



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Perfil químico de volátiles en hojas de *Acaciella angustissima* (Mill), planta hospedera de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae)

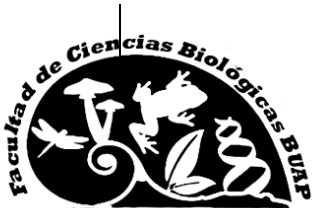
Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Noe Yamil Pages Paez

DIRECTOR: Angel Alonso Romero López



ABRIL, 2021

“No quiero creer, quiero saber”

-Carl Sagan

Agradecimientos

Agradezco a mi abuela Lilia Paez por ser mi musa y por el amor incondicional que me diste. Agradezco a mi madre Jouselyn Pages por los esfuerzos para que yo pudiera culminar este logro, y por enseñarme a soñar, eternamente agradecido con ustedes.

Gracias a mis hermanas, Karla Pages, por enseñarme de carácter y a Nory L. Pages por cuidarme, las amo. De igual manera a toda mi familia; Pages Paez, Pages García, Gallegos y Rosales, por sus buenos deseos y por sus ánimos, espero poder seguir aprendiendo de ustedes.

Gracias a todos mis amigos que igualmente son familia; Crasborn Herrera, López Michua, Mora Torres y Juárez por ser parte siempre de mí historia.

Gracias a Oscar Torres por darme la mano cuando lo necesite.

Al Dr. Angel Alonso Romero López por transmitirme su conocimiento y su dedicación a lo largo de este proyecto, de igual manera y no menos importante, agradecer el buen trato dentro y fuera de las instalaciones, por brindarme su confianza y su amistad.

A la M. en C. Ma. Concepción López Téllez, que a lo largo de sus cursos me hizo entender que siempre hay que mejorar en cada paso que damos. También por ser parte de este proyecto y apoyarme. Agradezco su amistad y su tiempo.

Al M. en C. Alan Carballo Carrasco por dedicarme el tiempo, sus conocimientos y las instalaciones, aparte de ser un gran amigo en todo este proceso.

A mi asesor técnico el Lic. en Biotecnología, J. Alberto Rojas Morales, por su dedicación total y apoyo que me brindo de inicio a fin y por su amistad.

Al M. en C. Guillermo Rueda Luna por aceptarme de inicio en la licenciatura y al apoyo que me dio en cada paso que di, cada libro, cada enseñanza, cada palabra, cada risa.

A mis compañeros y amigos del “infogrupo”: Fernanda, Xóchitl, Alice, Zaira, Francisco, Gabriela, por ayudarme y por sus buenos consejos,

Gracias a la Dra. A. Berenice Silva Gómez y a la secretaria Ariadna Arzate Valdés, por su gran amistad y apoyo a lo largo de toda la carrera.

Contenido

Resumen	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes.....	11
2.1. COVs	11
2.2. Metabolitos secundarios	12
2.2.1. Cumarinas	12
2.2.2. Lactonas	13
2.2.3. Xantinas.....	13
2.2.4. Flavonoides	14
2.2.5. Saponinas.....	15
2.2.6. Esteroides.....	15
2.2.7. Alcaloides	16
2.2.8. Insaturaciones.....	17
2.2.9. Azúcares.....	17
2.3. Ámbito cultural, aceites esenciales	18
2.4. Principales métodos de extracción e identificación de COVs	19
2.4.1. Destilación por arrastre de vapor	20
2.4.2. Extracción con disolventes.....	20
2.4.3. Método de Clevenger.....	21
2.7.2. Ecología química en Melolonthidae.....	24
2.7.3. Interacciones Melolonthidae-plantas mediadas por COVs	25
2.7.4. <i>Macrodactylus</i>	26
2.8. Modelo de estudio.....	27
2.8.1. <i>Acaciella angustissima</i>	27
2.8.2. <i>Macrodactylus mexicanus</i> como principal insecto visitador de <i>Acacia Angustissima</i>	28
3. Justificación	30
4. Hipótesis.....	32
5. Objetivos.....	32
5.1. Objetivo general.....	32

5.2. Objetivos particulares	32
6. Material y métodos.....	32
6.1. Zona de estudio y muestreo.....	32
6.2. Pruebas fitoquímicas	33
6.3. Extracción de COVs.....	34
6.4. CG-EM.....	35
6.5. Estudios <i>in silico</i>	35
Figura 15. Estructuras de α -pineno, β -mirceno y β -ionona, ligandos evaluados para estudios de Docking.....	36
7. Resultados.....	36
7.1. Pruebas fitoquímicas	36
7.2. Extracción e identificación de COVs	37
7.3. Estudios <i>in silico</i>	40
8. Discusión.....	46
9. Conclusiones	48
10. Literatura citada	49

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ejemplos de volátiles en diferentes familias de plantas (Martínez, 2001). 19	
Cuadro 2. Principales pruebas fitoquímicas empleadas para cada metabolito secundario.	22
Cuadro 3. Plantas hospederas de adultos de <i>Macroductylus</i> registradas en Guatemala y México (Arce-Pérez y Morón, 2012).....	29
Cuadro 4. Pruebas fitoquímicas para identificar metabolitos secundarios en hojas de <i>A. angustissima</i>	34
Cuadro 5. Proteínas evaluadas para estudio de ligandos encontrados en COVs de hojas de <i>A. angustissima</i>	35
Cuadro 6. Metabolitos secundarios presentes y con mayor abundancia en COVs de hojas de <i>A. angustissima</i> . Pruebas por triplicado, +++: presencia abundante, ++: presencia regular, +: presencia débil.	37
Cuadro 7. Composición química de los COVs de hojas de <i>A. angustissima</i> recolectadas en temporada invernal.	40

Cuadro 8. Valores de energía de acoplamiento de cada ligando calculados en el acoplamiento de Docking, como parte de los estudios bioinformáticos efectuados con parte de los COVs de hojas de <i>A. angustissima</i> .	40
---	----

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de algunos terpenos: β -ionona (homoterpeno), β -mirceno (monoterpeno) y α -farneseno (sesquiterpeno).	12
Figura 2. Estructura de la umbeliferona y escopoletina.	13
Figura 3. Estructura de la helenalina y grandinólida.	13
Figura 4. Estructura de la cafeína y teofilina.	14
Figura 5. Estructura de la quercetina y hesperidina.	14
Figura 6. Estructura de la dioscina y ácido oleanico.	15
Figura 7. Estructura de la ecdisona y prednisona.	16
Figura 8. Estructura de la morfina y protopina.	16
Figura 9. Estructura del limoneno y α -pineno.	17
Figura 10. Estructura de la glucosa y fructuosa.	18
Figura 11. Equipo de hidrodestilación Clevenger modificado empleado para la extracción de volátiles de hojas de <i>A. angustissima</i> .	21
Figura 12. Árbol de <i>A. angustissima</i> , ubicado en Cerro Zapotecas, Puebla.	28
Figura 13. Coleóptero adulto de <i>M. mexicanus</i> recolectado en la zona de estudio, Cerro Zapotecas, Puebla.	30
Figura 14. Ubicación del Cerro Zapotecas, San Pedro Cholula, Puebla, zona de recolecta del material obtenido de árboles de <i>A. angustissima</i> .	33
Figura 15. Estructuras de α -pineno, β -mirceno y β -ionona, ligandos evaluados para estudios de Docking.	36
Figura 16. Prueba fitoquímica para insaturaciones.	37
Figura 17. Cromatograma de COVs identificados en hojas de <i>A. angustissima</i> recolectadas en el periodo posterior a la actividad de los adultos de <i>M. mexicanus</i> en el Cerro Zapotecas.	39
Figura 18. Resultados de la proteína 1OW4 con superposición de ligandos.	41
Figura 19. Resultados de la proteína 3OGN con superposición de ligandos.	41
Figura 20. Resultados de la proteína 2ERB con superposición de ligandos.	42
Figura 21. Resultados de la proteína 3Q8I con superposición de ligandos.	42

Figura 22. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 1OW4. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.	43
Figura 23. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 3OGN. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.	44
Figura 24. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 2ERB. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.	45
Figura 25. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 3Q8I. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.	46

Abreviaturas

µm: micrómetro

°C: Celsius

aa: aminoácido

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

COVs: Compuestos orgánicos volátiles

g: gramo

Kcal/mol: kilocaloría sobre mol

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetro

m: metro

h: hora

Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son sustancias emitidas por diferentes partes de las plantas y resultan fundamentales para establecer interacciones con los insectos. Los COVs son mediadores clave en los esquemas de comunicación química de varias especies de coleópteros Melolonthidae, incluyendo su comunicación con sus plantas hospederas, esto es actualmente foco de atención para elucidar la identidad de los compuestos químicos que provocan las respuestas comportamentales de los coleópteros adultos de integrantes del género *Macrodactylus*. En este estudio se obtuvo el perfil químico de COVs de hojas de *Acaciella angustissima* Mill. (Fabaceae), identificada aquí como planta hospedera de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, en primer lugar se realizaron pruebas fitoquímicas para poder ver presencia de metabolitos secundarios y qué tipo de metabolitos estaban contenidos en sus hojas, de esta forma se identificaron los metabolitos secundarios de las hojas de *A. angustissima* (cumarinas, lactonas, xantinas, alcaloides, esteroides, insaturaciones, saponinas y azúcares) y los de interés en la comunicación química (insaturaciones), posterior a esto se decidió extraer los volátiles líquidos de las hojas mediante la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor con sistema Clevenger modificado, y posteriormente identificar la estructura química y el porcentaje de cada uno de los metabolitos contenidos en los volátiles. Con base en análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se detectaron tres picos de mayor abundancia que se identificaron como β -mirceno, α -pineno y grasas vegetales de bajo peso molecular, con tiempos de retención de 7.74, 17.10 y 39.41 minutos respectivamente. Las dos moléculas que presentaron la mayor abundancia en el extracto volátil fueron utilizadas para llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular, utilizando cuatro proteínas de transporte (1OW4,3 OGN,3Q8I y 2ERB) relacionados con recepción por parte de los insectos para determinar su afinidad a dichas proteínas, comparándolas con una molécula de referencia (β -ionona) y así ver la interacción con los COVs, la energía de acoplamiento y la posición de estos ligandos con resultados menores a nuestra molécula de referencia en todos los casos. Dando una aproximación de si β -mirceno y α -pineno tienen la función de ser mensajeros químicos para *M. mexicanus* por la energía de acoplamiento y posición de los ligandos en las proteínas utilizadas.

1. Introducción

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son mezclas complejas de muchos componentes químicos que representan pequeñas cantidades con respecto al peso total de la planta, sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al estar expuestos al aire o temperatura ambiente (Vaughn, 2001; Pichersky, 2004; Dudareva y Negre, 2005), en la mayoría de los casos, a temperatura ambiente, los COVs de las plantas son gases; algunos son emitidos por las plantas especialmente de las partes vegetativas cuando están expuestas a estímulos, ya sean bióticos o abióticos (Scala *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2016), estos también influyen a su vez en la dinámica de comunidades al inducir señalizaciones entre más miembros de una comunidad (Dicke y Baldwin, 2010; Stam *et al.*, 2014; Mofikoya *et al.*, 2017). Los COVs forman parte del metabolismo secundario de las plantas, siendo fracciones líquidas que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas (Cerutti *et al.*, 2004). Además de estudiar las interacciones que establecen las plantas con otros seres vivos a partir de la liberación de estas sustancias, es posible complementar la información con el análisis de los receptores proteínicos asociados a los COVs emitidos por las plantas, ya que, las proteínas de unión a COVs son las principales proteínas olfativas periféricas involucradas en la percepción de estas sustancias en los insectos (Leal, 2013), siendo moléculas solubles presentes en la linfa (Gu *et al.*, 2013). Estas proteínas se caracterizan por presentar en su estructura seis residuos de cisteína conservados unidos por tres puentes disulfuro (Pelosi, 1998) y seis hélices α que forman una cavidad para la unión del ligando (Leite *et al.*, 2009). Asimismo, son estructuras que funcionan como portadores de moléculas lipofílicas asociadas a los receptores olfativos (Wang *et al.*, 2013a, b) y están vinculadas al reconocimiento de los COVs en el proceso olfativo (Biessmann *et al.*, 2010).

En años recientes se han llevado a cabo estudios sobre dichas sustancias químicas y su relevancia para actividades sexuales y de alimentación de los coleópteros Melolonthidae (Romero-López, 2016), insectos que en su estado larvario y adulto se consideran de importancia ecológica y agrícola (Morón *et al.*, 2014). En particular, el interés se centra en las interacciones Melolonthidae-planta hospedera y los volátiles involucrados en ellas (Nieves-Silva y Romero-López, 2016). Por ello, en el presente trabajo se pretende obtener el perfil químico de los COVs de hojas de *A. angustissima* Mill., (Fabaceae), planta hospedera de coleópteros adultos de *M. mexicanus* e identificar qué compuestos volátiles podrían estar involucrados en esta interacción. También se plantea el estudio de la unión de estos compuestos a determinadas proteínas receptoras de unión, en particular el β -mirceno y el α -pineno y así dar una idea de cómo se está llevando a cabo la recepción de la información química. Con todo ello, se complementa el

esquema de comunicación química de los coleópteros Melolonthidae y su relación con las plantas hospederas.

2. Antecedentes

2.1. COVs

Las plantas producen metabolitos secundarios que tienen relación con el ambiente, entre ellas y con otros organismos (Taiz *et al.*, 2017), una manera de producirlos y que estén interactuando de manera constante en el ambiente y con otros organismos es mediante los COVs (Owen y Peñuelas, 2005). Los COVs emitidos por las plantas son generalmente una mezcla de varios compuestos y representan una cantidad mínima con respecto al peso total de la especie vegetal (Vaughn, 2001; Pichersky, 2004; Dudareva y Negre, 2005), los volátiles de plantas son producidos principalmente en las flores, pero también se encuentran en los frutos, tallos, hojas y raíz (Chen *et al.*, 2004; Steeghs *et al.*, 2004); son importantes como mecanismos de defensa para repeler insectos o detener la colonización por bacterias y hongos patógenos, para promover la reproducción al atraer polinizadores o dispersores de semilla o como mensajeros intraespecíficos e interespecíficos (Marín y Céspedes, 2007; Ángeles *et al.*, 2012; Dicke *et al.*, 2017). Los COVs están involucrados en una amplia clase de funciones ecológicas, como consecuencia de las interacciones de las plantas con factores bióticos y abióticos y actuando como señales en la comunicación planta-planta, planta-ambiente y planta-animal (Holopainen y Gershenzon 2010, Vivaldo *et al.*, 2017).

