de viento utilizado tenía unas dimensiones de 200 × 50 × 50 cm (QUERO y GUERRERO, 1993). Las pruebas se llevaron a cabo a una intensidad de luz de unos 4 lux, una velocidad del aire de 28 cm/s y 21 ± 1 °C.

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo exponiendo los machos a 1 µg de feromona mezclado con 10 µg de análogo. Los compuestos se aplicaron a una silueta simulando una hembra hecha de cartulina de color marrón, y ésta se colocó en un clip colgada a una altura de 20 cm del techo y a 30 cm de la parte anterior del túnel.

Se evaluaron 6 categorías de respuesta: sin respuesta, movimiento de antenas, inicio de vuelo, vuelo hasta la mitad del túnel, vuelo

de orientación y contacto con la fuente. No obstante, y a efectos prácticos, en los resultados sólo se han considerado las categorías de sin respuesta, movimiento de antenas, vuelo de orientación y contacto con la fuente. Cada macho sólo se utilizó en un experimento.

Para cada análogo se utilizaron 39-41 machos. El porcentaje de inhibición se calculó por la disminución relativa de respuesta en comparación a la feromona sola. Los resultados se analizaron estadísticamente para cada categoría de respuesta mediante una tabla de contingencia 2 × 2 χ^2 con $P < 0,05$ utilizando el número real de insectos con respuesta y sin respuesta. Los resultados están dados en porcentajes de inhibición de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de inhibición en electroantenografía (EAG)

En las pruebas de inhibición en EAG, después de presaturar los receptores de los machos en un atmósfera de inhibitor, se observa un efecto dosis-dependiente (figura 1), siendo la actividad más grande al aumentar la dosis. Para la dosis más alta los tres productos fluoracetatos se comportaban como inhibidores moderadamente buenos (inhibición superior al 60% en todos los casos). La trifluorometilcetona (Z11-16:TFP) fue el compuesto menos activo, ya que sólo a la dosis de 100 µg dio inhibición significativa del 40%. Fue especialmente remarcable la actividad del monofluoroacetato, muy activo a la dosis más baja (1 µg).

Pruebas de inhibición en campo

Las pruebas de inhibición en campo se realizaron colocado el análogo en el mismo difusor que la feromona o separado de la feromona en otros difusores alrededor de la trampa. Los resultados pueden observarse en la figura 2. El primer resultado que hay

