

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS DE *Bocconia frutescens* L. SOBRE
Hypothenemus hampei F.

Omar Andrés Valencia Gutiérrez 60942

Juan David Silva Arenas 61673

UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas
Programa de Química
Armenia, Quindío
2007

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS DE *Bocconia frutescens* L. SOBRE
Hypothenemus hampei F.**

Omar Andrés Valencia Gutiérrez 60942

Juan David Silva Arenas 61673

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar por el título de Químico de la
Universidad del Quindío**

DIRECTOR: Milton Gómez Barrera
Químico Farmacéutico, Magíster en Química.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas
Programa de Química
Armenia, Quindío
2007

Omar Andrés Valencia Gutiérrez

Dedico este trabajo a mis padres

*A mis hermanos, mis familiares y a mi
novia, los quiero mucho a todos.*

Juan David Silva Arenas

Dedico este trabajo a Hernán, Gloria,

*Roberto Carlos y a todos los que
brindaron su granito para que
este logro se llevara a cabo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos totales a nuestras familias, pilar y base de nuestra formación. “Los amamos”.

Agradecimientos a Diego Loaiza Londoño especialista en medicina natural y adyurbada y Samuel García Peláez Ing. Agrónomo ya que gracias a sus extensos conocimientos de la flora de la región nos permitió seleccionar apropiadamente la planta que se ajustó acorde a nuestra visión del proyecto.

Agradecimientos a Lina María Jaramillo Jefe de laboratorio Universidad La Gran Colombia, por toda su colaboración.

Agradecimientos a Edier Florez Henao Auxiliar Herbario Universidad del Quindío por enseñarnos a realizar el montaje para el herbario.

Agradecimientos a Adriana Lizeth Campo Zamora, Lic. en Biología y Educación Ambiental por su colaboración en el laboratorio de Aguas de la Universidad del Quindío.

Muchas gracias al Dr. José Hipólito Isaza Martínez por su gran paciencia y gran colaboración para que este proyecto se haya llevado a cabo.

Agradecemos a Ildelfonso Rivas por su valiosa colaboración. Biólogo especialista en medio Ambiente.

Agradecemos a nuestros compañeros y amigos por sus aportes, consejos, recomendaciones y colaboración.

Agradecimientos al Magíster Oscar Otalvaro, profesor de planta de la Universidad del Quindío por toda su colaboración con el análisis estadístico.

Agradecimientos **MUY ESPECIALES** al vicerrector académico de la Universidad del Quindío. Doctor Pedro Nel Martínez Yépez por garantizar los espacios físicos dentro y fuera de la Universidad del Quindío necesarios para la realización de este proyecto.

ABREVIATURAS Y TERMINOLOGÍA

Masa.

Kg = kilogramo
g = gramos
µg = microgramos
mg = miligramos

Volumen

L = litro
mL = mililitros

Longitud

cm = centímetro
m = metro
mm = milímetro
msnm = metros sobre el nivel del mar

Tiempo

min, minuto = minuto
h, hora = hora
s, segundos = segundos

Area

ha = Unidad de area

Temperatura

°C = grados centígrados

Concentración

ppm = mg/L, partes por millón
% = porcentaje ((parcial/total) 100)

Organismos

H. hampei = *Hypothenemus hampei*
Ferrari
B. frutescens = *Bocconia frutescens*
Linneo

Cantidad

DL₅₀ = dosis letal media
Max = máximo

Fl = filtrado

R = residuo

FO = fase orgánica

FA = fase acuosa

(+++)= abundante

(++) = presente

(+) = escaso

(+) = dudoso

(-) = no presente

R.F. = factor de resolución o separación

pH = potencial de hidrogeno

GLOSARIO

Aminoácido: Compuesto Orgánico con un grupo amino y grupo carboxílico a condiciones de pH 7, de fórmula general $RCHNH_2COOH$ donde R es un sustituyente que puede ser alifático, aromático, y contener otros elementos como Nitrógeno, oxígeno y Azufre. A pesar de existir más de 700 aminoácidos naturales, un grupo de 20 son los de mayor importancia dentro de los cuales se encuentran los aminoácidos esenciales que deben ser suplidos en la dieta ya que no pueden ser sintetizados. Los polímeros de aminoácidos forman las proteínas.

Analgésico: Sustancia con propiedad de inhibir el dolor.

Arbustiva: Planta leñosa de poca altura, ramificada desde la base.

Avispa: El término avispa proviene del latín “*vespa*” insectos himenópteros alados. Pueden vivir en forma solitaria o en grupo. Solo las especies eusociales poseen aguijón; se diferencian de las abejas en que no pierden su aguijón al picar y no producen miel. Existen avispas sin aguijón, estas no pican y tienen los ojos azules o verdosos.

Citotóxico: Venenoso para las células.

Coleóptero: Orden de insectos masticadores de metamorfosis completa con las alas del primer par endurecidas (Élitros) formando una especie de estuche que encierra a las alas del segundo par plegadas transversalmente.

Crustáceos: Son un extenso subphylum de artrópodos (alrededor de 55.000 especies). Su cuerpo esta constituido por cefalotórax y el abdomen algunas veces recubierto por un caparazón calcáreo. Incluyen varios conocidos grupos animales, como las langostas, los camarones, los cangrejos y los percebes. Existen crustáceos de agua salada, de agua dulce e, incluso, terrestres como la cochinilla de la humedad.

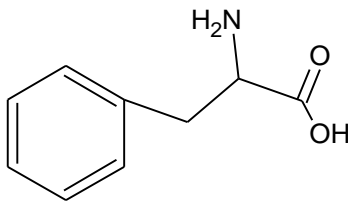
Ecosistema: Conjunto formado por los seres vivos, el ámbito territorial en el que viven y las relaciones que establecen entre ellos.

Ectoparásito: Parásito que vive en la superficie de otro organismo.

Entomopatogéno: Daño o enfermedad causada por insectos.

Erupción: Aparición en la piel de granos, manchas y vesículas.

Fenilalanina: Aminoácido esencial de formula $C_9H_{11}NO_2$ con abreviatura Phe (F) .



Glaucas: De color verde claro.

Hidropesía: Acumulación anómala de suero en cualquier parte del cuerpo.

Hongo: Clase de plantas criptógamas talofitas, desprovistas de clorofila, heterótrofas, saprofitas; pueden actuar como fermentos o parásitos.

Ictericia: Coloración amarilla de la piel y de los ojos debida a la presencia de material colorante (pigmento) de la bilis en los tejidos.

Infestar: Causar daño por la invasión de un lugar por animales o plantas perjudiciales.

Inhibe: Detiene

Inocuo: Inofensivo, que no hace daño.

Insecticida: Sustancia en forma de líquido o polvo para matar insectos.

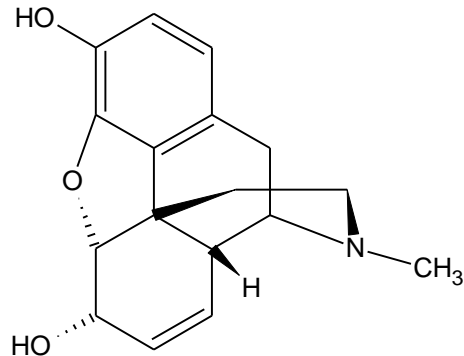
Látex: Jugo lechoso contenido en ciertos vasos de algunos vegetales que se coagulan al contacto con el aire y constituyen las gomas.

Mamíferos: Animales vertebrados, superiores, de sangre caliente, respiración pulmonar, corazón con cuatro cavidades (dos auriculares y dos ventriculares) y circulación doble y completa; piel cubierta de pelos, son vivíparos y las hembras tienen glándulas mamarias para la alimentación de las crías, exceptuando cetáceos y murciélagos.

Micotóxicas: Sustancia venenosa producto del metabolismo de hongos.

Moho: Nombre de varias especies de hongos que se desarrollan especialmente en ambientes oscuros y húmedos sobre productos orgánicos y producen su descomposición.

Morfina: es un alcaloide del opio. Aunque es un analgésico excelente, su uso está restringido debido a su potencial adicción. La Heroína es el diacetato de la Morfina.



Narcótico: Capacidad de medicamentos o drogas para producir adormecimiento.

Nemátodo: tipo de gusanos de cuerpo cilíndrico no segmentados, alargado, fusiforme o filamentosos. Su organización interna es relativamente sencilla y comprende grupos de vida libre y de vida parásita.

Orden: Grupo taxonómico que engloba diversas familias de características comunes. En botánica terminan en el sufijo **-ales**.

Ornamental: decorativo

Pecíolo: Pedúnculo de la hoja.

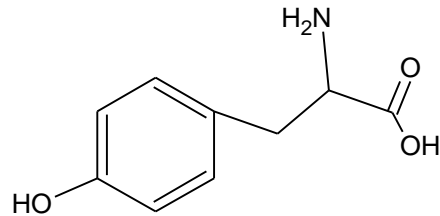
Pesticida: Sustancia utilizadas contra agentes perjudiciales.

Purgativas: Con propiedades de limpiar impurezas, purificador.

Secante: Medio o sustancia para eliminar humedad.

Sinergismo: Acción combinada de varias sustancias químicas, las cuales producen un efecto mayor o diferente a la suma del efecto de las sustancias individualmente.

Tirosina: Aminoácido de fórmula $C_9H_{11}NO_3$ con abreviatura Tyr (Y).



Tónico: Cualquier agente que produzca tonificación o que actúe como un vigorizador, entonando las energías ya que aumenta la resistencia capilar, mejora la circulación y prolonga el tiempo de coagulación.

Tóxico: Se dice de las sustancias venenosas o deletéreas (mortífero) que tomadas en forma o en dosis inadecuadas, puede convertirse en veneno.

Úlcera: Abertura en la piel o en las mucosas con desintegración gradual de los tejidos.

Vermífugo: vermífugo, que mata las lombrices intestinales.

Verruga: Abultamiento benigno, regularmente redondo que sale en la piel.

CONTENIDO

Capítulos	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. ANTECEDENTES	6
5. MARCO TEORICO	8
5.1 FAMILIA PAPAVERACEAE (Familia de la amapola o dormidera)	8
5.1.1 Número de género y especies	8
5.1.2 Distribución y hábitat	8
5.1.3 Clasificación familiar	9
5.1.4 Particularidades de la familia	9
5.1.5 Historia natural	10
5.1.6 Usos económicos	10
5.2 UBICACIÓN DE LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS DE LA FAMILIA Papaveraceae	11
5.3 <i>Bocconia frutescens</i> L	11
5.4 ALCALOIDES	13
5.4.1 Alcaloides bencilisoquinolinicos	15
5.4.2 Algunos factores a tener en cuenta en el estudio de alcaloides	20
5.4.3 Características químicas de los alcaloides para su calificación	21

5.5 EL CAFÉ	21
5.5.1 Descripción botánica	22
5.5.2 Historia del descubrimiento del café como bebida	22
5.6 LA BROCA DEL CAFÉ <i>Hypothenemus hampei</i>	
(Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)	23
5.6.1 Ficha Técnica	23
5.6.2 Descripción General del Hábitat y Hábitos	24
5.6.3 Apariencia general	24
5.6.4 Características de <i>Hypothenemus hampei</i>	26
5.6.5 Ciclo de vida	26
5.6.6 Historia y Orígenes en Colombia	26
5.6.7 Efecto de la broca sobre la bebida del café	27
5.7 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CONTROL DE LA BROCA	28
5.7.1 Control cultural	28
5.7.2 Control biológico	29
5.7.3 Control mecánico	29
5.7.4 Control químico	30
5.8 DL₅₀ DOSIS LETAL MEDIA	30
5.8.1 Validez de la prueba de toxicidad	31
6. PARTE EXPERIMENTAL	33
6.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	33
6.1.1 Ubicación de la planta	33
6.1.2 Recolección de la planta	33
6.1.2.1 Muestra herbario	33
6.1.2.2 Recolección para la marcha	34
6.2 Lixiviación de hojas, semillas y corteza	34
6.3 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL BIOENSAYO	36
6.3.1 Obtención y Selección de brocas	37

6.3.2 Acondicionamiento y desinfección	37
6.3.3 Solvente de exposición	37
6.3.4 Concentraciones de los extractos	38
6.3.5 Tiempo de exposición de <i>Hypothenemus Hampei</i> a los extractos de la planta	38
6.3.6 Numero de individuos y repeticiones	38
6.3.7 Determinación de mortalidad y supervivencia de la broca	38
6.3.8 Determinación del tiempo de mortalidad de la broca	38
6.3.9 Otros factores utilizados en el bioensayo	39
6.4 SELECCIÓN DE LA PARTE DE LA PLANTA CON MAYOR ACTIVIDAD INSECTICIDA	40
6.6.1 Análisis preliminar de alcaloides en corteza de <i>Bocconia frutescens</i> L	43
6.6.2 Método de Cain	45
6.6.3 Método de A. Sanabria	45
6.6.4 Enriquecimiento y reconocimiento de alcaloides (método de Cain modificado utilizando ácido sulfúrico)	48
6.7 ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	48
6.8 SEGUNDO TRATAMIENTO DE CORTEZA DE <i>Bocconia frutescens</i>	49
6.8.1 Procedimiento para extracción, detección de alcaloides y obtención de extractos para realización de bioensayos con corteza de <i>Bocconia frutescens</i> L.	49
6.9 OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS ENRIQUECIDOS DE ALCALOIDES	53
6.9.1 Extracción de corteza con etanol y ácido Sulfúrico	53
6.9.2 Extracción de corteza con etanol y ácido clorhídrico	55

6.10 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO SECO OBTENIDO DE CORTEZA	58
6.10.1 Cromatografía en Columna	58
6.10.2 Preparación de la muestra y de la columna	58
6.10.3 Bioensayos fracción Acetato de Etilo # 2	63
6.10.4 Cromatografía preparativa para fracción acetato de etilo #2 obtenido mediante cromatografía en columna	63
6.10.5 Cromatografía de gases acoplada a masas	67
6.10.5.1 Condiciones utilizadas en el equipo	67
7. ANALISIS Y RESULTADOS	69
7.1 EXTRACCIONES	69
7.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	70
7.3 DETECCIÓN DE ALCALOIDES	71
7.4 BIOENSAYOS	72
7.4.1 Observaciones de los bioensayos	76
7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA HOJAS, SEMILLAS Y CORTEZA	76
7.5.1 Análisis estadístico de los bioensayos realizados con hojas, semillas y corteza	82
7.6 Bioensayos con extractos etanólicos de hojas, semillas y corteza	82
7.7 Bioensayos con la fracción #2 obtenida del fraccionamiento en columna	82
7.8 Bioensayos con el sólido negro obtenido por extracción con H₂SO₄	84
7.9 Bioensayos con los sólidos café #1 y café-rojizo #2 obtenido por extracción con HCl	86
7.10 Comparación de la actividad insecticida de los tres sólidos ricos en alcaloides	87

7.11 Espectroscopia de gases acoplada a masas	89
8. CONCLUSIONES	91
9. RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	93

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta <i>Bocconia frutescens</i>.	12
Figura 2. Ruta enzimática de alcaloides tipo Benzilisoquinólicos	16
Figura 3. Alcaloides sintetizados a partir de (S)-Reticulina	16
Figura 4. Núcleos: Bencilisoquinolina BIQ (1), Bencil tetrahidroisoquinolina BTHIQ (2).	17
Figuras 5. Estructuras de los alcaloides presentes en <i>B. frutescens</i> L.	19
Figura 6. Estructuras de los alcaloides presentes en <i>B. frutescens</i> L.	19
Figura 7. Broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>.	24
Figura 8. Hojas, Corteza y Semillas de <i>Bocconia frutescens</i>.	34
Figura 9. Extractos secos de Hojas y Semillas de <i>Bocconia frutescens</i>.	35
Figura 10. Obtención de los extractos etanólicos para bioensayos.	36
Figura 11. Condiciones del bioensayo.	40
Figura 12. Preparación y condiciones de los bioensayos.	42
Figura 13. Metodologías seguidas para identificación de alcaloides.	44
Figura 14. Método de A. Sanabria aplicado a <i>B. frutescens</i> para la identificación de alcaloides.	47
Figura 15. Procedimiento para Corteza.	51
Figura 16. Sólido negro obtenido al secar solvente.	54
Figura 17. Obtención de extractos ricos en alcaloides.	56
Figura 18. Sólidos ricos en alcaloides, café #1(izquierda) y café-rojizo #2 (derecha).	57
Figura 19. Extracto de Corteza, Silica Gel, Solución en cloroformo, y Muestra seca.	59
Figura 20. Montaje Cromatografía en columna, Elusión y Extractos.	60
Figura 21. Fraccionamiento en columna de corteza.	62

Figura 22. Cromatografías en placa delgada y Preparativa con Aplicación de Muestra.	64
Figura 23. Elusión de cromatografía preparativa, recuperación de metabolitos separados.	65
Figura 24. Cromatografía preparativa expuesta a luz ultravioleta.	66
Figura 25. Extracción mediante solvente de la silica y extractos obtenidos.	67
Figura 26. % inactividad a 500 partes por millón de cada extracto.	73
Figura 27. % inactividad a 1000 partes por millón de cada extracto.	74
Figura 28. % de inactividad a 2000 partes por millón de cada extracto.	75
Figura 29. Interacción tiempo vs fracción Inactivos (inactivos/15).	79
Figura 30. Relación concentración vs fracción inactivos.	80
Figura 31. Correlación entre las partes de la planta y la Fracción inactivos	81
Figura 32. Porcentaje de inactividad de la fracción #2 de acetato de etilo obtenido por cromatografía en columna.	83
Figura 33. % de mortalidad de <i>H. hampei</i> causada por el sólido negro obtenido de corteza de <i>B. frutescens</i> frente a un blanco de DMSO: AGUA.	85
Figura 34. Mortalidad del sólido café #1.	86
Figura 35. Mortalidad del sólido café rojizo #2.	87
Figura 36. Comparación de la actividad insecticida de todos los sólidos ricos en alcaloides.	88
Figura 37. Efecto de mezclas DMSO-H₂O sobre <i>H. hampei</i>	89
Figura 38. Espectro de gases de la fracción ●●●●	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fracciones y respuestas obtenidas mediante el método propuesto por A. Sanabria para evaluación de alcaloides aplicado a corteza de <i>B. frutescens</i>	48
Tabla 2. Respuestas a reactivos de precipitación extractos de partes de la planta.	48
Tabla 3. Respuesta a reactivos de precipitación de alcaloides y solubilidad de los sólidos obtenidos en diferentes solventes.	57
Tabla 4. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 500 ppm	73
Tabla 5. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 1000 ppm	74
Tabla 6. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 2000 ppm.	75
Tabla 7. Análisis de la Varianza para Número de brocas inactivas / 15	76
Tabla 8. Método de comparaciones múltiples entre 1 (hojas) 2 (semillas) y 3 (corteza)	80
Tabla 9. Porcentaje de inactividad de la fracción #2 de Acetato de etilo	84

RESUMEN

Se evaluó la actividad de *Bocconia frutescens* L. como insecticida sobre *Hypothenemus hampei* F. Extractos de hojas, semillas, y corteza se estudiaron en concentraciones de 2000, 1000 y 500 ppm, encontrando que la corteza posee la mayor actividad insecticida. Posteriormente, se evaluó la actividad de varios extractos ricos en alcaloides obtenidos de diferentes formas, hallando una acción insecticida Aprox. 15%. Además se identificó la presencia de alcaloides. Mediante fraccionamiento por columna y capa delgada se obtuvieron fracciones que posteriormente se llevaron a CG-MS y se propusieron posibles estructuras y rutas de fragmentación. Se diseñó un método para evaluar la actividad insecticida de plantas que se presumen ricas en alcaloides sobre *Hypothenemus hampei* F.

PALABRAS CLAVES: broca del café (*Hypothenemus hampei* F), trompeta (*Bocconia frutescens*), actividad insecticida, alcaloides bencilisoquinoleínicos (BIQ), benciltetrahidroisoquinoleínicos (BTHIQ), bioensayos.

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Bocconia frutescens* L. conocida también como Curador y Trompeto, es un arbusto de la familia papaveraceae. En sus hojas se han encontrado alcaloides isoquinolínicos, saponinas y triterpenos¹.

La presencia de estos metabolitos proporciona propiedades antiparasitarias, antifúngica y antiprotozoos. Nuestro objetivo es probarla como un insecticida, ya que se ha demostrado que los alcaloides isoquinolínicos tienen potencial citotóxico².

La especie *Bocconia frutescens* L se encuentra en gran cantidad de lugares del mundo como Estados Unidos, Haití, México y Sur América, es utilizada en la desactivación de procesos enzimáticos en humanos, ³ la curación de heridas, en casos de problemas de la piel como úlceras y erupciones, remedio y control de ictericia, hidropesía, además de propiedades purgativas y de analgésico. El extracto de las semillas se aplica para teñir, además de utilizarse como secante en la industria⁴.

Las plantas manifiestan variedad de mecanismos de defensa, como respuesta a diferentes agentes del entorno como son el clima y depredadores, dentro de los segundos genera partes como espinas, tricomas, y muchas veces su composición es venenosa o alelopática; para ello sintetiza diferentes disuasorios nutritivos que son variedad de metabolitos secundarios según las familias y sus biogénesis⁵.

La aplicación humana de plantas con alcaloides es legendaria de más de 3500 años donde su uso es variado, aplicaciones medicinales, venenos, de forma mística como parte de su cultura.

El hombre ha utilizado para el control de diferentes insectos o plagas variedad de sustancias por ejemplo: La Nicotina fue uno de los primeros insecticidas para luchar contra los insectos dañinos en la agricultura, y aun es efectivo ^{5 6}. La Anabasina $C_{10}H_{14}N_2$, es un isómero de la Nicotina, inicialmente fue aislada de la especie *Anabasis aphylla*. Su aplicación industrial es contra parásitos del campo⁷.

El estudio de nuevos compuestos activos tanto de origen natural como sintético, puede ser orientado a nivel de laboratorio mediante la respuesta de otras formas de vida; a este respecto los insectos y otros organismos que pueden ser criados en forma masiva e inclusive organismos que sean considerados plagas para la agricultura de un país⁸ **como por ejemplo la broca de café** (*Hypothenemus hampei*), se convierten en herramientas de gran utilidad práctica que permiten implementar modelos de evaluación biológica con el fin de descubrir especies vegetales promisorias que manifiesten actividad insecticida.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Broca del café *Hypothenemus hampei* es la plaga más agresiva y dañina en la caficultura mundial, anualmente ocasiona pérdidas de cientos de millones de pesos a los caficultores colombianos, en Colombia las zonas más afectadas han remplazado el cultivo del café por cultivos de plátano, yuca, pasto entre otros, mientras que en algunos departamentos continúan afrontando la problemática. Se estima que para producir café tipo exportación se debe invertir un dólar en el manejo de la broca del café por cada 25 dólares de producción⁹.

El *H. hampei* es un insecto foráneo, monófago, oriundo de África Central, el primer registro como insecto dañino de cafeto se hizo en semillas provenientes del Congo y Gabón en 1901. Se cree que hacia 1913 llegó a Brasil en unas semillas traídas de Angola. En 1988 fue denunciada su presencia en la vereda Mateplátano, municipio Tumaco (Nariño, Colombia). La introducción de *H. hampei* se realiza mediante el traslado de frutos de café contaminados hacia otros cultivos que pueden ser susceptibles; para mantener la calidad y evitar el contagio el caficultor debe aplicar un riguroso manejo y eliminar cualquier infestación temprana¹⁰.

El *H. hampei* utiliza las cerezas del cafeto para sus necesidades de alimentación y reproducción atrofiando parte del sistema reproductor de la planta. La ausencia de depredadores, la mala planificación y las falencias de tecnificación hacen que la cadena trófica del *H. hampei* esté interrumpida y exponencializa su población; esto altera la actividad agropecuaria de la que se beneficia el hombre, pues el café es usado como una bebida por su sabor agradable y con frecuencia efectos ligeramente estimulantes¹¹.

El proyecto propone utilizar los componentes de las hojas de la *Bocconia frutescens* como agente fitoquímico contra la broca de café porque esta es una plaga que afecta a los caficultores de la región; esto podría generar una mejora en la calidad del fruto de café contribuyendo a la economía de los campesinos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad insecticida de los extractos de la corteza de *Bocconia frutescens* L sobre la broca de café *Hypothenemus hampei* F.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si los extractos ricos en alcaloides obtenidos de la planta *Bocconia frutescens* L, presentan mayor actividad tóxica frente a *Hypothenemus hampei*.
- Evaluar distintas concentraciones de los extractos de *Bocconia frutescens* L para conocer las más activas a nivel tóxico en: *Hypothenemus hampei*.
- Realizar un tamizaje fitoquímico preliminar para constatar por medio de pruebas cualitativas los metabolitos sustentados en la literatura.
- Proponer un método de bioensayo preliminar que permita la evaluación de toxicidad de extractos ricos en alcaloides sobre *Hypothenemus hampei*.

4. ANTECEDENTES

En la década de los 30` fue implementado el hongo *Beauveria bassiana* como entomopatógeno en el Congo belga. En Colombia su utilización inicial se reporta hacia 1989 en la región de Ancuyá (Nariño)¹².

En el año 1949 Henry T.A. señala los alcaloides presentes en *Bocconia frutescens* L como allocriptopina, queleritrina, protopina, sanguinarina los cuales hacen referencia al termino Bocconina ¹³.

En el año de 1988 Sakamoto y sus colaboradores patentan un método que inhibe la reabsorción de los huesos y liberación de colagenasa en mamíferos utilizando alcaloides en la especie vegetal *Bocconia frutescens* L ².

Hacia el año de 1993 se desarrollo un bioensayo para evaluar la patogenicidad del hongo *B. bassiana* contra la broca de café, esto se realizó en el centro nacional de investigaciones del café Cenicafé¹⁴ .

En el año 2000 el doctor Díaz Molina, aisló 6 alcaloides de la planta *Bocconia frutescens* descubriendo 2 nuevos alcaloides: bencilisoquinolina, (1-[2'-hidroximetilen-3',4'-metilendioxbenciliden]-2-metil-6,7-dímetoxi-3,4-tetrahidroisoquinolina) y 8-metoxisanguinarina, conocida como N-metilpancorina ¹⁵.

En el año 2000 estudios realizados en el laboratorio de nemátodos entomopatógenos CIC JAP ubicado en el IHCAFE Instituto Hondureño del Café, revelaron que el empleo de nemátodos causa letalidad a adultos de *H. hampei* en lapsos de tiempo de 24-72 horas¹⁶.

En el año 2003 mediante análisis de difracción de rayos X Marek y Dostal reportaron las conformaciones espaciales de la β -allocriptopina y α - allocriptopina¹⁷.

En el 2004 fue evaluada y validada la actividad de *B. frutescens* frente a parásitos externos de bovinos¹⁸ .

5. MARCO TEORICO

5.1 FAMILIA PAPAVERACEAE (Familia de la amapola o dormidera).

Características estructurales de la familia Papaveracea.

- Hierbas, arbustos y árboles.
- Plantas con látex, de látex regularmente naranja o amarillo.
- Hojas usualmente alternadas, simples.
- De flores vistosas, actinomorfas, bisexuales.
- Con frutos en cápsulas.

5.1.1 Número de género y especies En todo el mundo, las Papaveráceas comprenden 23 géneros y aproximadamente 220 especies. Otros autores manifiestan que consiste de 28 géneros y unas 250 especies en regiones templadas y en la parte subtropical del hemisferio norte. De los cuales tres géneros contienen la mayoría de las especies; el género *Papaver* contiene 80 especies principalmente de nortes templados; *Meconopsis* con 48 especies teniendo como centro de diversidad el centro y sur de la Asia; y el género *Argemone* que abarca 32 especies ubicadas en el hemisferio occidental. En América tropical, se hallan los tres géneros en la fauna nativa, *Argemone* con aproximadamente ocho especies, *Bocconia* con cerca de nueve especies. Algunas de las especies del género *Papaver* han sido introducidas por su carácter ornamental ^{19 20}.

5.1.2 Distribución y hábitat Las hierbas Papaveráceas predominan en altitudes templadas, estos géneros endémicos del oriente y el occidente de América y el oriente de Asia. De tres géneros asentados en América tropical, dos el *Argemone* y el *Bocconia* centran su

biodiversidad en Norte y Centro América respectivamente, acontece igualmente en India Occidental y en Sur América en la región Andina. *Hunnemannia*, con dos especies y una del Neotrópico, son endémicas de zonas montañosas neotrópicas del Oriente de México, la familia Papaveraceae se presenta en zonas bajas secas y montañosas húmedas de América Central¹⁹.

5.1.3 Clasificación familiar Las Papaveraceae y las Fumariaceae extraneotropicales fueron ubicadas en Papaverales por Cronquist. Otros sistemas de clasificación incluyen los 16 géneros y más de 500 especies de Fumariaceae en Papaveraceae y recientes estudios morfológicos y moleculares ubican los miembros de estas dos familias en las Renunculales y con acercamiento a familias tales como Menispermaceae, Berberidaceae y Renunculaceae¹⁹.

Excluyendo la Fumariaceae, la Papaveraceae son divididas en cinco subfamilias: Platystemonoideae; Papaveroideae incluyendo *Argemone*; Escholzioideae; Glaucioideae; y la bicarpellate Chelidoniodeae con látex naranja y semillas en capsulas, incluyendo *Bocconia*. Kadereit reorganizó cuatro subfamilias, ubicando Glaucioideae dentro de Chelidoniodeae y *Canyba* en Papaveroideae en vez Platystemonoideae. Basándose en datos moleculares, las Platystemonoideae se ubican dentro de las Papaveroideae ^{4 19}.

5.1.4 Particularidades de la familia Hábito: las Hierbas o pachycaulous treelets (*Bocconia*), algunos subarbustos, con hojas anuales o perennes; presentan látex, regularmente naranja o amarillo, algunas veces blanco, aguado en las *Hunnemannia*; manifiestan vellosidades (trichomes) (dividido en *Bocconia*) o presentan espinas algunas veces. De Estípulas Ausentes, las ramificaciones usualmente alternadas, algunas veces subopuestas, simples, constantemente glaucos; los márgenes del limbo entero cortado profundamente. Inflorescencias en disposición axilar o Terminal, de flores solitarias, ramificadas, o paniculada (altamente dividido en *Bocconia*). Flores actinomórficas, bisexuales, usualmente vistosas; con capullos dispuestos de cabeza o de forma erecta; presentan de 2 a 3 sépalos, de poca duración, casi siempre de 4 o 6 pétalos, excepto en *Bocconia*, con dos verticilos cuando presenta, capullo en forma de entejado (dispuesto

como tejas) y plegado; androceo de abundantes estambres, los estambres colgantes en *Bocconia* ; gynoecium syncarpous, de ovario superior, los carpelos (2 en *Bocconia*) en otros de 3 a 7, un loculo, de modo algunas veces cortos o ausentes (*Hunnemannia*), los estigmas fundidos, usualmente discoidales, persistente en los frutos; placentación parietal, los óvulos usualmente son numerosos, raramente uno en *Bocconia*. Frutos encapsulados, de diversas formas, presentándose glabros, velludos, y hasta espinas, deshicientes (acción de abrirse ciertos frutos para liberar las semillas) de forma becipetal o acropetal. Son Abundantes en semillas (de forma individual en *Bocconia*), pequeñas (copiosas en *Bocconia*), a menudo en cápsulas ^{4 19 20}.

5.1.5 Historia natural La mayoría de las especies es polinizada por insectos, con excepción de la *Bocconia*, ya que por la disposición de los estambres colgantes de las flores es polinizada por medio de voladores. Las semillas de algunas Pavaraceae son básicamente distribuidas por su caída desde los racimos al quebrarse las cápsulas, pero, las semillas naranjas y rojas de algunas *Bocconia* se le atribuye su dispersión a los desechos de aves, las hormigas pueden ayudar¹⁹.