Los terpenos son los metabolitos secundarios más relevantes, representando el grupo más diverso de compuestos volátiles, los cuales se clasifican de acuerdo con el número de carbonos en su cadena, incluidos hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), homoterpenos (C₁₁ y C₁₆), algunos diterpenos (C₂₀) y triterpenos (C₃₀) (Heil y Karban, 2010; Scala *et al.*, 2013; Vivaldo *et al.*, 2017), seguidos de los derivados de ácidos grasos tanto saturados como insaturados, derivados aromáticos, aunque también se han reportado sustancias azufradas y nitrogenadas (Knudsen, 1993; Dudareva *et al.*, 2004). Su producción ocurre en las mismas rutas biosintéticas de metabolitos secundarios no volátiles, lo que explica su diversidad. Esta producción de COVs se da por tres rutas biosintéticas. La primera, conocida como la vía de los ácidos grasos/lipooxigenasa (Paré y Tumlinson, 1996) o vía de los volátiles de hojas verdes (VHV) dan el olor característico a estas. En general, los VHV son liberados cuando las hojas son dañadas mecánicamente y cada compuesto volátil de seis carbonos (C₆) tiene un olor característico. La segunda ruta biosintética es la que da origen a los terpenos y se lleva a cabo a través de dos alternativas, una en donde hay mevalonato y otra en donde no lo hay (Rohmer o de la deoxi-xilulosa-4-fosfato). La mayoría de los terpenos conocidos se deriva de estas alternativas y son los homoterpenos (p. e., iononas, 6-metil-5-hepten-2-ona, geranil acetona)

(Figura 1), monoterpenos (p. e., linalool, limoneno, mirceno, trans- β -ocimeno) (Figura 2), sesquiterpenos (α - farneseno, nerolidol, cariofileno) (Figura 3) y diterpenos (cembreno, fitol) (Knudsen *et al.*, 1993).

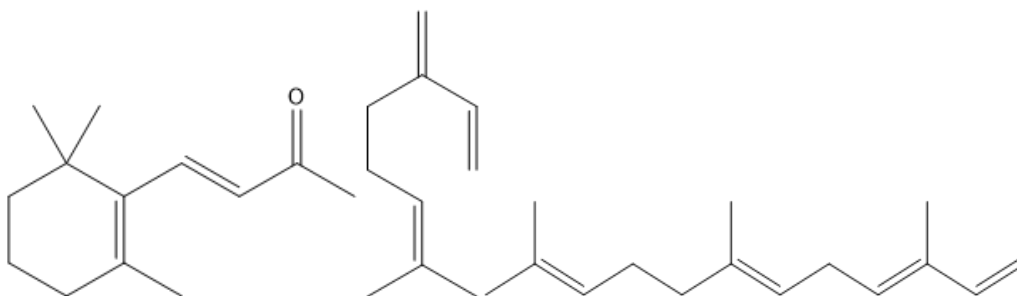


Figura 1. Estructura química de algunos terpenos: β -ionona (homoterpeno), β -mirceno (monoterpeno) y α -farneseno (sesquiterpeno).

2.2. Metabolitos secundarios

Las plantas, a diferencia de otros organismos, destinan una cantidad del carbono asimilado y de su energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa dentro de su metabolismo primario y a las cuales se les denomina metabolitos secundarios, estos se sintetizan en cantidades pequeñas y no de forma generalizada (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

2.2.1. Cumarinas

Así se les da nombre a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales, teniendo propiedades biológicas en el sistema vascular tanto arterial como venoso y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopirán-2-ona (Cañete, 2010); son frecuentes en integrantes de Fabaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Umbeliferae, Apocinaceae, Compositae, Orquidaceae, Rutaceae y Labiatae (López, 2007). Se identifican cualitativamente por medio de la prueba básica acuosa (Ikan, 1996). Se caracterizan por contar en su estructura con un hidroxilo en posición siete, libre o combinado (Figura 2).

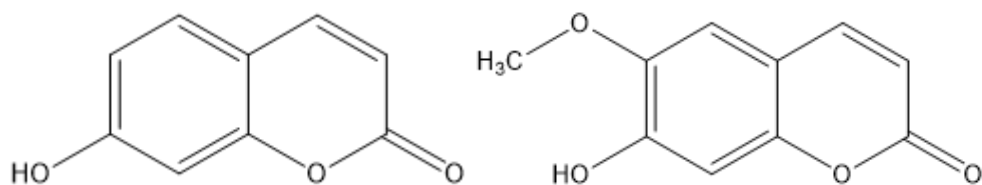


Figura 2. Estructura de la umbeliferona y escopoletina.

2.2.2. Lactonas

Se encuentran en numerosas especies o familias de plantas como Asteraceae, Apiaceae, Lauraceae y Magnoliaceae. Tienen un amplio espectro de actividades biológicas como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacterial, antimalaria y actividad neurotóxica y alérgica. Se utiliza la prueba cualitativa básica etanolica. Se caracterizan por contar en su estructura con un anillo lactónico (Figura 3).

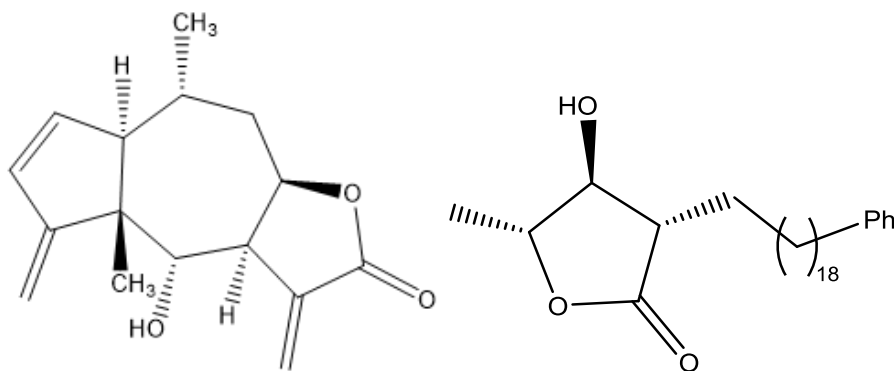


Figura 3. Estructura de la helenalina y grandinolida.

2.2.3. Xantinas

Grupo de principios activos de naturaleza alcaloidea de origen natural, derivados de la purina. Son sustancias que se distribuyen en la naturaleza de manera peculiar; están presentes en seis géneros de plantas pertenecientes a cinco familias diferentes Rubiáceas, Teáceas, Esterculiáceas, Aquifoliáceas y Sapindáceas (Lean *et al.*, 2012). Para detectar su presencia se efectúa la prueba colorimétrica de NH_4OH . Una vez obtenida la coloración se adiciona hidróxido de amonio en disolución acuosa, considerándose positiva si se aprecia la aparición de un anillo de color violeta. Se caracterizan por contar con una estructura cristalina y provenir del anillo de la purina (Figura 4).

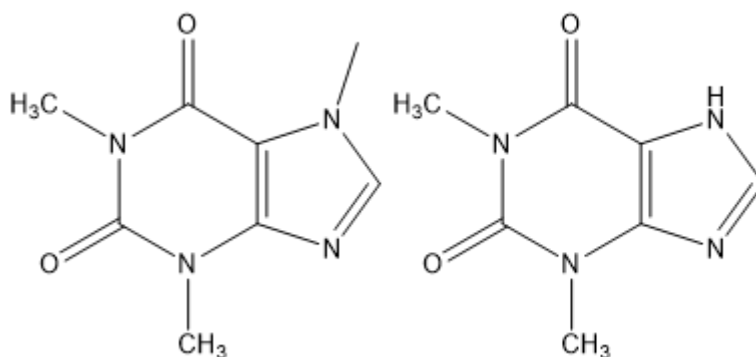


Figura 4. Estructura de la cafeína y teofilina.

2.2.4. Flavonoides

Pertencen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo (Figura 5). Se hallan presentes en varias partes de la planta y se ven más presentes las clases más comunes, como las flavonas y los flavonoles, en familias como Ginkgoaceae y Passifloraceae (López-Luego, 2002) presentando actividades biológicas como antiinflamatorias, antialérgicas, antiulcerogénicas y también con ciertos colores en las partes florales (Lock *et al.*, 2006). Para su identificación se utiliza la prueba de Shinoda, en la cual se considera como resultado positivo si se aprecia la formación de coloraciones rojizas a violetas.

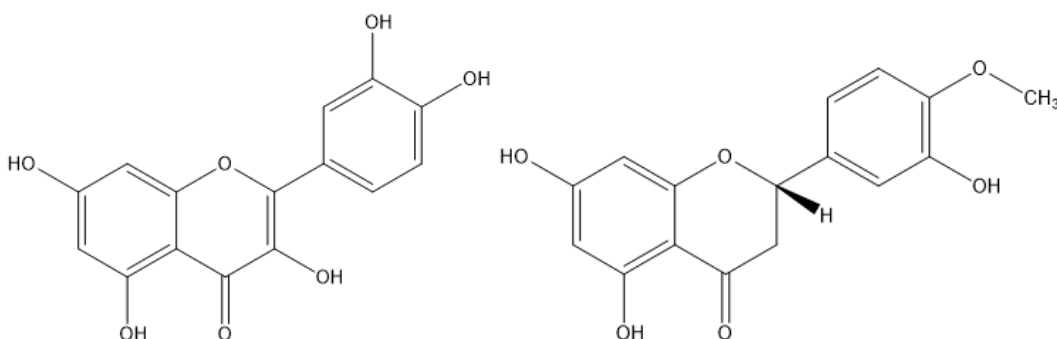


Figura 5. Estructura de la quercetina y hesperidina.

2.2.5. Saponinas

Son glicósidos hidrosolubles con propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfipática. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto piscida, insecticida, anti-protozoos, antiinflamatorio, antiagregante plaquetario, broncolítico, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias (Guirado, 2005; Suhagia *et al.*, 2011). Se detecta su presencia mediante la prueba de espuma colocando la muestra en agua destilada a 65° C e inmediatamente se agita hasta que haya formación de espuma. Se caracterizan por contar en su estructura con un anillo esteroideal que le da propiedades anfipáticas (Figura 6).

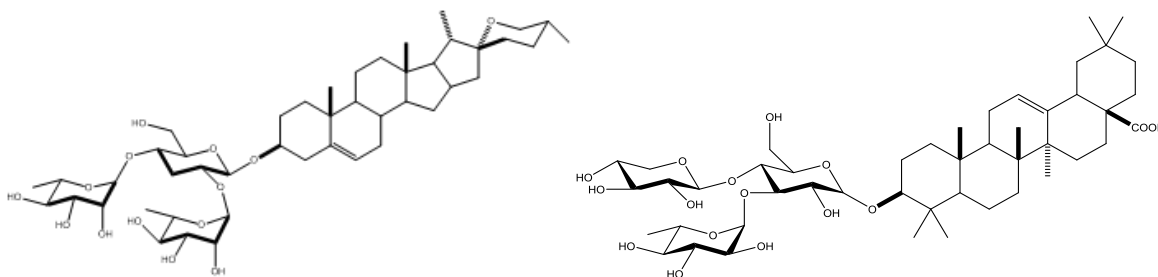


Figura 6. Estructura de la dioscina y ácido oleanico.

2.2.6. Esteroides

Son compuestos que poseen un esqueleto de ciclopentano[α]fenantreno, esto es, un conjunto de cuatro ciclos formado por escualeno (Figura 7) y están ampliamente distribuidos en las plantas, están involucrados en la síntesis de una gran variedad de esteroides y se caracterizan por llevar a cabo funciones biológicas hormonales, como el crecimiento vegetal (Bajguz, 2003) presentes en familias como Acanthaceae y Apocynaceae (Li *et al.*, 2007). Para su identificación se utiliza la prueba de Liebermann-Buchard la cual oxida el esqueleto esteroideal dando como resultado colores característicos.

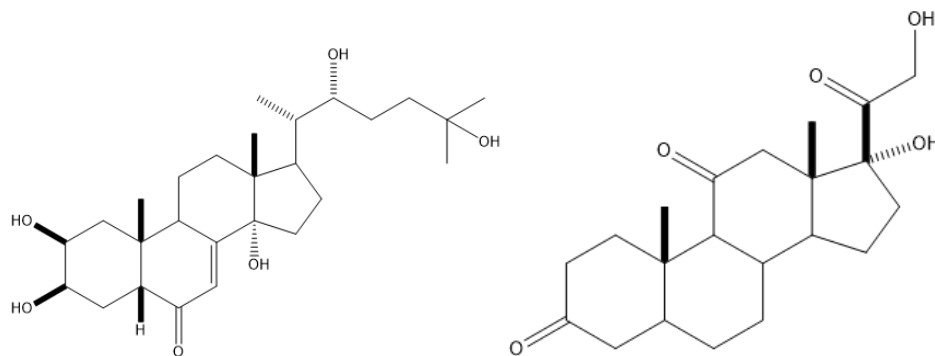


Figura 7. Estructura de la ecdisona y prednisona.

2.2.7. Alcaloides

Se los considera como depósitos para síntesis proteicas y estimulantes o reguladores de actividades como el crecimiento, metabolismo y reproducción, presentes en familias como Papaveraceae, Rubiaceae y Solanaceae (Martinez-Lombardo y Cano-Ortiz, 2009). Además, Albornoz (1980, citado por Miño, 2007) aclara que estos compuestos actúan como núcleos de coenzimas u hormonas y como fuentes desintoxicantes en procesos de metilación. Para su identificación, a menudo se utiliza la técnica de Dragendorff (Sierra *et al.*, 2018), que mediante la acidulación de la muestra y posterior adición del reactivo se esperan precipitados de color naranja-rojizo, siendo positivo para alcaloides. Se caracterizan por contar en su estructura generalmente hecha por anillos complejos y un nitrógeno heterocíclico (Figura 8).