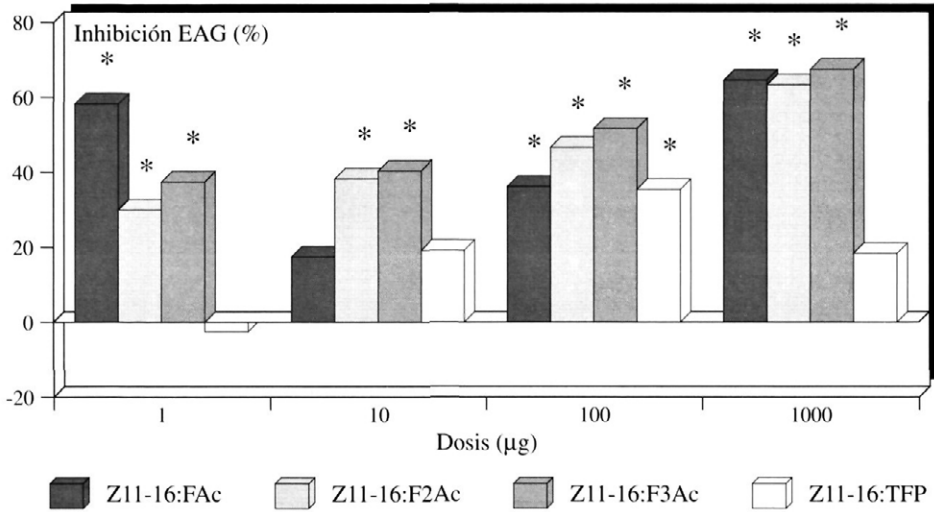


Fig. 1.—Inhibición de la respuesta EAG de machos de *Sesamia nonagrioides* a la feromona por los análogos fluoroacetatos del Z11-16:Ac. Se evaluó la respuesta EAG media a la mezcla feromonal 69:8:8:15 (Z11-16:Ac/Z11-16:OH/Z11-16:Ald/12:Ac) después de pre-saturar los receptores de la antena con vapores de los compuestos, durante 2 h en la oscuridad, en comparación con machos no tratados. Se probaron 8 insectos para cada ensayo y se consideraron las 5 respuestas mayores de 10 insufladas de la mezcla feromonal sobre la antena. Las barras con un asterisco (*) representan valores de inhibición significativos ($P < 0,05$, t de Student).

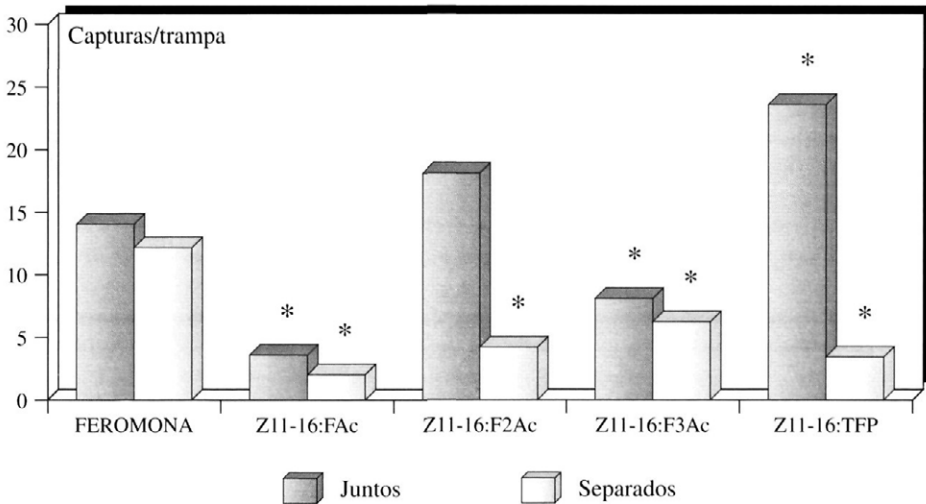


Fig. 2.—Capturas de machos de *Sesamia nonagrioides* en trampas cebadas con la feromona y mezclas de la feromona con los diferentes análogos del Z11-16:Ac en una relación 1:10. Los análogos se colocaron en el difusor junto con la feromona o separados alrededor del mismo. Como feromona se utilizó 200 µg de la mezcla 69:8:8:15 (Z11-16:Ac/Z11-16:OH/Z11-16:Ald/12:Ac). Se emplearon tres repeticiones por formulación. Las barras con asterisco (*) representan valores significativamente diferentes de la feromona sola ($P < 0,05$, t de Student), para cada tipo de colocación.

que remarcar es el reducido número de capturas obtenido en estas pruebas, explicable por las temperaturas anormalmente bajas que se dieron durante los meses de agosto y septiembre y que hizo que una parte importante de la población entrara en diapausa, originando una tercera generación muy poco numerosa (EIZAGUIRRE y ALBAJES, 1992).

Por tanto, el bajo número de capturas obtenidos en los controles, hacen que los resultados de inhibición obtenidos en las pruebas de campo se tengan que considerar con cierta reserva. En las pruebas en las que los análogos se colocaron junto con la feromona resultaron tener un gran efecto inhibitor el mono- y trifluoroacetato, con un 74% y un 42% de inhibición, respectivamente. La trifluorometilcetona mostraba un efecto sinérgico al de la feromona, incrementando el nivel de capturas del orden del 70% respecto a esta sola. Finalmente, el difluoroacetato no mostraba ningún efecto.