5.1.6 Usos económicos La Familia Papaveraceae es rica en alcaloides isoquinolínicos. Los látex de varias especies de *Papaver* contienen alcaloides con uso farmacéutico, incluyendo el opio, codeína, y la morfina, los cuales son derivados de la heroína. El látex es recolectado mediante incisiones hechas en las cápsulas verdes. Las *Argemones* es utilizada como purgativa, y *Bocconia* es utilizada para tratar verrugas. Los látex de varias especies son usados como colorantes. Especies de varios géneros, incluyendo *Papaver* y *Argemone*, son cultivadas ornamentalmente, y *A. mexicana* es ahora una maleza en zonas bajas de los trópicos ²⁰.

5.2 UBICACIÓN DE LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS DE LA FAMILIA

Papaveraceae

La naturaleza higroscópica de los alcaloides sugiere que estos pueden ser disueltos como grandes grupos de alta densidad electrónica, precipitados y acumulados en las vacuolas, sin embargo algunos alcaloides como la nicotina la cual predomina en las paredes celulares y en los plastidios demuestran, que aunque es común encontrar los alcaloides en las vacuolas no siempre es el caso. Las vacuolas aisladas del látex amarillo de las papaveráceas, contienen comúnmente sanguinarina y berberina entre otros alcaloides, que posiblemente se encuentran unidos a fenoles presentes en la savia de la célula²¹.

5.3 *Bocconia frutescens* L.

La especie *Bocconia frutescens* L. hace parte de la familia Papaveraceae de la cual se encuentran variedad de sinónimos Científicos tales como *Bocconia frutescens* variedad *cernua* Moc. & Sessé ex DC, *Bocconia glauca* Salisb, *Bocconia pearcei* Hutch, *Bocconia quercifoliamoench*, *Bocconia sinuatifolia* Stokes, *Bocconia subtomentosa* L'Hér. Exstahl, *Bocconia integrifolia* H.& B es conocida a nivel vulgar como curador, palo amarillo, saúco, yagrunito ,chocolate blanco, tabaquillo, trompeto, llorasangre, Cuatlataya, Gordolobo, Lloro sangre, Mano de león, Palo santo²² (figura 1). En otros países como México se le conoce como palo amarillo, palo del diablo, yerba picosa que se deriva del nombre Cocoxchuitl (cococ= picoso y xchuitl =yerba) dado por los indios aztecas; en el Salvador se le denomina sangre de toro y tiñe canasto; en Venezuela como cheledonia y leñoso²³.



Figura 1. Planta *Bocconia frutescens*.

Es una planta arbustiva o arbórea, perennifolia de 1-3 m de alto, con látex amarillo o anaranjado a rojo; tallo a menudo ramificado desde la base, ramas jóvenes lanoso-tomentosas, con hojas aglomeradas hacia la parte superior; hojas con pecíolos de 2-8 cm de largo, oblongas a elípticas en contorno general, hasta de 45 cm de largo y 30 cm de ancho (las superiores de dimensiones menores), con frecuencia glaucas, borde pinnatipartido hasta la mitad o menos de la distancia hacia el nervio medio, lóbulos laterales en hojas bien desarrolladas por lo común 6 o menos de cada lado, oblicuamente triangulares a trapeciformes, 2 o menos veces más largos que anchos, su ápice agudo u obtuso, aserrados, la base de la lámina por lo general truncada, haz glabro o casi glabro, envés tomentoso a glabrado; inflorescencia en forma de panícula amplia y laxa, muy ramificada, hasta de unos 40 cm de largo y 30 cm de ancho, brácteas oblongas-lanceoladas, de alrededor de 1 cm de largo; flores numerosas sobre pedicelos finos hasta de 1 cm de largo; estambres por lo común 16-20, filamentos delgados de 3-5 mm de largo, anteras lineares de unos 6 mm de largo; ovario estipitado, estilo evidente, estigma bimelado; fruto elipsoide, angostándose hacia ambos extremos de 7-8 mm de largo, tanto replo como estilo (de unos 4 mm de largo) y estigma (de 4 mm de largo) persistentes, estípites hasta de 1 cm de largo; semillas de alrededor de 6 mm de largo, obscura, levemente reticulada, con un arrio basal evidente, cupuliforme, escamoso-pulposo. Florece y fructifica todo el año^{24,25}.

La especie vegetal *Bocconia frutescens* L. se ha ubicado en la región Quindiana, en diferentes zonas limítrofes al norte de Armenia como chaguala, Regivit, la vereda San Juan y en otras veredas del municipio de Salento; en cercanías a Filandia. Y en las inmediaciones con el departamento de Risaralda, como también se percibe su abundancia en el sector de la zona montañosa conocido como la Línea. La literatura lo reporta en los departamentos zonas montañosas de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Norte de Santander, Meta y Putumayo; y en países cercanos Venezuela, Puerto Rico, México y Perú^{26 27 28}. La presencia se manifiesta desde especímenes aislados a varios especímenes juntos. El trompeta es una especie pionera en el desarrollo de los bosques, esto quizás se deba a la aspersión realizada por las aves. Se encuentra sitios con abundante luz y humedad de las cordilleras desde 1500 hasta cerca de 3200 metros sobre el nivel de mar.

5.4 ALCALOIDES

El término alcaloide de *álcali* (bases hidrosolubles) con el sufijo *oide* del latín *eides* (forma), fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819, se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas (bases naturales), este carácter básico es debido a la disposición espacial de un par electrónico procedente del nitrógeno en su estructura.

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado, derivados de aminoácidos²⁹. Hoy en día se conoce exactamente el papel que desempeñan algunos de estos en las plantas como es el caso de la morfina el cual desempeña un papel como compuesto químico de defensa (disuasorios nutritivos) para proteger la planta del opio de varios herbívoros³⁰. También hay antecedentes que indican que son importantes para el desarrollo de la planta como regulador u hormona de crecimiento, transportadores de N₂, o reserva de N₂, ya que se pueden transformar en aminoácidos.

Según la ruta metabólica y la posición del nitrógeno se clasifican en alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los alcaloides verdaderos tienen siempre un Nitrógeno heterocíclico con carácter básico y biogénicamente derivan de aminoácidos. Los protoalcaloides son aminas simples con Nitrógeno extracíclico (No heterocíclico) también con carácter básico y provienen del metabolismo de aminoácidos, es decir derivan biogénicamente de aminoácidos. Los pseudoalcaloides poseen las propiedades de los alcaloides pero su biosíntesis no es a partir de aminoácidos, la mayoría de estos alcaloides deriva del metabolismo del isopreno³¹.

Sin embargo en el momento la clasificación biogénica parece estar cobrando fuerza y ser la más aceptada. Esta clasificación consiste en el tipo de precursor o compuestos “bloques” usados por los organismos para sintetizar estructuras complejas por ejemplo algunos alcaloides indólicos complejos derivan del triptófano tiene la siguiente forma:

I. Alcaloides derivados de ornitina y lisina: tropánicos, pirrolizidínicos, piperidínicos y quinolizidínicos.

II. Alcaloides derivados del ácido nicotínico.

III. Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina: feniletilamínicos e isoquinoleínicos.

IV. Alcaloides derivados del triptófano: indólicos y quinoleínicos.

V. Alcaloides derivados de la histidina: imidazólicos.

VI. Alcaloides derivados del ácido antranílico.

VII. Alcaloides derivados del metabolismo terpénico:

diterpénicos y esteroídicos.

VIII. Otros alcaloides: bases xánticas.

5.4.1 Alcaloides bencilisoquinolínicos

En este grupo de alcaloides se encuentran bencilisoquinolinas simples (BIQ), benciltetrahydroquinolinas (BTHIQ) y las bisbenciltetrahydroquinolinas (BBTHIQ) los aminoácidos precursores de estos alcaloides son fenilalanina y tirosina (figuras 2-3).¹⁰

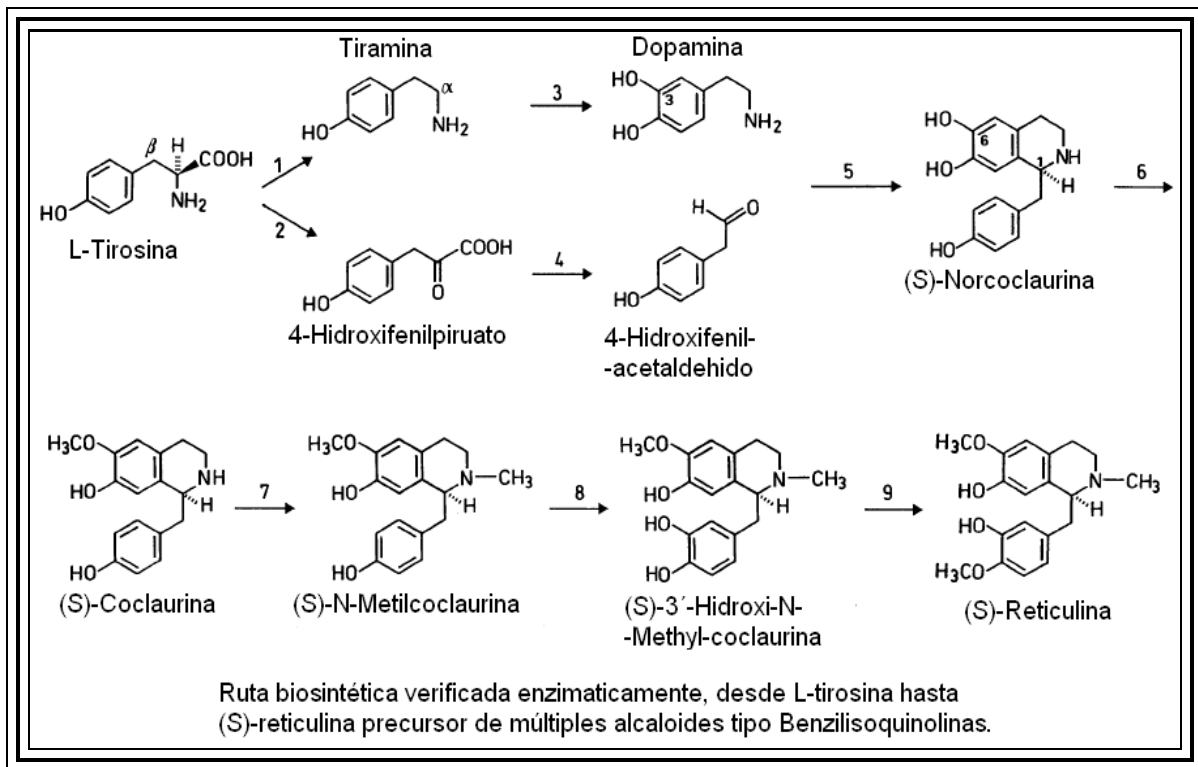


Figura 2. Ruta enzimática de alcaloides tipo Benzilisoquinolínicos³²

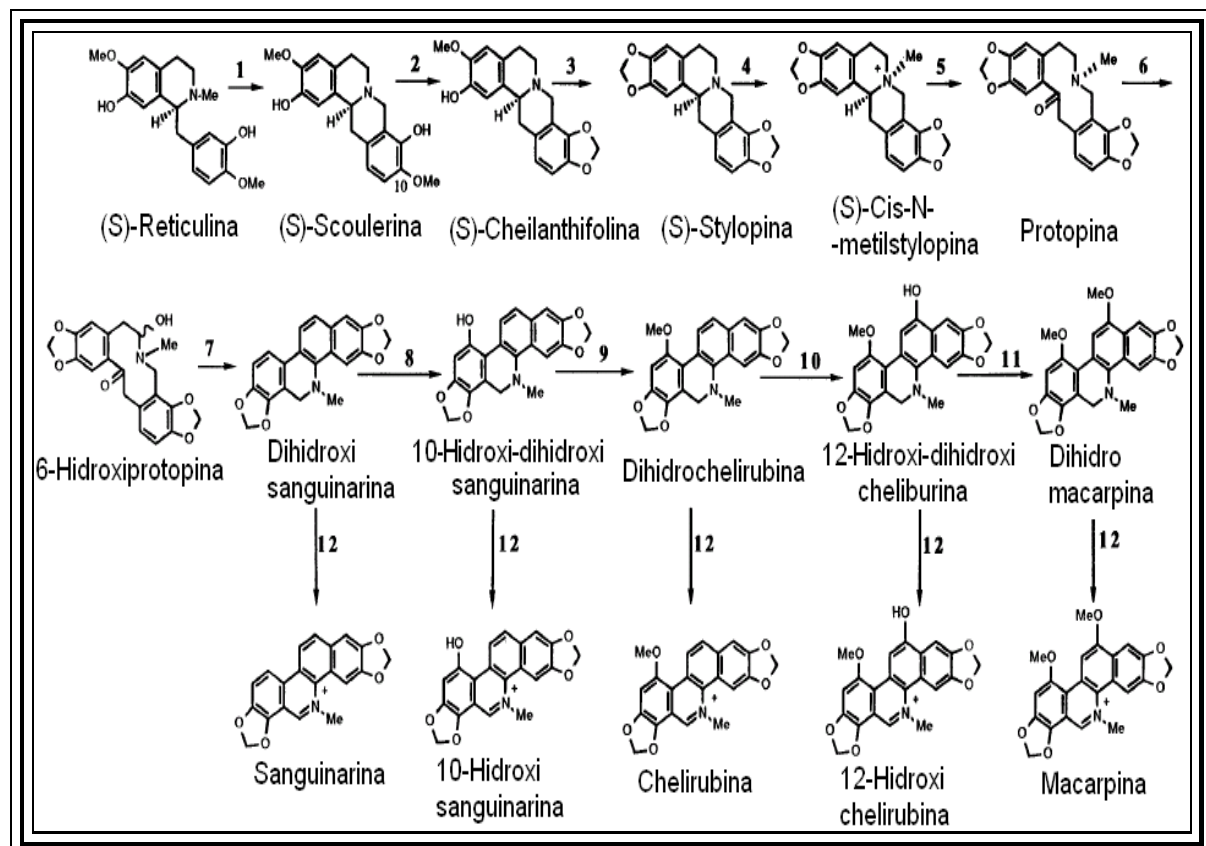


Figura 3. Alcaloides sintetizados a partir de (S)-Reticulina²⁹.

Las plantas del género Papaveraceae se caracterizan por ser ricas en alcaloides. Dentro del género papaveraceae encontramos las especies *papaver somniferum* y *papaver rhocas*. El opio obtenido de *papaver somniferum* cuenta con cerca de 25 alcaloides todos combinados con ácido mecóico, Serturmer aisló la morfina en 1805 el primer alcaloide isoquinolínico, posteriormente se aislaron la codeína y la narcotina las cuales aun hoy son drogas muy importantes. La mayoría de estos alcaloides se pueden clasificar como de tipo Bencilisoquinolina y Benciltetrahidroisoquinolina^{33,8} (figura 4).

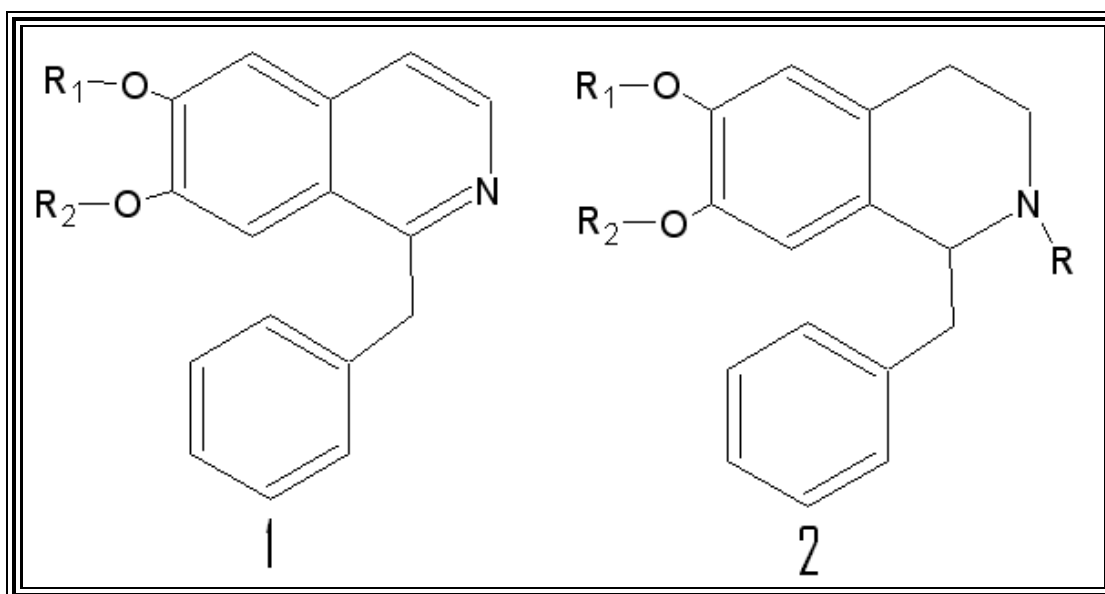
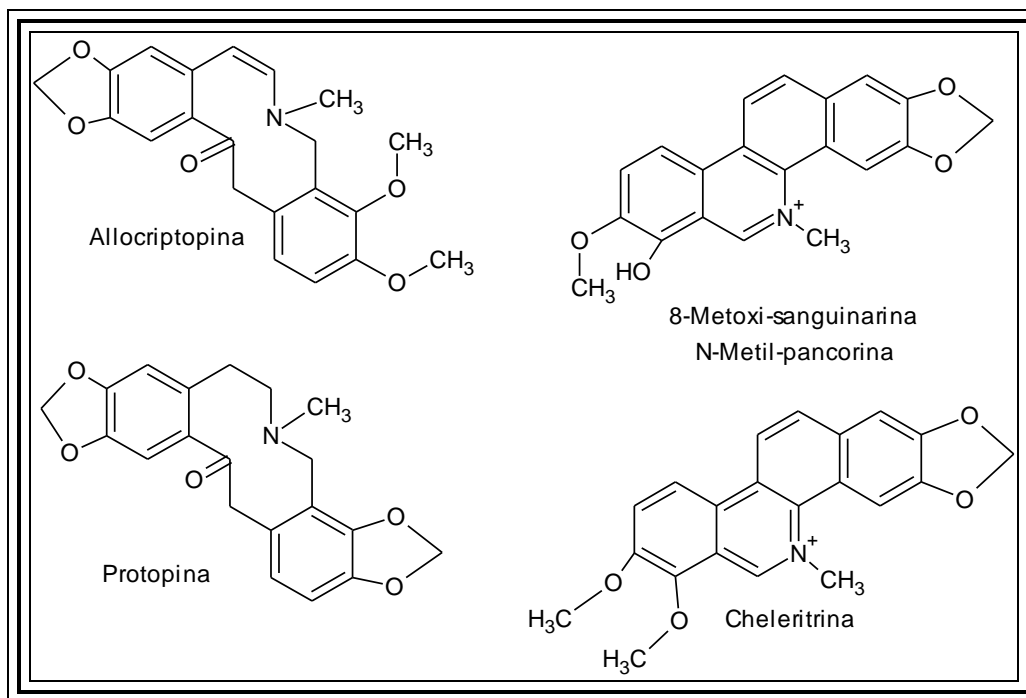


Figura 4. Núcleos: Bencilisoquinolina BIQ (1), Bencil tetrahidroisoquinolina BTHIQ (2).

De acuerdo a Wettstein (1935) las Rhoadales contienen la familia Papaveraceae entre otras como Cruciferae, Resedaceae, y Capparidaceae sin embargo solo se han encontrado alcaloides verdaderos en el género Papaveraceae de las cuales todas las especies contienen compuestos del tipo Benciltetrahidroisoquinolinas. Por mucho tiempo se pensó que la Protopina era el alcaloide más distribuido en el género, sin embargo Hakim (1961) demostró que la coptisina y la sanguinarina se encuentran igualmente distribuidos. Desde el punto de vista quimiotaxonómico es importante conocer que alcaloides representativos

aislados de Rutaceae también han sido aislados de Polyarpaceae y Papaveraceae como es el caso de la Chelitrina y la allocriptopina³⁴.

En el año 1949 Henry T. A. señaló cuatro alcaloides presentes en *Bocconia frutescens* L como Allocriptopina, Chelitrina, Protopina, Sanguinarina los cuales hacen referencia al termino Bocconina³⁵. Estos alcaloides son del tipo Isoquinolínicos, Díaz M, aisló 6 alcaloides de la planta *Bocconia frutescens* descubriendo 2 nuevos que no habían sido reportados anteriormente; Estos corresponden a BE2 (bencilisoquinolina), (1-[2'-hidroximetil-3',4'-metilendioxbenciliden]-2-metil-6,7-dimetoxi-3,4-tetrahidroisoquinolina); BHO chelitrina; BH1, 8-hídrixchelitrina- BH3, la dihidromarcapina, BC1, la angolína ó 8-metoxidihidrochelitrina; BC2, la nor-sanguinarina- BC3 (también denominado BE1) es aislado tanto del extracto clorofórmico como del etanólico se identifica como 8-metoxisanguinarina, conocida como N-metilpancorina³⁶ (figura 5 y 6). Mediante análisis de difracción de rayos X Marek y Dostal reportaron las conformaciones espaciales de la β -Allocriptopina y α - Allocriptopina.¹³. La presencia de Protopina concuerda con la quimiotaxonomía propuesta a partir de las observaciones realizadas por Mc Nair donde se afirmó la presencia de Protopina en todas las papaveráceas³⁷.



Figuras 5. Estructuras de los alcaloides presentes en *B. frutescens* L.

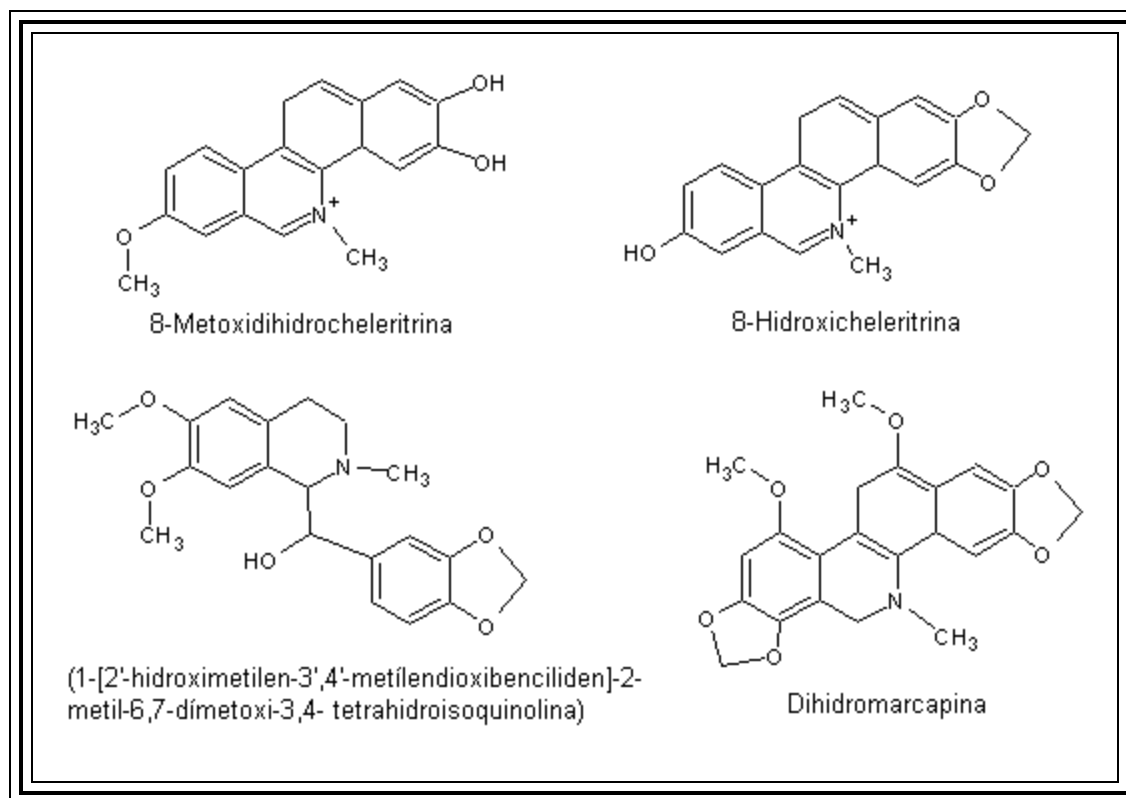


Figura 6. Estructuras de los alcaloides presentes en *B. frutescens* L.

Hoy en día estudios recientes de la planta *Bocconia frutescens* ratifican su actividad frente a *Mycrobacterium tuberculosis* ya que el extracto obtenido de la hoja demuestra actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* y actividad estimuladora sobre macrófagos en tanto que el extracto hexanoico obtenido de la hoja solo presenta acción contra *M. tuberculosis*, los extractos hexánico y metanólico de hojas de *B. frutescens* L, presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/ml³⁸.

En el año de 1988 Sakamoto y sus colaboradores patentan un método que inhibe la reabsorción de los huesos y liberación de colagenasa en mamíferos periodontales utilizando alcaloides que se encuentran en la especie vegetal *Bocconia frutescens* L.

El jugo acre obtenido de corteza y hojas de esta planta se utiliza como vermífugo y purgante¹⁴, el extracto de hojas presenta actividad en la desparasitación de mamíferos en el control de Ectoparásitos³⁹. Algunos autores indican que las semillas maceradas de *B. frutescens* son empleadas para eliminar los piojos⁴⁰, se reporta también que las semillas contienen un aceite altamente tóxico además Fumarina y Chelidonina⁴¹.

Conocimientos etnobotánicos de la zona indican la aplicación del extracto de la planta para el control de pulgas y garrapatas. Lo cual es consistente con la actividad descrita en semillas por C Cuervo M¹⁴. La mezcla de alcaloides obtenida de la corteza se conoce con el nombre de Bucconia el cual es un analgésico potente similar a la morfina.

Dado que las diferentes reseñas bibliográficas dan indicios de actividad toxica tanto en hojas cómo corteza y semillas se hace necesario la evaluación preliminar de extractos obtenidos de las tres partes para seleccionar el o los más tóxicos contra la broca y así aplicar las técnicas químicas y estadísticas apropiadas para encontrar las dosis más letales.

5.4.2 Algunos factores a tener en cuenta en el estudio de alcaloides Para la evaluación de alcaloides en una especie vegetal se tiene inicialmente en cuenta sus características fisiológicas y clasificación taxonómica-quimiotaxonómica. Ya que los indicios de su presencia en las especies vegetales de la familia permite una mejor orientación.

La interacción de otros tipos de metabolitos con algunos reactivos de precipitación puede presentar falsos positivos, como son el caso de derivados del isopreno, compuestos con grupos funcionales con alta densidad electrónica; algunos compuestos alfa-beta α - β -insaturados, péptidos, cumarinas, purinas, betaínas, ciertos polifenoles, hidroxiflavonas, α -pironas y algunas proteínas, aunque sus monómeros es decir sus aminoácidos no interaccionan con los reactivos.

Múltiples estudios han demostrado que los reactivos de precipitación manifiestan diferentes niveles de sensibilidad y selectividad. Para este trabajo se tuvo en cuenta las observaciones realizadas en las investigaciones de Martello y Farnsworth.^{42,43}

5.4.3 Características químicas de los alcaloides para su calificación La evaluación cualitativa de alcaloides, se realiza mediante reactivos de precipitación los cuales generalmente se constituyen de complejos de ácidos o sales de metales pesados (Hg, W, Au, Pt, Mo, Bi (ácido intermedio en blando)) algunos de ellos con yodo. Estos metales que actúan como ácidos blandos (electrófilos) por su volumen y por la disponibilidad de orbitales d, pueden generar aductos con los alcaloides que funcionan como bases blandas (Nucleófilos), esta característica de basicidad la aportan los pares de electrones del Nitrógeno y las interacciones electrónicas del heterociclo como también los grupos funcionales que lo compongan. La interacción entre ácidos blandos y bases blandas (especies voluminosas) forman complejos estables que precipitan ocasionando productos coloreados por las características de los grupos cromóforos que poseen los alcaloides.^{44, 45}

5.5 EL CAFÉ

El Café es una planta superior herbácea, la cual pertenece al orden de las **Rubiales**, y a la Familia de las **Rubiáceas** como también otras plantas muy conocidas como el borjojo, la Ipecacuana de Jalapa (*Uragoga acuminata*) (la cual se utiliza como emético “Emitina y Cefalina”), la Quina (*Cinchona calisaya*), la Cuajaleche (*Galium verum*)^{46 47}.

Es un arbusto tropical del género *Coffea* que se denomina el Cafeto (*Coffea arabica*), se considera una planta vascular “superior” por poseer diferentes órganos raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Cuyo fruto carnoso, de color rojo, contienen en su interior dos Semillas yuxtapuestas. Con las semillas secas, tostadas y molidas se elabora una infusión conocida con el nombre de Café, de cualidades estimulantes debido especialmente a la Cafeína ^{46 47}.

Al género *Coffea* se le atribuyen propiedades alelopáticas por evitar la germinación y desarrollo de competidores.

El Cafeto es originario de los bosques tropicales, al Nor-Oriente de África, en los países de Sudán y Etiopía donde se encuentra en estado silvestre. Actualmente se encuentra su cultivo extendido por las regiones Ecuatoriales de África, Asia, y América. En Europa su cultivo se generalizó en el siglo XVII, procedente de Arabia ⁴⁷.

El Café y el Té (*Camellia sinensis*) proporcionan las dos bebidas mas importantes del mundo. Pero no las únicas que contienen Cafeína, pues la Cocoa (*Theobroma Cacao*) también la contiene dentro de su composición; la cocoa es el principal componente del Chocolate⁴⁷.

Este arbusto es cultivado a altitudes templadas entre 1000 y 2000 m.s.n.m, su cultivo es el medio de sustento a más de 25 millones de personas por las zonas ecuatoriales del Globo⁴⁷.

5.5.1 Descripción botánica arbusto leñoso, hasta de 7 m de altura. Tallo delgado y recto. Hojas perennes, opuestas, lanceoladas. Flores sésiles, infundibuliformes, blancas, fragantes, reunidas en racimos axilares. Fruto globoso, semilla ovalada, cóncavas de un lado con un surco longitudinal en el centro^{48 49}.

5.5.2 Historia del descubrimiento del café como bebida El hombre mediante ensayo y error, ha llegado a conocer variedad de procesos y diferentes tipos de herramientas minerales, vegetales y hasta animales para disponer en su beneficio. Dentro de estos eventos la concepción de la utilización de fruto café, presenta una historia, en la parte

nororiental de África, en Abisinia hoy Etiopia, un pastor llamado Kaldi, llevaba su rebaño a pastar y en uno de esos días noto un comportamiento muy singular en sus cabras entre saltos y piques, esto generó su curiosidad por la causa de tan rara conducta. Mediante su observación comprobó que sus animales se agitaban y se desvelaban por comer los cogollos de unos arbustos que producían unos frutos rojos⁹.

El compartió su observación con unos monjes, los cuales se interesaron por el extraño prodigio y se dispusieron a cocinar los frutos y las hojas, obteniendo una bebida de muy mal sabor, lo que llevo a que arrojaran lo que quedaba en el recipiente a la hoguera. Los granos al quemarse desprendían un aroma muy agradable, lo que conllevó al monje a preparar la bebida utilizando los granos tostados, encontrando que el brebaje, aunque amargo tenía un agradable aroma y sabor, y que después de tomarlo un efecto tonificante⁵⁰.

El cafeto pertenece a la gran familia de las Rubiáceas que abarca 500 géneros y 8000 especies entre las que hay árboles, arbustos, pequeños plantas y bejucos. Uno de esos 500 géneros de la familia Rubiáceas es el Coffea, que a su vez comprende unas 10 especies civilizadas, esto es cultivadas por el hombre y 50 especies silvestres. Dentro de las especies civilizadas la *Coffea Arábica* L.

5.6 LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)

5.6.1 Ficha Técnica

Reino: Animal

Phylum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Scolytidae

Género: *Hypothenemus*

Especie: *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867

Nombre Común: Broca del fruto del cafeto, gorgojo del grano del cafeto

Origen: África Ecuatorial.

5.6.2 Descripción General del Hábitat y Hábitos Es atraída al fruto por olor, color, forma y por los desechos de frutos brocados. La mayor actividad de vuelo de la broca adulta ocurre por la tarde entre las 16 y las 18 horas. Es monófoga, se alimenta y reproduce solo en *Coffea* sp. Es un fitoparásito, perfora el fruto y se alimenta de la semilla y se mantiene allí casi todo el tiempo, solo sale en búsqueda de nuevos frutos para reproducirse⁵¹.