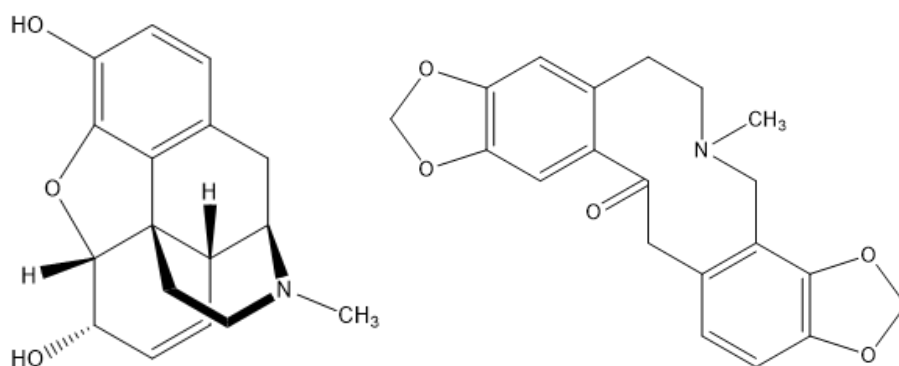


Figura 8. Estructura de la morfina y protopina.

2.2.8. Insaturaciones

Son hidrocarburos que presentan dobles enlaces en sus estructuras (Figura 9); se sintetizan en casi todas las plantas tales como Apiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Piperaceae, Verbenaceae y Rutaceae (Simões *et al.*, 2003), presentando actividad biológica como atrayentes de insectos o repelentes y un amplio uso en la industria cosmética y alimentaria (Irchhaiya *et al.*, 2014). Se identifican a partir de la prueba KMnO_4 , en la cual debe observarse un cambio de coloración de violeta intenso a pardo.

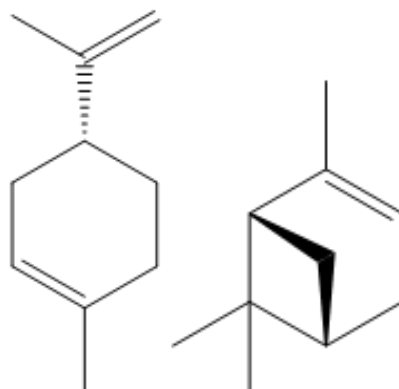


Figura 9. Estructura del limoneno y α -pineno.

2.2.9. Azúcares

Constituyen la mayor parte de la materia orgánica y promueven varias funciones en los seres vivos. Son compuestos que sirven como almacenes de energía, combustibles e intermediarios metabólicos. Pueden liberar con rapidez glucosa, el combustible energético primario indispensable para las funciones celulares (Cárabez y Chavarría, 2013). Se identifican con la prueba de β -naftol/ H_2SO_4 ; la formación de un anillo coloreado en la interfase es señal de azúcares. Se caracterizan por contar en su estructura con una organización cíclica y con dos o más grupos hidroxilos (Figura 10).

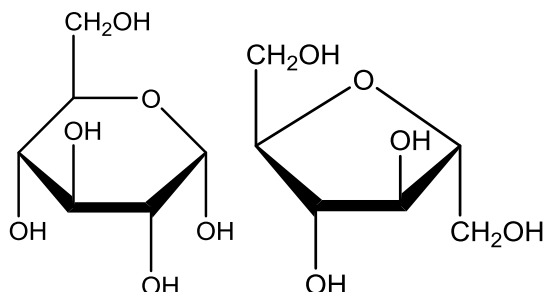


Figura 10. Estructura de la glucosa y fructuosa.

2.3. Ámbito cultural, aceites esenciales

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por las plantas, se encuentran los aceites esenciales, que son compuestos químicos que a temperatura ambiente se presentan como líquidos y son altamente volátiles; son una mezcla de hidrocarburos saturados y no saturados, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y terpenos (Ali *et al.*, 2015). Los aceites esenciales son sustancias naturales contenidas en glándulas microscópicas de las plantas (Martínez, 2003). Los aceites esenciales constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta; líquidos casi insolubles en agua, solubles en alcohol y otros disolventes orgánicos; generalmente son incoloros cuando están frescos, aunque al oxidarse se tornan de color amarillento oscuro (López-Luengo, 2004).

A los aceites esenciales se les puede encontrar en las diferentes partes de la planta, tales como las hojas, raíces, el pericarpio del fruto, las semillas, el tallo, las flores y los frutos (Martínez, 1996); estos son sintetizados, almacenados y liberados al ambiente por medio de estructuras secretoras como tricomas, glándulas, cavidades secretoras, idioblastos y otros (Gershenzon, 1994). En su gran mayoría son compuestos de olor agradable, aunque algunos como los que están presentes en el ajo y la cebolla presentan olores desagradables debido a la presencia de compuestos azufrados (Martínez, 1996). Dependiendo de la especie, se calcula que un aceite esencial puede contener entre 50 a 300 compuestos químicos (Stashenko, 2009). Algunos aceites son casi monomoleculares, ya que poseen casi en exclusiva un solo componente, mientras que otros son ricos en dos o tres moléculas; sin embargo, la mayoría de los aceites esenciales son polimoleculares debido a que contienen de tres a cuatro moléculas mayoritarias y cierto número de moléculas minoritarias, que en ocasiones son centenares de moléculas diferentes que sólo están presentes en trazas (López, 2004).

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios como la consistencia, el origen y la naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia, estos aceites se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, como el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, estoraque, etc. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos

muy viscosos o sustancias semisólidas como el caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc, (Martínez, 1996). También se pueden clasificar de acuerdo con el origen que presentan: 1) naturales, obtenidos directamente de la planta sin sufrir modificaciones físicas o químicas y 2) artificiales, obtenidos a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes; son productos con base en síntesis química (Martínez, 2003). Su producción en las plantas está regulada fisiológica, bioquímica, metabólica y genéticamente. La regulación fisiológica es altamente susceptible a ser modulada a través del ambiente (Sangwan *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales son producidos en mayor parte por especies vegetales de las familias Apiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Piperaceae, Verbenaceae y Rutaceae (Simões *et al.*, 2003). Este tipo de mezclas tienen funciones variadas en las plantas, como es la protección frente a insectos fitófagos y la adaptación frente al estrés hídrico, entre otros, además de que son de gran importancia en la polinización, debido a que constituyen elementos de comunicación química por su volatilidad y pronunciado aroma (López-Luengo, 2004).

Cuadro 1. Ejemplos de volátiles en diferentes familias de plantas (Martínez, 2001).

Familia	Por composición química	Ejemplos de volátiles
Lamiaceae	monoterpenoides	Limoneno β-Mirceno
Asteraceae	monoterpenoides	
Rutaceae	monoterpenoides	
Pinaceae	sesquiterpenoides	α-farneseno
Fabaceae	sesquiterpenoides	
Apiaceae	fenilpropanoides	Ácido cinámico
Lauraceae	fenilpropanoides	

2.4. Principales métodos de extracción e identificación de COVs

La extracción de los COVs, volátiles líquidos o aceites esenciales puede llevarse a cabo por métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor, extracción con disolventes, hidrodestilación y a través del llamado headspace. En la actualidad adquiere gran importancia la extracción con fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono como disolvente y extracción por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (Guerra, *et al.*, 2004; Chemat *et al.*, 2006).

2.4.1. Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor se lleva a cabo la vaporización selectiva de los componentes volátiles de una matriz sólida, que puede ser vegetal, permitiendo la transferencia de los componentes más volátiles a la fase vapor. Existe una gran diferencia entre una destilación simple a una por arrastre de vapor, ya que en el arrastre de vapor no se presenta un equilibrio de fases líquido-vapor entre los dos componentes a destilar como se da en la destilación simple. Por lo tanto, en el arrastre de vapor nunca estará presente el componente no volátil, mientras esté destilando el volátil. Además, en la destilación por arrastre de vapor el destilado obtenido será puro en relación con el componente no volátil (aunque requiera de una decantación para ser separado del agua), algo que no sucede en la destilación simple, en la cual el destilado sigue presentando ambos componentes, aunque más enriquecido en alguno de ellos. La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos y ofrece rendimientos bajos en comparación con otros métodos (Sefidkon *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Da Porto *et al.*, 2009).

2.4.2. Extracción con disolventes

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como etanol y cloroformo, para polares y hexano o eter de petróleo para poco polares, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro (Martínez, 2003). Por ende, los extractos suelen ser más complejos, ya que además arrastran pigmentos, también la solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o a vacío. Los restos de disolvente deben separarse a temperatura baja (Ortuño, 2006). Con estos procedimientos se obtienen masas viscosas según la materia prima que contienen el aceite esencial, grandes cantidades de ceras, resinas y pigmentos que se eliminan realizando extracciones con alcohol, enfriado a -13°C , filtrando y evaporando el alcohol (Ortuño, 2006). Los métodos más usados a nivel laboratorio son extracción por reflujo y mediante equipo Soxhlet (Thongson *et al.*, 2004; Proestos y Komaitis, 2006). Otro tipo de extracción por disolventes, mayormente usada a nivel laboratorio, es la maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos definidos. Los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol a presión

reducida. (Chua *et al.*, 2008). Para la extracción de terpenoides, el diclorometano se usa específicamente para su obtención (Prashant *et al.*, 2011).

2.4.3. Método de Clevenger

El método Clevenger (Figura 13), recibe el nombre gracias al inventor de la técnica e instrumentación, usado en muchos laboratorios y considerados en varios estándares internacionales como el más adecuado para la determinación del contenido total de aceite esencial de una planta aromática. El equipo está compuesto de un reservorio, donde se deposita la materia prima molida y agua destilada. Se calienta de forma uniforme de tal manera que el aceite esencial junto con el agua presente en la mezcla vegetal se evaporará continuamente. Un condensador va acoplado al reservorio y una conexión en forma de “D”, lo cual permite acumular y separar el aceite de la mezcla condensada. Las ventajas de este equipo son su simplicidad y flexibilidad para trabajar con volátiles de diferentes densidades y naturaleza. Además, el hecho de estar triturada la materia vegetal genera que los volátiles estén disponibles para la vaporización y arrastre. La única desventaja es el tiempo de extracción excesivo, debido a que se busca agotar todo el aceite contenido en la planta (Cerpa, 2007).

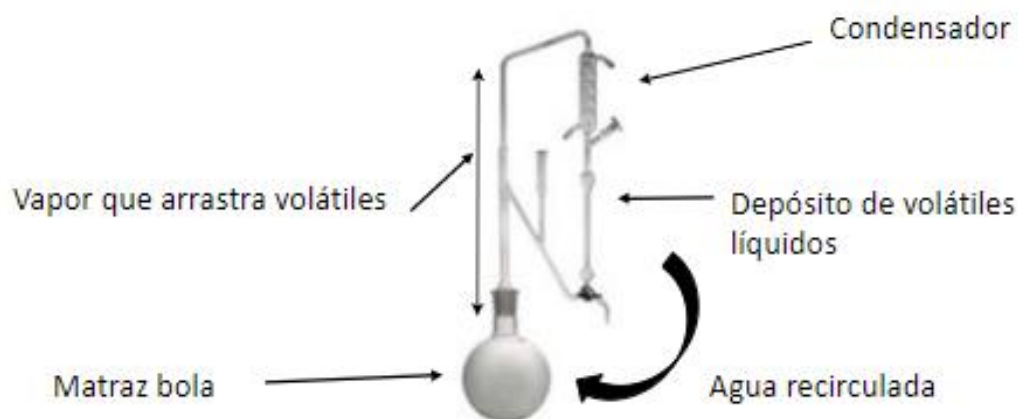


Figura 11. Equipo de hidroddestilación Clevenger modificado empleado para la extracción de volátiles de hojas de *A. angustissima*.

2.5. Pruebas fitoquímicas y CG-EM

Las pruebas fitoquímicas son pruebas importantes para la determinación de los metabolitos secundarios en plantas, ya sea en hojas, flores, raíces y tallo. Estas consisten en la trituración de materia vegetal y la aplicación de disolventes o soluciones reactivas para la determinación de grupos específicos de metabolitos secundarios. Sus resultados son cualitativos, y se basan en base al cambio de color en la muestra al estar presente el metabolito a identificar. Otra manera que no es el cambio de color en la muestra sería la prueba para saponinas, la cual podemos determinar si la muestra tiene producción de burbujas (Hernández y Hermosilla, 2013).

Cuadro 2. Principales pruebas fitoquímicas empleadas para cada metabolito secundario.

Pruebas fitoquímicas	Metabolito identificado
KOH/H ₂ O	Cumarinas
KOH/EtOH	Lactonas
NH ₄ OH	Xantinas
Shinoda	Flavonoides
Espuma	Saponinas
Ac ₂ O/H ₂ SO ₄	Esteroides
Dragendorff	Alcaloides
KMnO ₄	Insaturaciones
β-naftol/H ₂ SO ₄	Azúcares reductores

Recientemente, la química de productos naturales ha experimentado un crecimiento explosivo debido a los avances en técnicas de aislamiento, enfoques sintéticos y biosintéticos, así como métodos espectroscópicos y cromatográficos. El acoplamiento de los instrumentos cromatográficos a los espectrómetros permite un análisis parcialmente automatizado en un período de tiempo aún más corto. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se utiliza para la identificación de compuestos químicos previamente ya extraídos, esta técnica se emplea para COVs, los cuales se volatilizan y se inyectan a la columna cromatográfica y son acarreados por un gas inerte. El análisis permite detectar e identificar los compuestos, esta determinación espectrométrica de masas (EM) es

una técnica destructiva pero necesaria (Ikan, 2008), generando el espectro de masa de los compuestos individuales (Hostettmann *et al.*, 2001, Gou *et al.*, 2006; Teo *et al.*, 2008).