Cuando los productos análogos se colocaron separados de la feromona y alrededor de la trampa, el monofluoroacetato (Z11-16:FAC) resultó ser también el análogo con más actividad inhibitora. El resto de los productos mostraron también un buen efecto inhibitor en este tipo de ensayos. Es curiosa la diferencia de actividad del difluoroacetato (Z11-16:F2Ac), que no mostró efecto cuan-

do se colocó junto con la feromona y si un buen efecto inhibitor al colocarlo separado, al igual que la diferencia de actividad de la trifluorometilcetona (Z11-16:TFP) que en estas pruebas muestra un efecto inhibitor y cuando se colocó junto a la feromona mostraba un efecto sinérgico.

Pruebas de inhibición en túnel de viento

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de inhibición de respuesta en túnel de viento de machos de *S. nonagrioides* mostrada por los análogos fluorados del componente principal de la feromona sexual. La feromona sola (1 µg) exhibió unos porcentajes bastante altos de respuesta. Estos fueron del 100% en movimiento de antenas, 85% en vuelo de orientación y del 77% en el contacto con la fuente.

Cuando se añadió a la feromona 10 µg de los diferentes análogos se encontraron diferencias según los productos. La adición del monofluoroacetato (Z11-16:FAC) provocó una inhibición moderada en la primera secuencia de respuesta (14%), mientras que la inhibición fue elevada en las últimas secuencias (vuelo de orientación y contacto con la fuente). El difluoroacetato (Z11-16:F2Ac) no mostró ninguna actividad inhi-

Cuadro 1.—Inhibición de la respuesta de machos de *Sesamia nonagrioides* en ensayos en túnel de viento por exposición simultánea a la feromona y a análogos fluorados

Producto (a)	Insectos probados	Inhibición de respuesta (%) (b)		
		Movimiento de antenas	Vuelo de orientación	Contacto con la fuente
Feromona sola	48	0	0	0
Z11-16:FAC	44	14**	52**	79**
Z11-16:F2Ac	41	2	2	8
Z11-16:F3Ac	39	5	46**	53**
Z11-16:TFP	39	18**	25*	47**

(a) En cada prueba se utilizó 1 µg de feromona + 10 µg de análogo. La feromona utilizada mantenía la relación 77:8:10:5 (Z11-16:Ac/Z11-16:OH/Z11-16:Ald/12:Ac).

(b) Significación estadística $P < 0,05$.

(*) $P < 0,01$.

(**) Según tabla de contingencia $2 \times 2 \chi^2$.

bidora en toda la secuencia. El trifluoroacetato (Z11-16:F3Ac) no actuó como inhibidor en el movimiento de antenas, pero en cambio, sí que se mostró como bastante buen inhibidor del vuelo de orientación y del contacto con la fuente. Finalmente, la trifluorometil cetona (Z11-16:TFP) mostró una actividad inhibidora moderada en el movimiento de antenas y en el vuelo de orientación y una actividad inhibidora media en el contacto con la fuente.

DISCUSIÓN

Según todos los resultados, el monofluoroacetato se ha mostrado como el mejor inhibidor de respuesta a la feromona en los tres tipos de ensayos, EAG, campo y túnel de viento. El trifluoroacetato ha exhibido también una actividad inhibidora bastante buena en estas pruebas. En cambio, el difluoroacetato es el que ha mostrado el efecto inhibidor más bajo de los tres fluoroacetatos. Finalmente, la trifluorometil cetona ha mostrado un efecto variable según el tipo de prueba. Así, en las pruebas de túnel de viento y pruebas de capturas en campo al colocarla separada de la feromona ha mostrado un efecto inhibidor de la respuesta de los machos. En cambio, en los bioensayos en EAG casi no tiene efecto y en las pruebas de capturas en campo mezclada con la feromona se le observa una actividad sinérgica.

Algunos productos similares a los probados en este trabajo ya habían estado ensayados en otras especies. Así, los análogos halogenados de la feromona sexual de *Plutella xylostella* ya habían estado previamente estudiados en estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Los compuestos, particularmente fluoroacetatos, mostraron una potente actividad EAG y ser unos buenos inhibidores competitivos de la hidrólisis del acetato de (Z)-11-hexadecenilo al correspondiente alcohol per les esterases de la antena (PRESTWICH y STREINZ, 1988).