5.6.3 Apariencia general El insecto *Hypothenemus hampei* (figura 7) presenta metamorfosis completa, pasando por huevo, tres estadios larvales, prepupa, pupa y adulto.

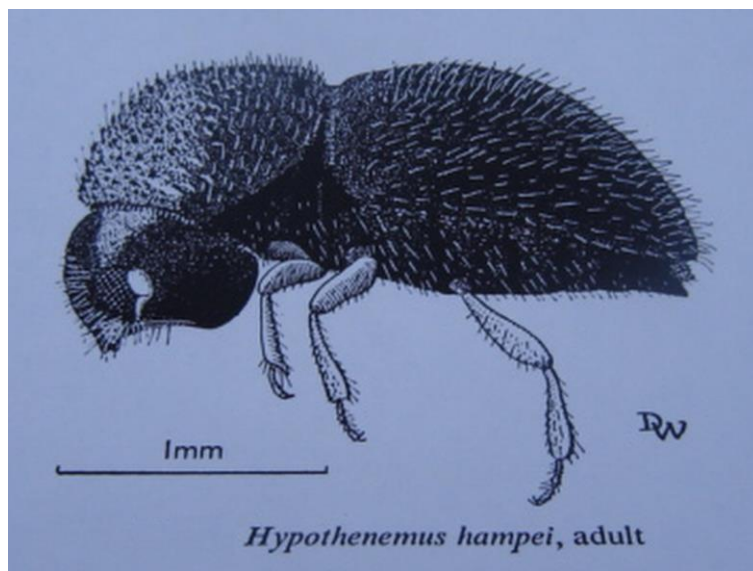


Figura 7. Broca del café *Hypothenemus hampei*.

El huevo es puesto dentro del endospermo en una cámara hecha por la hembra cerca al ápice (punto de entrada a la semilla). Inicialmente es blanco y hialino hacia los polos y luego amarillento antes de la eclosión. Es de forma oblonga y con superficie lisa; mide hasta 0,7mm de largo por 0,3 de ancho. Se observa que los huevos puestos en frutos sobremaduros y secos son más grandes que los puestos en los frutos verdes¹¹.

Insecto holometábolo, los huevos recién ovipositados en el endospermo son de color blanco lechoso y se vuelven amarillentos, de forma ligeramente elíptica, miden de 0,54 a 0,82 mm de largo y de 0,2 a 0,8 mm de diámetro. Las larvas son apodas, de color blanco lechoso y blandas, la cápsula cefálica esta bien esclerotizada, con mandíbulas fuertes y en el último instar miden entre 1,88 a 2,30 mm de largo. Las pupas son de color blanco amarillento al inicio y después cambian a pardo claro, así también van diferenciándose los apéndices de la cabeza, las alas y las patas. Prefiere lugares sombreados en los cafetales.

Cuando la hembra intenta la colonización de frutos verdes de menos de 18 semanas de edad (más de 80% de agua en peso) se queda entre las semillas y allí pone 2-3 huevos pequeños y generalmente de poca fertilidad. Cuando el fruto es monocárpico, parece que el desarrollo es más rápido y siempre se observa a la hembra dentro del endospermo.

Cuando la broca del café entra a una semilla con un contenido de peso seco superior al 20 % en 1-2 días ha hecho una cámara de postura y en las primeras tres semanas pone entre 30 y 40 huevos; a mayor desarrollo del fruto mayor velocidad de postura, de manera que en frutos de 24 semanas el desarrollo de la población es mayor que en frutos de 18 – 20 semanas. Después de esta primera camada, la hembra colonizadora se dedica a proteger su descendencia y puede reiniciar la postura unas 3 semanas después pero a un ritmo mucho menor. Se ha encontrado que en un periodo de cinco meses puede poner un poco más de 100 huevos⁵².

La Broca se expande a otras plantaciones por varias vías: en las semillas y frutos atacados; cuando el hombre los lleva de un lugar a otro; en la ropa, sombrero o calzado de las personas que transitan por las plantaciones; en herramientas y equipos, tales como machetes, costales y canastos; en los vehículos; y en el agua que se usa durante el lavado del café, etc.

5.6.4 Características de *Hypothenemus hampei* El insecto adulto es un pequeño escarabajo de coloración oscura, con un cuerpo cilíndrico, robusto, recurvado en la región posterior, del tamaño de la cabeza de un alfiler. Su cuerpo está cubierto de cerdas y sus élitros están estriados en forma longitudinal. Su longitud es de casi 1,7 mm y el ancho del cuerpo de unos 0,7 mm. El macho es un poco más pequeño, tiene alas rudimentarias y no vuela, y vive dentro del fruto donde se originó toman un color café oscuro (casi negro) cuando han alcanzado la madurez sexual, lo cual ocurre de 3-4 días después de que emergen los adultos. Recién emergidos, son de color café claro o pardo rojizo. El macho no vuela por tener el segundo par de alas atrofiadas y es más pequeño que la hembra. Mide entre 1 a 1,25 mm de largo y la hembra mide de 1,4 a 1,85 mm de largo, ambos tienen el cuerpo cubierto de setas (pelos). La proporción de hembras a machos es aproximadamente 10:1.

5.6.5 Ciclo de vida El ciclo de vida depende de la temperatura y la humedad relativa, las cuales a su vez varían con la altitud.

La hembra puede ovipositar de 12 a 63 huevos. La duración en huevo es de 9,2 a 13,7 días promedio, la de larva de 17 a 17,9 días, pupa de 11,3 a 14,7 días y el período de adulto a cuando inicia la oviposición la hembra de 13,5 a 16,6 días promedio.

5.6.6 Historia y Orígenes en Colombia La Broca es la plaga más dañina que ha afectado el cultivo del café en toda su historia. Desde que se registró en el país ha ocasionado grandes pérdidas en todos los departamentos cafeteros; incluso, marginó el cultivo de las zonas bajas. Ataca directamente los frutos de café, es decir, afecta principalmente la producción y la calidad ¹⁰.

En julio de 1988 La presencia de la broca fue denunciada en una vereda de Nariño Colombia desde entonces la Federación Nacional de Cafeteros no ha cesado en su empeño de colocar todas las barreras posibles para retardar la entrada de la broca del café a las diferentes regiones cafeteras del país. Sin embargo hoy en día se encuentra por casi todo el

territorio Colombiano y solo los cafetales del noreste colombiano no han sido colonizados por la Broca de café en su totalidad⁵³.

Para el año 2006 Los insecticidas utilizados para el control de la broca fueron prohibidos por el gobierno nacional debido a su alta toxicidad y a los daños que causa en otras plantaciones, ocasionando la reaparición de la plaga invadiendo hasta el 40 % de los cultivos en la región de Caldas generando pérdidas de cerca de 7 mil millones de pesos para el sector caficultor⁵⁴.

5.6.7 Efecto de la broca sobre la bebida del café El *H. hampei* utiliza las cerezas del cafeto para sus necesidades de alimentación y reproducción atrofiando parte del sistema reproductor de la planta. La ausencia de depredadores, la mala planificación y las falencias de tecnificación hacen que la cadena trófica del *H. hampei* esta interrumpida y exponencializa su población; esto altera la actividad agropecuaria de la que se beneficia el hombre, pues el café es usado como una bebida por su sabor agradable y con frecuencia efectos ligeramente estimulantes⁵⁵.

A mayor grado de daño en la almendra por infestación de la broca, mayor es el deterioro de la bebida, las características del café afectadas por la broca son: acidez titulable, pH, aroma extracto, aroma bebida, acidez organoléptica, amargo, cuerpo, impresión global.

Cuando la bebida de café es preparada con granos que presentan leves lesiones físicas y fisiológicas en los tejidos de las almendras (nivel de daño leve) la tasa de café es aceptable mientras que con lesiones moderadas y avanzadas la bebida es rechazada ya que en almacenamiento puede incrementarse el deterioro de la almendra, por esto se recomienda descartar la posibilidad de comercializar el café Colombiano con niveles de infestación leves en sus granos^{56 57}.

5.7 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CONTROL DE LA BROCA

La broca de café como insecto ha sido un factor biótico de gran importancia responsable de los daños presentados en las plantaciones de café. Es un insecto de difícil manejo con los métodos tradicionales de control como los insecticidas, porque permanece protegida la mayor parte de su vida en el interior de los frutos. Algunos de los adultos son susceptibles a las aspersiones de estos productos, que tienen efecto únicamente por contacto con la plaga⁵⁸.

Para su control hay diferentes métodos, de los cuales el más utilizado es el conocido como **manejo integrado de la broca**. Éste consiste en un control cultural, que incluye el manejo en el beneficio, la recolección oportuna de los frutos en el momento de su maduración y el control biológico con la utilización de avispas y de hongos. Las avispas se crían y luego se liberan en los cafetales para que se establezcan y se coman parte de la población de broca, buscándola dentro de los frutos. El hongo es un moho blanco que se espolvorea en los cafetales para que mate parte de la población de la broca. Este método ha permitido que el país mantenga bajos niveles de infestación en sus cafetales y cumpla con sus compromisos de exportación en cuanto a producción y calidad⁵⁹.

5.7.1 Control cultural El control cultural se realiza mediante la pepena (recoger frutos caídos al suelo) y repela (quitar frutos que quedan después de la cosecha.); corte de frutos prematuros, poda de cafetos, poda de árboles de sombra, control de malezas y registro de floraciones. Entre el 65 y 75 % del control de la broca se hace con el **re-re** es decir con la recolección oportuna de granos maduros, sobre maduros y secos en el árbol y en el suelo con el fin de romper su ciclo biológico. Esta herramienta ambientalista ha sido adoptada por los caficultores colombianos y es la principal responsable de que los niveles de Broca en el país estén por debajo del 5 %¹².

5.7.2 Control biológico En la década de los 30` fue implementado el hongo *Beauveria bassiana* como entomopatógeno en el Congo Belga. En Colombia su utilización inicial se reporta hacia 1989 en la región de Ancyú (Nariño) ¹⁴. El hongo *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina) es de tipo entomopatógeno con capacidad de matar la Broca del Café en condiciones de laboratorio y campo. Las diferentes razas (aislamientos) de esta especie de hongo presentan una gran actividad patogénica ya que las características de la Broca la hacen naturalmente susceptible a la infección por *Beauveria bassiana* si este se aplica como micoinsecticida. Sin embargo las poblaciones de *Beauveria bassiana* no son confiables como forma de control⁶⁰.

La avispa "*Cephalonomia stephanoderis*" se esta utilizando actualmente como control biológico (ectoparasitida) de la broca de café. Esta avispa es procedente del oeste del continente africano y su comportamiento natural es poner huevos en los granos de café brocados para que estos se alimenten de lo estados larvales de la plaga. Como en Colombia este cultivo es introducido no existe un insecto que realice esta misma función, por esto, se trajo la avispa con fines científicos⁶¹.

Los nemátodos han sido empleados con éxito en el control de larvas de coleópteros como *hypothenemus hampei* ya que estas penetran rápidamente a través de sus orificios naturales produciendo la muerte de la broca entre 24-72 horas. Una vez finalizado la infección miles de nuevas larvas de nematodo abandonan el cadáver en busca de nuevos hospedadores. Estos nemátodos son nativos de honduras y solo se les encuentra entre 600- 850 metros sobre el nivel del mar ⁹.

5.7.3 Control mecánico La broca de café es atraída a trampas cebadas con una mezcla de alcoholes y los datos de la captura muestran que estas trampas localizadas en los cafetales sirven como una herramienta de alerta a los caficultores para conocer cuando la broca esta volando en busca de nuevos frutos. La trampa "BROCAP", fue diseñada para capturar brocas, en el período después de la cosecha hasta que inicia la maduración de la nueva fructificación⁶².

5.7.4 Control químico Los adultos son susceptibles a las aspersiones de estos productos, que tienen efecto únicamente por contacto con la plaga⁶³ Para la aplicación de esta práctica, es necesario determinar el nivel población de la plaga para decidir si hacemos uso o no de este recurso donde campos con niveles de infestación del más del 2% justifican este control. La realización del muestreo es imprescindible para la determinación del nivel de daño económico⁶³.

La eficacia de los insecticidas aumenta cuando se usan coadyuvantes en proporción de 0,75 IM/Ha reduciendo sus dosis de 1,5 L/ha a 1,0 L/ha⁶⁴.

La efectividad de estos productos puede llegar a superar el 98%, aplicando diferentes parámetros como la elección adecuada del insecticida, la edad y el estado de maduración de los frutos, las condiciones ambientales predominantes, la topografía del terreno y el momento oportuno de las aspersiones ⁶⁴.

Este Control se realiza mediante la aplicación de productos químicos como fenthion (Lebaycid), clorpirifos (Lorsban), tiodan (Endosulfan 35 CE), Actellic 50 EC (pirimifos-metil)⁷.

5.8 DL₅₀ DOSIS LETAL MEDIA

Fue en 1927 que J. W. Trevan la definió como: "aquella dosis que origina la muerte del 50% de los animales" (habitualmente ratones de laboratorio); a menor valor, mayor nivel de toxicidad. El valor de DL₅₀ es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia.⁶⁵ Aunque la concentración es el factor principal para determinar la DL₅₀ el tiempo de exposición también influye sobre la DL₅₀. Hoy en día sabemos que un compuesto expuesto a un organismo vivo causa un efecto adverso cuando entra en contacto con el mismo, la exposición depende de la cantidad de compuesto y del periodo (tiempo) durante el cual éste es expuesto (organismo vivo).

Para la implementación de un organismo para bioensayos es necesario tener en cuenta los siguientes criterios:

- a) Ser representativo dentro de un nivel trópico ecológico y de la biota Nacional.
- b) Ocupar una posición importante dentro de las cadenas alimenticias.
- c) Ser manejable en el laboratorio.
- d) Tener una importancia económica.
- f) Ser sensible a los tóxicos.
- g) Ser consistentes a las respuestas a los tóxicos.

Loomis en su publicación de 1982 clasificó las DL₅₀ de sustancias químicas según el nivel de dosis en que se encuentran en una escala que comienza en extremadamente tóxico (1mg/kg o menos), altamente tóxico (1 a 50mg/kg), moderadamente tóxico (50 a 500mg/kg), ligeramente tóxico (500 a 5000mg/kg), prácticamente atóxico (5000 a 15000 mg/kg) y relativamente inocuo (más de 15000mg/kg)⁶⁶.

La determinación de la DL₅₀ se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias, en fitoquímica valiéndose del principio de que farmacología es simplemente toxicología a bajas concentraciones y toxicología es farmacología a concentraciones altas. La determinación de la DL₅₀ requiere de la estadística cuantil, para lo cual es necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit para así obtener la DL₅₀ con un 95 % de confianza⁶⁷.

5.8.1 Validez de la prueba de toxicidad Para que sea aceptable la prueba, el porcentaje de mortalidad del control no debe exceder del 10%, y un porcentaje de sobrevivencia sea mayor de 80%, una prueba individual puede considerarse aceptable si la temperatura, oxígeno disuelto u otras condiciones específicas caen fuera de las especificaciones dependiendo del objetivo de la prueba. La validez de la prueba va a depender de los mejores juicios profesionales, la experiencia del analista y la autoridad reguladora.

Existen diversos métodos para la realización de pruebas toxicológicas, pero en general se eligen aquellos ya normalizados y reconocidos internacionalmente por organizaciones y agencias como: Organización Internacional de Estandarización (ISO), agencia para la protección del Ambiente de Estados Unidos (USEPA).

Hoy en día es una herramienta muy empleada para establecer criterios de aceptación de pesticidas, también se emplea como procedimiento de estudio inicial de propiedades farmacéuticas, muchos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos con propiedades anticancerígenos son estudiados inicialmente por medio de este análisis⁶⁸.

Cualquier tipo de organismo vivo puede servir para estudiar la dosis letal media aunque la utilización de organismos superiores vertebrados exigen el permiso de las autoridades correspondientes, Algunos científicos emplean pollas de reposición blancas o/y marrones para estudiar alcaloides con propiedades antinutricionales³², otros científicos estudian sustancias con actividad antagonista sobre la mortalidad intestinal y toxicidad aguda oral sobre ratones⁶⁹. Recientemente se ha implementado el uso de *Daphnia magna* en efluentes industriales y el resultado provee información de la contaminación en los cuerpos receptores⁷⁰, incluso mediante el empleo de la DI 50 fue posible el descubrimiento de compuestos con actividad en bacterias gram positivas que se caracterizaban por ser resistentes a múltiples drogas⁷¹.

Como organismo de prueba se puede utilizar *Artemia salina*, el cual es un pequeño crustáceo de la subclase de los anostráceos, cuyos huevos pueden ser comprados a muy bajo costo en tiendas de mascotas como comida para peces tropicales⁴, sin embargo la utilización de organismos que se consideran plagas para la agricultura del hombre trae consigo el gran beneficio de estudiar directamente compuestos químicos que demuestren actividad toxica particular hacia ciertas formas de vida y no una toxicidad general que afecte todo el ciclo biológico a su entorno.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

6.1.1 Ubicación de la planta Se ubicó la presencia de *Bocconia frutescens* L. a lo largo de distintos lugares: El “vivero bar” avenida centenario con calle primera norte, en la carretera chaguala que une Armenia con Calarcá se aprecian múltiples ejemplares y en la bomba de oro negro avenida Bolívar vía Circacia cuentan con cuatro ejemplares, dentro del perímetro urbano de Armenia se encuentra en cercanía a la estación de servicio “Galán”.

Otros ejemplares se encuentran aislados y otras veces en grupos que llegan hasta de seis, en colinas, quizás proliferen fácilmente al asperjarse sus semillas en forma de cápsulas que en los racimos son abundantes. Al diseccionar cualquier parte del tronco emana látex de color naranja.

6.1.2 Recolección de la planta

6.1.2.1 Muestra herbario La muestra para el herbario fue recolectada el 10 de abril de 2007, en la Cr.19, Vía al Museo Quimbaya, Comuna diez “Quimbaya”. A borde de ladera y cercano a carretera, en el Departamento del Quindío, de aproximados 4m de altura, aislado. La vegetación que la rodea es baja, se observa a su alrededor helechos y se le nota con plantas enredaderas.

El material vegetal se sometió prensado y secado a una temperatura de 60°C. Se procedió a realizar 2 montajes para el herbario de la Universidad del Quindío (HUQ). Donde fue registrada y archivada con el número 29299.

6.1.2.2 Recolección para la marcha Las hojas, semillas y corteza fueron recolectados en la Cr.19, Vía al Museo Quimbaya (figura 8), Comuna diez “Quimbaya”. El peso obtenido de hojas fue de 2180 g, este material vegetal fue secado a una temperatura aproximada entre 24-28 ° C en sombra durante 10 días y después se seco en estufa a 39 °C durante un día. Posteriormente fue molido cada material por separado hasta obtener un polvo fino.



Figura 8. Hojas, Corteza y Semillas de *Bocconia frutescens*.

6.2 Lixiviación de hojas, semillas y corteza Se tomaron 50 g de hojas, semillas con cápsulas, y corteza y se sometió a lixiviación con 250 ml de etanol al 94 % durante 120 horas (5 días) adicionando volumen de solvente a diario.

Los Extractos de hojas, semillas y corteza fueron concentrados mediante un equipo de rotavapor con bomba de vacío a una temperatura de 40° C hasta obtener una textura de jarabe. Posteriormente se llevó a extracto seco a 40° C donde se obtuvieron 2.8053 g de extracto seco de semillas y 1.5835 g de extracto seco de hojas (figura 9) y 2.9016 gramos de extracto seco de corteza. A partir de los extractos secos se prepararon soluciones etanólicas de concentraciones 500, 1000 y 2000 partes por millón (ppm) (figura 10).



Figura 9. Extractos secos de Hojas y Semillas de *Bocconia frutescens*.

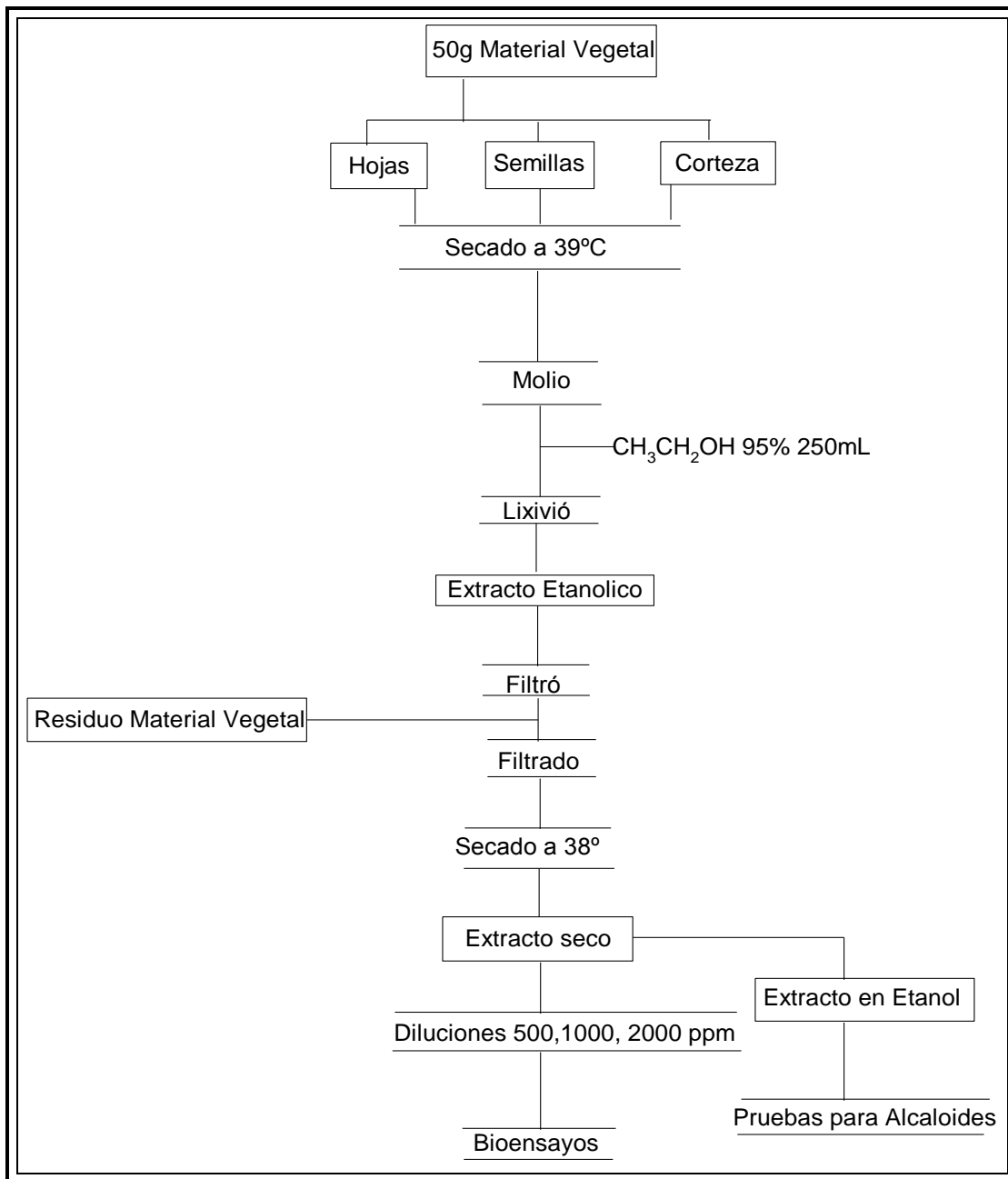


Figura 10. Obtención de los extractos etanólicos para bioensayos.

6.3 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL BIOENSAYO

Algunos aspectos del acondicionamiento de las brocas para el bioensayo como la desinfección y el tiempo de inmersión, se realizó siguiendo los pasos sugeridos por el

bioensayo para evaluar la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* contra la broca de café desarrollado en Cenicafé¹⁴.

6.3.1 Obtención y Selección de brocas Los granos brocados que proporcionaron las brocas para el bioensayo fueron recolectados en un lapso menor de 24 horas. Las brocas se adquirieron por extracción manual de granos infestados, a los cuales se les realizó un corte lateral a través del epicarpio sin pasar por el disco u ombligo y sin lastimar la almendra. Una vez extraídas las brocas se almacenaron en un frasco. Las que presentaron mayor movilidad, fueron seleccionadas para el bioensayo.

6.3.2 Acondicionamiento y desinfección Una vez seleccionadas las brocas se sometieron a una desinfección mediante inmersión en Hipoclorito de Sodio al 1 % durante 30 segundos y así evitar la contaminación por microorganismos que puedan afectar al *H. hampei*. Posteriormente fueron lavados con agua destilada clase tipo II para eliminar excesos de hipoclorito.

6.3.3 Solvente de exposición Tomando en cuenta la forma cultural en como se emplea la planta en la región. Se decidió emplear un solvente de moderada polaridad el cual posee afinidad por un mayor rango de metabolitos que el agua, por esta razón para realizar la selección entre hojas, semillas y corteza de la planta, se empleó etanol al 94 %. Se realizaron múltiples experimentos para determinar la mortalidad causada por el etanol al 94 % y se descubrió que este causa una mortalidad del 39.99 % a un tiempo de exposición de 2 minutos.

Para la evaluación de la actividad insecticida de los componentes de la planta se emplearon diferentes solventes y diluciones en agua de estos, de acuerdo a la solubilidad de los metabolitos.

6.3.4 Concentraciones de los extractos

La razón por la cual se seleccionó utilizar concentraciones de 500, 1000 y 2000 ppm es que de esta forma se puede evaluar rápidamente el potencial preliminar de un extracto puro, ya que cuando se presenta una alta mortalidad empleando soluciones de 500 ppm o de menor concentración, se considera que la solución responsable de esta mortalidad tiene un alto poder tóxico, en nuestro caso una alta actividad insecticida. Cuando extractos de concentraciones entre 500 y 1000 ppm producen una alta mortalidad se considera que el extracto posee un moderado potencial tóxico para nuestro caso moderada actividad insecticida. Por último extractos que ocasionan una alta mortalidad a concentraciones iguales o mayores a 2000 ppm se considera que estos tienen un bajo poder tóxico en nuestro caso una baja actividad insecticida.

6.3.5 Tiempo de exposición de *Hypothenemus Hampei* a los extractos de la planta El tiempo de exposición fue de 2 minutos por inmersión en 3ml del extracto a analizar.

6.3.6 Número de individuos y repeticiones Para el análisis estadístico del experimento, se hicieron tres réplicas de cada tratamiento consistente de 15 individuos, obteniéndose así un total de 45 brocas empleadas por experimento.

6.3.7 Determinación de mortalidad y supervivencia de la broca Después de transcurrido el tiempo de exposición, cada individuo se trata de forma específica, y broca por broca se deposita en un recipiente de 12 ml con tapa junto a un grano de café Borbom sano, en un estado de maduración verde (Verde 2) ⁷². A continuación, se realizó un seguimiento cada 24 horas durante 6 días. Las brocas que durante las primeras 168 horas no perforan el grano se consideran como “inactivas”. Las brocas de los experimentos que en el transcurso del tiempo de seguimiento (168 horas) logran introducirse totalmente dentro del grano se consideran como supervivientes, si no lo logran y se observan inmóviles, se consideran muertas. Esto se expresa en términos de “mortalidad”.

6.3.8 Determinación del tiempo de mortalidad de la broca Los experimentos se sometieron a seguimiento durante 168 horas. Donde se observó que a partir de las primeras

96 horas, la activación de las brocas es variable, mientras que a 168 horas se genera una estabilización de los organismos.

6.3.9 Otros factores utilizados en el bioensayo De forma paralela se llevan a cabo blancos (solventes), en las proporciones que sirven como vehículo de los extractos de la planta para los bioensayos.

Los granos que manifiestan la mayor facilidad de manejo y seguimiento durante el desarrollo de los bioensayos son los granos de estado verde y clasificación 2. Ya que la utilización de granos maduros en los bioensayos pueden presentar hongos y una consistencia que dificulta la extracción y evaluación de los individuos al terminar el bioensayo.

En la recolección de granos brocados para el bioensayo debe tenerse en cuenta el estado de fructificación del café, ya que este, aunque produce frutos varias veces al año, durante cosecha y cosecha suele quedar sin granos por lo tanto no se pueden coleccionar frutos brocados durante estos periodos por su escasez.

Los recipientes contenedores de los granos y las brocas en los bioensayos son tapados con tapas perforadas. Para garantizar que las brocas no abandonen el recipiente donde se encuentran contenidas y dentro se pueda dar el intercambio gaseoso con la atmósfera (figura 11). La Broca no presenta inconvenientes para introducirse en granos de tempranos estados de maduración hasta estados avanzados de maduración.

Cuando el bioensayo es terminado todos los granos infestados son incinerados y enterrados bajo tierra y las brocas muertas son recolectadas rotuladas y guardadas.



Figura 11. Condiciones del bioensayo.

6.4 SELECCIÓN DE LA PARTE DE LA PLANTA CON MAYOR ACTIVIDAD INSECTICIDA

Dada la discusión y los aportes bibliográficos de diferentes autores, es necesario evaluar preliminarmente la actividad toxica de las hojas, semillas y corteza de la planta *Bocconia frutescens* con el fin de encontrar la más activa a nivel de la broca y así seleccionar con mayor criterio la parte a utilizar en: el fraccionamiento por cromatografía en columna, obtención y actividad insecticida de fracciones ricas en alcaloides mediante extracción ácido-base, análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de posibles fracciones ricas en alcaloides, así como la marcha fitoquímica preliminar. Ya establecidas las condiciones del bioensayo (Figura12) se prepararon y aplicaron tres concentraciones 500, 1000 y 2000 ppm de hojas, semillas y corteza partiendo de los extractos secos (anexo 1).

Mediante el programa estadístico STATGRAPHIS plus 5.1 se realizó una regresión avanzada por medio de un modelo lineal general. Para esto fue necesario codificar los datos de la siguiente manera: Las replicas fueron 3, numeradas 1, 2, 3 se codificaron las partes de la planta de tal forma que las Hojas fueron =1, Semillas = 2 y Corteza = 3. Las

concentraciones utilizadas como: 500, 1000, 2000 partes por millón= mg /l = (ppm). Para codificar el tiempo fue necesario cambiar el tiempo 0 por tiempo 1 esto se hizo con el fin de facilitar el uso del programa estadístico, los tiempos utilizados fueron 1, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas. La respuesta indica individuos inactivos (*H. hampei*) teniendo en cuenta los 15 empleados por replica. Y por ultimo la Número de brocas inactivas / 15 equivale a la fracción de individuos inactivos por cada 15 empleados por replica (anexo 2).

Diseño factorial con tres factores

Modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \Gamma_i + \beta_j + \Psi_k + (\Gamma\beta)_{ij} + (\Gamma\Psi)_{ik} + (\beta\Psi)_{jk} + (\Gamma_i\beta_j\Psi_k)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} porcentaje de inactivos

Dentro del modelo encontramos tres factores:

Γ Parte de la planta

β Concentración

Ψ Tiempo

Con base en los resultados obtenidos, que serán discutidos en la sección de análisis y resultados, se reconoce que la parte mas activa de la planta *B. frutescens* frente a *Hypothenemus Hampei* es la corteza y por esta razón se dispuso a continuar el estudio con esta parte de la planta.