El gas generalmente es un gas inerte, como hidrógeno, helio, nitrógeno, argón o dióxido de carbono, que se aplica a presión para transportar muestra para su separación a través de la columna hasta que se eluyen los componentes. El principio de separación aquí se basa en diferencias en punto de ebullición (volatilidad) y afinidad por la fase estacionaria. (Niessen, 2001, Kong y Hochmuth, 2004).

2.6. Estudios *in silico* de acoplamiento de proteínas de transporte.

Los estudios *in silico* son pruebas que simulan cómo actuaría nuestro experimento de manera anticipada. Nos ayudan a determinar posibles acoples entre ligandos y proteínas. Nos arroja los valores de energía que utiliza el acoplamiento, la posición de acople y la interacción con los sitios de acople dentro de la proteína, así se nos muestra, tanto la posición de acople y valor de energía usada para identificar qué ligando-proteína tiene mejor acople, este enfoque, denominado “ecología química inversa”, reduce el número de compuestos candidatos odorantes basados en ligando-proteína (Leal, 2005).

Los datos con menor energía empleada en el acoplamiento son los que demuestran un mejor complejo, al igual que la posición en la que el ligando se une a la proteína, estas proteínas empleadas en este estudio son proteínas que transportan compuestos químicos, proteínas periféricas, implicadas en la percepción de olores en insectos (Leal, 2013), lo cual, cuentan con una cavidad en ellas, es ahí donde los ligandos se unen, por ser de naturaleza hidrofóbica caracterizándose por seis residuos de cisteína y seis hélices alfa (Pelosii, 1998; Leite *et al.*, 2009).

Aparte de considerar el menor dato de energía, se llega a considerar el clúster más poblado entre los clusters obtenidos por el acople molecular y en ocasiones se considera el menor valor de RMSD con respecto a alguna estructura de referencia (Schulz-Gasch *et al.*, 2004; Wong, 2008).

Una facilidad que nos da el estudio *in silico* es el Docking, y por medio de este podemos realizar estrategias para el control y manipulación de insectos, impulsados por el olfato o la quimiorrecepción (Zhuang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Estos estudios moleculares de proteínas se centran en las proteínas de unión a olores en insectos (Leal, 2013), que son proteínas olfativas periféricas, solubles y presentes en el sensillum linfa de los insectos (Gu *et al.*, 2013), sirviendo como portadores de moléculas odoríferas lipofílicas a los receptores olfativos (Wang *et al.*, 2013) y están vinculados a reconocimiento de olores en el proceso olfativo (Biessmann *et al.*, 2010).

2.7. Antecedentes sobre COVs de plantas hospederas de coleópteros *Macrodactylus*

2.7.1. Coleópteros Melolonthidae

De acuerdo con Cherman y Morón (2014), la familia Melolonthidae comprende un número considerable de coleópteros de formas, tamaños y hábitats variados; están presentes en todos los hábitats continentales, insulares y algunos lénticos, excepto en ambientes con hielos perennes, encontrándose desde el edafón hasta el dosel. Los adultos presentan dimorfismo sexual diverso, desde muy acentuado hasta poco perceptible y se alimentan de hojas, flores, tallos, frutos, polen, néctar, savia, corteza y detritus vegetal, rara vez depredando adultos o inmaduros de coleópteros, homópteros o formícidos, mientras que las larvas consumen raíces, humus o xilema. Varias especies se asocian con nidos de termitas y hormigas y madrigueras de roedores (Morón *et al.*, 1997; Morón *et al.*, 2014). Se trata de insectos holometábolos (durante su desarrollo ocurren eventos de embriogénesis y diferenciación con intervención de formas larvales y pupales) con huevo, tres estadios larvales, pupa y adulto. El ciclo de vida es usualmente univoltino, bivoltino o trivoltino (Morón *et al.*, 2014).

2.7.2. Ecología química en Melolonthidae

La Ecología química es una de las disciplinas más recientes que conduce al estudio de las interacciones ecológicas intra e interespecíficas de organismos vivos (Ruther *et al.*, 2002), al igual que entre ellos y su entorno, por medio de sustancias químicas que producen o reciben (Wood, 1983). El interés en el estudio de la ecología química de los Melolonthidae se ha incrementado en los últimos años, principalmente en el área agrícola para el monitoreo y manejo de especies plaga, ya que permite conocer la etapa de su comportamiento en que puede observarse algún tipo de comunicación basada en el uso de sustancias químicas. Además de aspectos relacionados con la actividad sexual de este grupo de coleópteros, la ecología química también permite el estudio de su actividad alimentaria, la cual se basa en las interacciones entre larvas o adultos con partes aéreas o raíces de sus plantas hospederas; en este caso, con fines de

alimentación, en las cuales están involucradas dichas sustancias (Romero- López, 2016).

2.7.3. Interacciones Melolonthidae-plantas mediadas por COVs

La interacción ecológica más importante en la cual están involucradas las plantas es la que mantienen con los insectos, en donde estas producen y emiten “señales químicas” atractivas para dichos artrópodos. Se ha registrado que las plantas producen y liberan COVs (mezclas de varios compuestos orgánicos, lipofílicos, de bajo peso molecular), siendo útiles para su defensa, protección y comunicación. Los COVs son cruciales para los insectos fitófagos, pues les permite detectar y localizar sus plantas hospederas; dependiendo de la naturaleza de la mezcla de compuestos, un insecto puede determinar qué planta elegir. La cantidad, tipo de compuestos y su proporción en la mezcla suelen ser exclusivos de la especie que los emite, provocando que la interacción tienda también a la especificidad (Xu y Turlings, 2017). Los insectos cuentan con estructuras en las antenas y partes bucales que les sirven para detectar los COVs de las plantas y de esta manera se promueven distintos tipos de interacción entre estos organismos; por ejemplo, atracción de polinizadores, selección y localización de los hospederos o defensa indirecta, mediante la atracción de enemigos naturales (Conchou *et al.*, 2019).

En Melolonthidae, predominan los estudios en los que se enlistan las especies vegetales que fungen como alimento, refugio y sitios de oviposición (Morón *et al.*, 1997; Aragón *et al.*, 2010). Debido a la naturaleza de su alimentación, esta familia provoca efectos negativos en cultivos agrícolas, follaje y frutos (Londoño, 1993; Morón *et al.*, 2014). Se tienen registros sobre la forma en que los adultos de algunas especies de esta familia responden a compuestos volátiles de plantas; destacan los estudios de Heath *et al.* (2001) y Ruther *et al.* (2002), en los cuales se señala que los adultos de *M. subspinosus* F. y *Melolontha hippocastani* F. son atraídos a plantas, principalmente a mezclas de ácido hexanoico, ácido valérico y octil-butirato (Williams *et al.*, 1993, 2000; Heath *et al.*, 2001).

Para especies de Melolonthidae distribuidas en México se cuenta con evidencias de la relación entre adultos de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y *Phyllophaga ravidia* Blanchard con árboles de encino (*Quercus* spp., Fagaceae), encontrándose que existen sustancias químicas que provocan el acercamiento de estos insectos hacia las hojas para morderlas y, aparentemente, alimentarse de ellas (Romero-López *et al.*, 2007). Otros registros de este tipo corresponden a adultos de *M. nigripes*, para los cuales se ha observado que los volátiles liberados por árboles de “castaño” (*Aesculus* sp., Sapindaceae), “pino de navidad” (*Pseudotsuga macrolepis*, Pinaceae), maíz (*Zea mays*, Poaceae) y “azumiate”

(*Baccharis salicifolia*, Asteraceae) provocan su acercamiento para morder sus hojas y alimentarse de ellas (Nieves-Silva y Romero-López, 2016, 2019).

2.7.4. *Macrodactylus*

El género *Macrodactylus* forma parte de Melolonthidae y está formado por 112 especies distribuidas desde el centro sur de Argentina y Chile hasta el sureste de Canadá (Evans 2003; Arce-Pérez y Morón 2005, 2009, 2010). En su etapa adulta, los adultos (“frailecillos”) de este taxón son considerados como una plaga importante dentro de la producción de cultivos agrícolas (Caselín-Castro *et al.*, 2003), llegando a dañar flores y frutas de muchas especies de rosas (*Rosa* spp), uvas (*Vitis* spp.), manzanas (*Malus* spp.), cerezas (*Prunus* spp.), fresas (*Fragaria* spp.), entre otros árboles y arbustos (Williams *et al.*, 1990; Arce-Pérez y Morón, 2000).

Para los integrantes de *Macrodactylus* se cuenta con información sobre su biología y taxonomía (Arce-Pérez y Morón, 2000) y recientemente sobre su ecología química (Romero-López, 2016). Con respecto a esto último, se ha documentado que cerca de sesenta y seis especies de plantas de veintiséis familias (principalmente Rosaceae, Asteraceae, Lauraceae y Pinaceae) fungen como sitios de alimentación, agregación y reproducción de los adultos de este género (Arce-Pérez y Morón, 2000; Nieves-Silva y Romero-López, 2016), eventos que pueden estar mediados por compuestos orgánicos volátiles. Un ejemplo es *M. nigripes* Bates, cuyos miembros son considerados como una especie importante en el sector agrícola por generar pérdidas económicas (Guzman-Mendoza *et al.*, 2013). Nieves-Silva y Romero-López (2016) registraron la interacción entre hembras y machos de *M. nigripes* y diferentes fuentes que emiten COVs como fue el caso de hojas de azumiate y maíz, así como el fruto de piña, utilizando un olfatómetro portátil de cuatro vías. De forma complementaria, estos mismos autores en el año 2019 estudiaron nuevamente la respuesta de adultos de *M. nigripes* en la interacción con arbustos de azumiate, pero ahora en su entorno natural. Adicionalmente analizaron el perfil químico de las hojas de estos por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

De acuerdo a *Macrodactylus* y su ecología química también contamos con estudios de comportamiento en adultos y su acercamiento a *E. Polystachya* (Ortega) Sarg. (Morales-Blancas y Romero-López, 2019), en el cual se describe el comportamiento de *M. mexicanus* en presencia de su planta hospedera y la posible participación de infoquímicos, viendo un desplazamiento aéreo dirigido hacia flores de *E. Polystachya* y un movimiento antenal. Posterior a esto se llevaron a cabo observaciones del comportamiento de estas mismas especies,

dando seguimiento a observaciones en campo del momento de contacto con flores de *E. Polystachya* y la realización de bioensayos en laboratorio, esto con el fin de evidenciar la atracción por infoquímicos hacia flores de la planta (Morales-Blancas y Romero-López, 2020).

2.8. Modelo de estudio

En el género *Acacia*, se cuenta con aproximadamente 1200 especies ampliamente distribuidas por el mundo, pertenecientes a la familia Fabaceae, extendiéndose por regiones cálidas y áridas del mundo (Seigler, 2003). En México se cuenta con 84 especies nativas, 34 endémicas del país (Elias, 1981; Gunn, 1984). Se reconocen tres subgéneros dentro de *Acacia*: *Acacia* con 161 especies cosmopolitas; *Aculeiferum* con 207 especies también cosmopolitas, ampliamente distribuidas en América y *Phyllodineae* con 1045 especies principalmente australianas (Vassal, 1972; Miller y Bayer, 2003; Lewis *et al.*, 2005). En diferentes partes del mundo se utilizan plantas medicinales para el tratamiento de la malaria, siendo el género *Acacia* muy utilizado en preparaciones tradicionales como decocciones e infusiones de hojas, raíces y cortezas (Muthaura *et al.*, 2007), utilizando en África a especies como *Acacia mellifera* (Muthaura *et al.*, 2011; Mutai *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2005; Wambugu *et al.*, 2011), *Acacia nilotica* (L.) Willd (Muthaura *et al.*, 2007; Wambugu *et al.*, 2011), *Acacia seyal* (Nguta *et al.*, 2010; Wambugu *et al.*, 2011) y *Acacia xanthophloeae* (Pillay *et al.*, 2008; Prozesky *et al.*, 2001).

Algunos integrantes de este género tienen propiedades medicinales, tales como *Acacia farnesia* “aromo”, la cual se distribuye desde el sureste de Estados Unidos hasta América del Sur. Sus frutos molidos en decocción se usan en caso de gonorreas y flor blanca; las hojas en coccción se usan contra la artritis (UNAM, 1987, citado por Grijalva-Pineda, 1992); también de las semillas del aroma se obtiene aceite de cocina (Bown, 1995). En México, la infusión de las flores se emplea contra la dispepsia y el cocimiento de los frutos se toma contra la disentería (Martínez, 1936), al igual para tratar trastornos gastrointestinales por medio de una decocción de la corteza o las espinas (Moreno *et al.*, 2008). En Colombia se utiliza *Acacia farnesiana*, de la cual se utilizan principalmente hojas y corteza en decocciones (García-Barriga, 1992).

2.8.1. *Acaciella angustissima*

Árboles, arbustos, bejucos o hierbas; frecuentemente inermes o armados con aguijones o espinas. Hojas bipinnadas o reducidas a filodios, generalmente con una o varias glándulas peciolares; estípulas ovadas a lineares, comúnmente

transformadas en espinas, rectas o curvadas, sólidas o huecas (algunas especies mirmecófilas). Cabezuelas, espigas o racimos cortos o alargados, terminales o axilares, flores actinomorfas, bisexuales o andromonoicas, sésiles o pediceladas; cáliz (3-)5(6)-lobado; corola (3-)5(-6)-lobada; estambres siempre más de 10, libres, unidos inconspicuamente en la base, excepciones marcadas en el texto, anteras generalmente eglandulares; ovario glabro o peloso, sésil o estipitado, anillo que rodea al ovario presente o ausente. Legumbre aplanada o túrgida, dehiscente o indehiscente, de membranácea a leñosa, septada o no septada, glabra o pelosa. Semillas por lo general aplanadas y de elipsoides a ovoides, con línea fisural completa, pardas, a veces rodeadas por un arilo amarillo. Plántulas de germinación epigea, eófilos 1, 2-pinnado compuestos, alternos o ligeramente opuestos (Rico-Arce, 2001).