En el mismo contexto, los fluoroacetatos análogos de la feromona sexual de *Ostrinia*

nubilalis también habían estado probados como inhibidores de la respuesta de machos de las razas feromonales E y Z de este pirárido en bioensayos de túnel de viento (SCHWARZ *et al.*, 1990). Los autores encuentran que estos análogos muestran una actividad feromonal diferencial, mientras los compuestos tenían una actividad feromonal de moderada a débil en el tipo Z, en el tipo E solamente el monofluoroacetato era altamente activo.

Otros análogos halogenados del (Z)-11-hexadecenal, el componente mayoritario de la feromona sexual de *Heliothis virescens*, han mostrado una actividad inhibitoria reversible en laboratorio y en campo. El efecto se ha postulado que ocurría a través de un mecanismo asociativo-desasociativo de la antiferomona y los receptores de la antena (MORGAN y MANDAVA, 1988). En la procesionaria del pino *Thaumetopoea pityocampa* también se ha descrito que mientras los análogos fluorados eran moderadamente activos, los correspondientes análogos clorados mostraban una actividad débil o nula (CAMPS *et al.*, 1990). Los compuestos también fueron probados como inhibidores de la respuesta feromonal en laboratorio y en campo, siendo los compuestos fluorados notablemente mejores antagonistas de la acción de la feromona que los correspondientes no fluorados.

En relación a la trifluorometil cetona análoga probada, no ha mostrado una fuerte actividad inhibidora de la respuesta de los machos. Incluso, en campo y mezclada con la feromona, se ha observado un efecto sinérgico en las capturas de machos. Respecto a este tipo de compuestos, en la literatura se encuentran resultados diferentes según las especies. Así, ALBANS *et al.* (1984) describen a la metil cetona análoga de la feromona de *H. virescens*, (Z)-12-heptadecen-2-ona, como un inhibidor de la respuesta a la feromona en túnel de viento. En *Antheraea polyphemus* la 1,1,1-trifluoro-2-tetradecanona resulta ser un potente inhibidor de la actividad de las esterases (VOGT *et al.*, 1985). En *Trichoplusia ni*, este mismo compuesto y la (Z)-1,1,1-trifluoro-10-pentadecen-2-ona

son también potentes inhibidores de las esterases, pero esta última no inhibe las capturas en campo (HAMMOCK *et al.*, comunicación personal en PRESTWICH, 1987). En cambio, en *P. xylostella* y *O. nubilalis*, las trifluorometil cetonas análogas solamente actúan como inhibidores moderados de la esterasa (PRESTWICH y STREINZ, 1988; KLUN *et al.*, 1991). En *T. pityocampa*, las trifluorometil cetonas análogas de la feromona no muestran actividad inhibidora de la

respuesta EAG, pero sí de inhibición de capturas en campo al mezclarlas con la feromona (PARRILLA, 1993).

En consecuencia, se puede decir que la actividad de un determinado tipo de análogo no es extrapolable de una especie a otra, sino que se ha de estudiar cada caso en concreto. Esto demuestra que las proteínas relacionadas con la percepción de la feromona y su funcionamiento pueden diferir notablemente entre especies.

ABSTRACT

SANS, A.; PRADOS, M.; EIZAGUIRRE, M.; LÓPEZ, C. y RIBA, M., 1998: Use of fluorinated analogues of the sex pheromone of *Sesamia nonagrioides* Lef. as inhibitors of its biological activity. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(Adenda al n.º 2): 435-442.