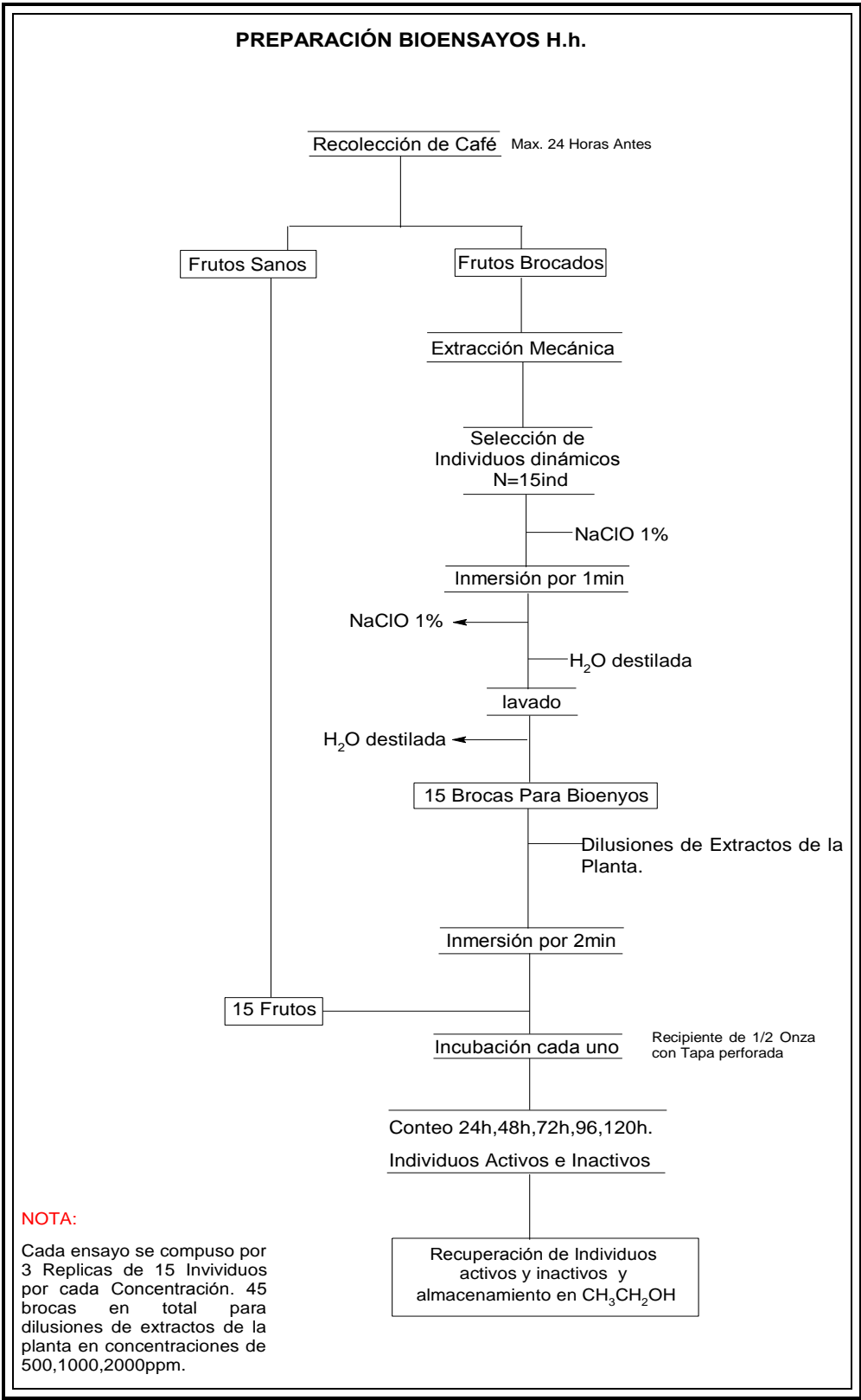


Figura 12. Preparación y condiciones de los bioensayos.

6.6.1 Análisis preliminar de alcaloides en corteza de *Bocconia frutescens* L La evaluación de la presencia de alcaloides en la corteza se realizó mediante los métodos propuestos por Cain⁷³ y por A. Sanabria⁷⁴, Siendo el primero de carácter preliminar, y debe ser aplicado donde se tenga indicios de la presencia de alcaloides en la planta, ya que este permite una rápida identificación de los mismos. Sin embargo este procedimiento tiene la desventaja de que algunos tipos de metabolitos de la planta, pueden interaccionar con algunos reactivos de precipitación, manifestando falsos positivos. La detección de alcaloides requiere que se realice: a) de forma rápida y sin requerir gran cantidad de material y equipos, b) reproducibilidad y c) sensibilidad.

El método de A. Sanabria permite eliminar metabolitos que interfieren (falsos positivos) y además permite una clasificación de acuerdo a su estructura y grupos funcionales. Como: Solubles en cloroformo, solubles en mezcla Cloroformo 3:2 Etanol, Alcaloides fenólicos, Alcaloides cuaternarios y N-Óxidos. Sin embargo este método no permite una diferenciación entre N-óxidos y alcaloides cuaternarios. Pero en comparación al método de Cain es mas Completo y seguro.

Para el análisis de los alcaloides por los métodos nombrados se partió de 0,25 g de extracto seco de corteza el cual se solubilizó en 7 ml de HCL 5% con reposo de 24 horas y agitación, mediante un equipo vortex durante 1h para obtener un extracto ácido de alcaloides. Este extracto se dividió en 3 y 4 ml respectivamente para cada método (figura 13).

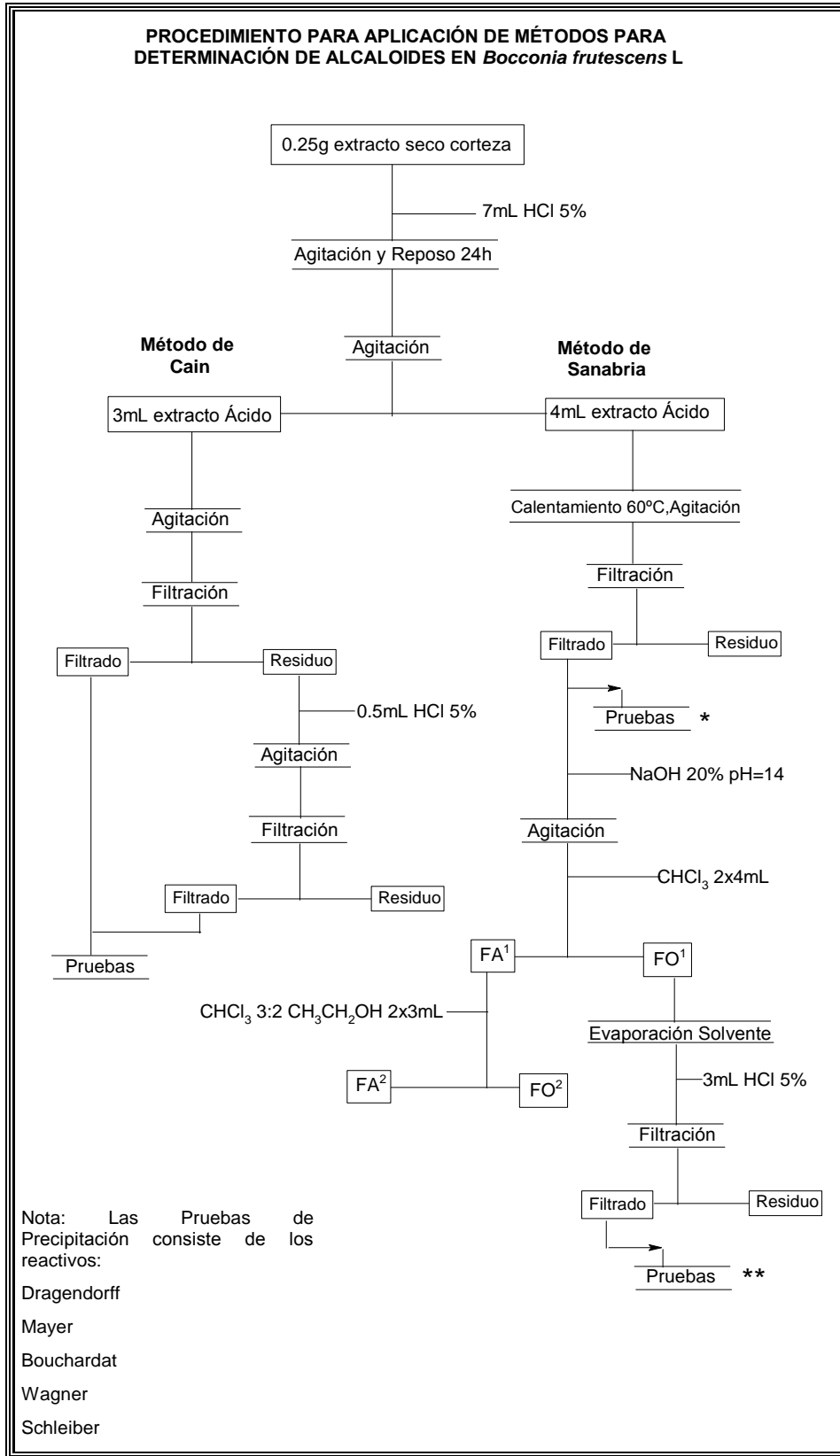


Figura 13. Metodologías seguidas para identificación de alcaloides.

6.6.2 Método de Cain 3 ml de extracto ácido de corteza se sometió a agitación durante 10 minutos para su posterior filtración, el filtrado obtenido se manifestó como una solución amarilla translúcida; el residuo se sometió a una segunda extracción con 0,5 ml de ácido clorhídrico al 5% con agitación como en la primera extracción y posteriormente fue filtrado. Los filtrados obtenidos de ambas extracciones fueron unidos obteniendo aproximadamente 3,5 ml, los cuales fueron divididos en alícuotas de 0,5ml y se realizaron las pruebas con los reactivos de precipitación (Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Wagner y Scheibler) con respuestas abundantes (+++).

6.6.3 Método de A. Sanabria 4 ml de extracto ácido de corteza se sometió a calentamiento a 60°C con agitación durante 15 minutos, se dejó enfriar y se filtró. Para obtener un filtrado translucido de color amarillo el cual se denomina medio ácido. Una pequeña parte del **medio ácido** * se divide en varias porciones que se sometieron a los cinco reactivos de precipitación nombrados y manifestó precipitados en forma abundante (+++), en este punto por más que se realice un resultado positivo no es un punto decisivo en la evaluación de alcaloides, ya que en esta parte consiste del extracto concentrado de la planta diluido en medio ácido, es un punto en el cual pueden existir interferentes (falsos positivos), pero se puede tomar la prueba como la verificación de alcaloides totales. El procedimiento continúa mediante la adición de hidróxido de sodio hasta un pH entre 8-9 y se somete a extracción con cloroformo en dos porciones de 4 ml, obteniendo así la fase orgánica 1 (**FO1**) y la fase acuosa (FA1). La fracción **FO1**** se sometió a la evaporación del solvente orgánico, posteriormente se aciduló y filtró, se sometió el filtrado a los reactivos de precipitación exhibiendo respuesta abundante (+++), lo que permite la verificación de alcaloides solubles en cloroformo.

La fase acuosa (FA1) se sometió a extracción con una mezcla compuesta de cloroformo-etanol (3:2 v/v) en tres porciones de 2 ml, consiguiéndose la fase orgánica 2 (**FO2**) y la fase acuosa (FA2); a la fracción **FO2****** se le evaporaron los solventes, se diluyó con 3ml de ácido clorhídrico y finalmente se filtró, sometiendo el filtrado a los reactivos de precipitación manifestado respuesta de escasez (+) con los reactivos de Mayer, Wagner y

Scheibler y negativo con Dragendorff y Bouchardat. Lo que da indicios de pocos alcaloides de alta polaridad.

A la fase acuosa (FA2) se aciduló a pH 2 con ácido clorhídrico 5%, se concentró y filtró y una porción del filtrado (FA2^{***}) se sometió a las pruebas de precipitación respondiendo de forma presente (++) con el reactivo de Mayer, escaso (+) con Scheibler y negativo frente a Wagner, Dragendorff y Bouchardat. A pesar de las pobres respuestas de los reactivos, se sometió el resto del filtrado a neutralización pH 7 con bicarbonato de sodio y a dos extracciones con 4 ml cloroformo, para obtener la fase orgánica 3 (FO3) y la fase acuosa (FA3), A la fase (FO3) se le evaporó el solvente, se aciduló y filtró, para someter el filtrado (FO3^{*****}) a los reactivos para alcaloides, respondiendo de forma negativa todos. Lo que niega la presencia de alcaloides fenólicos.

La fracción (FA3) se aciduló a pH 2, se le evaporó residuos de solventes y se filtró. Para someter el filtrado (FA3^{*****}) a los reactivos de precipitación respondiendo con escasez (+) a los reactivos de Mayer y Scheibler, y negativo (-) a los reactivos de Bouchardat, Dragendorff y Wagner. Según la respuesta de los agentes de precipitación, la presencia de alcaloides cuaternarios y/o N-óxidos es escasa. (figura 14 y tabla 1)

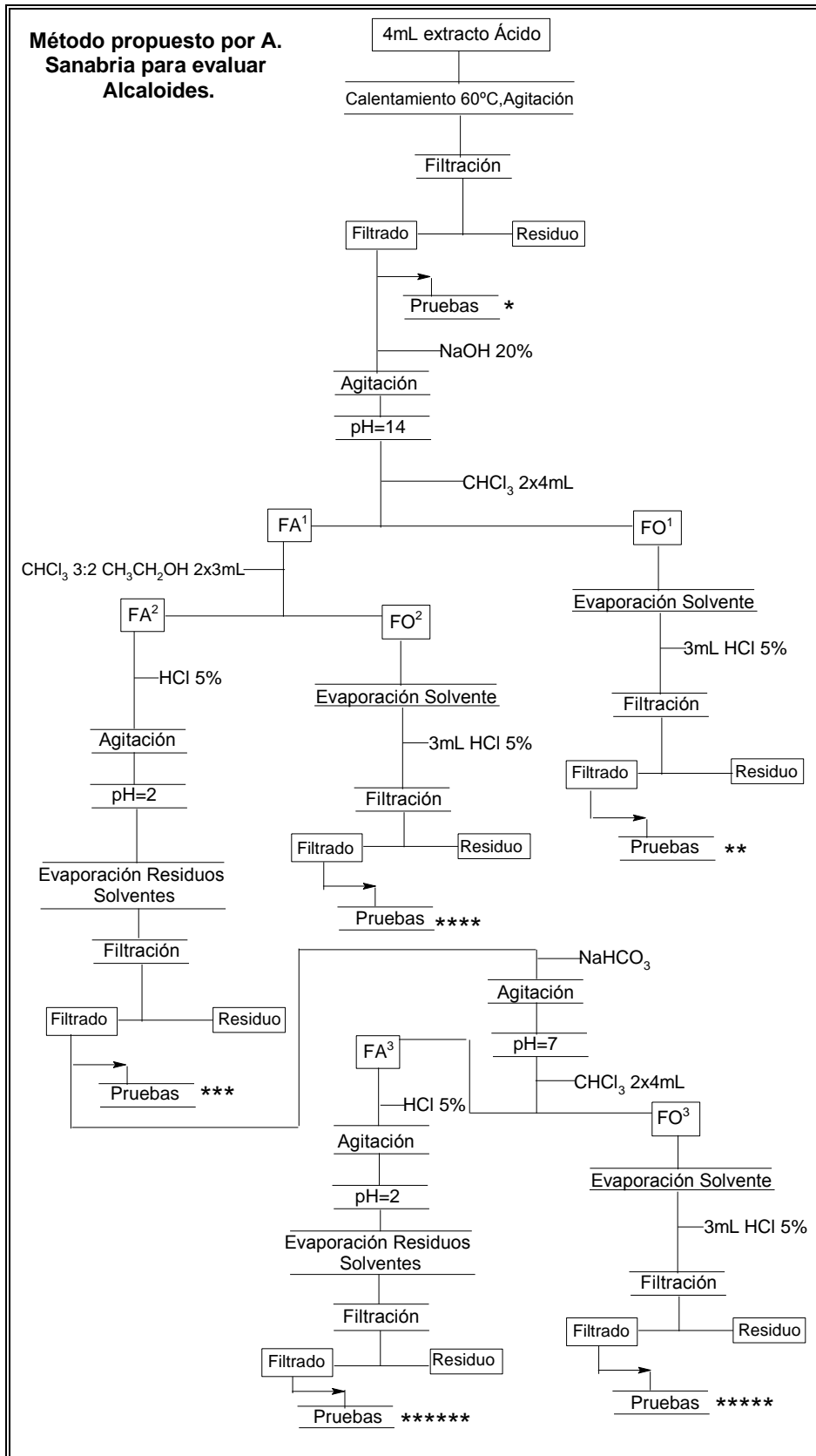


Figura 14. Método de A. Sanabria aplicado a *B. frutescens* para la identificación de alcaloides.

Tabla 1. Fracciones y respuestas obtenidas mediante el método propuesto por A. Sanabria para evaluación de alcaloides aplicado a corteza de *B. frutescens*.

PRUEBAS	Medio ácido *	FO1 **	FA2 ***	FO2 ****	FA3 *****	FO3 *****
Dragendorff	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mayer	(+++)	(+++)	(++)	(+)	(+)	(-)
Wagner	(+++)	(+++)	(-)	(+)	(-)	(-)
Bouchardat	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
Scheibler	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(+)	(-)

6.6.4 Enriquecimiento y reconocimiento de alcaloides (método de Cain modificado utilizando ácido sulfúrico) 0,5 g del extracto seco de semillas, hojas y corteza fueron diluidos en 20 ml de etanol al 94 %, luego se adicionaron 10 ml de H₂SO₄ al 5.88 % y 15 ml de cloroformo, después se llevó a agitación vigorosa en un embudo de separación durante 10 minutos, posteriormente se separaron la fase orgánica rica en ceras, grasas y aceites, y la fase acuosa rica en alcaloides en forma de sales. A esta fase se le realizaron tres pruebas características de reconocimiento de alcaloides Mayer, Dragendorff, y Bouchardat (tabla 2).

Tabla 2. Respuestas a reactivos de precipitación extractos de partes de la planta.

	HOJAS	SEMILLAS	CORTEZA
DRAGENDORF	++	++	+++
MAYER	+++	+++	+++
BOUCHARDAT	++	+++	+++

6.7 ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

De acuerdo a las características quimiotaxonómicas de la especie vegetal se realizó la evaluación de alcaloides en semillas, hojas y corteza de la planta. Pero por los resultados de los bioensayos y la selección de la corteza como la parte mas tóxica frente a *H. hampei*. El análisis fitoquímico se orientó a esta parte del vegetal.

Mediante la obtención del extracto de corteza se realizaron pruebas fitoquímicas utilizando diluciones en etanol como solvente general para la mayoría de los casos, y en casos particulares el solvente adecuado según lo requiera la prueba. También se realizaron adaptaciones para el análisis de alcaloides donde predomina la necesidad de medios ácidos (pH entre 3-5).

En los casos más representativos de repuestas positivas a pesar de hacer pruebas por triplicado se procedió a adaptar la prueba desde el extracto seco para reconfirmar.

La marca positiva para las pruebas de identificación se simboliza con un signo mas, donde tres marcas (+++) significan abundante, dos marcas (++) moderado y una marca (+) significa escaso, el signo negativo menos (-) significa la ausencia del metabolito.

Las pruebas fitoquímicas se realizaron para el extracto de corteza y paralelamente frente a los solventes y a un testigo de cada tipo de metabolito a analizar, para observar la respuesta visual de los resultados positivos de la prueba, además evaluar la calidad y respuesta de los reactivos como también la interacción de los solventes para dar falsos positivos.

6.8 SEGUNDO TRATAMIENTO DE CORTEZA DE *Bocconia frutescens*

6.8.1 Procedimiento para extracción, detección de alcaloides y obtención de extractos para realización de bioensayos con corteza de *Bocconia frutescens* L.

Extracción; de acuerdo al procedimiento (Figura 15) a la corteza se le realizaron dos tipos de extracciones consecutivas. Esto se realiza para una extracción más exhaustiva de los componentes del material vegetal. La finalidad de la primera es la obtención de una fracción etanólica total (Extracto seco de Corteza) rica en todo tipo de metabolitos presentes en la planta (extraíbles con Etanol) y la segunda extracción se realizó en medio ácido y básico para la obtención de alcaloides en forma de sales y bases, los distintos fraccionamientos permitieron la clasificación de diferentes tipos de alcaloides como a)

aminas primarias, secundarias, terciarias en la FO₁ y b) formadores de fenoxidos en la FO₂.

Pruebas: las fracciones obtenidas del vegetal se adecuaron para diferentes pruebas haciendo énfasis en alcaloides (Bouchardat, Mayer, Dragendorff y en casos especiales Scheibler).

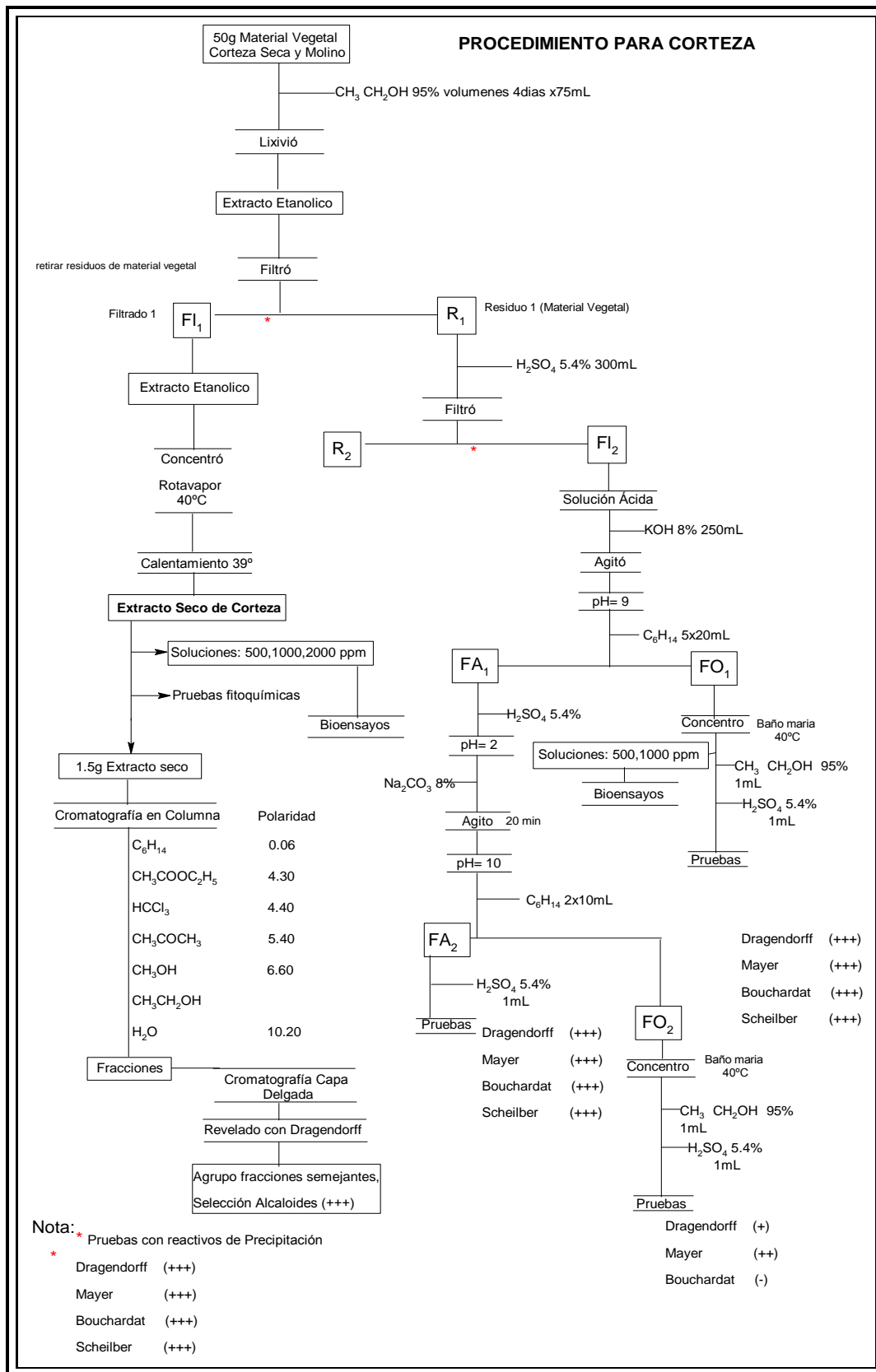


Figura 15. Procedimiento para Corteza.

La Fracción etanólica y extracto seco de corteza permitió el análisis cualitativo de diversos metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Quinonas, Esteroles, Saponinas, Cardiotónicos, Lactosas Terpénicas, Alcaloides y pruebas de metabolitos primarios como Azúcares y Proteínas. (Anexo 3).

Taninos: Para la detección de taninos se realizaron las pruebas de triclورو férrico FeCl_3 , acetato de plomo y gelatina sal frente a una muestra de ácido tánico.

Flavonoides: Para la detección de flavonoides se realizaron las pruebas de Shinoda y Rosenhein frente a un extracto Ginkgo Biloba.

Quinonas: Para la detección de quinonas se realizaron las reacciones frente a medios ácidos y básicos frente a muestras diluidas de antraquinona e hidroquinona.

Esteroles: Para la detección de esteroles se realizaron las reacciones de Libermann-Burchard y Karp-Price frente a muestras diluidas de colesterol y vitamina A respectivamente.

Saponinas: Para la detección de saponinas se realizaron la reacción de hemólisis e índice de espuma frente a un extracto zarzaparrilla.

Cardiotónicos: Para la detección de cardiotónicos se realizaron la reacciones de Baljet, kedde frente a una muestra diluida de Lanitop (B-metildigoxina).

Lactonas Terpénicas: Para la detección de lactosas terpénicas se realizó la reacción de hidroxamato férrico frente a una muestra diluida de Lanitop (B-metildigoxina).

Azucars: Para la detección de azucars se realizaron la reacciones de los reactivos de Molish, Tollens, Fehling frente a muestras diluidas de sacarosa y glucosa respectivamente.

Bioensayos: Los bioensayos realizados se dividen en dos clases; el primero es de carácter preliminar y busca reconocer la actividad insecticida general aplicando el extracto total etanólico que agrupa la mayor variedad de metabolitos secundarios. La segunda clase de bioensayos se realizaron evaluando las fracciones que contienen alcaloides con el fin de cuantificar su carácter insecticida, y reconocer si el mayor poder insecticida corresponde a los alcaloides.

6.9 OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS ENRIQUECIDOS DE ALCALOIDES

6.9.1 Extracción de corteza con etanol y ácido Sulfúrico Se desprendió la parte más externa del tallo es decir la corteza cuando esta estuvo completamente seca a 40°C, hecho esto, se molió 3 veces en un molino corona, obteniendo un polvo de color entre naranja y café.

El polvo se peso y 50.02 g se sometieron a lixiviación con etanol 250 ml durante 32 horas (4 días) cambiando volumen a diario. El volumen obtenido de la corteza se concentró mediante la utilización de un equipo rotavapor a 40°C, y mediante exposición a 39°C se llevó hasta extracto seco.

El material vegetal lixiviado con etanol, posteriormente se lixivió con 250 ml al 5.4 % de H₂SO₄ por 32 horas, de lo que se recogieron 166 ml de extracto ácido, se agitó y se adicionaron sucesivamente 269 ml de KOH al 4% hasta obtener un pH de 9,3 con agitación continua durante hora y media. La solución manifestó un oscurecimiento y formación de espuma en su superficie. Después se sometió a cinco extracciones en un embudo de separación con porciones de 20 ml de n-Hexano, donde se obtuvieron dos fases, fase orgánica (superior) color café oscuro y fase acuosa (inferior) color café claro. Una porción de la fase orgánica se sometió a las pruebas de precipitación de alcaloides manifestando precipitados abundantes (+++). La fase acuosa se aciduló con ácido sulfúrico al 5.4 % hasta un pH=2 con agitación continua 20 min. Posteriormente se agregó carbonato

de sodio al 8% hasta un pH=10, y se sometió a una extracción con hexano en dos porciones de 20 ml. Esto se realizó con la finalidad de que los alcaloides fenólicos no formaran sus respectivos fenóxidos y así pudieran ser arrastrados a la fase orgánica FO₂. Las diferentes fases obtenidas de esta extracción FA₂ y FO₂ se adaptaron y sometieron a Pruebas para alcaloides. Manifestando la fase acuosa abundancia (+++) con los reactivos Dragendorff, Mayer, Bouchardat y Scheibler, la fase orgánica manifestó Dragendorff (+), Mayer (++), Bouchardat (-).

La fase orgánica FO₁ se sometió a secado del solvente obteniendo un sólido en polvo de color café con pequeños cristales traslúcidos (figura 15). Al polvo seco se le realizaron pruebas de solubilidad encontrando que los cristales son solubles únicamente en agua, el sólido café oscuro presento total solubilidad en dimetilsulfoxido (DMSO) insolubilidad en etanol, metanol y hexano, y una pequeña fracción del sólido presentó solubilidad en acetona. Al sólido se le realizaron lavados, con 20ml de Acetona, 20ml de Etanol. Los cristales se separaron del sólido mediante filtración en agua obteniendo por residuo 0.05g de un polvo de color negro. Al polvo se le realizaron pruebas para identificar alcaloides manifestando abundancia (+++).

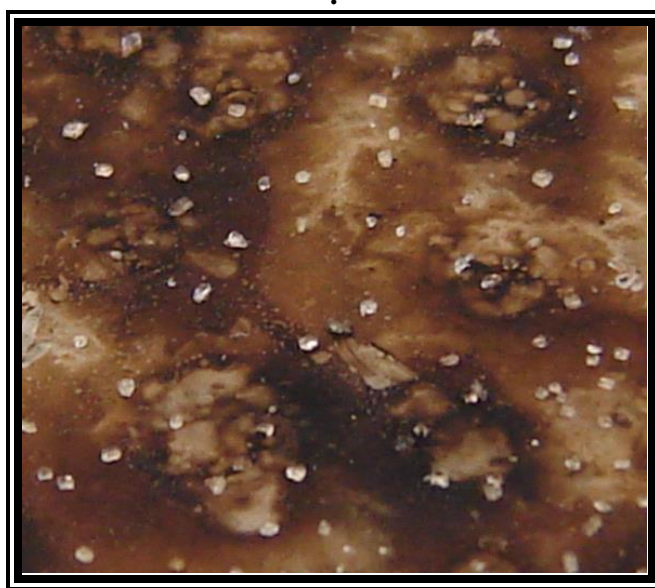


Figura 16. Sólido negro obtenido al secar solvente

6.9.2 Extracción de corteza con etanol y ácido clorhídrico 51,08 gramos de corteza seca se sometió a lixiviación durante 32 horas, empleando varias fracciones hasta completar 200 ml de etanol al 94 %, obteniéndose un extracto etanólico el cual se filtró. El material vegetal se lixivió nuevamente durante 32 horas con 150 ml de ácido Clorhídrico al 3.64 %, el extracto obtenido se filtró y se mezcló con el extracto etanólico obteniéndose 388 ml de extracto ácido etanólico el cual manifestó un pH de 1,56, esta mezcla se dejó reposar durante 24 horas en un embudo de separación, decantándose un sólido color naranja el cual fue separado del extracto. El extracto se basificó controladamente con 159 ml de KOH 4% con agitación prolongada hasta obtener un pH de 9,462.

La solución basificada se dejó reposar durante 24 horas y se determinó su pH que fue 8,5 y se sometió a extracción con 200 ml de acetato de etilo manifestándose la precipitación de un sólido café oscuro y no la formación de interfases. El sólido fue separado por decantación y se seco a 39 °C obteniéndose 1,54g de un polvo oscuro (figura 17).

Después de la extracción con acetato de etilo el extracto presentó un pH de 6 y se le agregó 5ml de KOH 4% para obtener un pH de 9, esta solución se concentró a 39°C precipitando un sólido café el cual se filtró y se sometió a lavado con 40ml de agua este peso 0,65559g (figura 18).