Figura 12. Árbol de *A. angustissima*, ubicado en Cerro Zapotecas, Puebla.

2.8.2. *Macrodactylus mexicanus* como principal insecto visitador de *Acacia Angustissima*

Los coleópteros adultos de esta muestran una apariencia corporal externa con ornamentación de tipo circular setoso; cabeza ovalada con el clípeo trapezoidal

truncado; últimos artejos de los palpos labiales y maxilares oblongos y sumamente punteados; antenas con nueve artejos; élitros largos y anchos que cubren cinco esternitos abdominales; patas largas y delgadas; protibias ensanchadas en la parte media y mesotibias con dos largos espolones. Suelen ser coleópteros activos en los meses de mayo a agosto, sobre todo en ambientes templados o semicálidos situados entre los 100 y los 2650 m de altitud (Arce-Pérez y Morón, 2000).

Estos insectos se alimentan de flores, hojas y frutos de diversas plantas, entre ellas el maíz, alfalfa y frijol y su vida activa en promedio es de 6 semanas. Las hembras pueden depositar en el suelo cerca de treinta huevos, los cuales son de color blanco y esféricos (Carrillo, 1960). Puede pasar un año en su estadio inmaduro y de 70 a 90 días como adulto. La cópula se presenta durante las horas más soleadas del día, en el follaje de la planta en donde se alimentan. Después de la cópula los machos mueren y las hembras depositan sus huevos en el suelo de la planta hospedera. (Arce-Pérez, 2008). Históricamente se han registrado las plantas que fungen como hospederas de estos insectos, es decir, una planta hospedera es aquella que está positivamente relacionada con su cualidad como recurso alimenticio, reflejándose en la fecundidad y longevidad de los adultos, la frecuencia de oviposición, y el desarrollo y la mortalidad de ninfas (Van Boxtel *et al.*, 1978; Van de Merendonk y Van Lenteren, 1978).

Cuadro 3. Plantas hospederas de adultos de *Macroductylus* registradas en Guatemala y México (Arce-Pérez y Morón, 2012).

Especie de <i>Macroductylus</i>	Planta hospedera (familia)	Planta hospedera (especie)
<i>M. costulatus</i> (Bates)	Sapotaceae	<i>Pouteria sapota</i> (Jacq) (zapote mamey)
<i>M. dimidiatus</i> (Guérin)	Poaceae	<i>Zea mays</i> (maíz) (Linneo)
<i>M. fulvescens</i> (Bates)	Poaceae	<i>Zea mays</i> (maíz) (Linneo)
<i>M. lineatocollis</i> (Bates)	Poaceae	<i>Zea mays</i> (maíz) (Linneo)
<i>M. rufescens</i> (Bates)	Poaceae	<i>Zea mays</i> (Linneo) (maíz)
<i>M. syiphis</i>	Sapotaceae	<i>Manikara zapota</i> (Linneo) (chicozapote)
<i>M. zunilensis</i> (Bates)	Asteraceae	<i>Verbesina turbacensis</i> (Kunth)



Figura 13. Coleóptero adulto de *M. mexicanus* recolectado en la zona de estudio, Cerro Zapotecas, Puebla.

3. Justificación

Los estudios relacionados con las interacciones planta-insecto, desde el punto de vista de la ecología química, concluyen que las interacciones se dan por la participación de compuestos orgánicos volátiles. Con el fin de saber sobre el efecto de estas sustancias en la interacción, se busca reconocer la identidad de los compuestos químicos de los volátiles en las hojas de *A. angustissima*. Estudios relacionados con *M. mexicanus* y su planta hospedera *E. polystachya* registran la atracción de adultos de esta especie hacia sus hojas y flores, además de cambios en el comportamiento reflejados en movimiento antenal y desplazamiento de los insectos, por lo que podría pensarse que esta interacción insecto-planta está mediada por volátiles que son sintetizados y liberados por la planta (Morales-Blancas y Romero-López, 2019).

Por ello, en el presente estudio se pretende identificar los COVs de hojas de *A. angustissima* para así tener información sobre las sustancias involucradas en la interacción entre adultos de *M. mexicanus* y hojas de *A. angustissima*, como posibles atrayentes. Además de generar información básica relacionada con la ecología química de *M. mexicanus* y sus plantas hospederas, se brindan aportes en términos de bioinformática con la utilización del Docking como herramienta para ver de qué manera se da el acople ligando-proteína, modelando las moléculas y prediciendo estructuras para así dar una idea de cómo podría

interactuar el COV liberado por *A. angustissima*, y cómo *M. mexicanus* lo identificaría de manera natural, siendo estos compuestos, atrayentes para esta interacción insecto-planta.

4. Hipótesis

Los COVs que conforman las hojas de *A. angustissima* del cerro Zapotecas, Puebla, presentan terpenos que participan en la comunicación química de *M. mexicanus*.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Analizar el perfil químico de los COVs extraídos de las hojas de *A. angustissima* distribuidos en el Cerro Zapotecas, Puebla

5.2. Objetivos particulares

- ☐ Establecer el perfil fitoquímico de las hojas de *A. angustissima*.
- ☐ Seleccionar la técnica de extracción de COVs de las hojas de los árboles de *A. angustissima* bajo estudio.
- ☐ Extraer e Identificar la identidad química de los COVs de hojas de *A. angustissima*.
- ☐ Determinar *in silico* la interacción de compuestos seleccionados del perfil químico con proteínas de unión a compuestos potenciales relacionados con receptores antenales de adultos de *M. mexicanus*.

6. Material y métodos

6.1. Zona de estudio y muestreo

El cerro Zapotecas se encuentra en el centro del municipio de San Pedro Cholula, a 1,5 km de la ciudad, levantándose a una altura de 2300 msnm; contando con una extensión de 510 hectáreas y colinda con siete localidades (San Cristóbal Tepontla, San Gregorio Zacapechpan, San Francisco Coapa, San Juan Tlautla, San Sebastián Tepalcatepec, San Diego Cuachayotla y San Agustín Calvario) (Tlapa-Almonte, 2005). La zona centro-oriente del estado de Puebla, perteneciente a San Andrés Cholula y San Andrés Calpan cuentan con un clima templado

subhúmedo con lluvias en verano y con una temperatura media anual que fluctúa entre 18° y 20° C.

Se recolectaron hojas sin daño aparente de árboles de *A. angustissima*, del Cerro Zapotecas, ubicados en la localidad de San Pedro Cholula, Puebla (coordenadas 19° 04'31" N 98°20'46" O, altitud de 2380 msnm), en el periodo noviembre-diciembre de 2019 (posterior a la actividad observada de los adultos de *M. mexicanus*) y junio-julio de 2020 (momento de la mayor actividad de estos insectos, registrada en el presente estudio) realizando un mapeo de la zona por medio de QGIS 3.18.1. Se llevaron a cabo muestreos dirigidos hacia los árboles de esta especie vegetal y se eligieron árboles que mostraran más de cincuenta adultos de *M. mexicanus* con actividad sexual y alimentaria; esto con base en lo propuesto por Morales-Blancas y Romero-López (2019). La toma del material vegetal se llevó a cabo a partir de cortes manuales de las hojas de cada uno de los árboles seleccionados, tomando en cuenta la hoja desde el peciolo hasta el ápice, considerando una altura de 1.60 m para cada árbol. Las hojas recolectadas se transportaron en bolsas herméticas selladas al vacío al Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica LESQO-BUAP y almacenadas hasta su uso posterior.



Figura 14. Ubicación del Cerro Zapotecas, San Pedro Cholula, Puebla, zona de recolecta del material obtenido de árboles de *A. angustissima*.

6.2. Pruebas fitoquímicas

Se realizaron los estudios fitoquímicos de rigor para corroborar la presencia de metabolitos secundarios en hojas del encino bajo estudio, con base en la

metodología propuesta por Ikan (1991). Primero se trituro la materia vegetal (previamente seca) de manera mecánica hasta la obtención de un polvo fino homogéneo; se ocuparon aproximadamente 350 mg por muestra, realizándose un triplicado por ensayo y por último se colocó la muestra en tubos de ensayo con su reactivo correspondiente.

Cuadro 4. Pruebas fitoquímicas para identificar metabolitos secundarios en hojas de *A. angustissima*.

Pruebas fitoquímicas	Metabolito identificado	Promedio de peso	Desviación estándar
KOH/H ₂ O	Cumarinas	0,0310 g	0,0010
KOH/EtOH	Lactonas	0,0307 g	0,0021
NH ₄ OH	Xantinas	0,0327 g	0,0006
Shinoda	Flavonoides	0,0313 g	0,0015
Espuma	Saponinas	0,0310 g	0,0010
Ac ₂ O/H ₂ SO ₄	Esteroides	0,0307 g	0,0021
Dragendorff	Alcaloides	0,0320 g	0,0017
KMnO ₄	Insaturaciones	0,0300 g	0,0010
β-naftol/H ₂ SO ₄	Azúcares reductores	0,0313 g	0,0015

6.3. Extracción de COVs

Se tomaron muestras de material foliar (100 g por muestra) y se aplicó el método de hidrodestilación usando un sistema tipo Clevenger modificado (Figura 5) con 400 ml de agua destilada. El condensador de rosario estuvo acoplado a un recirculador marca Witeg®, a una temperatura de -15°C. El material vegetal se mantuvo en ebullición durante 3 h para cada muestra. Una vez finalizado el proceso, se llevó a cabo la extracción y secado del volátil líquido en un embudo de separación utilizando diclorometano (tres extracciones por muestra), Posteriormente, se adicionó sulfato de sodio para eliminar el agua remanente. La muestra se colocó en rotavapor para eliminar el disolvente. Para su almacenamiento, se preparó una solución estándar en cloroformo, determinando la concentración específica a emplear en los análisis cromatográficos, estudio

realizado por triplicado generando muestras independientes para lograr resultados significativamente estadísticos.

6.4. CG-EM

Con la finalidad de identificar los compuestos químicos extraídos previamente, se consideraron las condiciones propiamente estandarizadas por el departamento de CG-EM de la facultad de ciencias químicas. Se utilizó una columna DB5-MS (30 m, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μ m de espesor de la película). La temperatura del cromatógrafo fue de 300°C inyector, 70°C de temperatura inicial con incremento de 3°C/min hasta llegar a 280°C. Como gas acarreador se empleó hidrógeno (1.5 mL/min) y el inyector se mantuvo en modo splitless. Por otro lado, se utilizó un espectrómetro de masas Agilent 5975C en modo SCAN (50 a 400 UMA). La identificación de los compuestos se efectuó mediante la Biblioteca de Espectros Wiley-NIST Ed 11-2017, tomando en cuenta los compuestos con una similitud de espectros mayor al 95%.

6.5. Estudios *in silico*

Del perfil químico generado se efectuó una simulación *in silico*. Las proteínas y ligandos evaluados fueron preparados por el departamento de bioinformática del Laboratorio de Elucidación y Síntesis de Química Orgánica. Se ocupó el software AutoDock Vina y se llevaron a cabo 100 repeticiones de cada análisis por molécula. Se obtuvieron los valores de energía de acoplamiento en kcal/mol llevando a cabo la minimización energética para obtener la conformación más estable y se obtuvieron los diagramas 2D de las interacciones de los ligandos con las proteínas. Se analizaron cuatro proteínas de transporte de compuestos químicos, las cuales se obtuvieron de la base de datos RSCB PDB. Finalmente, se seleccionó una molécula, la β -ionona para comparar las energías de afinidad de las moléculas en estudio, ya que en la literatura y en los estudios de las proteínas analizadas, es la molécula que presenta mejor afinidad para las 4 proteínas.

Cuadro 5. Proteínas evaluadas para estudio de ligandos encontrados en COVs de hojas de *A. angustissima*.

Código PDB	Descripción de la proteína
1OW4	Proteína de unión a compuestos químicos asociados a recepción olfativa de <i>Leucophaea maderae</i> (Fabricius)
3OGN	Proteína de unión a compuestos químicos asociados a recepción olfativa de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say)
3Q8I	Proteína de unión a odorante 4 de <i>Anopheles gambiae</i> (Scott)
2ERB	Proteína de unión a odorante 1 de <i>Anopheles gambiae</i> (Scott)

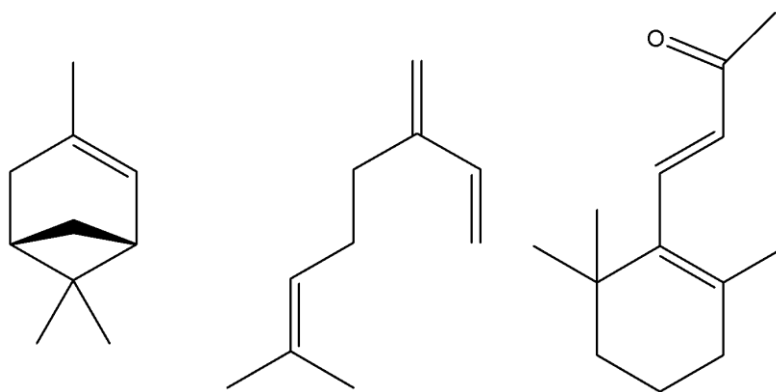


Figura 15. Estructuras de α -pineno, β -mirceno y β -ionona, ligandos evaluados para estudios de Docking.

Las cuatro proteínas son de bajo peso molecular (1OW4, 137 aa; 3Q8I, 150 aa; 2ERB, 144 aa; 3OGN, 149 aa) y están implicadas en el transporte de moléculas odorantes hacia los receptores especializados que se encargan de transmitir el mensaje químico inherente a cada molécula. Debido a que actualmente no existe ninguna estructura cristalizada de receptores de odorantes, se decidió llevar a cabo el estudio con las proteínas encargadas de transportarlas. Las moléculas caracterizadas y con mayor presencia en el extracto de volátiles fueron las seleccionadas para llevar a cabo el estudio de acoplamiento molecular.

7. Resultados

7.1. Pruebas fitoquímicas

Se determinó por medio de pruebas fitoquímicas, la presencia de lactonas, xantinas, saponinas, azúcares e insaturaciones, siendo estas últimas, presentes de manera abundante en hojas de *A. angustissima*.