Some fluorinated compounds, analogues of the (Z)-11-hexadecenyl acetate, main component of the sex pheromone of the noctuid *Sesamia nonagrioides* Lef. have been evaluated as inhibitors of the pheromone action. These compounds were the fluoroacetates (mono, di and trifluoroacetate) and the trifluoromethyl ketone [(Z)-1,1,1-trifluoro-14-nonadecen-2-one] analogues. Studies on the electrophysiological activity (electroantennogram, EAG), on the behaviour in wind tunnel and field catches tests were used to evaluate the inhibitory action. The fluoroacetates, specially mono and trifluoroacetate, showed an inhibition of the pheromone action in all tests, whereas the trifluoromethyl ketone showed an activity much lower.

Key words: *Sesamia nonagrioides*, inhibition, sex pheromone, fluorinated analogues, field tests, wind tunnel, EAG.

REFERENCIAS

- ALBANS, K. R.; BAKER, R.; JONES, O. T.; JUTSUM, A. R. y TURNBULL, M. D., 1984: Inhibition of response of *Heliothis virescens* to its natural pheromone by antipheromones. *Crop Prot.* 3: 501-506.
- CAMPS, F.; GASOL, V. y GUERRERO, A., 1990: Inhibition of the processionary moth sex pheromone by some haloacetate analogues. *Pestic. Sci.* 29: 123-134.
- EIZAGUIRRE, M. y ALBAJES, R., 1992: Diapause induction in the stem corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Gen.* 17: 277-283.
- GUERRERO, A.; MURGO, R. y MARTORELL, X., 1986: An improved electroantennogram apparatus with a new automatic sample injection system. *Physiol. Entomol.* 11: 273-277.
- KLUN, J. A.; SCHWARZ, M. y UEBEL, E. C., 1991: European corn borer: pheromonal catabolism and behavioral response to sex pheromone. *J. Chem. Ecol.* 17: 317-334.
- MAZOMENOS, B. E., 1989: Sex pheromone components of corn stalk borer, *Sesamia nonagrioides* (Lef.). Isolation, identification and field tests. *J. Chem. Ecol.* 11: 1241-1247.
- MORGAN, E. D. y MANDAVA, N. B., 1988: CRC Handbook of Natural Pesticides. Vol IV, Pheromones, Part A. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- PARRILLA, A., 1993: Estudios sobre mediadores químicos con actividad sobre el comportamiento de insectos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona.
- PRESTWICH, G. D., 1987: Chemical studies of pheromone reception and catabolism. En «Pheromone Biochemistry» (G. D. Prestwich y G. J. Blomquist, eds.) pp. 473-527. Academic Press, Orlando, Florida.
- PRESTWICH, G. D. y STREINZ, L., 1988: Haloacetate analogs of pheromones: effects on catabolism and electrophysiology in *Plutella xylostella*. *J. Chem. Ecol.* 14: 1003-1021.
- QUERO, C. y GUERRERO, A., 1993: Behavioural effects induced by the sex pheromone components of the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis*. *Bull. OILB-SROP* 16 (10): 320-323.

- SANS, A.; RIBA, M.; EIZAGUIRRE, M. y LÓPEZ, C., 1997: Electroantennogram, wind tunnel and field responses of male Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, to several blends of its sex pheromone components. *Entomol. Exp. Appl.* **82**: 121-127.
- SRENG, I.; MAUME, B. y FREROT, B., 1985: Analyse de la sécrétion phéromonale produite par les femelles vierges de *Sesamia nonagrioides* (Lef.) (Lépidoptère, Noctuidae). *C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie* **301** (9): 439-442.
- SCHWARZ, M.; KLUN, J. A. y UEBEL, E. C., 1990: European corn borer sex pheromone inhibition and elicitation of behavioral response by analogs. *J. Chem. Ecol.* **16**: 1591-1604.
- TAMAKI, Y., 1988: Pheromones of the Lepidoptera. En «Handbook of Natural Pesticides. Vol. IV» (E.D. Morgan y N.B. Mandava, eds.) pp. 35-94. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. y PRESTWICH, G. D., 1985: Kinetic properties of a pheromone degrading enzyme: The sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8827-8831.

(Recepción: 7 enero 1998)

(Aceptación: 18 marzo 1998)