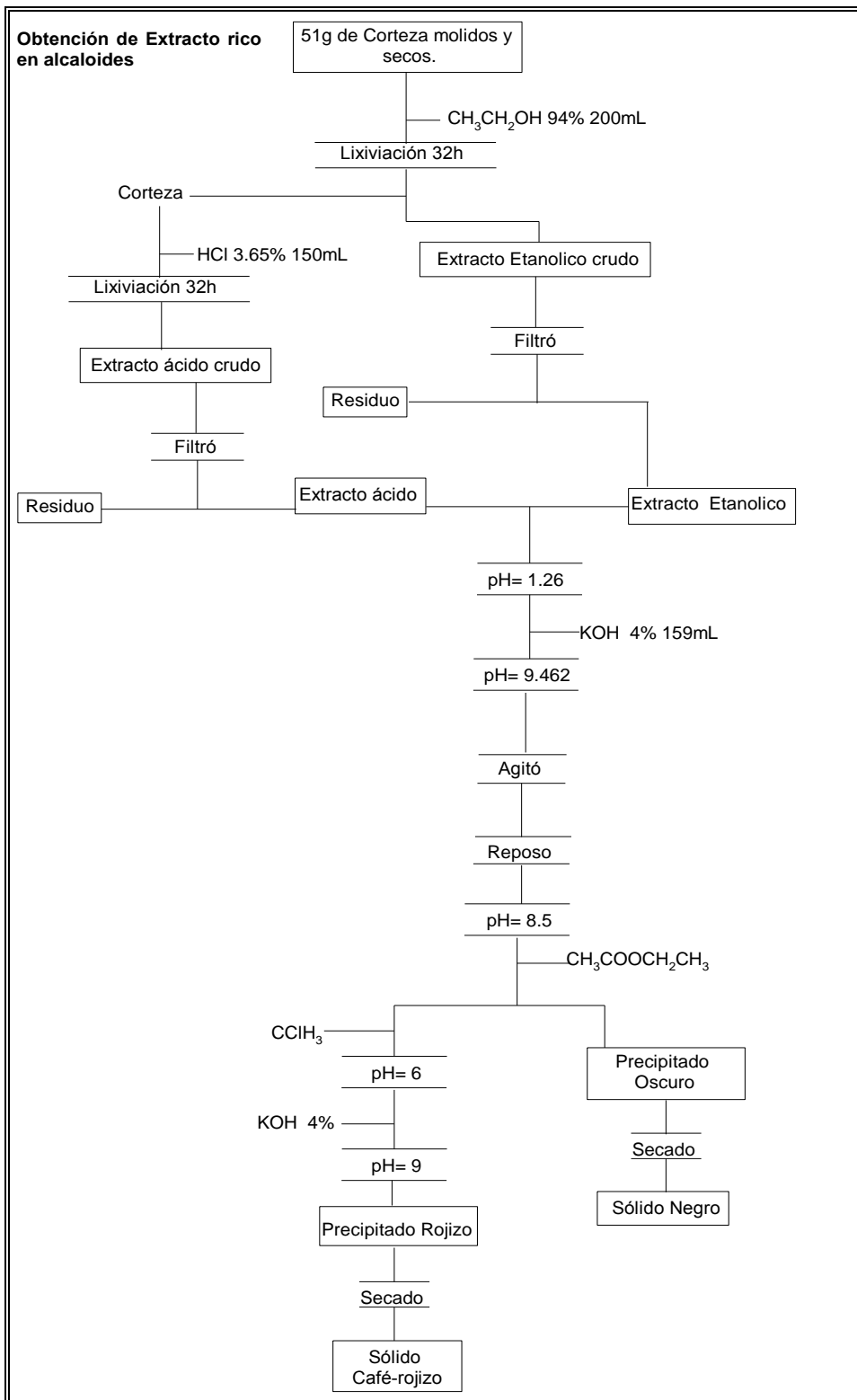


Figura 17. Obtención de extractos ricos en alcaloides.

Los sólidos café #1 y café-rojizo #2 se sometieron a pruebas de solubilidad y se sometieron a pruebas para alcaloides donde se encontró que ambos presentan abundancia en casi todas las pruebas (tabla 3).



Figura 18. Sólidos ricos en alcaloides, café #1 (izquierda) y café-rojizo #2 (derecha).

Tabla 3. Respuesta a reactivos de precipitación de alcaloides y solubilidad de los sólidos obtenidos en diferentes solventes.

Prueba	Sólido Café #1	Observación	Sólido Café-Rojizo #2	Observación
Scheibler	(+++)	Ppdo. amarillo	(+++)	Ppdo. amarillo menudo
Mayer	(+++)	Ppdo. naranja	(+++)	Ppdo. naranja
Wagner	(+++)	Ppdo. marrón	(+++)	Ppdo. marrón
Dragendorff	(++)	Ppdo. naranja menudo	(+++)	Ppdo. naranja floculento
Observación		Solubidades		Observación
Sln. Naranja	(-)	Hexano	(-)	Sln. Naranja
	(++)	Cloroformo	(+++)	
	(++)	Acetona	(+++)	
	(+)	Etanol	(++)	
Sln Oscura	(+++)	DMSO	(+++)	Sln Naranja

Se prepararon soluciones en proporciones 1:3 DMSO-H₂O de sólido negro en concentraciones 1000 y 500 ppm y sólido rojizo 2000, 1000, y 500 ppm y se realizaron bioensayos.

6.10 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO SECO OBTENIDO DE CORTEZA

6.10.1 Cromatografía en Columna La cromatografía en columna se realiza para fraccionar los componentes de la planta en mezclas mas simples de metabolitos, este fraccionamiento se lleva a cabo mediante la utilización de una fase estacionaria la cual son compuestos sólidos granulares como la silica Gel MERCK 60-200 para columna, y una fase móvil que la componen los solventes o eluentes líquidos que pueden utilizarse en mezclas o por separado cada uno; las fases estacionaria y móvil necesitan un contenedor el cual es un cilindro de vidrio (columna), en el interior de esta se llevara a cabo la interacción de las fases y orientara los eluentes y los metabolitos eluidos o arrastrados por los solventes hasta una embocadura, por la cual salen las fracciones de cada solvente que son recogidos en recipientes, algunas columnas poseen llaves y otras no, su capacidad también varía.

La elusión o arrastre de los solventes se puede realizar mediante gravedad o mediante vacío, en nuestro caso se realizo por gravedad.

Un equipo similar a una columna de cromatografía es la bureta volumétrica con la diferencia que ésta está graduada indicando su volumen.

6.10.2 Preparación de la muestra y de la columna La muestra para la cromatografía se prepara a partir de 1.5g extracto seco de corteza el cual se solubilizó en cloroformo y a la solución formada se le agrego 4g de silica para columna; la mezcla se homogenizo y se dejo evaporar el solvente, dejando así la muestra de corteza contenida en la silica. Esta mezcla sólida se maceró antes de montarla en la columna. (figura 19)



Figura 19. Extracto de Corteza, Silica Gel, Solución en cloroformo, y Muestra seca.

La columna de fraccionamiento se preparó mediante la ubicación vertical de la columna de vidrio limpia, en un soporte universal mediante unas pinzas.

Posteriormente se agregó hasta el fondo de la columna una mota de algodón como tapón, seguida con una circunferencia de papel filtro. La columna se inundó con hexano, para posteriormente agregar la sílica Gel de forma continua, dando leves golpes en las paredes de la columna con corchos, para dejar la columna homogénea y evitar que no se fracturara. La columna debe permanecer húmeda durante todo el proceso.

Las dimensiones de la columna son importantes para las proporciones a utilizar la relación de ancho a la longitud deben ser como mínimo de 1 a 8.

En nuestro caso la columna tenía de ancho 2 cm y la altura de la sílica fue de 18-20cm, una vez introducida la sílica Gel se procedió a adicionar la muestra preparada.

Una vez montada la fase estacionaria y la muestra, se conservó por encima el nivel de hexano, para comenzar la elución con los solventes o fase móvil.

Los eluentes a utilizar se emplean en orden creciente de polaridad, y como el solvente de primera elusión y menos polar fue el hexano, fue el utilizado para preparar la columna.

Los solventes empleados fueron hexano obteniendo 11 fracciones de aproximadamente 10ml, acetato de etilo de cual se obtuvieron 10 fracciones, cloroformo con 10 fracciones, acetona con 7 fracciones, metanol, etanol y agua con 2 fracciones. Cada eluyente se agregó por la parte superior de la columna y con un flujo aproximado de 2ml /min (figura 20).



Figura 20. Montaje Cromatografía en columna, Elusión y Extractos.

Una vez hecha las eluciones con los diferentes solventes las fracciones fueron concentradas y evaluadas en cromatografía en capa delgada.

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna se evaluaron mediante cromatografía en capa delgada y revelado de alcaloides mediante reactivo de Dragendorff (manifestando manchas naranjas que perduraron por más de 24 horas) las fracciones 1, 2, 3, 4 de acetato de etilo presentaron coloración naranja en los distintos compuestos separados, algunos extractos de metanol presentan una mancha naranja y algunos de acetona presenta esta mancha muy leve. Se agruparon las fracciones de acuerdo a su semejanza, y se evaporó el solvente al ambiente.

La fracción denominada Acetato de Etilo #2 agrupó las fracciones 2, 3, y 4 y al eliminar el solvente se manifestó con la abundancia más notoria de las fracciones, lo que permitió la realización de bioensayos y el posterior fraccionamiento mediante cromatografía preparativa (figura 21).

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA PARA CORTEZA.

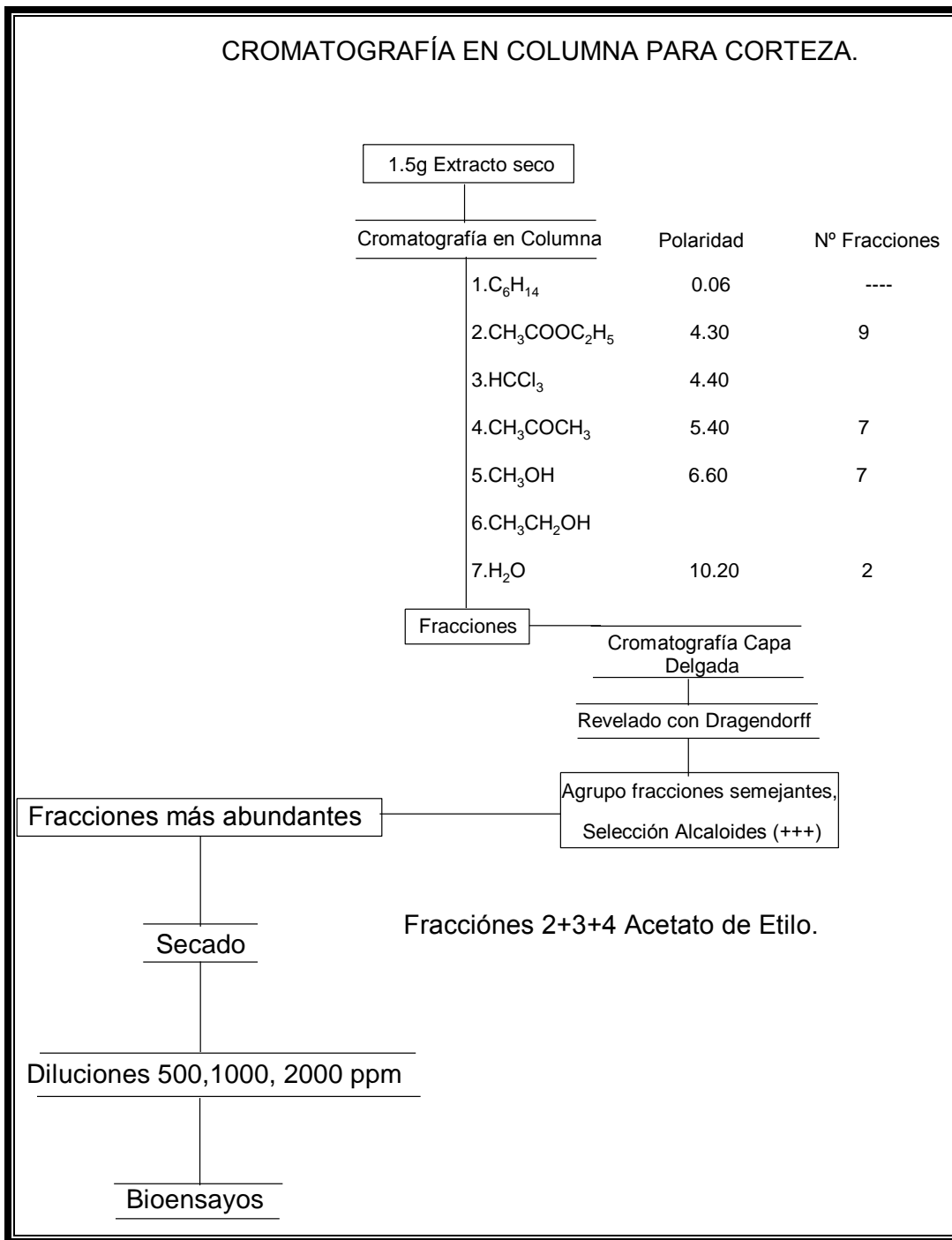


Figura 21. Fraccionamiento en columna de corteza.

6.10.3 Bioensayos fracción Acetato de Etilo # 2

Se pesaron 0,0202 g de sólido Acetato de etilo #2 obtenido a partir del fraccionamiento, y se aforó en etanol hasta completar 5 ml en un balón aforado, obteniendo así un volumen de 5 ml a una concentración de 4000 ppm posteriormente se aforó nuevamente pero esta vez a 10 ml con agua destilada por lo cual la concentración final fue de 2000 ppm en mezcla agua-etanol 1-1 a partir de esta solución se prepararon soluciones a concentraciones de 1000 y 500 ppm y se sometieron a bioensayos.

6.10.4 Cromatografía preparativa para fracción acetato de etilo #2 obtenido mediante cromatografía en columna

Las placas para capa fina y preparativa se prepararon mediante mezcla de silica gel MERK G 60 con agua destilada en proporción aproximada de 1:2 hasta formar una emulsión de textura fluida para poder aplicarla en las placas de vidrio. Una vez aplicada sobre la superficie de la placa de forma uniforme se somete a calentamiento a 100 °C para secarlas y activar la silica; una vez secas las placas se retiraron y se dejaron enfriar. En este punto se procedió a la aplicación mediante tubos capilares de la fracción acetato de etilo #2 se solubilizó en acetato de etilo, a una distancia de 1cm del borde inferior de la placa para que el eluyente estuviera por debajo del nivel de la muestra y 0,5 cm con respecto a sus bordes laterales. Generándose una línea de aplicación que recorre de forma horizontal la placa (figura 22).

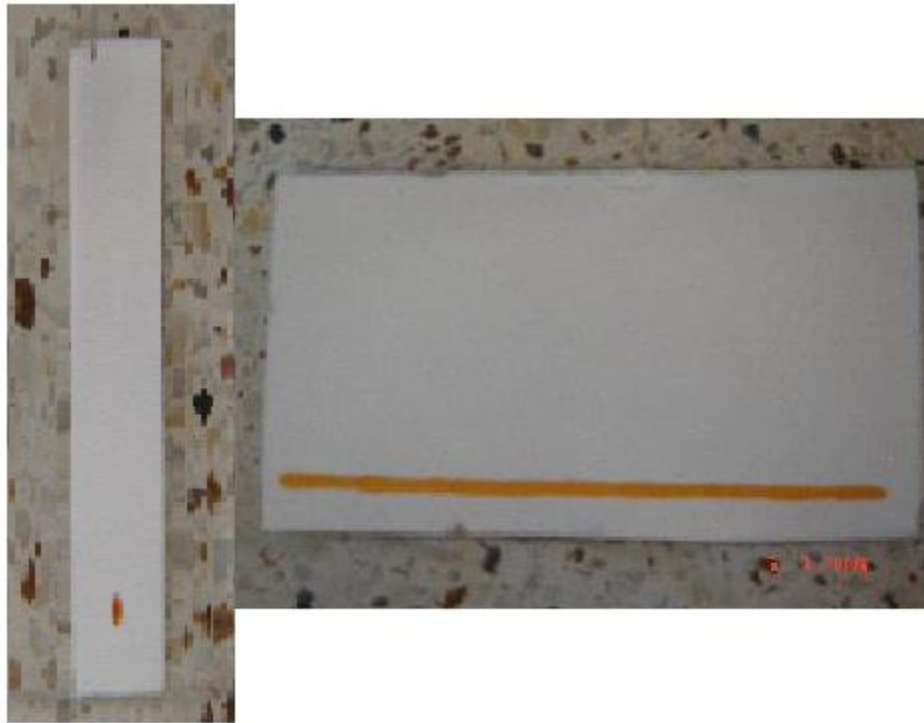


Figura 22. Cromatografías en placa delgada y Preparativa con Aplicación de Muestra.

Inicialmente se realizaron cromatografías en capa delgada frente a diferentes eluentes, conservando el acetato de etilo el cual manifestó la elusión de varias manchas en las placas: 1 mancha verdosa, 2 mancha naranja, 3 mancha en forma de vela amarilla. Se probó ácido fórmico en conjunto con el acetato de etilo en proporción (0.1ml-4.9ml respectivamente) manifestó una retención de la mancha correspondiente al amarillo con el eluyente acetato de etilo. La resolución que ofrece el ácido fórmico con el acetato de etilo es menor que al utilizar el segundo sin componer una mezcla.

Por lo tanto, se realizó la mezcla (0.1ml-4.9ml respectivamente) de Acetona –Acetato de etilo. Manifestando la elusión de las marcas 1,2 y además manifestó el arrastre de la mancha amarilla de forma más definida es decir sin forma de vela.

Se probó esta misma mezcla pero con la adición de una porción mínima de ácido fórmico (2 gotas) en la mezcla, manifestándose una retención en el punto de aplicación y notándose una vela naranja y amarilla. Y eluyendo las marcas 1 y 2 pero no con mayor calidad de resolución que en los casos mencionados.

El caso de mayor calidad es el manifestado por la mezcla acetona-acetato de etilo (0,1 ml-5 ml), se realizaron placas preparativas de 20 cm x 10 cm con silica gel y se observaron mediante una lámpara ultravioleta notándose las marcas: la primera (1●) mancha verdusca, la segunda (2●●) con dos manchas naranjas una de color mas tenue que recorren consecutivas y al ser obtenidas de la placa quedan juntas, la tercera (3●●●) se manifiesta como una mancha rosada casi imperceptible la cual se recupera, y en cuarto lugar (4●●●●) se manifiesta como una marca amarilla que también es recuperada (figuras 23 y 24). Manifestando los RF 0,94, 0,78-0,67, 0,31, y 0,18 respectivamente.

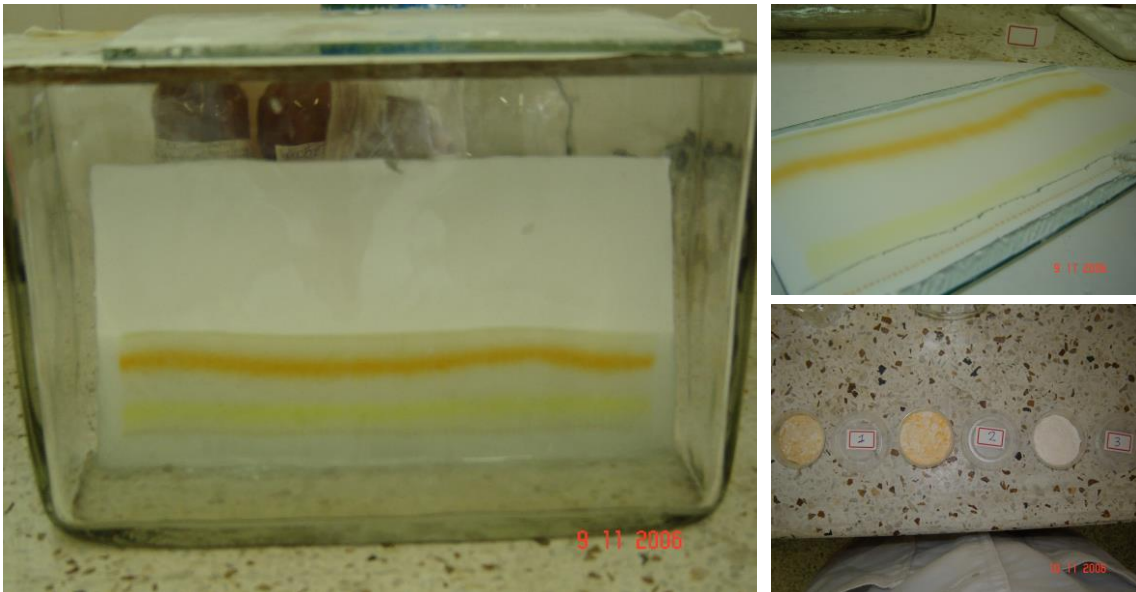


Figura 23. Elusión de cromatografía preparativa, recuperación de metabolitos separados.

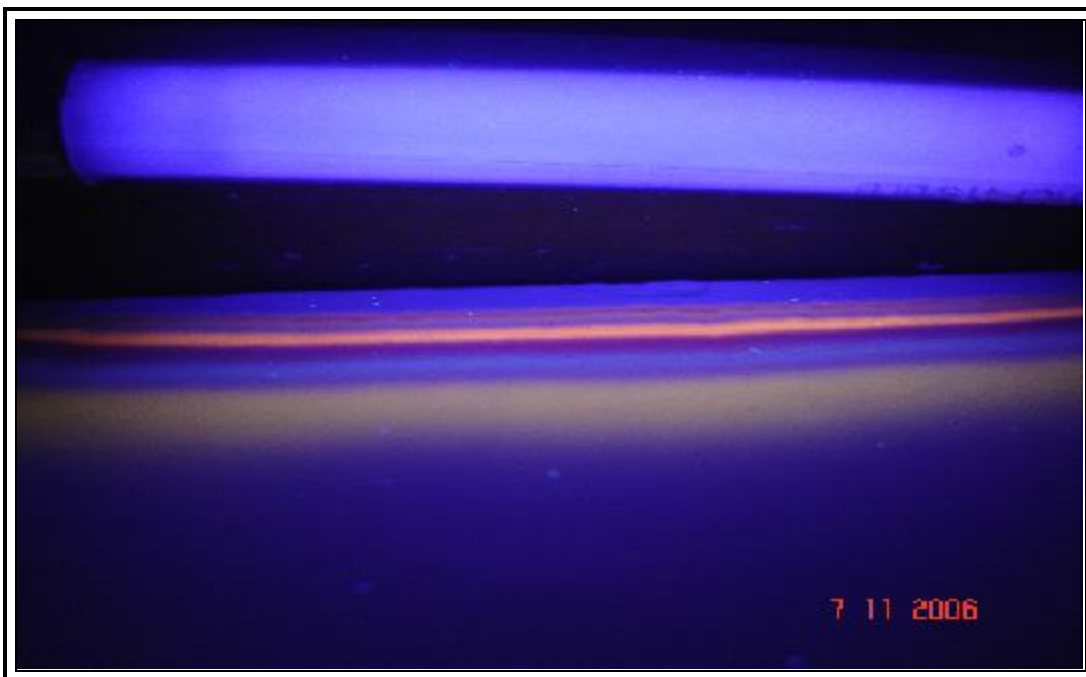


Figura 24. Cromatografía preparativa expuesta a luz ultravioleta.

La mezcla nombrada se preparó y se adicionó a una cuba para cromatografía en la cual se expuso en contacto la placa de cromatografía con el eluyente y se colocó su respectiva tapa. Una vez se manifiesta la elusión de la placa se retiró a 1 cm antes de terminar el recorrido total de la placa. Se deja secar la placa y se realizaron los raspados de las marcas eluidas.

Cada una de las marcas raspadas se acumuló en recipientes para después ser sometidas a extracción con solventes, para retirar los compuestos de la sílica gel mediante filtración (figura 25). Se obtuvieron 4 filtrados los cuales se concentraron mediante corriente de aire hasta sequedad en sus recipientes correspondientes (•, ••, •••, ••••) y su posterior pesada. Obteniendo de las marcas cromatográficas los pesos de •=14mg, ••=14,7mg, •••=1,7mg, y ••••=24,4mg.



Figura 25. Extracción mediante solvente de la silica y extractos obtenidos.

6.10.5 Cromatografía de gases acoplada a masas

6.10.5.1 Condiciones utilizadas en el equipo. Las muestras obtenidas del fraccionamiento se llevaron a un cromatógrafo de gases acoplado a masas Shimadzu con auto muestreador [GCMS-QP2010] del laboratorio de polifenoles de la Universidad tecnológica de pereira. Se corrieron las muestras diluidas en acetona y se inyectaron en una columna Rtx.5Si1.MS marca RESTEK de longitud 30 m y diámetro interno 0.25 mm a una temperatura de 275.0 °C en modo de inyección Split, en un control de flujo de velocidad lineal, a una presión de 139,5 KPa, utilizando un flujo total de 6ml/min. Y un flujo de columna de 1ml/min. Se empleo una rampa de temperatura de 2 minutos hasta 275°C y 10 minutos hasta 320°C el

equipo de masas utilizó una temperatura en la fuente de iones de 260°C y una interfase de temperatura de 280°C.

Se obtuvieron espectros de gases y masas de las muestras •, ••, •••• la muestra ••• no produjo ningún espectro. Se realizó el análisis del espectro de la muestra •••• por ser una mezcla menos compleja (3 compuestos) en comparación con •, •• (9 y 13 compuestos respectivamente).

7. ANALISIS Y RESULTADOS

Dentro de los procedimientos utilizados es importante resaltar la poca cantidad de planta y de reactivos teniendo en cuenta el alcance de la detección de metabolitos como la realización de bioensayos. Estos procedimientos también permiten el máximo aprovechamiento del material vegetal mediante las extracciones a las que fue sometido.

Los diferentes extractos de los órganos de la planta fueron útiles para:

- A partir de los componentes de la planta extraídos y llevado a estados sólidos o semi-sólido (engrudos pastosos), ya que fueran por extracción con solventes o otros procedimientos químicos permitieron la obtención de disoluciones, para la realización de bioensayos con *H. hampei* F.
- La realización de procedimientos para detección de alcaloides y otros metabolitos.

7.1 EXTRACCIONES

Las soluciones etanólicas preparadas a partir de los extractos secos se sometieron a bioensayos con *H. hampei* permitiendo definir a la corteza como la parte con el mayor potencial insecticida. La corteza se orientó a la obtención de concentrado de alcaloides. Mediante la extracción con solventes y medio ácido-base. Lo cual consiste en generar sales (cloruros, sulfatos) con el grupo amino de los alcaloides en medio ácido y la formación de sus respectivas bases en medio básico, las cuales pueden ser retiradas mediante solvente orgánico (cloroformo, éter, acetato de etilo).

Así que por estas características se realizó la extracción mediante la utilización de pares ácido sulfúrico-hidróxido de potasio, ácido clorhídrico- hidróxido de potasio.

La extracción y enriquecimiento de alcaloides con ácido sulfúrico puede llevar a la formación de artefactos cuyo poder insecticida puede variar del potencial inicialmente observado, estos artefactos pueden ser formados debido al fuerte potencial oxidante del ácido sulfúrico, por esta razón el procedimiento de extracción y enriquecimiento de alcaloides fue posteriormente repetido realizando un cambio del ácido sulfúrico por ácido clorhídrico.

Los extractos secos de hojas, semillas y corteza presentaron abundancia de alcaloides con los reactivos de precipitación, sin embargo estos reactivos no permiten conocer la parte de la planta con mayor cantidad de alcaloides, pero si permiten su comprobación frente a la literatura.

7.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

La realización de pruebas cualitativas mediante reacciones y reactivos de caracterización permiten orientar a los diversos tipos de metabolitos secundarios que pueden contener las diferentes partes de las plantas. Estas reacciones de pruebas, permiten por su interacción con los diferentes tipos de metabolitos, variedad de respuestas, características como son el color, formación de interfases, precipitados.

La evaluación cualitativa de metabolitos secundarios se basó en la identificación de los siguientes metabolitos: alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, cardiotónicos, quinonas, cumarinas (Anexo 3). Para comparar los resultados con otros estudios de los metabolitos contenidos en la especie *B. frutescens* como lo son alcaloides y triterpénos.

A la corteza de *Bocconia frutescens* se le realizaron pruebas de detección de alcaloides, taninos, flavonoides, quinonas, esteroides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, lactosas terpénicas, y metabolitos primarios como azúcares y proteínas. Detectando la presencia abundante de metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides, y saponinas, y en menor proporción cardiotónicos y azúcares.

7.3 DETECCIÓN DE ALCALOIDES

Se presentan diversos métodos para la detección cualitativa de alcaloides, algunos de ellos son Webb, Cain y Sanabria, los cuales consisten en la obtención de extracto mediante la utilización de solventes y su posterior extracción con ácido y realización de pruebas cualitativas. Hay otros mecanismos como el de Kiang-Douglas tanto de obtención como de evaluación, el cual consiste en el tratamiento del vegetal con base como amonio para generar las bases libres y extraerlas con cloroformo, y el concentrado con alcaloides se remueve con ácido clorhídrico 2 N, se filtran y filtrado se somete a reactivos de Mayer, Dragendorff, Bouchardat. Existen otros métodos como el de la prueba de toque la cual es una prueba de campo que consiste en impregnar un papel Whatman con la solución reveladora del reactivo de Dragendorff, una vez seco se somete a contacto con la parte de la planta fresca a analizar y en caso de aparición de coloraciones entre café-rojiza da indicios de la presencia de alcaloides.

Así como el anterior método, cada uno de los otros contiene similar ideas como también variaciones. Como ejemplos: la cantidad de material vegetal, el tipos de solventes (etanol, metanol), la forma de extracción en algunos por maceración, lixiviación, soxhlet, las concentraciones de los medios ácidos y bases, oscilando en un rango de 1 al 10%.

Los procedimientos para la detección de alcaloides maniobran dentro de las propiedades químicas de estos, lo que no los aleja de los procedimientos para su extracción. Dentro de los métodos existen desventajas y/o limitantes, en el caso del método de Kiang-Douglas, la extracción de las bases libres mediante extracción con amonio y solvente orgánico margina los alcaloides cuaternarios por sus características de solubilidad, además pueden generar

artefactos que en algunos casos producen compuestos con características de alcaloides con algunos metabolitos. Los métodos de Webb y Cain son de carácter superficial, ya que puede manifestar falsos positivos. Dentro de los métodos observados se resalta el propuesto por A. Sanabria ya que permite un análisis de alcaloides según su solubilidad (polaridad).

Dentro del laboratorio se realizaron los métodos de forma muy similar a como están propuestos por sus autores, pero se variaron algunas condiciones como cantidad de material vegetal, concentración de los reactivos, cantidad de reactivos de precipitación. Como se muestra en las figuras 13 y 14.

Se manifiesta la respuesta abundante a los reactivos empleados para la detección de alcaloides del método rápido de Cain.

El desarrollo del método propuesto por A. Sanabria indica dentro de su fraccionamiento la presencia mayoritaria de alcaloides solubles en cloroformo, lo que es congruente con los sólidos obtenidos de los extractos enriquecidos en alcaloides. Además se encontró la presencia de alcaloides de alta polaridad, no se manifestó la presencia de alcaloides fenólicos, y se detectó una mínima presencia de alcaloides cuaternarios y/o N-óxidos.

7.4 BIOENSAYOS

La evolución y los resultados obtenidos de los bioensayos sobre *Hypothenemus hampei* están representados en las siguientes graficas donde se observa la actividad insecticida de los diferentes extractos evaluados a diferentes concentraciones.

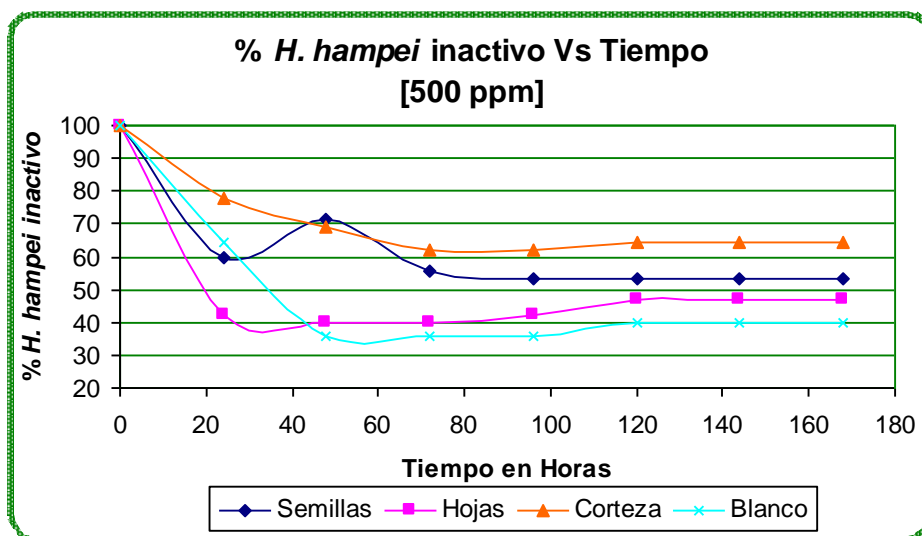


Figura 26. % inactividad a 500 partes por millón de cada extracto.