Cuadro 6. Metabolitos secundarios presentes y con mayor abundancia en COVs de hojas de *A. angustissima*. Pruebas por triplicado, +++: presencia abundante, ++: presencia regular, +: presencia débil.

Metabolito identificado	Presencia
Cumarinas	-
Lactonas	+
Xantinas	+
Flavonoides	-
Saponinas	++
Esteroides	-
Alcaloides	-
Insaturaciones	+++
Azúcares	+

Con el perfil fitoquímico de las hojas de *A. angustissima* se indicó la presencia de metabolitos secundarios. La muestra más representativa fue la prueba para insaturaciones, la cual nos demuestra la presencia de compuestos químicos con dobles enlaces que por valoración colorimétrica se considera que es el metabolito con mayor presencia.



Figura 16. Prueba fitoquímica para insaturaciones.

7.2. Extracción e identificación de COVs

Se generó un perfil químico, el cual se muestra en el cromatograma (Figura 17); se observan tres picos con mayor abundancia en tiempos de retención de 7.74, 17.10 y 39.41 minutos, respectivamente. El β -mirceno y el α -pineno fueron los

primeros compuestos en aparecer en el análisis por CG-EM, presentando mayor volatilidad y menor retención de la muestra. A mayor tiempo se observaron grasas bajas de origen vegetal inmersas en el volátil líquido, pero no volátiles y el porcentaje restante corresponde a impurezas de la muestra, debido al arrastre de vapor pero que corresponden a una abundancia menor al 1%, por lo que no se consideran suficientemente concentrados para desempeñar una función biológica. Sólo se consideraron los compuestos con mayor abundancia.

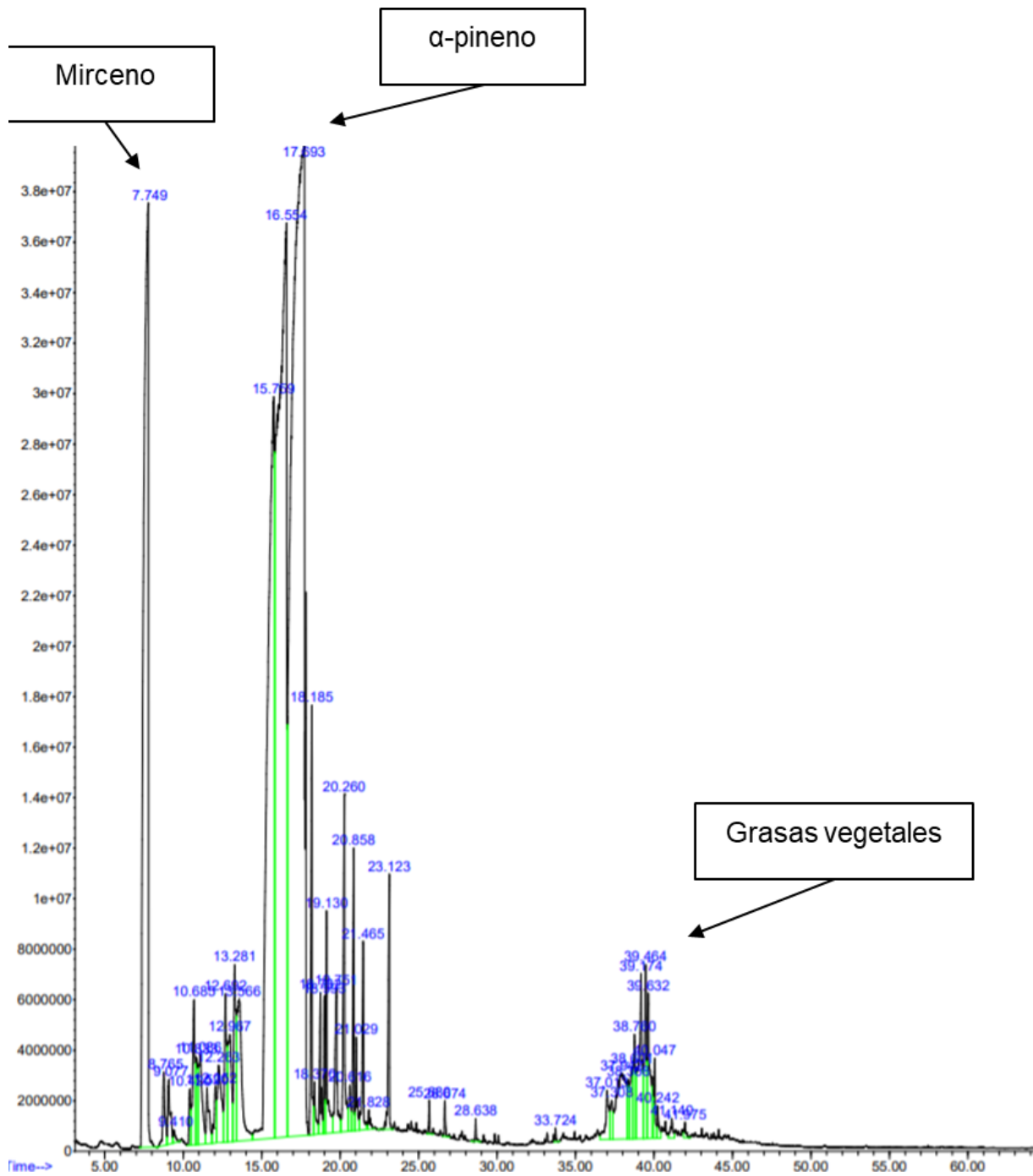
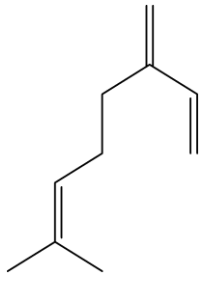

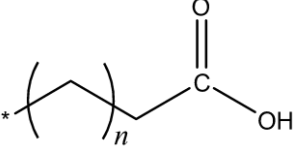


Figura 17. Cromatograma de COVs identificados en hojas de *A. angustissima* recolectadas en el periodo posterior a la actividad de los adultos de *M. mexicanus* en el Cerro Zapotecas.

Cuadro 7. Composición química de los COVs de hojas de *A. angustissima* recolectadas en temporada invernal.

Nombre	β -mirceno	α -pineno	Grasas B.P.M.
Abundancia	32.86%	32.12%	10.70%
Estructura			

7.3. Estudios *in silico*

En el siguiente cuadro se plasman las cuatro proteínas utilizadas con los tres tipos de ligandos, el control (β -ionona), que tiene mejor acople, y los dos ligandos identificados (β -mirceno y α -pineno). Mostramos los resultados de energía de acoplamiento de Docking de acuerdo con cada proteína con el respectivo ligando. Se tomó sólo el mejor valor de acuerdo con la energía empleada en tal acoplamiento, siendo el valor más negativo el de mejor energía.

Cuadro 8. Valores de energía de acoplamiento de cada ligando calculados en el acoplamiento de Docking, como parte de los estudios bioinformáticos efectuados con parte de los COVs de hojas de *A. angustissima*.

Proteína	Ligando	Energía de acoplamiento (kcal/mol)	Proteína	Ligando	Energía de acoplamiento (kcal/mol)
1WO4	β -ionona	-7,6	2ERB	β -ionona	-7,6
	β -mirceno	-6,6		β -mirceno	-7,1
	α -pineno	-5,9		α -pineno	-6,1
3OGN	β -ionona	-7,8	3Q8I	β -ionona	-8,3
	β -mirceno	-7,2		β -mirceno	-7
	α -pineno	-6,5		α -pineno	-6,1

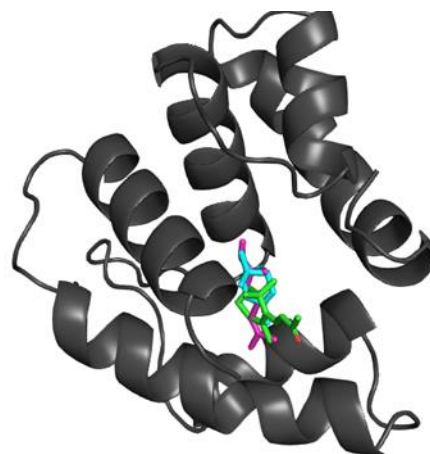
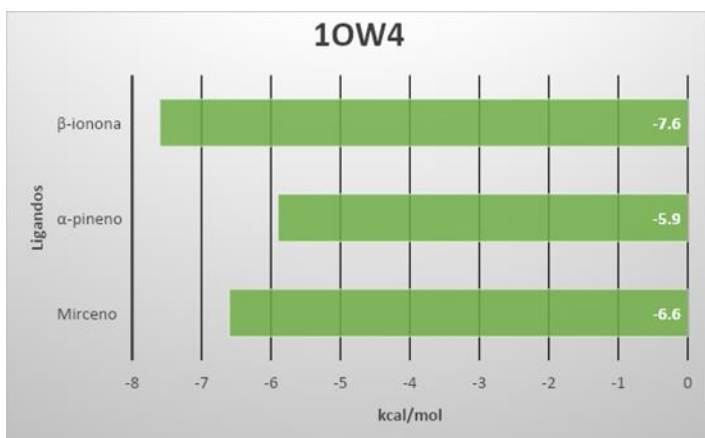


Figura 18. Resultados de la proteína 1OW4 con superposición de ligandos.

En el caso de la proteína 1OW4 (figura 18), el β -mirceno fue el ligando que tuvo el mejor acoplamiento, con una energía de afinidad de -6.6 kcal/mol comparado con el α -pineno, el cual presenta menor afinidad por la proteína con un valor de energía de -5.9 kcal/mol. En ambos casos, no tienen una afinidad similar o superior al del ligando de referencia, la β -ionona con un valor de -7.6 kcal/mol.

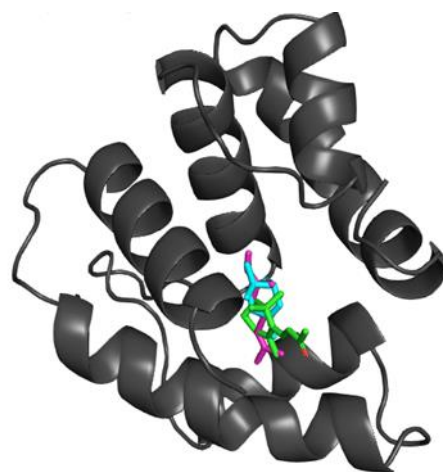
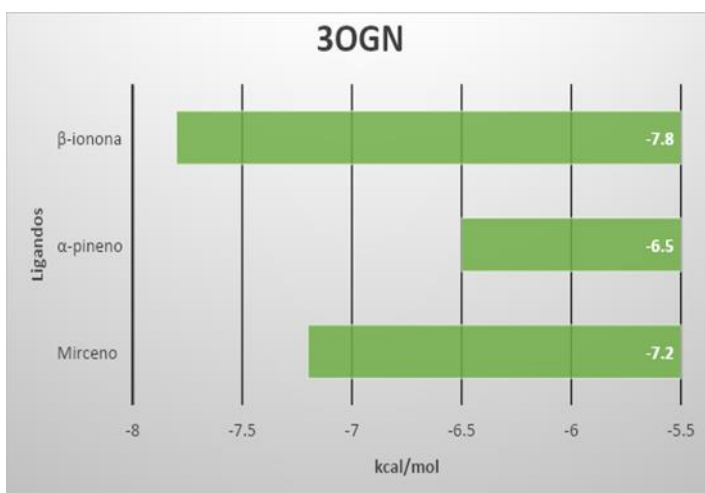


Figura 19. Resultados de la proteína 3OGN con superposición de ligandos.

Para la proteína 3OGN (Figura 19), igualmente es el β -mirceno el que presenta mayor afinidad con un valor de -7.2 kcal/mol siendo el de mejor acoplamiento, comparado con α -pineno que tiene una afinidad de -6.5 kcal/mol. Sin embargo, el de mejor acople sigue siendo para β -ionona, con afinidad superior a las dos moléculas anteriores.

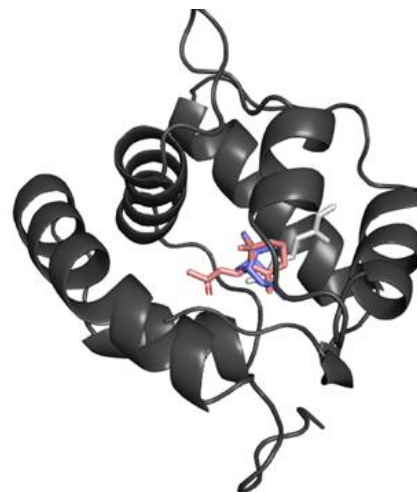
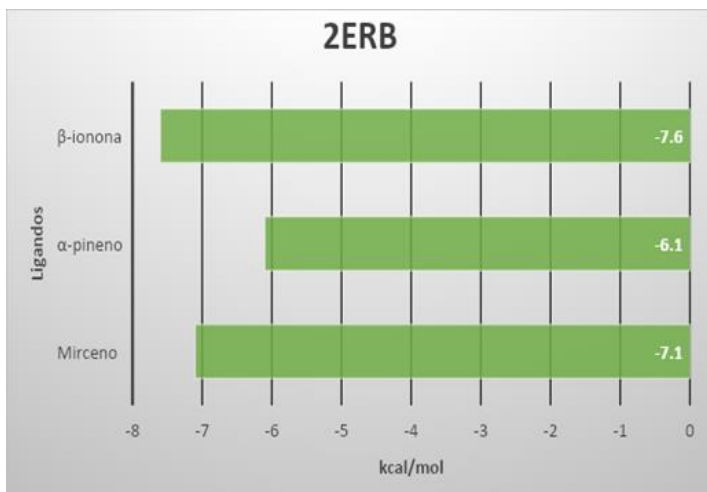


Figura 20. Resultados de la proteína 2ERB con superposición de ligandos.

Para la proteína 2ERB (figura 20), se presenta lo mismo que lo anterior a las otras proteínas, la β -ionona sigue siendo la molécula con mayor afinidad con -7.6 kcal/mol, seguido del β -mirceno con -7.1 kcal/mol y por último y con menor afinidad de acoplamiento el α -pineno con un valor de -6.1 kcal/mol.

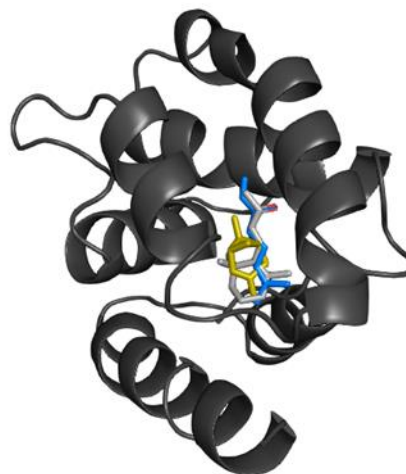
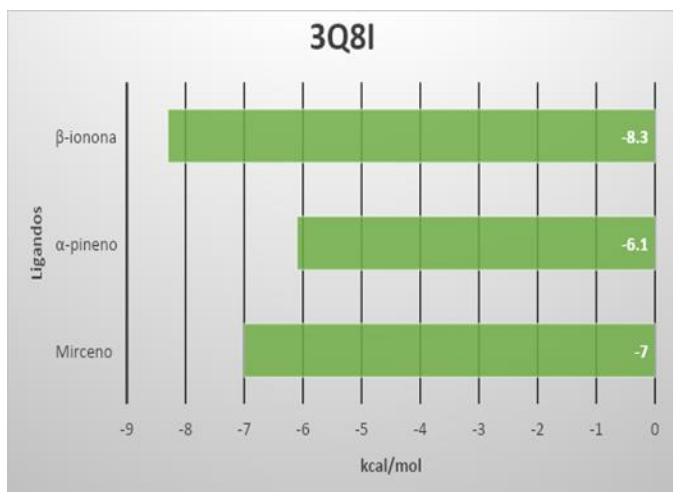


Figura 21. Resultados de la proteína 3Q8I con superposición de ligandos.

Por último, la proteína 3Q8I (figura 21), también presenta los mismos valores que las anteriores, β -mirceno es superior con un valor de energía de -7 kcal/mol comparado con α -pineno con un valor de -6.3 kcal/mol, siendo β -ionona la molécula con mejor afinidad en el acoplamiento con -8.3 kcal/mol.

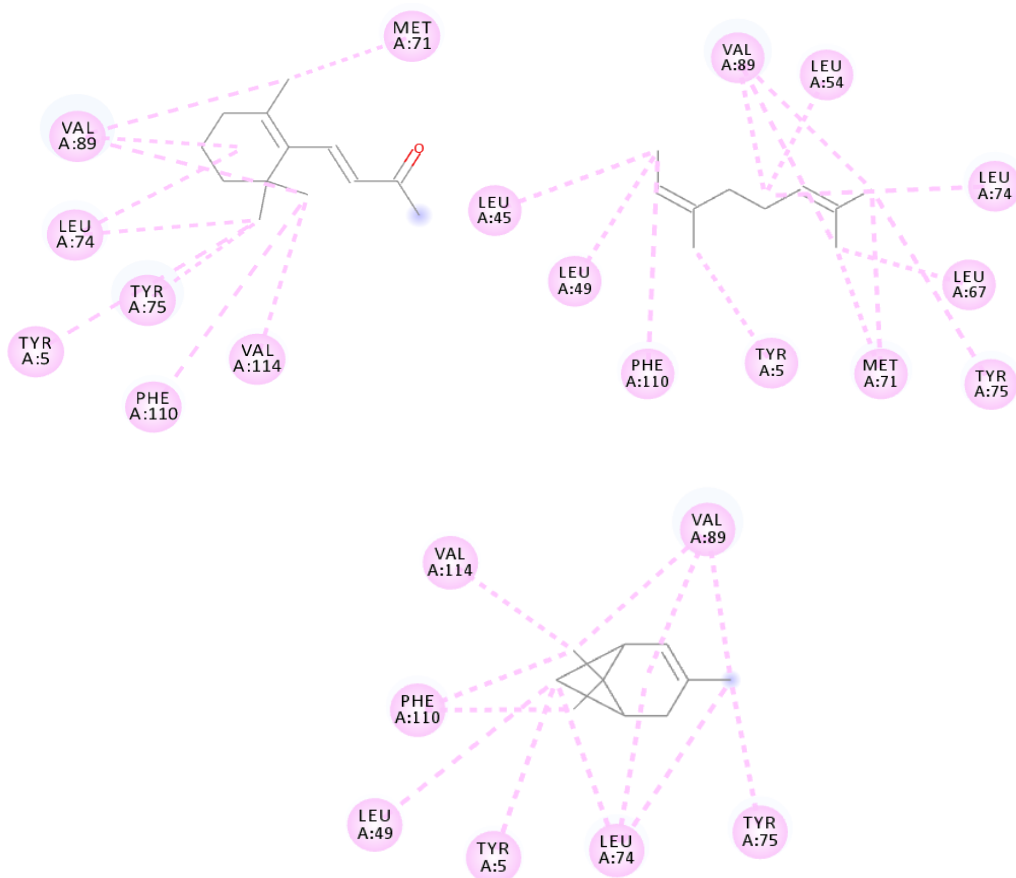


Figura 22. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 1OW4. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.

Podemos observar en la interacción de con la proteína 1OW4, las interacciones de ligandos con los residuos de la proteína, donde podemos ver que para β -mirceno en primer lugar todas sus interacciones son de tipo alquílicas, esto se demuestra por las cinco interacciones que presenta con leucina, un aminoácido con cadena lateral de naturaleza no polar. Asimismo, también se observan otras interacciones con aminoácidos aromáticos como tirosina y fenilalanina, destacando que estas interacciones siguen siendo alquílicas. Lo mismo sucede con el α -pineno teniendo toda interacción alquílica y compartiendo con el β -mirceno, la presencia de valinas, presencia de aminoácidos aromáticos y teniendo acople con aminoácidos en la misma secuencia como valina: 89 y tirosina: 5 y 75, sólo que para α -pineno las interacciones son en menor número que β -mirceno.

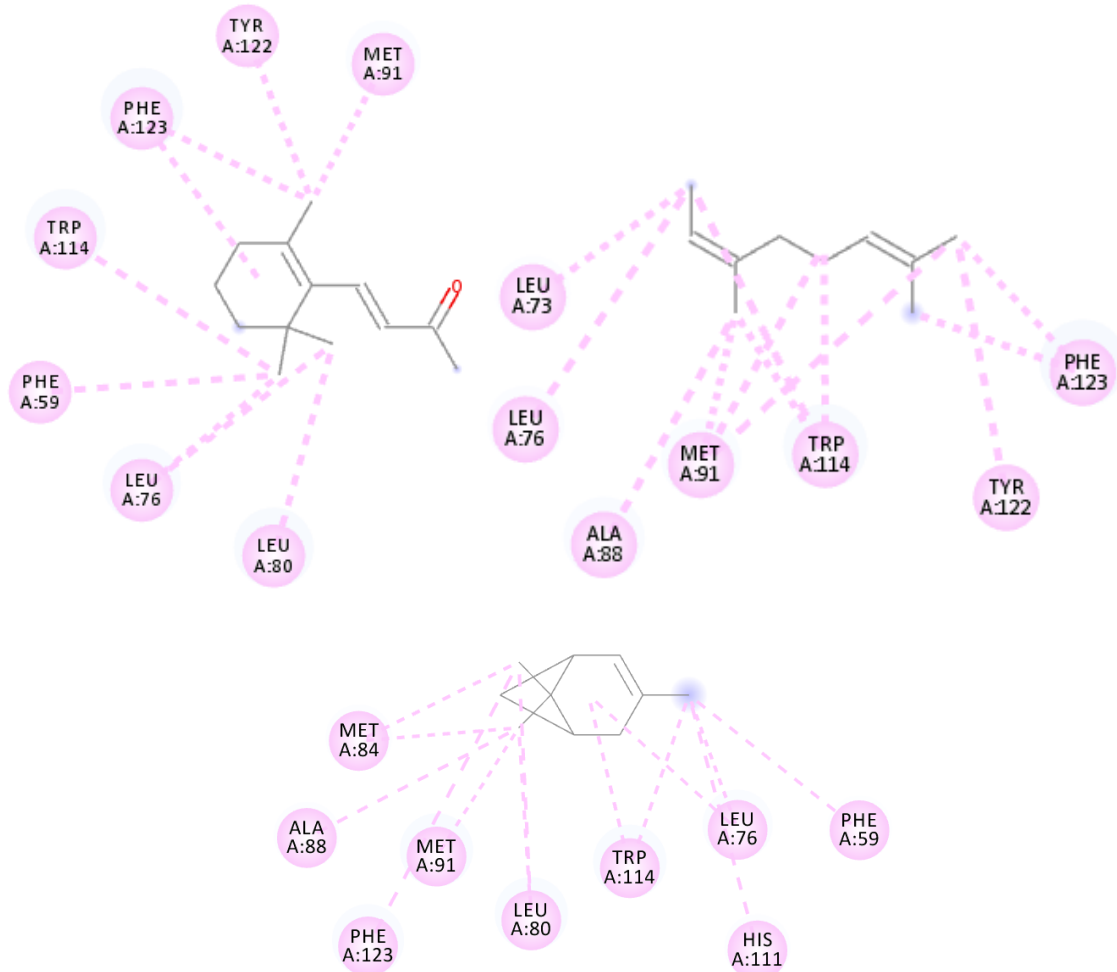


Figura 23. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 3OGN. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.

Para la interacción de los ligandos con la proteína 3OGN (figura 23), observamos en caso contrario a la proteína 1OW4, mayor número de interacciones para α -pineno que para β -mirceno, igualmente todas las interacciones que presentan ambos ligandos son de tipo alquílico y con presencia de aminoácidos aromáticos, compartiendo aminoácidos como alanina: 88, triptófano: 114 y fenilalanina: 123.

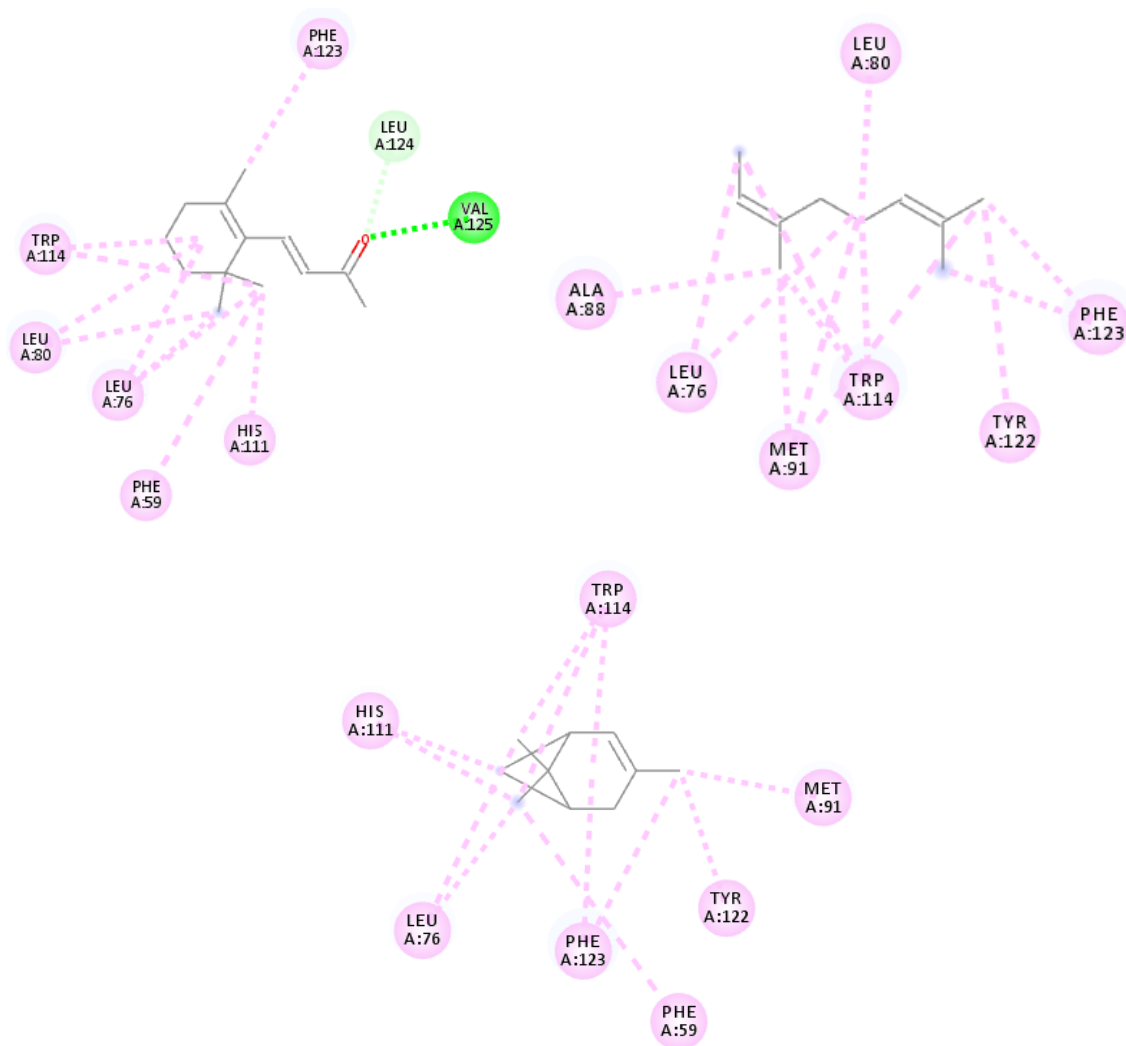


Figura 24. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 2ERB. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.