Indiferentemente de la parte de la planta a utilizar, la inactividad de las brocas (*H. hampei*) inmediatamente comienza el experimento es 100 %, esto es debido al mecanismo de defensa utilizado por *H. hampei* cuando es expuesto a etanol. La mayor letalidad corresponde al extracto etanólico preparado a partir del extracto seco de corteza 64,4 %, la menor corresponde al extracto seco de hojas 46,66 %, todas las partes evaluadas de *B. frutescens* poseen actividad insecticida combinadas con etanol al 94%. (Figura 26 y tabla 4).

Tabla 4. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 500 ppm.

Tiempo en Horas	500 ppm Semillas % Brocas Inactivas	500 ppm Hojas % Brocas Inactivas	500 ppm Corteza % Brocas Inactivas	Blanco % Brocas Inactivas
0	100	100	100	100
24	60	42,22	77,77	64,44
48	71,11	40	68,88	35,55
72	55,55	40	62,2	35,55
96	53,33	42,22	62,22	35,55
120	53,33	46,66	64,4	40
144	53,33	46,66	64,4	40
168	53,33	46,66	64,4	40

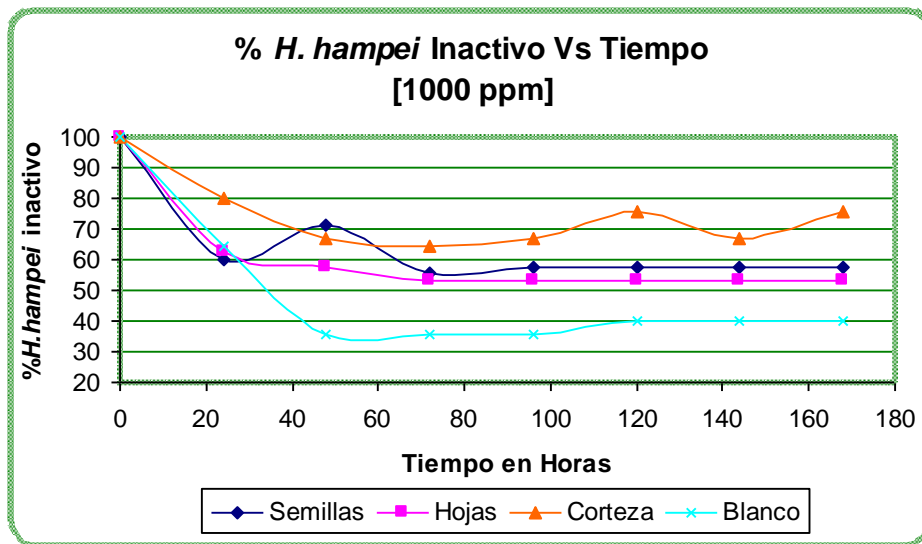


Figura 27. % inactividad a 1000 partes por millón de cada extracto.

Como podemos observar en la figura 27 y tabla 5 la mayor letalidad 75,55 % nuevamente la presenta el extracto etanólico preparado a partir del extracto seco de corteza, y la menor 53,33 % nuevamente la presenta el extracto de hojas.

Tabla 5. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 1000 ppm.

Tiempo en Horas	1000 ppm Semillas % Brocas Inactivas	1000 ppm Hojas % Hojas Inactivas	1000 ppm Corteza % Brocas Inactivas	Blanco
0	100	100	100	100
24	60	62,22	80	64,44
48	71,11	57,77	66,6	35,55
72	55,55	53,33	64,4	35,55
96	57,77	53,33	66,66	35,55
120	57,77	53,33	75,55	40
144	57,77	53,33	66,66	40
168	57,77	53,33	75,55	40

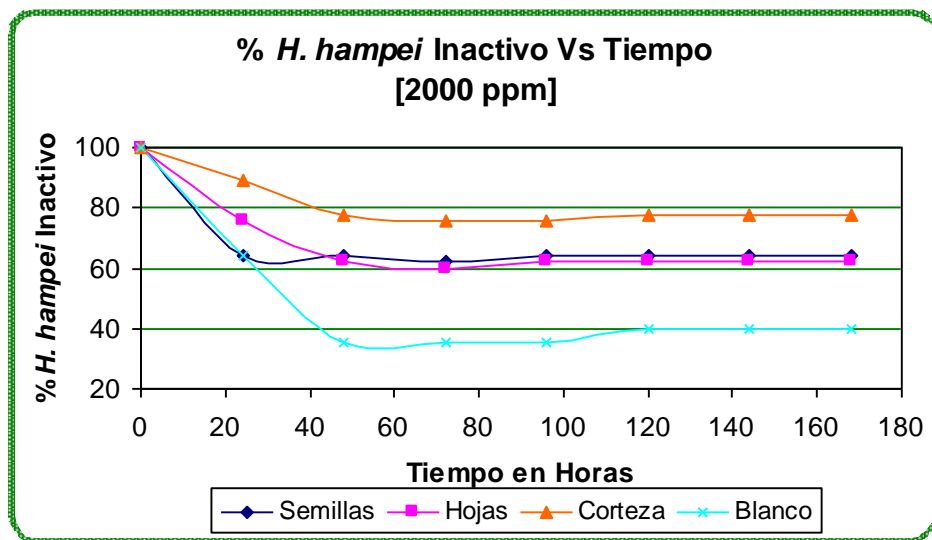


Figura 28. % de inactividad a 2000 partes por millón de cada extracto.

En la figura 28 y tabla 6 podemos encontrar que la letalidad ocasionada por el extracto etanólico preparado a partir del extracto seco de corteza alcanza una letalidad alta, de 77,77 %. El orden de mortalidad ordenado en forma descendente desde el de mayor mortalidad hasta el de menor mortalidad para cada parte de la planta estudiada a concentraciones de 500, 1000 y 2000 ppm es el siguiente: Corteza > Semillas > Hojas.

Tabla 6. % inactividad de brocas frente a extractos de hojas, semillas y corteza a 2000 ppm.

Tiempo en Horas	2000 ppm Semillas % Brocas Inactivas	2000 ppm Hojas % Brocas Inactivas	2000 ppm Corteza % Brocas Inactivas	Blanco % de Brocas Inactivas
0	100	100	100	100
24	64,44	75,55	88,88	64,44
48	64,44	62,22	77,77	35,55
72	62,22	60	75,55	35,55
96	64,44	62,22	75,55	35,55
120	64,44	62,22	77,77	40
144	64,44	62,22	77,77	40
168	64,44	62,22	77,77	40

7.4.1 Observaciones de los bioensayos Como se puede observar en todas las gráficas de los extractos de hojas, semillas, corteza exhiben una mortalidad apreciable al tiempo de estabilización.

Las brocas manifiestan inactividad alta desde el comienzo del experimento (0 horas) hasta un tiempo de 24 e incluso 48 horas. Transcurridas 168 horas el comportamiento de los bioensayos se estabiliza y no se manifiestan cambios en la inactividad de los insectos. **Por lo tanto la inactividad se convierte en mortalidad.**

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA HOJAS, SEMILLAS Y CORTEZA

Modelos Lineales Generales

Número de variables dependientes: 1
 Número de factores categóricos: 3

Tabla 7. Análisis de la Varianza para Número de brocas inactivas / 15

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	6,4056	71	0,0902197	7,27	0,0000
Residuos	1,78667	144	0,0124074		
Total (Corr.)	8,19226	215			

Sumas de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Parte de la planta	1,15486	2	0,577428	46,54	0,0000
concentracion	0,537078	2	0,268539	21,64	0,0000
Tiempo	3,83802	7	0,548289	44,19	0,0000
Parte de la planta*concent	0,210329	4	0,0525823	4,24	0,0028
Parte de la planta*tiempo	0,30358	14	0,0216843	1,75	0,0523
concentracion*tiempo	0,150988	14	0,0107848	0,87	0,5933
Parte de la planta*concent	0,210741	28	0,00752646	0,61	0,9387
Residuos	1,78667	144	0,0124074		
Total (corregido)	8,19226	215			

Cuadrados Medios Esperados

Fuente	EMS
Parte de la planta	(8)+Q1
concentracion	(8)+Q2
tiempo	(8)+Q3
Parte de la planta*concent	(8)+Q4
Parte de la planta*tiempo	(8)+Q5
concentracion*tiempo	(8)+Q6
Parte de la planta*concent	(8)+Q7
Residuos	(8)

Denominadores F-Test

Fuente	G.l.	Cuadrado Medio	Denominador
Parte de la planta	144,00	0,0124074	(8)
concentracion	144,00	0,0124074	(8)
tiempo	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*concent	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*tiempo	144,00	0,0124074	(8)
concentracion*tiempo	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*concent	144,00	0,0124074	(8)

Componentes de la Varianza

Fuente	Estimación
Residuos	0,0124074

R-Cuadrado = 78,1908 porcentaje

R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 67,4377 porcentaje

Error Estándar de la Est. = 0,111389

Error absoluto de la Media = 0,0666667

Estadístico Durbin-Watson = 2,32725 (P=0,0079)

Análisis de Residuos

	Estimación	Validación
n	216	
MSE	0,0124074	
MAE	0,0666667	
MAPE	12,0535	
ME	7,55311E-16	
MPE	-2,73075	

El StatAdvisor

Como se puede apreciar en la tabla 7 se pueden observar los resultados del ajuste a un modelo estadístico lineal general que relaciona número de brocas inactivas / 15 (porción de brocas inactivas) con 3 factores pronosticados. Puesto que el p-valor en la primera tabla ANOVA para número de brocas inactivas / 15 es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre número de brocas inactivas / 15 y las variables pronosticadas al 99% de nivel de confianza.

La segunda tabla ANOVA para número de brocas inactivas / 15 comprueba la significación estadística de cada uno de los factores según se introdujeron en el modelo. Se observa que el p-valor más grande es 0,9387, perteneciente a A*B*C. Puesto que el p-valor es mayor a 0.10, ese término no es estadísticamente significativo al 90% de nivel de confianza o superior. Por consiguiente, debe considerar el eliminar A*B*C del modelo.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica 78,1908 el % de la variabilidad del número de brocas inactivas / 15. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 67,4377%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,111389. Este valor puede utilizarse para establecer los límites de predicción para las nuevas observaciones. El error absoluto de la media (MAE) de 0,0666667 es el valor promedio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) comprueba los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que estos tienen lugar en el fichero de datos. Dado que p-valor es inferior a 0.05, hay indicio de una posible correlación serial.

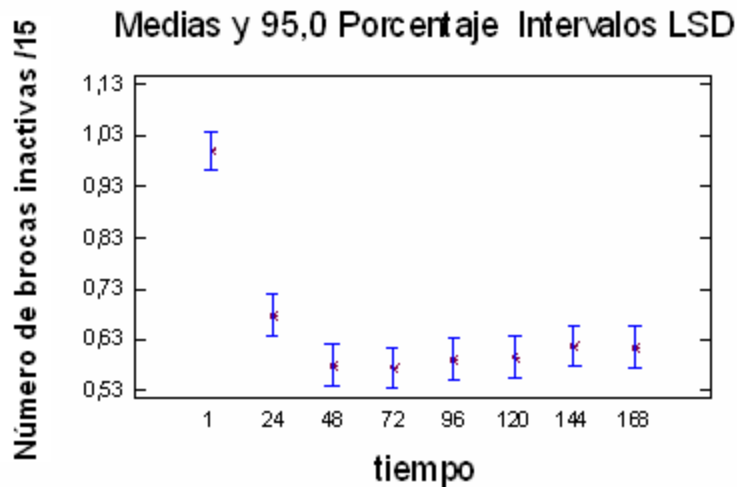


Figura 29. Interacción tiempo vs número de brocas inactivas / 15.

Tiempo vs número de brocas inactivas / 15:

Relacionando las medias de las lecturas de inactividad con respecto al transcurso del tiempo con un intervalo de confianza de 95%. Esta gráfica permite apreciar el desarrollo de los bioensayos desde su iniciación hasta el final de su seguimiento o tiempo de estabilización (1-168 horas), en la cual al comienzo del experimento (tiempo 1) las brocas permanecen inactivas¹ y a medida que transcurre el tiempo se reduce la inactividad y lo podemos relacionar ya con la actividad² de los individuos del bioensayo (48-168 horas), la estabilización de la actividad se presentó regularmente entre 144-168 horas y permitió la realización de la lectura, en este punto el número de brocas inactivas / 15 se puede relacionar con el porcentaje de mortalidad.

El seguimiento en el desarrollo del bioensayo se hace hasta llegar al tiempo de estabilización donde se puede determinar la actividad insecticida expresada en número de brocas inactivas / 15 (figura 29).

¹ Lo que no se puede tomar como mortalidad ya que como mecanismo de defensa los individuos permanecen en un estado de letargo, mas no representa una actividad insecticida.

² Capacidad de los individuos sobrevivientes de moverse e introducirse al grano de café sano.

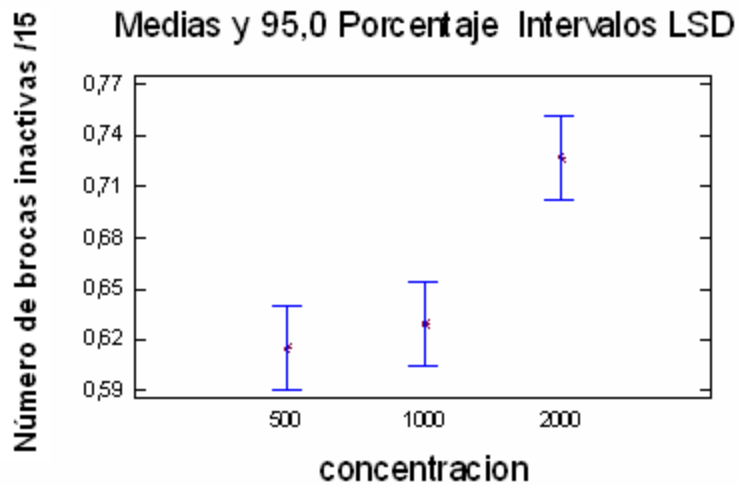


Figura 30. Relación concentración vs número de brocas inactivas / 15

Concentración vs número de brocas inactivas / 15:

La figura 30 muestra la relación de las medias de las lecturas de número de brocas inactivas / 15 con respecto a las tres concentraciones con un intervalo de confianza de 95%.

La gráfica permite observar las medias de las fracciones inactivas para las diferentes concentraciones aplicadas en los bioensayos con sus límites superiores e inferiores, notándose una relación proporcional del número de brocas inactivas / 15 con respecto al aumento de la concentración.

Tabla 8. Método de comparaciones múltiples entre 1 (hojas) 2 (semillas) y 3 (corteza)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Nivel	Recuento	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos

1	72	0,603704	0,0131273	X
2	72	0,606481	0,0131273	X
3	72	0,760185	0,0131273	X

Contraste		Diferencia	+/- Limites	

1 - 2		-0,00277778	0,0366947	
1 - 3		*-0,156481	0,0366947	
2 - 3		*-0,153704	0,0366947	

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

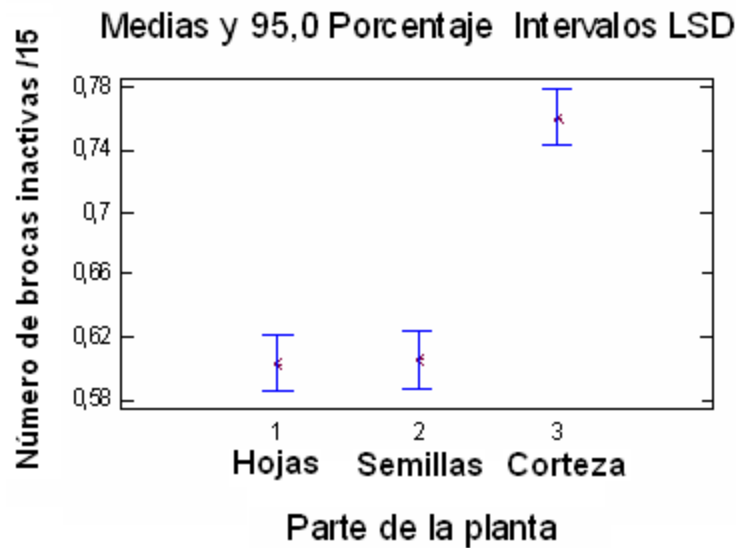


Figura 31. Correlación entre las partes de la planta y el número de brocas inactivas / 15

Parte de la Planta vs número de brocas inactivas / 15:

Se aplicó un método de comparaciones múltiples para determinar las medias que son significativamente diferentes entre (1) hojas (2) semillas y (3) corteza. Se encontró que la número de brocas inactivas / 15 es estadísticamente significativa a un 95 % de confianza entre 1-3 (hojas y corteza) y 2-3 (semillas y corteza) (tabla 8). Como se puede apreciar en la figura 31 se muestran los valores medios con sus límites superiores e inferiores y también se puede apreciar que la corteza (3) posee la mayor fracción inactiva.

La Mortalidad más alta en todas las concentraciones (500 1000 y 2000 ppm) la manifiesta el extracto de corteza, seguido por el extracto de semillas y seguido del extracto de hojas como el de menor mortalidad.

El tiempo de estabilización del experimento 168 horas permite la total recuperación (estabilización) de las brocas sobrevivientes a la inmersión en los extractos empleados durante los experimentos, ya que, como se puede ver en las gráficas de mortalidad de la brocas (*H. hampei*) estas se encuentran totalmente inactivas durante las primeras horas del

experimento, lo cual puede llevar a confundir las brocas (*H. hampei*) que se encuentran inactivas o en estado de letargo con las brocas que se encuentran muertas.

Es importante tener en cuenta que la mortalidad del blanco etanólico es mayor del 10 % en todos los experimentos y por esta razón no es apropiado aplicar un modelo estadístico cuantil como el Probit. El efecto sinérgico que se presenta en los extractos preparados a partir de extractos etanólicos seco no puede ser igualado a la suma de las mortalidades del blanco más la mortalidad de los extractos de fracciones ó compuestos aislados y estudiados individualmente, a menos que la mortalidad del blanco sea menor o igual al 10 %.

7.5.1 Análisis estadístico de los bioensayos realizados con hojas, semillas y corteza

Los datos estadísticos confirman que el mayor potencial insecticida se encuentra en la parte de la planta con codificación número 3 el cual corresponde a la corteza de la planta. Además de proporcionar los límites superior e inferior de confiabilidad, que son los intervalos de confianza al 95 % de cada una de las medias (anexo 2).

7.6 Bioensayos con extractos etanólicos de hojas, semillas y corteza La mortalidad de la broca es directamente proporcional a la concentración del extracto de hojas semillas y corteza empleadas, en todas las concentraciones la mortalidad ocasionada por la corteza siempre estuvo por encima de las mortalidades causadas por semillas y hojas.

Los extractos secos de hojas, semillas y corteza fueron disueltos en etanol al 94 % para preparar las diferentes concentraciones, ya que inicialmente se busca disolver la mayor cantidad de metabolitos posibles de los extractos, para ser evaluados sobre *H. hampei*. Y posteriormente se evaluaron extractos menos complejos (extractos enriquecidos en alcaloides) en mezclas de solventes con agua con carácter inocuo. Así se logró una menor mortalidad de los blancos de los experimentos.

7.7 Bioensayos con la fracción #2 obtenida del fraccionamiento en columna La fracción # 2 fue seleccionada para bioensayos por revelar una abundante presencia de alcaloides con las pruebas cualitativas realizadas. Sin embargo esta demostró una baja actividad insecticida 2.22% a 500 ppm y 6.66% a 1000 ppm. Esta baja actividad insecticida

sugiere que el metabolito responsable de la actividad insecticida de la planta puede no encontrarse o encontrarse en muy poca presencia en esta fracción.

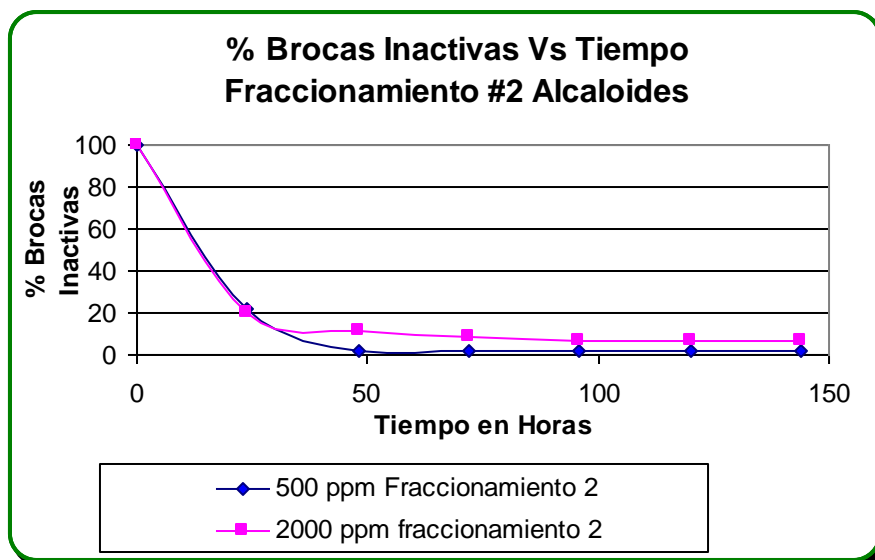


Figura 32. Porcentaje de inactividad de la fracción #2 de acetato de etilo obtenido por cromatografía en columna.

Como se puede observar en la figura 32 y tabla 9, la fracción #2 de acetato de etilo presenta una muy baja mortalidad de *H. hampei*. El tiempo requerido para la estabilización del experimento es mucho menor que el requerido cuando el solvente empleado como vehiculo es etanol.

Tabla 9. Porcentaje de inactividad de la fracción #2 de Acetato de etilo.

tiempo en Horas	500 ppm % Brocas Inactivas	1000 ppm % brocas inactivas
0	100	100
24	22,22	20
48	2,22	11,11
72	2,22	8,88
96	2,22	6,66
120	2,22	6,66
144	2,22	6,66

7.8 Bioensayos con el sólido negro obtenido por extracción con H₂SO₄

La letalidad causada por los alcaloides obtenidos por el método que emplea H₂SO₄ es baja, es importante tener en cuenta que el DMSO (dimetil sulfoxido) posee una mortalidad del 100 % sobre *H. hampei* cuando se utiliza este como solvente, es por esto que se recurrió a evaluar diluciones con agua preparadas a partir de una solución madre del sólido negro disuelto en DMSO y posterior aforo. Cuando se emplean mezclas de 1:1(DMSO: H₂O) La mortalidad de la solución de 1000 ppm es mayor al blanco (DMSO), como se aprecia en la gráfica. Sin embargo cuando se mezcla en proporción 1:3 (DMSO: H₂O) la mortalidad del blanco es 0 mientras que la solución de 500 ppm presenta mortalidad cercana al 15 % (figura 33).

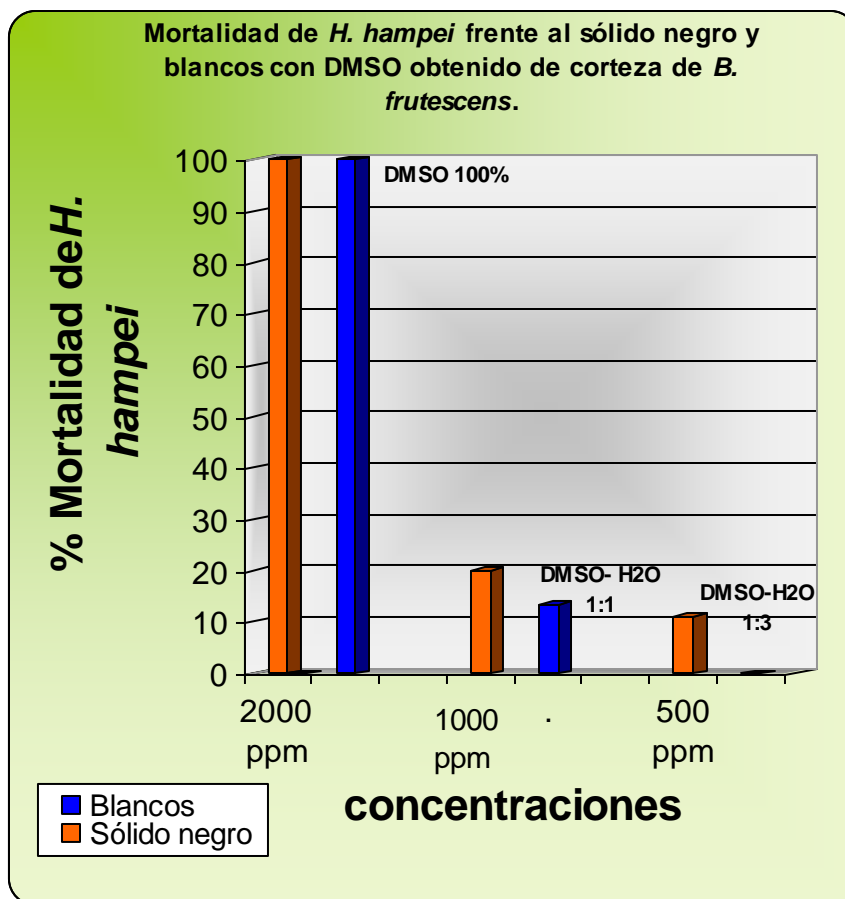


Figura 33. % de mortalidad de *H. hampei* causada por el sólido negro obtenido de corteza de *B. frutescens* frente a un blanco de DMSO: AGUA.

Según el comportamiento de los blancos durante los experimentos se encontró que cuando se emplean soluciones al 100% en DMSO este causa el 100 % de la mortalidad *H. hampei*, como también se encontró que mezclas 1:3 DMSO-H₂O no causan mortalidad en *H. hampei*.

500 ppm del sólido negro disuelto en mezcla 1:3 DMSO-H₂O produce una mortalidad del 11,11 % las concentraciones de 1000 y 2000 se evaluaron en mezclas 1:1 y 1 DMSO:H₂O y DMSO (solo) respectivamente.

7.9 Bioensayos con los sólidos café #1 y café-rojizo #2 obtenido por extracción con HCl

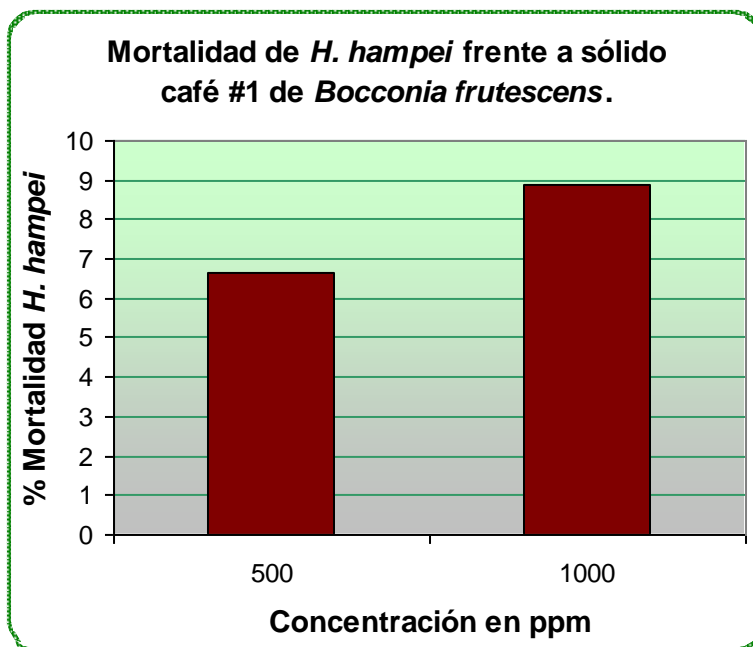


Figura 34. Mortalidad del sólido café #1.

El sólido café #1 presenta una baja mortalidad sobre *H. hampei* (figura 34) sin embargo ya que el blanco no presenta mortalidad alguna podemos descartar cualquier efecto sinérgico con el solvente empleado como blanco por lo tanto esta actividad se atribuye a la mezcla de compuestos presentes. Y considerando que el sólido es rico en alcaloides se puede suponer que los alcaloides presentes en dicho sólido poseen una baja actividad insecticida.

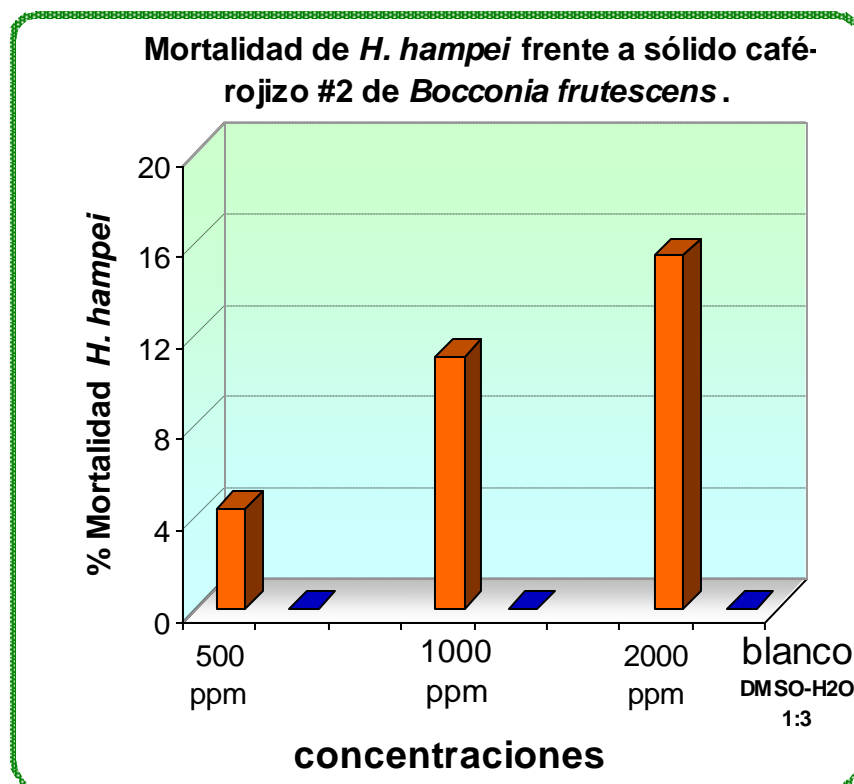


Figura 35. Mortalidad del sólido café rojizo #2.

El sólido café-rojizo #2 presenta una baja mortalidad que aumenta conforme aumenta la concentración de este sólido (figura 35). Nuevamente es importante considerar que dicha actividad es atribuida únicamente a la mezcla de metabolitos presentes en el sólido, el cual previamente demostró una abundante presencia de alcaloides con los reactivos de precipitación. Dado que el blanco seleccionado (mezcla DMSO 1:3 H₂O) no demuestra mortalidad alguna en *H. hampei* nuevamente se descarta posibles efectos sinérgicos entre el solvente y el sólido evaluado.

7.10 Comparación de la actividad insecticida de los tres sólidos ricos en alcaloides

La actividad insecticida presentada por los sólidos ricos en alcaloides (sólido negro obtenido por extracción con ácido sulfúrico y los sólidos café #1 y café-rojizo # 2 por extracción con ácido clorhídrico) se encuentra entre el 9-15 % (figura 36), muy cercana a la presentada por la fracción acetato de etilo #2 obtenida por fraccionamiento en columna 6.66 %. Esta actividad no iguala la actividad insecticida presentada por los extractos etanólicos

totales obtenidos de la planta, ya que estos manifiestan entre el 60-77 % de mortalidad, por lo tanto la actividad insecticida es complementada por los extractos ricos en alcaloides de carácter medianamente polar de la planta, pero estos no son el causante de la mayor actividad insecticida. Por lo tanto es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) El efecto que presenta el etanol al 94 % como solvente de los extractos sobre *H. hampei*. Ya que este solvente presenta un actividad insecticida del 40% aproximadamente.
- 2) La actividad insecticida puede deberse a otros metabolitos.

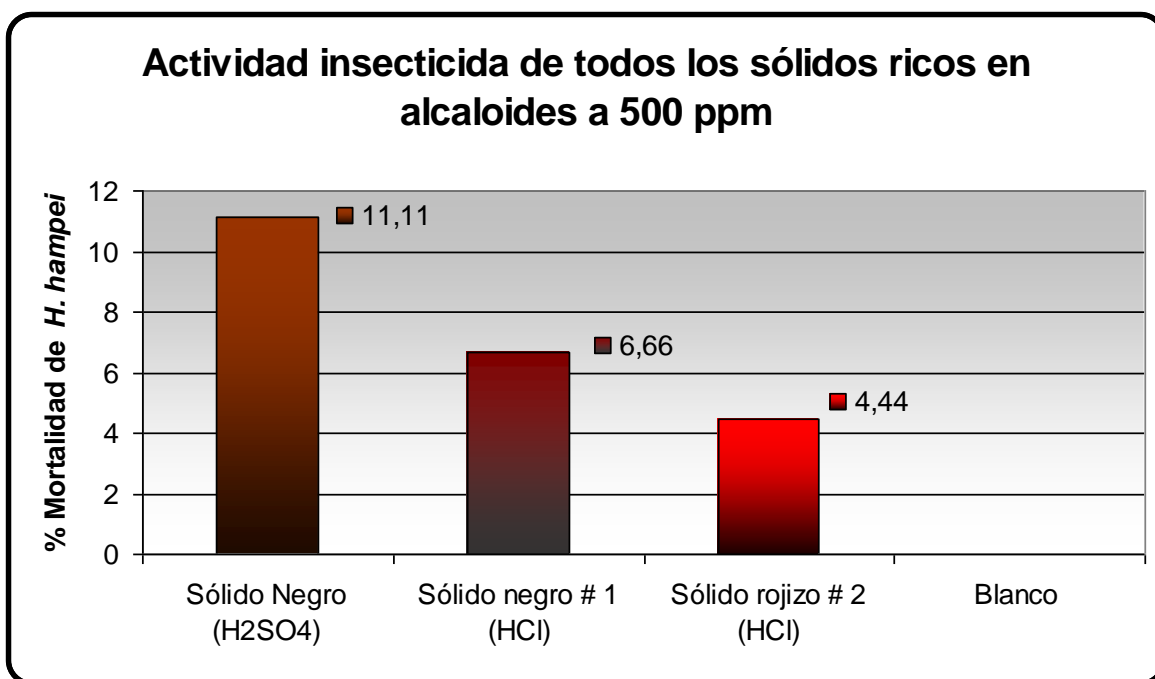


Figura 36. Comparación de la actividad insecticida de todos los sólidos ricos en alcaloides.

La mayor actividad insecticida a 500 ppm la presenta el sólido negro obtenido a partir de la extracción por H₂SO₄, en todos los casos se empleo una mezcla de DMSO 1:3 AGUA como blanco, y se observó que ésta no posee mortalidad sobre *H. hampei* (figura 37).

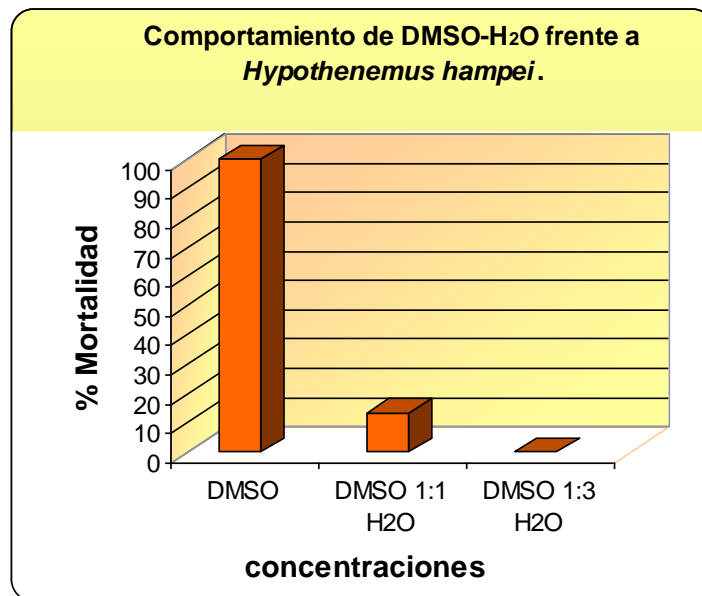


Figura 37. Efecto de mezclas DMSO-H₂O sobre *H. hampei*

7.11 CG-MS cromatografía de gases acoplada a masas El cromatograma de gases obtenido de la fracción acetato de etilo ●●● muestra que esta fracción es una mezcla de tres compuestos con tiempos de retención de 6,74, 7,48 y 7,73 minutos en concentraciones relativas de 41,5 7,5 y 51 respectivamente (figura 38).

El espectro de masas de la fracción acetato de etilo ●●● mostró los iones moleculares (M^+) en $m/z = 405$, (M^+) en $m/z = 381$ y el ion molecular (M^+) en $m/z = 333$, los cuales pueden corresponder a las siguientes formulas moleculares: $C_{25}H_{27}NO_4$, $C_{21}H_{19}NO_6$, $C_{20}H_{15}NO_4$, en el anexo 4 se encuentran las estructuras tentativas y rutas de fragmentación.

En la fracción ● se encontraron iones moleculares que la biblioteca del equipo asocio a gamma-sitoesterol (M^+) $m/z=43$ con un 95% y trans-stigma-5,22-dien-beta-ol (M^+) $m/z=83$ con un 98% de similitud esto aunque no prueba la presencia de estos esteroides concuerda con los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares sugiriendo la posibilidad de que estos esteroides sean los que sugiere la biblioteca sin embargo se hace necesario la confirmación de esta suposición por complementación con los resultados de otras técnicas espectroscópicas (anexo 4).

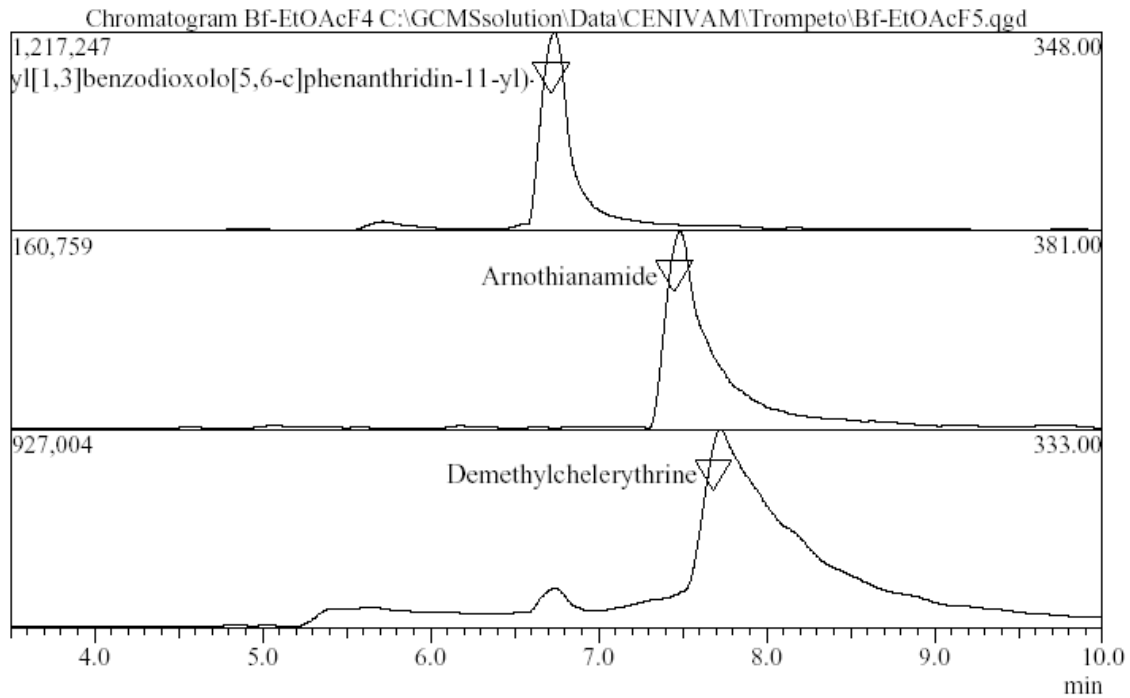


LABORATORIO DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

CERTICADO DE CALIDAD/QUALITY CERTIFICATE

Reporte/Report : Bf-EtOAcF4
Fecha/Date : 3/10/2007 3:36:32 PM

Identificación de la muestra/Sample ID : Bf-EtOAcF4
Vol. Inyección/Injection Vol.: 2.000
Archivo/Data File : C:\GCMSsolution\Data\CENIVAM\Trompeto\Bf-EtOAcF5.qgd
Método/Method File : C:\GCMSsolution\Data\CENIVAM\linas\Justi\ESTEROIDESLINAS.qgm
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune\CPN-SEI10260CLOSE20070222.qgt
Descripción muestra/Sample Descr. :



Quantitative Result Table

ID#	R.Time	Name	m/z	Area	Conc.	ilarity
1	6.736	2-Propanone, 1-(12,13-dihydro-1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]ben	348	14580402	41.5	96
2	7.485	Arnothianamide	381	2630067	7.5	80
3	7.727	Demethylchelerythrine	333	17927372	51.0	89

Figura 38. Espectro de gases de la fracción ●●●

8. CONCLUSIONES

La actividad insecticida de la corteza de *Bocconia frutescens* en extractos etanólicos, a 500, 1000 y 2000 ppm sobre *Hypothenemus hampei* F. fue de 64.4 %, 75.55%, y 77.77 % respectivamente.

Se obtuvieron diferentes extractos ricos en alcaloides de la corteza de *B. frutescens* y se realizaron bioensayos sobre *H. hampei*, se encontró que los extractos ricos en alcaloides no manifiestan la mayor actividad insecticida frente a *Hypothenemus hampei*.

La mayor actividad insecticida la manifiestan los extractos crudos de la planta en comparación a sus fraccionamientos. La corteza presentó 77.77% de mortalidad de individuos con la mayor concentración empleada 2000 ppm en etanol, en comparación de hojas (62.22%) y semillas (64.44%) a la misma concentración. La relación concentración mortalidad es directamente proporcional.

El tamizaje fitoquímico preliminar de corteza indica presencia abundante de metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides, y saponinas, y en menor proporción de cardiotónicos y azúcares. Se reconfirmaron metabolitos reportados en la literatura como: Alcaloides, terpenos y saponinas.

El método propuesto permite la evaluación de la toxicidad de extractos ricos en alcaloides sobre *H. hampei*. Además de permitir la aplicación a otros tipos de extractos con otros metabolitos para evaluar preliminarmente la actividad insecticida.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el estudio de especies promisorias de nuestra región y del país de las cuales se conozca a nivel etnobotánico su potencial insecticida.

Se recomienda llevar a cabo proyectos piloto empleando los métodos planteados en este proyecto para evaluar especies ricas en alcaloides y otros metabolitos en diferentes tipos de plagas problemáticas para la agricultura.

Se recomienda la creación de grupos de investigación en el área de química de productos vegetales.

La implementación de métodos alternativos para el control de la broca de café puede significar el comienzo de una biotecnología más limpia, utilizando especies vegetales con propiedades etnobotánicas conocidas por la cultura de la región.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Sanches A. E. Maiti M R. Quintero F. E. Vazquez T. M. XV Congreso de Botánica Fitoquímica, Ciudad de Queretaro Méjico del 14 al 19 de Noviembre del **2001**.
- ² Sakamoto, Seizaburo; Sakamoto, Masako. **Patente** Method for inhibiting bone resorption and collagenase release. www.freepatentsonline.com/index.html visitado 29 de octubre de **2005**.
- ³ Caballero-G.C, Vanderheyden PM, Apers S, Van den Heuvel H, Solis PN, Gupta MP, Claeys M, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck AJ. Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT(1) and endothelin 1 ET(A) receptors: bioactive benzo[c]phenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Med.* Sep;68(9):770-5. **2002**
- ⁴ Vargas G. William. Guía de las montañas del Quindío y los Andes Centrales. Editorial Universidad de Caldas, Colección Ciencias Agropecuarias. pag. 495-497 **2002**.
- ⁵ ROCHA S. Pedro J. ALCALOIDES ¿Qué son y para qué sirven?. *Botánica Médica*, Vol. X ,Nº 2, **2002**.
- ⁶ McKEE Trudy. –Bioquímica- La Base Molecular de la Vida. 3ª Edición, editorial Mc. Graw-Hill · Interamericana. España. **2003**.
- ⁷ Potapov V.M., Tatarinchik S.N., *Química Orgánica*, Editorial MIR, pags.445-446 /528, **1974**.
- ⁸ Vásquez Arango E. (UNALMED) grupo de investigación de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín, **2002**.
- ⁹ Hernandez C, H. Valoración económica de los daños causados por *Hypothenemus hampei* (Broca del fruto), en granos de *coffea canephora* vari. `Robusta` en el municipio de Pio Vila Nova de Seles, Kuanza Sul, R. P. de Angola. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Protección de Plantas* 5(1): 51-60. **1982**.

-
- ¹⁰ Le Pelley, R.H. *Pets of Coffee*. Editorial Longmans Págs. 114-117 **1968**.
- ¹¹ Fuller H. J., Ritchie D. D. *Botánica General*, Pág 260. Compañía Editorial Continental, Mexico. **1974**.
- ¹² Steyaert, R. L. Un ennemi naturel du *Stephanoderes*, le *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Etude des facteurs ambiants requissant sa pullulation. Bruselas (Bélgica), institute de etudes agronomiques do Congo Belg,46p. (serie Sc Scientifique N° 2) **1939**.
- ¹³ Henry TA. *The Plant Alkaloids*. Philadelphia, PA: Blakiston CO pag 169, **1949**.
- ¹⁴ Gonzales Garcia M.T, Posada Florez F.J, Bustillo Pardey A.E, Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hyphthenemus hampei* cenicafe 44(3) 93-102 **1993**.
- ¹⁵ Houghton PJ, Old yet new-Pharmaceuticals from plants. *Journal of Chemical education*, vol 78(2)175-184,**2001**.
- ¹⁶ Manual Técnico: Manejo integrado de la broca de café en honduras, Trejo A. Funez R. IHCAFE **2004**
- ¹⁷ Marek J, Dostal J and Slavik J. crystal structures of α - and β -allocryptopine *Czechoslovak Chemical Communications* **1998**, 63(3), 416-424; doi.
- ¹⁸ Portela C. R."evaluación y validación de la medicina herbaria en el control de parásitos externos de bovinos para pequeños productores de las zonas de ladera cálida y media de los departamentos del cauca y valle del cauca" Palmira, Valle del Cauca – Enero de **2004**.
- ¹⁹ Perez Arbelaez E, PLantas Utiles de Colombia 3^a redaccion; 14^a Edición, Editorial Victor Hugo, 583-586 Medellín **1990**.
- ²⁰ Editado por Smith N., Mori S. A., Henderson A., Stevenson D. WM, Heald S. V.. Publicado en asociación con Jardín Botánico de New Cork. FLOWERING PLANTS OF THE NEOTROPICS. Pricenton & Oxford, impreso en Italia por Eurographica, **2004**.
- ²¹ Bonner J., Varner J.E., *Plant Biochemistry*. Academic press. Pag 202-205. **1976**
- ²² Houghton PJ, Old yet new-Pharmaceuticals from plants. *Journal of Chemical education*,vol 78(2)175-184,**2001**.
- ²³ Hernández Mesa M. *Plantas Colombianas –Su Aplicación medicinal*-editorial Presencia, Santafé de Bogotá. Pag.93-94 **1992**.
- ²⁴ Howard R.A. *Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Dicotyledoneae, Part 1. Vol. 4. Arnold, Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, MA. 673 p. 1988*.

-
- ²⁵ University of Hawaii Botany.. *Bocconia frutescens*, bocconia, Papaveraceae. http://www.botany.hawaii.edu/faculty/cw_smith/boc_fru.htm. **2002**.
- ²⁶ Acero Duarte L. H., Plantas Útiles de la Cuenca del Orinoco. Editorial Panamericana primera edicion Págs 90-91. **2005**.
- ²⁷ Garcia Barriga H. Flora medicinal de Colombia “botanica medica” Imprenta Nacional, Bogota Tomo I pags. 372-374. **1974**.
- ²⁸ ARBELÁEZ Perez E. Plantas útiles de Colombia. 3ª redacción, 14ª Edición. Editorial Victor Hugo. Medellín **1990**.
- ²⁹ Arango Acosta G.J. Alcaloides y compuestos nitrogenados, Universidad de Antioquia, Medellín. Pág. 2-4 Abril de **2000**.
- ³⁰ Morimoto S, Suemori K, Taura F, Shoyama Y. New Dimeric Morphine from Opium Poppy (*Papaver Somniferum*) and Its Physiological Function J. Nat. Prod. **2003**, 66, 987-989.
- ³¹ Carretero Accame M.E. Alcaloides: aspectos generales (I). *Panorama Actual Med*; 25 (241): 222-227 **2001**.
- ³² M. H. Zenk. University of Munich, Karlstr. The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 66, Nos 10/11, pp. 2023-2028, **1994**.
- ³³ Bruneton J. “Elementets de Phytochimie et de Pharmacognosie” Ed Technique et Documentation (Lavoisier). **1987**.
- ³⁴ T. Swain *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, pag 418-423 **1963**.
- ³⁵ Garcia Barriga H. Flora medicinal de Colombia “botánica medica” Imprenta Nacional, Bogota **1974** Tomo I pags. 372-374.
- ³⁶ Diaz Molina B. Estudio Fitoquímico y Biológico de las Plantas Argemone Mexicana y *Bocconia Frutescens*. Facultad de Ciencias Universidad de Venezuela. Tesis de Doctorado **2000**.
- ³⁷ Domínguez Xorge Alejandro, Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, Capitulo 5 pag 67-70 **1985**.
- ³⁸ Cruz Vega D. E. , Rosales Hernandez B. , Castro Garza J. , Estrada Garcia I. , Mendez Aragon P. , Gonzales Garza M. Análisis de la Actividad Antimicobacteriana Sobre *Mycobacterium tuberculosis* y/o Activadora de Macrófagos de Plantas de Extractos

Mexicanos Conocidas como Gordolobo. Respin edición especial No. 7-2005 respyn@uanl.mx **2005**.

³⁹ Procimaf. Semarnap <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/bibliografia.htm#25>. visitado 29 de octubre de **2005**.

⁴⁰ Acero Duarte L. H., Plantas Útiles de la Cuenca del Orinoco. Editorial Panamericana primera edición Págs 90-91 **2005**.

⁴¹ H. Daniel. Plantas Medicinales un resumen de Farmacognosia, editorial Tercer Mundo, Colombia. Pag.68 **1988**.

⁴² Martello, R and Farnsworth N.R.: Observations on the sensitivity of several common alkaloids precipitating reagents. *Lloydia* 25, 176-185, **1962**.

⁴³ Ikram M. Said, Laily bin Din, Mohd Wahid Samsudin, Nik Idris Yusoff, A. Latiff, Rasadah Mat Ali, A. Hamid A. Hadi. a phytochemical survey of sayap-kinabalu park, sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)* July **1998**.

⁴⁴ Pearson Ralph G. traducción por Laura Gasque, Ácidos y bases duros y blandos-primera parte: principios fundamentales. *Educación Química* 8 (4), pag.208-215, octubre **1997**.

⁴⁵ Geoffrey A. Codell –U. Illinois-. Introduction to alkaloids a biogenetic approach (introducción a los alcaloides un acercamiento a su biogenética). Editorial John Wiley & Sons inc. USA, **1981**.

⁴⁶ Uberto Tosco, Atlas de Botánica, Editorial Teide, S.A.-Barcelona instituto Geográfico de Agostini. Pag.212. **1973**.

⁴⁷ Raven Peter H., Evert Ray F., Eichhorn Susan E.. *Biology of Plants*, 9ª edición, W.H. Freeman and Company Publishers. NY, USA. Pag.28, 479, 483, 484. **2005**.

⁴⁸ Fonnegra G. R., Jiménez R. S. L.. Plantas medicinales aprobadas en Colombia, 1ª Edición. Editorial Universidad de Antioquia yuluka interés general, Pag. 54-57. Medellín **1999**

⁴⁹ Federación Nacional de Cafeteros, Manual del cafetero colombiano, 3ª edición, Editorial Bedout. Medellín (Col.) **1969**.

⁵⁰ Chalarca J. Historia Fabulosa de una Taza de Café, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia **1985**.

⁵¹ Borror D.J.; De Long D.M.; Triplehorn C.A. An Introduction to the study of insects. 5a Ed. Filadelfia Estados Unidos. 827 pp **1981**.

-
- ⁵² MANUAL DEL CAFETERO COLOMBIANO, Cuarta Edición Federación Nacional de Cafeteros de Colombia Pág. 4-11 **1979**.
- ⁵³ Cárdenas Murillo R, Posada Florez F. Los insectos y otros habitantes de cafetales y platanales, cenicafe Primera Edición Págs. 126-137 Agosto **2001**.
- ⁵⁴ Periódico la Crónica, Broca amenaza cultivo en Caldas, Pág. 1B. Armenia, Lunes 3 de abril del **2006**.
- ⁵⁵ Fuller H. J., Ritchie D. D. Botanica General, Pág 260. Compañía Editorial Continental, Mexico. **1974**.
- ⁵⁶ Montoya Restrepo E.C. Caracterización de la infestación del café por la broca y efecto del daño en la calidad de la bebida. Cenicafe, 50 (4): 245-258 **1999**.
- ⁵⁷ Castaño Castrillón J.J., Quintero G.P., Calidad de extractos de café perforado por broca obtenidos por crioconcentración Cenicafe 55 (3): 183-201 **2004**.
- ⁵⁸ El Café de Colombia. Enfermedades y Plagas del Café, Principales Plagas del Café pagina oficial de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, <http://cafedecolombia.com/caficultura/plagas.html> visitado junio 2007, publicado **2004**.
- ⁵⁹ Mondragón Rosales M. Acuña Silva. R. Rodríguez González. G. Versión electrónica. Estrategias para el manejo integrado del minador de la hoja y la broca del fruto del cafeto. fonaiap Divulga. <http://www.fonaiap.gov.ve/publica/divulga/fd60/broca.html> pagina visitada **2005**.
- ⁶⁰ Jiménez-Gomez J, Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la Broca del café, Cenicafe 43(3): 84-98, **1992**.
- ⁶¹ Gómez j, Barrera jf, Rojas j c, Acias samano jm, Liedo jp., Cruz Lopez L, Badii MH. Volatile compounds released by disturbed females of *cephalonomia stephanoderis* (hymenoptera: bethylidae): a parasitoid of the coffee berry borer *hypothenemus hampei* (coleoptera: scolytidae). *florida entomologist* 88(2) june **2005**.
- ⁶² Bustillo Pardey AE. Nuevo modelo de trampa para la captura de adultos de broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) Entomólogo Numero 97 vol 31enero -junio **2004**.
- ⁶³ Posada Florez FJ, Villalba Gault DA, Bustillo Pardey AE. Los insecticidas y el hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café Cenicafe, 55(2) 136-149 **2004**.
- ⁶⁴ Boletín Informativo sobre la broca del café. La Broca del Café y su Relación con los Fenómenos Climáticos. Brocarta, Número 34, febrero de **1998**.

-
- ⁶⁵ Cubillos, A., Gadicke, P., Von Baer, D. *et al.* Determinación de la dosis letal media (DL50) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marón. *Arch. med. vet.*, Vol. 31, No. 2, pp. 249-256. ISSN 0301-732X **1999**.
- ⁶⁶ Loomis, T.A. Fundamentos de Toxicología. Acribia, Zaragoza **1982**.
- ⁶⁷ Martínez Yopez P,N, Osorio Grisales J, Ariel Cardenas G. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL 50 (Dosis letal media) a través del método de probit en un bioensayo. Revista de investigaciones Universidad del Quindío vol. 4 No 12.pp 109-122. Armenia, Septiembre de **2003**.
- ⁶⁸ Gil E,S. Ferreira E,I. Valderrama A,C, Zyngier S,B. Najjar Y,R. Carboxilatos hidroxilados de Rodio II (gluconato, lactobiato e lactato). Síntesis, caracterización y ensayos de citotoxicidad in Vitro. *Anal. Real Acad. Farm.* 200, 66: **2000**.
- ⁶⁹ Vega Montalvo L, Carrillo Domínguez C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). *Rev Cubana Plant Med*; 2(2-3):14-8 **1997**.
- ⁷⁰ Republica de Honduras, Centro de Estudios y Control de Contaminantes CESCOO [www.cescoo.gob.hn/informes/ Estudio%20de%20efluentes%20industriales.pdf](http://www.cescoo.gob.hn/informes/Estudio%20de%20efluentes%20industriales.pdf) **2005**.
- ⁷¹ Tanitame A,, Oyamada Y, Ofuji K, Fujimoto M, Iwai N, Hiyama Y, Suzuki K, Ito H, Terauchi H, Kawasaki M, Nagai K, Wachi M, and Yamagishi J Synthesis and Antibacterial Activity of a Novel Series of Potent DNA Gyrase Inhibitors. Pyrazole Derivatives 3693 *J. Med. Chem.*, 47, 3693-3696 **2004**.
- ⁷² Marin Lopez S. M . Arcila Pulgarin J. Montoya Restrepo E.C. Oliveros Tascon. C.E. Escala de maduración para los frutos del Cafeto (*Coffea arabica* L) Avances técnicos Cenicafé 315 Septiembre **2003**.
- ⁷³ Maldoni B, Alkaloids: Isolation and Purification. *Journal of chemical Education*. Vol 68 #8 pag. 700-703 august **1991**.
- ⁷⁴ Sanabria G.A. ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR Metodología y su Aplicación en la Evaluación de 40 Plantas de la Familia Compositaeae. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá **1983**.



ANEXO 1.
TABLAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

HOJAS = 1

Replica	Parte de la planta	Concentració n	Tiempo	Respuesta	Fracción inactivos/15
1	1	500	1	15	1
2	1	500	1	15	1
3	1	500	1	15	1
1	1	1000	1	15	1
2	1	1000	1	15	1
3	1	1000	1	15	1
1	1	2000	1	15	1
2	1	2000	1	15	1
3	1	2000	1	15	1
1	1	500	24	9	0,6
2	1	500	24	9	0,6
3	1	500	24	10	0,6666667
1	1	1000	24	6	0,4
2	1	1000	24	13	0,8666667
3	1	1000	24	5	0,33333333
1	1	2000	24	8	0,53333333
2	1	2000	24	14	0,93333333
3	1	2000	24	12	0,8
1	1	500	48	9	0,6
2	1	500	48	9	0,6
3	1	500	48	8	0,53333333
1	1	1000	48	4	0,2666667
2	1	1000	48	8	0,53333333
3	1	1000	48	5	0,33333333
1	1	2000	48	6	0,4
2	1	2000	48	12	0,8
3	1	2000	48	10	0,6666667
1	1	500	72	8	0,53333333
2	1	500	72	9	0,6
3	1	500	72	7	0,4666667
1	1	1000	72	6	0,4
2	1	1000	72	7	0,4666667
3	1	1000	72	6	0,4
1	1	2000	72	7	0,4666667
2	1	2000	72	11	0,73333333
3	1	2000	72	9	0,6
1	1	500	96	8	0,53333333
2	1	500	96	9	0,6
3	1	500	96	7	0,4666667
1	1	1000	96	6	0,4
2	1	1000	96	7	0,4666667

3	1	1000	96	6	0,4
1	1	2000	96	7	0,46666667
2	1	2000	96	11	0,73333333
3	1	2000	96	10	0,66666667
1	1	500	120	8	0,53333333
2	1	500	120	9	0,6
3	1	500	120	7	0,46666667
1	1	1000	120	7	0,46666667
2	1	1000	120	7	0,46666667
3	1	1000	120	7	0,46666667
1	1	2000	120	7	0,46666667
2	1	2000	120	11	0,73333333
3	1	2000	120	10	0,66666667
1	1	500	144	8	0,53333333
2	1	500	144	9	0,6
3	1	500	144	7	0,46666667
1	1	1000	144	7	0,46666667
2	1	1000	144	7	0,46666667
3	1	1000	144	7	0,46666667
1	1	2000	144	7	0,46666667
2	1	2000	144	11	0,73333333
3	1	2000	144	10	0,66666667
1	1	500	168	8	0,53333333
2	1	500	168	9	0,6
3	1	500	168	7	0,46666667
1	1	1000	168	7	0,46666667
2	1	1000	168	7	0,46666667
3	1	1000	168	7	0,46666667
1	1	2000	168	7	0,46666667
2	1	2000	168	11	0,73333333
3	1	2000	168	10	0,66666667

SEMILLAS =2

Replica	Parte de la planta	Concentración	Tiempo	Respuesta	Fracción inactivos/15
1	2	500	1	15	1
2	2	500	1	15	1
3	2	500	1	15	1
1	2	1000	1	15	1
2	2	1000	1	15	1
3	2	1000	1	15	1
1	2	2000	1	15	1
2	2	2000	1	15	1
3	2	2000	1	15	1
1	2	500	24	10	0,66666667

2	2	500	24	9	0,6
3	2	500	24	8	0,53333333
1	2	1000	24	3	0,2
2	2	1000	24	8	0,53333333
3	2	1000	24	8	0,53333333
1	2	2000	24	7	0,46666667
2	2	2000	24	10	0,66666667
3	2	2000	24	11	0,73333333
1	2	500	48	8	0,53333333
2	2	500	48	5	0,33333333
3	2	500	48	5	0,33333333
1	2	1000	48	6	0,4
2	2	1000	48	8	0,53333333
3	2	1000	48	8	0,53333333
1	2	2000	48	8	0,53333333
2	2	2000	48	9	0,6
3	2	2000	48	11	0,73333333
1	2	500	72	8	0,53333333
2	2	500	72	4	0,26666667
3	2	500	72	6	0,4
1	2	1000	72	10	0,66666667
2	2	1000	72	7	0,46666667
3	2	1000	72	8	0,53333333
1	2	2000	72	8	0,53333333
2	2	2000	72	10	0,66666667
3	2	2000	72	11	0,73333333
1	2	500	96	9	0,6
2	2	500	96	4	0,26666667
3	2	500	96	6	0,4
1	2	1000	96	11	0,73333333
2	2	1000	96	11	0,73333333
3	2	1000	96	8	0,53333333
1	2	2000	96	8	0,53333333
2	2	2000	96	10	0,66666667
3	2	2000	96	11	0,73333333
1	2	500	120	9	0,6
2	2	500	120	5	0,33333333
3	2	500	120	7	0,46666667
1	2	1000	120	11	0,73333333
2	2	1000	120	7	0,46666667
3	2	1000	120	8	0,53333333
1	2	2000	120	8	0,53333333
2	2	2000	120	10	0,66666667
3	2	2000	120	11	0,73333333
1	2	500	144	9	0,6
2	2	500	144	5	0,33333333
3	2	500	144	7	0,46666667
1	2	1000	144	11	0,73333333

2	2	1000	144	7	0,46666667
3	2	1000	144	8	0,53333333
1	2	2000	144	8	0,53333333
2	2	2000	144	10	0,66666667
3	2	2000	144	11	0,73333333
1	2	500	168	9	0,6
2	2	500	168	5	0,33333333
3	2	500	168	7	0,46666667
1	2	1000	168	11	0,73333333
2	2	1000	168	7	0,46666667
3	2	1000	168	8	0,53333333
1	2	2000	168	8	0,53333333
2	2	2000	168	10	0,66666667
3	2	2000	168	11	0,73333333

CORTEZA =3

Replica	Parte de la planta	Concentración	Tiempo	Respuesta	Fracción inactivos/15
1	3	500	1	15	1
2	3	500	1	15	1
3	3	500	1	15	1
1	3	1000	1	15	1
2	3	1000	1	15	1
3	3	1000	1	15	1
1	3	2000	1	15	1
2	3	2000	1	15	1
3	3	2000	1	15	1
1	3	500	24	12	0,8
2	3	500	24	10	0,66666667
3	3	500	24	13	0,86666667
1	3	1000	24	11	0,73333333
2	3	1000	24	14	0,93333333
3	3	1000	24	15	1
1	3	2000	24	14	0,93333333
2	3	2000	24	15	1
3	3	2000	24	11	0,73333333
1	3	500	48	10	0,66666667
2	3	500	48	10	0,66666667
3	3	500	48	11	0,73333333
1	3	1000	48	9	0,6
2	3	1000	48	10	0,66666667
3	3	1000	48	11	0,73333333
1	3	2000	48	14	0,93333333
2	3	2000	48	12	0,8

3	3	2000	48	9	0,6
1	3	500	72	9	0,6
2	3	500	72	9	0,6
3	3	500	72	10	0,66666667
1	3	1000	72	9	0,6
2	3	1000	72	9	0,6
3	3	1000	72	10	0,66666667
1	3	2000	72	13	0,86666667
2	3	2000	72	12	0,8
3	3	2000	72	9	0,6
1	3	500	96	9	0,6
2	3	500	96	9	0,6
3	3	500	96	10	0,66666667
1	3	1000	96	10	0,66666667
2	3	1000	96	10	0,66666667
3	3	1000	96	9	0,6
1	3	2000	96	13	0,86666667
2	3	2000	96	12	0,8
3	3	2000	96	9	0,6
1	3	500	120	10	0,66666667
2	3	500	120	9	0,6
3	3	500	120	10	0,66666667
1	3	1000	120	9	0,6
2	3	1000	120	10	0,66666667
3	3	1000	120	10	0,66666667
1	3	2000	120	14	0,93333333
2	3	2000	120	12	0,8
3	3	2000	120	9	0,6
1	3	500	144	10	0,66666667
2	3	500	144	9	0,6
3	3	500	144	11	0,73333333
1	3	1000	144	12	0,8
2	3	1000	144	10	0,66666667
3	3	1000	144	14	0,93333333
1	3	2000	144	14	0,93333333
2	3	2000	144	12	0,8
3	3	2000	144	9	0,6
1	3	500	168	9	0,6
2	3	500	168	9	0,6
3	3	500	168	11	0,73333333
1	3	1000	168	12	0,8
2	3	1000	168	10	0,66666667
3	3	1000	168	14	0,93333333
1	3	2000	168	14	0,93333333
2	3	2000	168	12	0,8
3	3	2000	168	9	0,6

sólido café #1				
Replica	Concentración	Tiempo	Respuesta	Fracción inactivos/15
1	500	1	15	1
2	500	1	15	1
3	500	1	15	1
1	1000	1	15	1
2	1000	1	15	1
3	1000	1	15	1
1	500	24	0	0
2	500	24	2	0,1333
3	500	24	3	0,2
1	1000	24	2	0,1333
2	1000	24	1	0,0666
3	1000	24	1	0,0666
1	500	48	1	0,0666
2	500	48	2	0,1333
3	500	48	0	0
1	1000	48	2	0,1333
2	1000	48	1	0,0666
3	1000	48	1	0,0666
1	500	72	1	0,0666
2	500	72	2	0,1333
3	500	72	0	0
1	1000	72	2	0,1333
2	1000	72	1	0,0666
3	1000	72	1	0,0666
1	500	96	1	0,0666
2	500	96	2	0,1333
3	500	96	0	0
1	1000	96	2	0,1333
2	1000	96	1	0,0666

3	1000	96	1	0,0666
1	500	120	1	0,0666
2	500	120	2	0,1333
3	500	120	0	0
1	1000	120	2	0,1333
2	1000	120	1	0,0666
3	1000	120	1	0,0666
1	500	144	1	0,0666
2	500	144	2	0,1333
3	500	144	0	0
1	1000	144	2	0,1333
2	1000	144	1	0,0666
3	1000	144	1	0,0666

Sólido café-rojizo #2				
Replica	Concentración	Tiempo	Respuesta	Fracción inactivos/15
1	500	1	15	1
2	500	1	15	1
3	500	1	15	1
1	1000	1	15	1
2	1000	1	15	1
3	1000	1	15	1
1	2000	1	15	1
2	2000	1	15	1
3	2000	1	15	1
1	500	24	2	0,1333
2	500	24	2	0,1333
3	500	24	0	0
1	1000	24	3	0,2
2	1000	24	1	0,0666
3	1000	24	1	0,0666
1	2000	24	2	0,1333
2	2000	24	1	0,0666
3	2000	24	4	0,2666
1	500	48	2	0,133
2	500	48	0	0
3	500	48	0	0
1	1000	48	3	0,2
2	1000	48	0	0

3	1000	48	1	0,0666
1	2000	48	2	0,1333
2	2000	48	1	0,0666
3	2000	48	3	0,2
1	500	72	2	0,1333
2	500	72	0	0
3	500	72	0	0
1	1000	72	3	0,2
2	1000	72	0	0
3	1000	72	1	0,0666
1	2000	72	2	0,1333
2	2000	72	1	0,0666
3	2000	72	3	0,2
1	500	96	2	0,1333
2	500	96	0	0
3	500	96	0	0
1	1000	96	3	0,2
2	1000	96	1	0,0666
3	1000	96	1	0,0666
1	2000	96	2	0,1333
2	2000	96	2	0,1333
3	2000	96	3	0,2
1	500	120	2	0,1333
2	500	120	0	0
3	500	120	0	0
1	1000	120	2	0,1333
2	1000	120	1	0,0666
3	1000	120	1	0,0666
1	2000	120	2	0,1333
2	2000	120	2	0,1333
3	2000	120	3	0,2
1	500	144	2	0,1333
2	500	144	0	0
3	500	144	0	0
1	1000	144	3	0,2
2	1000	144	1	0,0666
3	1000	144	1	0,0666
1	2000	144	2	0,1333
2	2000	144	2	0,1333
3	2000	144	3	0,2

ANEXO 2.

TABLAS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Modelos Lineales Generales

Número de variables dependientes: 1

Número de factores categóricos: 3

Número de factores cuantitativos: 0

Análisis de la Varianza para número de brocas inactivas / 15

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Modelo	6,4056	71	0,0902197	7,27	0,0000
Residuos	1,78667	144	0,0124074		
Total (Corr.)	8,19226	215			

Sumas de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F-Ratio	P-Valor
Parte de la planta	1,15486	2	0,577428	46,54	0,0000
concentracion	0,537078	2	0,268539	21,64	0,0000
tiempo	3,83802	7	0,548289	44,19	0,0000
Parte de la planta*concent	0,210329	4	0,0525823	4,24	0,0028
Parte de la planta*tiempo	0,30358	14	0,0216843	1,75	0,0523
concentracion*tiempo	0,150988	14	0,0107848	0,87	0,5933
P. P*concent*tiempo	0,210741	28	0,00752646	0,61	0,9387
Residuos	1,78667	144	0,0124074		
Total (corregido)	8,19226	215			

Cuadrados Medios Esperados

Fuente	EMS
Parte de la planta	(8)+Q1
concentracion	(8)+Q2
tiempo	(8)+Q3
Parte de la planta*concent	(8)+Q4
Parte de la planta*tiempo	(8)+Q5
concentracion*tiempo	(8)+Q6
Parte de la planta*concent	(8)+Q7
Residuos	(8)

Denominadores F-Test

Fuente	G.l.	Cuadrado Medio	Denominador
Parte de la planta	144,00	0,0124074	(8)
concentracion	144,00	0,0124074	(8)

tiempo	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*concent	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*tiempo	144,00	0,0124074	(8)
concentracion*tiempo	144,00	0,0124074	(8)
Parte de la planta*concent	144,00	0,0124074	(8)

Componentes de la Varianza

Fuente	Estimación
Residuos	0,0124074

R-Cuadrado = 78,1908 porcentaje

R-Cuadrado (adaptado para g.l.) = 67,4377 porcentaje

Error Estándar de la Est. = 0,111389

Error absoluto de la Media = 0,0666667

Estadístico Durbin-Watson = 2,32725 (P=0,0079)

Análisis de Residuos

	Estimación	Validación
n	216	
MSE	0,0124074	
MAE	0,0666667	
MAPE	12,0535	
ME	7,55311E-16	
MPE	-2,73075	

El StatAdvisor

Esta ventana resume los resultados del ajuste a un modelo estadístico lineal general que relaciona número de brocas inactivas / 15 con 3 factores pronosticados. Puesto que el p-valor en la primera tabla ANOVA para número de brocas inactivas / 15 es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre número de brocas inactivas / 15 y las variables pronosticadas al 99% de nivel de confianza.

La segunda tabla ANOVA para número de brocas inactivas / 15 comprobar la significación estadística de cada uno de los factores según se introdujeron en el modelo. Observe que el p-valor más grande es 0,9387, perteneciente a A*B*C. Puesto que el p-valor es mayor o igual a 0.10, ese término no es estadísticamente significativo al 90% de nivel de confianza superior. Por consiguiente, debe considerar el eliminar A*B*C del modelo.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica 78,1908 el % de la variabilidad en número de brocas inactivas / 15. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 67,4377%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,111389. Este valor puede utilizarse para establecer los límites de predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Informes del menú del texto. El error absoluto de la media (MAE) de 0,0666667 es el valor promedio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) comprueba los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que estos tienen lugar en el fichero de datos. Dado que p-valor es inferior a 0.05, hay indicio de una posible correlación serial.

La salida también resume el rendimiento del modelo ajustando los datos, y prediciendo cualquier valor rehusado del proceso de ajuste.

Muestra:

- (1) el error cuadrado medio (MSE)
- (2) el error absoluto medio (MAE)
- (3) el error del porcentaje absoluto medio (MAPE)
- (4) el error medio (ME)
- (5) el error del porcentaje medio (MPE)

Cada uno de los estadísticos está basado en los residuos. Los tres primeros estadísticos miden la magnitud de los errores.

95,0% intervalos de confianza para los coeficientes estimados (número de brocas inactivas / 15)

Parámetro	Error				V.I.F.
	Estimado	Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
CONSTANTE	0,65679	0,00757903	0,64181	0,671771	
Parte de la planta	-0,0530864	0,0107184	-0,0742721	-0,0319007	1,33333
Parte de la planta	-0,0503086	0,0107184	-0,0714943	-0,0291229	1,33333
concentracion	-0,0419753	0,0107184	-0,063161	-0,0207896	1,33333
concentracion	-0,0280864	0,0107184	-0,0492721	-0,00690072	1,33333
tiempo	0,34321	0,0200522	0,303575	0,382845	1,75
tiempo	0,0222222	0,0200522	-0,0174126	0,061857	1,75
tiempo	-0,0765432	0,0200522	-0,116178	-0,0369084	1,75
tiempo	-0,0839506	0,0200522	-0,123585	-0,0443158	1,75
tiempo	-0,0641975	0,0200522	-0,103832	-0,0245627	1,75
tiempo	-0,0592593	0,0200522	-0,0988941	-0,0196244	1,75
tiempo	-0,0395062	0,0200522	-0,079141	0,000128641	1,75
Parte de la planta*c	0,0466049	0,0151581	0,0166438	0,076566	1,77778
Parte de la planta*c	-0,0561728	0,0151581	-0,0861339	-0,0262117	1,77778
Parte de la planta*c	-0,0367284	0,0151581	-0,0666895	-0,00676729	1,77778
Parte de la planta*c	0,0299383	0,0151581	-0,000022831	0,0598994	1,77778
Parte de la planta*t	0,0530864	0,0283581	-0,00296567	0,109139	2,33333

Parte de la planta*t	0,0111111	0,0283581	-0,044941	0,0671632	2,33333
Parte de la planta*t	-0,00123457	0,0283581	-0,0572867	0,0548175	2,33333
Parte de la planta*t	-0,00123457	0,0283581	-0,0572867	0,0548175	2,33333
Parte de la planta*t	-0,0135802	0,0283581	-0,0696323	0,0424718	2,33333
Parte de la planta*t	-0,0037037	0,0283581	-0,0597558	0,0523484	2,33333
Parte de la planta*t	-0,0234568	0,0283581	-0,0795089	0,0325953	2,33333
Parte de la planta*t	0,0503086	0,0283581	-0,00574345	0,106361	2,33333
Parte de la planta*t	-0,0805556	0,0283581	-0,136608	-0,0245035	2,33333
Parte de la planta*t	-0,0262346	0,0283581	-0,0822867	0,0298175	2,33333
Parte de la planta*t	0,0108025	0,0283581	-0,0452496	0,0668546	2,33333
Parte de la planta*t	0,0354938	0,0283581	-0,0205583	0,0915459	2,33333
Parte de la planta*t	0,0157407	0,0283581	-0,0403114	0,0717928	2,33333
Parte de la planta*t	-0,00401235	0,0283581	-0,0600644	0,0520397	2,33333
concentracion*tiempo	0,0419753	0,0283581	-0,0140768	0,0980274	2,33333
concentracion*tiempo	0,0296296	0,0283581	-0,0264225	0,0856817	2,33333
concentracion*tiempo	0,017284	0,0283581	-0,0387681	0,073336	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0123457	0,0283581	-0,0683978	0,0437064	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0246914	0,0283581	-0,0807434	0,0313607	2,33333
concentracion*tiempo	-0,00740741	0,0283581	-0,0634595	0,0486447	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0197531	0,0283581	-0,0758052	0,036299	2,33333
concentracion*tiempo	0,0280864	0,0283581	-0,0279657	0,0841385	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0361111	0,0283581	-0,0921632	0,019941	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0410494	0,0283581	-0,0971015	0,0150027	2,33333
concentracion*tiempo	-0,0114198	0,0283581	-0,0674718	0,0446323	2,33333
concentracion*tiempo	0,0132716	0,0283581	-0,0427805	0,0693237	2,33333
concentracion*tiempo	-0,00648148	0,0283581	-0,0625336	0,0495706	2,33333
concentracion*tiempo	0,0256173	0,0283581	-0,0304348	0,0816694	2,33333
Parte de la planta*c	-0,0466049	0,0401045	-0,125875	0,0326647	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0490741	0,0401045	-0,128344	0,0301956	3,11111
Parte de la planta*c	0,0299383	0,0401045	-0,0493314	0,109208	3,11111
Parte de la planta*c	0,0225309	0,0401045	-0,0567388	0,1018	3,11111
Parte de la planta*c	0,0274691	0,0401045	-0,0518005	0,106739	3,11111
Parte de la planta*c	-0,00462963	0,0401045	-0,0838993	0,07464	3,11111
Parte de la planta*c	0,00771605	0,0401045	-0,0715536	0,0869857	3,11111
Parte de la planta*c	0,0561728	0,0401045	-0,0230968	0,135442	3,11111
Parte de la planta*c	0,0166667	0,0401045	-0,062603	0,0959363	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0228395	0,0401045	-0,102109	0,0564301	3,11111
Parte de la planta*c	-0,000617284	0,0401045	-0,0798869	0,0786523	3,11111
Parte de la planta*c	-0,032716	0,0401045	-0,111986	0,0465536	3,11111
Parte de la planta*c	0,0166667	0,0401045	-0,062603	0,0959363	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0154321	0,0401045	-0,0947017	0,0638375	3,11111
Parte de la planta*c	0,0367284	0,0401045	-0,0425412	0,115998	3,11111
Parte de la planta*c	0,100926	0,0401045	0,0216563	0,180196	3,11111
Parte de la planta*c	-0,042284	0,0401045	-0,121554	0,0369857	3,11111
Parte de la planta*c	-0,042284	0,0401045	-0,121554	0,0369857	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0521605	0,0401045	-0,13143	0,0271091	3,11111

Parte de la planta*c	-0,0101852	0,0401045	-0,0894548	0,0690844	3,11111
Parte de la planta*c	0,00216049	0,0401045	-0,0771091	0,0814301	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0299383	0,0401045	-0,109208	0,0493314	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0916667	0,0401045	-0,170936	-0,012397	3,11111
Parte de la planta*c	0,0243827	0,0401045	-0,0548869	0,103652	3,11111
Parte de la planta*c	0,0317901	0,0401045	-0,0474795	0,111106	3,11111
Parte de la planta*c	0,0737654	0,0401045	-0,0055042	0,153035	3,11111
Parte de la planta*c	0,0194444	0,0401045	-0,0598252	0,0987141	3,11111
Parte de la planta*c	-0,0126543	0,0401045	-0,0919239	0,0666153	3,11111

El StatAdvisor

Esta tabla muestra 95,0% intervalos de confianza para los coeficientes en el modelo.

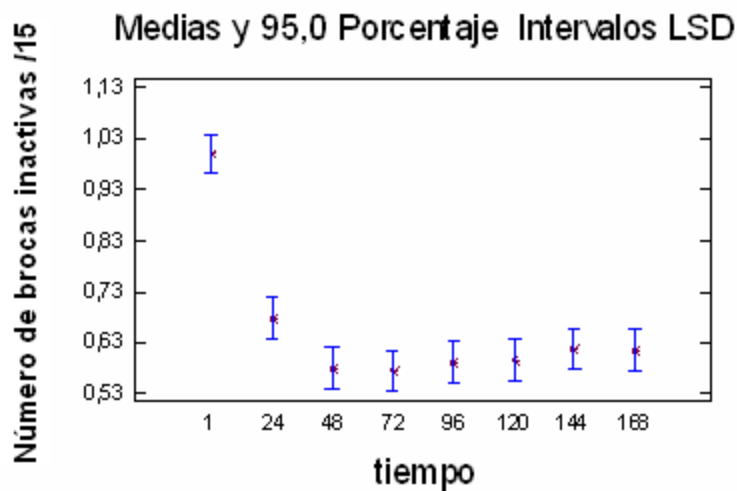
Los intervalos de confianza muestran la precisión con que pueden estimarse los coeficientes dada la cantidad de datos disponibles y el ruido que están presentes. También están incluidos los factores de inflación de la varianza, que pueden utilizarse para medir la extensión en la cual las variables pronosticadas están en correlación entre ellas. VIF por encima de 10, de los que hay 0, normalmente están considerados para indicar serias multicorrelaciones. Multicorrelaciones serias incrementa en gran medida el error de estimación de los coeficientes del modelo comparado con una muestra ortogonal.

Nivel	Recuento	Error Media	Límite Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
-------	----------	----------------	--------------------	--------------------	--------------------

Parte de la planta según concentración

1	500	24	0,608333	0,0227371	0,563392	0,653275
1	1000	24	0,519444	0,0227371	0,474503	0,564386
1	2000	24	0,683333	0,0227371	0,638392	0,728275
2	500	24	0,527778	0,0227371	0,482836	0,572719
2	1000	24	0,608333	0,0227371	0,563392	0,653275
2	2000	24	0,683333	0,0227371	0,638392	0,728275
3	500	24	0,708333	0,0227371	0,663392	0,753275
3	1000	24	0,758333	0,0227371	0,713392	0,803275
3	2000	24	0,813889	0,0227371	0,768947	0,858831

Nivel	Recuento	Error Media	Límite Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Parte de la planta según tiempo					
1	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
1	24	9	0,637037	0,0371295	0,563648 0,710426
1	48	9	0,525926	0,0371295	0,452537 0,599315
1	72	9	0,518519	0,0371295	0,445129 0,591908
1	96	9	0,525926	0,0371295	0,452537 0,599315
1	120	9	0,540741	0,0371295	0,467351 0,61413
1	144	9	0,540741	0,0371295	0,467351 0,61413
1	168	9	0,540741	0,0371295	0,467351 0,61413
2	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
2	24	9	0,548148	0,0371295	0,474759 0,621538
2	48	9	0,503704	0,0371295	0,430314 0,577093
2	72	9	0,533333	0,0371295	0,459944 0,606723
2	96	9	0,577778	0,0371295	0,504388 0,651167
2	120	9	0,562963	0,0371295	0,489574 0,636352
2	144	9	0,562963	0,0371295	0,489574 0,636352
2	168	9	0,562963	0,0371295	0,489574 0,636352
3	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
3	24	9	0,851852	0,0371295	0,778462 0,925241
3	48	9	0,711111	0,0371295	0,637722 0,784501
3	72	9	0,666667	0,0371295	0,593277 0,740056
3	96	9	0,674074	0,0371295	0,600685 0,747463
3	120	9	0,688889	0,0371295	0,615499 0,762278
3	144	9	0,748148	0,0371295	0,674759 0,821538
3	168	9	0,740741	0,0371295	0,667351 0,81413



Nivel	Recuento	Error Media	Límite Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Concentracion según tiempo					
500	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
500	24	9	0,666667	0,0371295	0,593277 0,740056
500	48	9	0,555556	0,0371295	0,482166 0,628945
500	72	9	0,518519	0,0371295	0,445129 0,591908
500	96	9	0,525926	0,0371295	0,452537 0,599315
500	120	9	0,548148	0,0371295	0,474759 0,621538
500	144	9	0,555556	0,0371295	0,482166 0,628945
500	168	9	0,548148	0,0371295	0,474759 0,621538
1000	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
1000	24	9	0,614815	0,0371295	0,541425 0,688204
1000	48	9	0,511111	0,0371295	0,437722 0,584501
1000	72	9	0,533333	0,0371295	0,459944 0,606723
1000	96	9	0,577778	0,0371295	0,504388 0,651167
1000	120	9	0,562963	0,0371295	0,489574 0,636352
1000	144	9	0,614815	0,0371295	0,541425 0,688204
1000	168	9	0,614815	0,0371295	0,541425 0,688204
2000	1	9	1,0	0,0371295	0,926611 1,07339
2000	24	9	0,755556	0,0371295	0,682166 0,828945
2000	48	9	0,674074	0,0371295	0,600685 0,747463
2000	72	9	0,666667	0,0371295	0,593277 0,740056
2000	96	9	0,674074	0,0371295	0,600685 0,747463
2000	120	9	0,681481	0,0371295	0,608092 0,754871
2000	144	9	0,681481	0,0371295	0,608092 0,754871
2000	168	9	0,681481	0,0371295	0,608092 0,754871

El StatAdvisor

Esta ventana muestra el número de brocas inactivas / 15 medio para cada nivel de los factores. También muestra el error estándar de cada media, que es una medida de su variabilidad en el muestreo. Las dos columnas que se encuentran más a la derecha muestran 95,0% intervalos de confianza para cada una de las medias.

Comparaciones múltiples para número de brocas inactivas / 15 según Parte de la planta

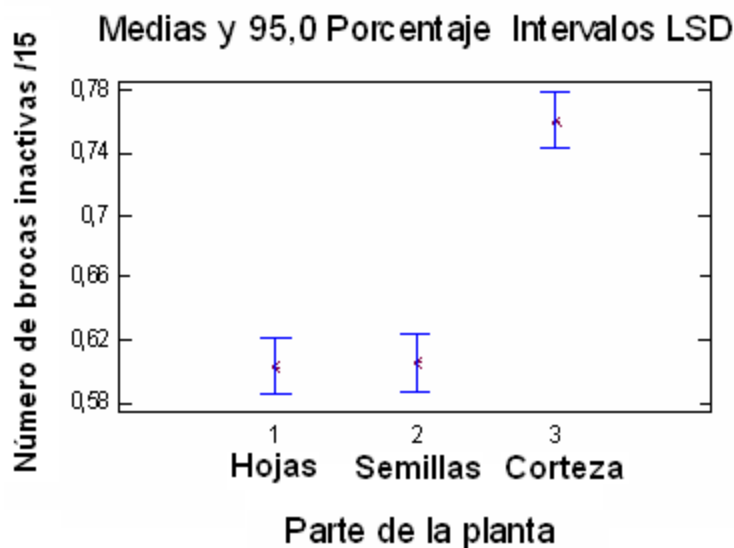
Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Recuento	LS Media	LS Sigma	Grupos Homogéneos
1	72	0,603704	0,0131273	X
2	72	0,606481	0,0131273	X
3	72	0,760185	0,0131273	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,00277778	0,0366947
1 - 3	*-0,156481	0,0366947
2 - 3	*-0,153704	0,0366947

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

El StatAdvisor



Esta tabla aplica un método de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de los resultados muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha puesto un asterisco al lado de 2 pares, indicando que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas al 95,0% de nivel de confianza. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos utilizando X alineadas en columnas. Dentro de cada columna, los niveles que contienen una X forman un grupo de medias entre las que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa. El método utilizado actualmente para diferenciar entre las medias es el procedimiento de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD). Con este método, hay

un 5,0% de riesgo de decir que los pares de medias son significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Resultados de la Regresión para número de brocas inactivas / 15

Ajustdos 95,0% CL	Error Estd.	Inf. 95,0% CL	Sup. 95,0% CL	Inf. 95,0% CL	Sup.
Fila	Valor	el Pronóstico	el Pronóstico	el Pronóstico	para Media para
Media					

El StatAdvisor

Esta tabla contiene información sobre número de brocas inactivas / 15 generados utilizando el modelo ajustado. Esta tabla incluye:

- (1) el valor predicho de número de brocas inactivas / 15 utilizando el modelo ajustado
- (2) el error estándar para cada valor pronosticado
- (3) 95,0% límites de predicción para observaciones nuevas.
- (4) 95,0% límites de confianza para la respuesta media

Cada ítem corresponde a los valores de las variables independientes en una fila específica de su archivo de los datos.

Puntos Influyentes para número de brocas inactivas / 15

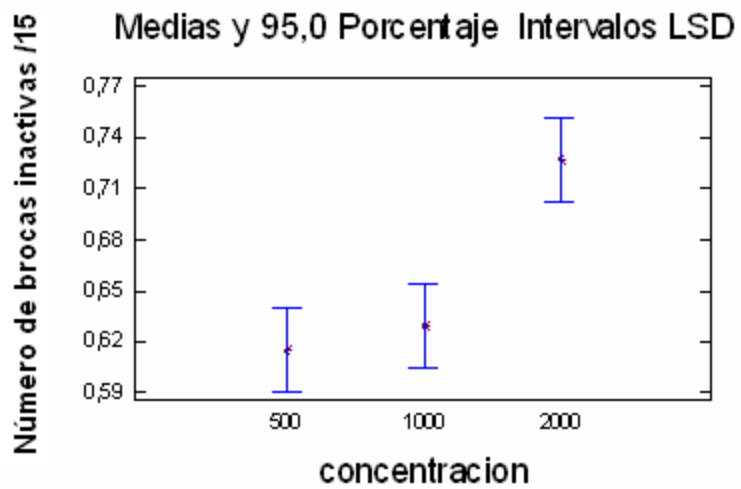
Fila	Influencia	Distancia Mahalanobis	DFITS	Distancia Cook's
14	0,333333	106,005	2,71219	0,0207297
15	0,333333	106,005	-1,57625	0,00746269
16	0,333333	106,005	-1,75857	0,00921319
17	0,333333	106,005	1,39603	0,00589644
23	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
25	0,333333	106,005	-1,75857	0,00921319
26	0,333333	106,005	1,39603	0,00589644
43	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
52	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
61	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
70	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
85	0,333333	106,005	-1,75857	0,00921319
88	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
109	0,333333	106,005	1,39603	0,00589644
110	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
121	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
130	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446

139	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
157	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
162	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
169	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
171	0,333333	106,005	-1,39603	0,00589644
180	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
189	0,333333	106,005	-1,21764	0,00451446
196	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
198	0,333333	106,005	-1,39603	0,00589644
205	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
207	0,333333	106,005	-1,39603	0,00589644
214	0,333333	106,005	1,21764	0,00451446
216	0,333333	106,005	-1,39603	0,00589644

Influencia media de un solo punto = 0,333333

El StatAdvisor

La tabla de puntos influyentes listas todas las observaciones que tienen valores de influencia superiores 3 veces el de un punto medio, o que tiene un valor extraordinariamente grande de DFITS o de distancia Cook's. La influencia es un estadístico que mide lo influyente que es cada observación para determinar los coeficientes del modelo estimado. DFITS es un estadístico que mide cuánto cambiarán los coeficientes estimados si se elimina cada una de las observaciones de la serie de datos. la distancia Cooks mide la distancia entre los coeficientes estimados con y sin cada una de las observaciones. En este caso, un punto medio tendría un valor de influencia igual a 0,333333. No hay ningún punto con más de 3 veces la influencia media Hay 30 puntos con valores extraordinariamente grandes de DFITS. No hay ningún punto valores extraordinariamente grandes de distancia de Cooks.



ANEXO 3. RESULTADOS ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Metabolito	Prueba	Color	Fracción	Observación	Testigo
					ácido tánico
Taninos	FeCl ₃	turbiedad naranja	(-)	No hay cambio representativo	(+++) Azul
	Acetato de Pb	turbiedad naranja	(-)	No se genera presipitado	(+++) pdo blanco
	Gelatina Sal	turbiedad naranja	(-)	No se genera presipitado	(+++) pdo Blanco gelatinoso

Flavonoides					Ginkgo Biloba
	Shinoda	naranja	(-)	Efervescencia sin cambio de color	(+++)rojizo
	Rosenhein	naranja	(-)	sin cambio representativo	(+++)interfase amilica café
Quinonas					Antraquinona, Hidroquinona
	Medio ácido	efervescencia y oscurecimiento del naranja	(-)	la intensidad del color siempre incrementa en medio ácido	(-) efervescencia sin coloración. (+)aparición leve amarillo no persistente
	Medio básico	coloración rosada	(-)	la muestra sin Zn se torna rosada	(+++) Coloración Amarilla-con el tiempo se oscurece a café. No manifiesta cambio de color.

Metabolito	Prueba	Color	Fracción	Observación	Testigo
Esteroles					Vitamina A 50,000u.i, Colesterol
	Libermann-Burchard	Naranja-café	(++)	cambio de color de naranja a café	(+++) Azul oscuro
	Karp-price	Leve verdoso	(++)	Al adicionar ácido sulfúrico cambio inmediato	(+++) violeta

					extracto comercial Zarzaparrilla
Saponinas	Rosenthaler				
	Hemólisis	Ppdo amarillento	(+++)	bajo lectura 100x se nota destrucción de los globulos rojos.	
	índice Espuma	espuma no persistente	(-)	Poca espuma y desaparece en menos de 5 minutos	(+++) espuma blanca persistente por más de 20 minutos
Cardiotónicos					B-metildigoxina
	Baljet	intensifica el naranja	(+)	Cambio inmediato en calentamiento	(+++)Sln rojo intenso 5812
	Kedde	naranja turbio	(+)	Variación de color muy leve	(+++) leve violeta no persistente
	Legal	calentando Sln marron	(+++)	coloración semejante al Patrón	(+++) calentando la sln cambia de amarillo a vino tinto.

Metabolito	Prueba	Color	Fracción	Observación	Testigo
Lactonas					Lanitop (B- metildigoxina)
Terpénicas	Hidroxamato férico	enturbia solución naranja	(-)	Al adicionar el tricloruro férrico no hay cambio	(+++)+Solución azul oscuro persistente

Azúcares					Sacarosa, B-metil-digoxina, glucosa
	Molish	interfase naranja	(-)	Interfase sin cambio de color	(+++) anillo violeta
	Tollens	negro-espejo	(+++)	Aparición de espejo a los 10 minutos de calentamiento	(+++) espejo de plata
	Fehling (azucar reductor)	leve pdo y flotantes rojizos	(+)	Fue necesario calentamiento arduo	(+++) Pdo naranja ladrillo

Metabolito	Prueba	Color	Fracción	Observación	Testigo
Alcaloides					Quinina
	Bourchardat	pdo. Café	(+++)	Precipitación inmediata persistente	(+++) Pdo.café
	Mayer	pdo. blanco	(+++)	Aparición del precipitado a 30s	(+++) Pdo.blanco
	Wagner	pdo. Marrón	(+++)	Precipitación inmediata persistente	(+++) Pdo.café
	Dragendorff	Pdo.naranja	(+++)	Se torna mas intenso la solución naranja	(+++) Pdo.naranja
	Hager	Pdo.naranja	(+++)	Precipitación inmediata persistente	(+++) Pdo.amarillo blancusco
	Schleiber	Pdo.naranja claro arenoso	(+++)	Precipitación inmediata persistente	(+++) Pdo. Blanco hueso