Para la interacción con la proteína 2ERB (figura 24), ambos ligandos, β -mirceno y α -pineno comparten 7 interacciones con aminoácidos, nuevamente destacando que todas sus interacciones son de tipo alquílicas con presencia de aminoácidos aromáticos, compartiendo entre ellos interacciones con leucina: 76, fenilalanina: 123 y tirosina: 122.

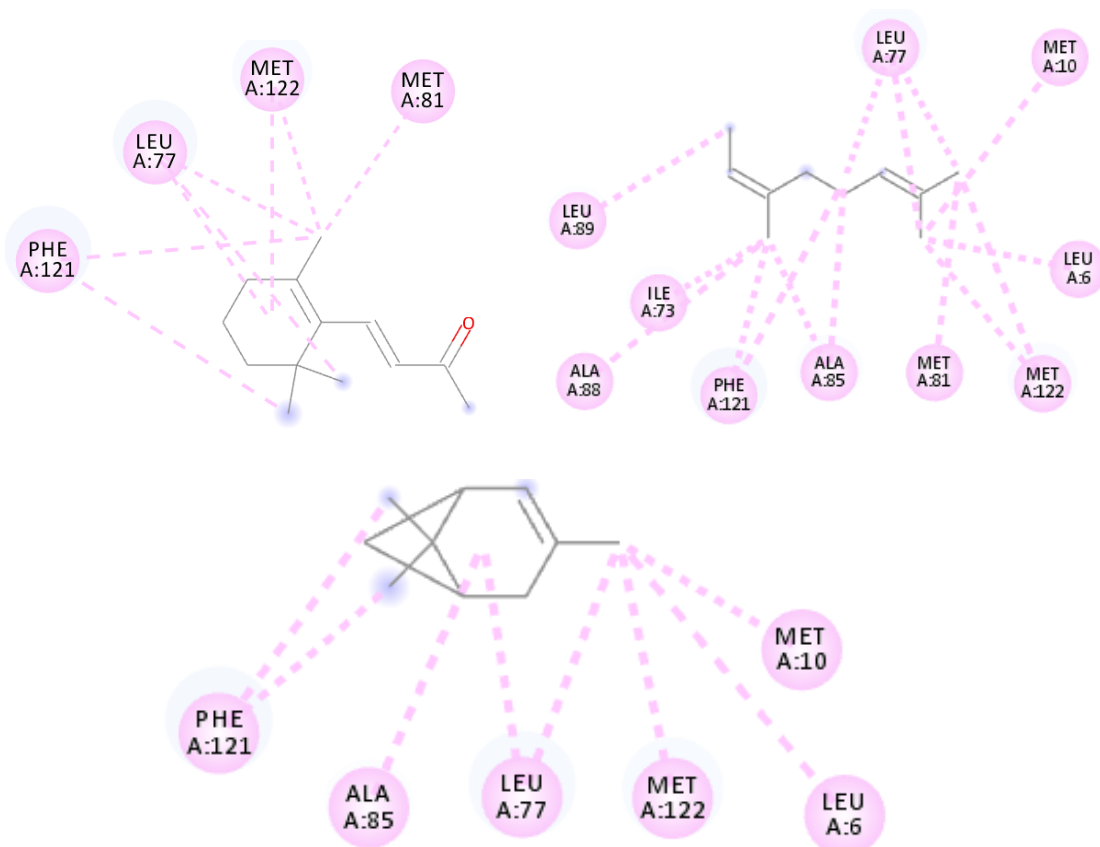


Figura 25. Diagramas de interacción 2D de ligandos con la proteína 3Q8I. Las líneas indican la interacción del ligando con los residuos de la proteína.

Por último, tenemos la interacción con la proteína 3Q8I (figura 30), donde observamos que por número de interacciones, el β -mirceno presenta más que α -pineno, siendo 10 interacciones contra 6. Las interacciones siguen siendo de naturaleza alquílica y con presencia de aminoácidos aromáticos, compartiendo interacciones con leucina: 6 y 77, metionina: 122 y 10 y por último con alanina: 85.

8. Discusión

La emisión de COVs en plantas da como resultado interacciones entre organismos, esto a llevando al estudio de las sustancias químicas y su relevancia con las actividades en coleópteros Melolonthidae (Romero-López, 2016), por lo cual, en la presente investigación podemos dar una aproximación de cómo *M. mexicanus* interactúa con su planta hospedera *A. angustissima*. Estudios recientes han demostrado la atracción de *M. mexicanus* por parte de *E. polystachya*

evidenciando su acercamiento a hojas y flores, y describiendo su comportamiento, siendo esta interacción influenciada por COVs (Morales-Blancas y Romero-López, 2019). Para el género *Acacia* se ha obtenido la presencia de terpenos y de lactonas, xantinas, saponinas y azúcares entre otros (Seigler, 2003), al igual para la especie *A. farnesiana* que tiene presencia de metabolitos no sólo en hojas, sino en corteza y flores (Devi *et al.*, 1991), lo cual concuerda con el presente estudio donde se identificaron los metabolitos secundarios por medio de pruebas fitoquímicas en hojas de *A. angustissima*, la presencia de insaturaciones previamente descritos como atrayentes de insectos, pero no descritos para la interacción insecto-planta entre *M. mexicanus* y *A. angustissima*.

Por otra parte se analizaron e identificaron COVs por medio de CG-EM dando como resultado a β -mirceno y α -pineno los compuestos químicos más abundantes en hojas de *A. angustissima*, nos hace pensar que podrían estar involucrados en la comunicación química con *M. mexicanus* provocando su atracción hacia la planta, ya que, reportes de que en insectos nocturnos como polillas y otros animales donde el estímulo visual es ausente, los COVs son de especial importancia (Vainstein *et al.*, 2001). Al igual que en insectos, está el caso de los murciélagos y la interacción con las flores que polinizan; en las mezclas de COVs se encuentran compuestos isoprenoides como el α -pineno (Bestmann *et al.*, 1997). Este compuesto también ha sido identificado en *Pinus pinea* (L.) y se ha probado, en una mezcla con β -mirceno y α -terpinoleno, con coleópteros *Tonicus destruens* Wollaston (Scolytidae) en un detector electroantenográfico para evaluar respuestas de atracción en estos insectos (Faccoli *et al.*, 2011). De igual forma, el α -pineno se ha descrito como parte de los COVs extraídos de las hojas de *B. salicifolia* (Ruiz y Pav) Pers, por el método de hidrodestilación (Loayza *et al.*, 1995; Malizia *et al.*, 2005; Carrizo *et al.*, 2009; Budel *et al.*, 2018), donde se ve involucrado en la atracción de adultos de *M. nigripes* a su planta hospedera (Nieves-Silva y Romero-López, 2016).

Por último, los estudios *in silico* son los primeros en realizarse para la interacción entre *M. mexicanus*-planta hospedera, con la recepción de moléculas de olor y dar un posible entendimiento y complemento de esta interacción a nivel molecular, siendo importante el ver de qué manera se reciben los COVs. Igualmente, el observar con qué tipo de aminoácidos se unen los ligandos, es de gran ayuda para ver de qué naturaleza es la proteína, el determinar el sitio de unión de estas interacciones proteína-ligando, determina posición y energía utilizada para su acople, por lo cual con ayuda del docking podemos predecir que están siendo percibidos los COVs de *A. angustissima* por *M. mexicanus*.

9. Conclusiones

Los COVs que emiten las hojas de *A. angustissima* demostraron tener terpenos e insaturaciones, metabolitos secundarios que tienen funciones como atractores en interacciones con insectos. Se extrajeron por el método Clevenger, se determinaron por medio de pruebas fitoquímicas y se identificaron por medio de la CG-EM, observándose dos compuestos volátiles mayoritarios (β -mirceno y α -pineno) en hojas de *A. angustissima* y que podrían tener la función de infoquímicos en la interacción *M. mexicanus*-*A. angustissima*, siendo los COVs los responsables de un posible acercamiento a la planta. Esto anteriormente dicho se complementa y refuerza la investigación con el uso del Docking, ya que en el trabajo el uso de esta herramienta nos permitió observar el acoplamiento entre proteínas y ligandos (β -mirceno y α -pineno), dándonos una idea de cómo podría reconocer *M. mexicanus* los COVs emitidos por su planta hospedera y de qué manera se podrían acoplar a los receptores de *M. mexicanus*.

10. Literatura citada

- Anaya-Lang, A.L. y Espinosa-García, F.J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*, 83: 4-13.
- Arce-Pérez, R. y Morón, M.Á. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macroductylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana*, 79: 123-239.
- Arce-Pérez y Morón, M.A. (2012). Las especies de escarabajos *Macroductylus* de Guatemala (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Biodiversidad*, 2: 193-196.
- Archangelsky, M., Menzo, V., C. Michat, M. y L. M. Torres, P. (2009). Coleoptera, Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. *Sistemática y biología*, 14: 411-468.
- Ávalos, A. y Pérez E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. REDUCA.119-145.
- Baldelomar, M., Lacerda, Viana, M. y Jane, Telles, F. (2018). El rol de los compuestos orgánicos volátiles florales en las interacciones planta-insecto. *Oecología australis*, 22(4): 348-361.
- Cantúa, Ayala, J. A., Flores, Olivas, A. y Valenzuela, Soto, J. H. (2019). Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: situación actual en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(3): 729-742.
- Cárabez, A. y Chavarria, A. (2013). Química de los carbohidratos. *Bioquímica de Laguna*, 7:201-214.
- Castilla, V., Ramírez, J. y Coto, C. (2009). Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Revista Química Viva*, 8 (1): 8-24.
- Cerutti, Mariano, Neumayer y Fernando. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, 7: 149-155.
- Cherman, M. A. y Morón, M. Á. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30 (1): 201-220.

- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. Cuadernos de Biodiversidad: 16-21.
- Castillo-Olvera, G., Zavala-Cuevas, D. y Carrillo-Inungaray, M. L. (2017). Análisis fitoquímico: Una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. Tlatemoani, 24.
- Chukwuebuka, E., Chinenye, J., Chidi, S. y Kumar, S. (2019). Fitoquímica. Fundamentos, técnicas modernas y aplicaciones. Apple Academic Press, 1:1-658.
- Daza-Bareño, A., Z. (2014). Estudio fitoquímico de la corteza de *Acacia farnesiana* utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria. Universidad Nacional de Colombia.
- Faccoli, M., Anfora, G. and Tasin, M. (2011). Stone pine volátiles and host selection by *Tomicus destruens* (Wollaston) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytidae). Silva Lusitana, 61-73.
- Flores-Hernández, J. (2011). Listado preliminar de mariposas diurnas de Cholula. Elementos. 83:25-28.
- Gómez-Acevedo, S., Rico-Arce, L., Delgado-Salinas, A., Magallón, S. y Eguiarte-Frutos, L. (2015). Análisis molecular del género *Acacia* (Leguminosae, Mimosoideae), con énfasis en el grupo mirmecófilo. Memorias de la V Conferencia Internacional de Leguminosas, VILC: 201-223.
- González-González, A., Palma-Millanao, R., Yáñez, O., Rojas, M., Mutis, A., Venthur, H., Quiroz, A. y Ramírez, C. (2016). Detección virtual de compuestos volátiles de plantas revela una alta afinidad de las proteínas de unión a los olores *Hylamorpha elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) para sesquiterpenos de su huésped nativo. *Journal of Insect Science*, 16 (1):1-15.
- Grijalva-Pineda, A. (2006). Flora útil etnobotánica de Nicaragua. MARENA, 1-352.
- Ikan, R. (1991). Natural products: a laboratory guide. Academic Press, 2: 1-367.

- Ikan R. (2008). Selected topics in the chemistry of natural. World scientific, 1-581.
- Jiménez-Sánchez, E., Deloya, C., Zaragoza-Caballero, S. y Pérez-Zuñiga, J. (2017). Especies de Coleoptera (Insecta) de la colección de artrópodos de la Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 33(2): 359-381.
- Jiménez, G.S., Ducoing, H.P. y Sosa, M.R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 355-363.
- Jerónimo, M.A.S., Guzmán-Mendoza, R., del Carmen Herrera-Fuentes, M. y Orendain, J. (2014). Ciclo de vida y comportamiento de *Macroductylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) en Ixtlahuaca, México. *Entomología Mexicana*, 1: 710-714.
- León-Méndez, G., Fortich, O., del Rosario, M., & Martínez Useche, S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4): 742-750.
- López-Briz, E. y Giner-García, R. (2013). Chocolate, café, té y otros estimulantes: bebidas energéticas Avant la lettre (I). *Revista Española de Drogodependencias*, 38 (4):391-409.
- López-Luengo, M.T.L. (2002). Flavonoides. *Offarm. Ámbito farmacéutico*. 21: 108-114.
- López-Luengo, M.T.L. (2004). Los aceites esenciales: aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(7), 88-91.
- Marín-Loaiza, J.C., and Céspedes, C.L. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4): 327-351.
- Martínez, A. (2001). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, 1-34.
- Martínez-Lombardo, M.C. y Cano-Ortiz, A. (2009). Plantas medicinales con alcaloides en la provincia de Jaén. *Boletín del instituto de estudios Giennenses*.200:125-163.

- Méndez-Aguilar, M.d.J., Castro-Ramírez, A.E., Rojas, C.J., y Huerta-Lwanga, E. (2008). Respuesta olfativa de larvas de *Phyllophaga ravidia* y *P. tumulosa* (Melolonthidae) a volátiles de raíces de cuatro plantas hospederas. *Acta Zoológica Mexicana*, 24 (1):115-128.
- Morales-Blancas, G. y Romero-López, A.A. (2019). Comportamiento de adultos de *Macroductylus mexicanus* Burmeister, 1855 (Coleoptera: Melolonthidae) en su acercamiento a árboles de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. 1892 (Fabaceae). *Entomología Mexicana*: 352-357.
- Morales-Blancas, G. y Romero-López, A.A. (2020). Observaciones del comportamiento de “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) en campo y laboratorio que evidencian atracción de estos hacia flores y brotes de su planta hospedera. *Entomología Mexicana*, 7: 279-285.
- Morón, M.A., Nogueira, G., Rojas-Gómez, C.V., y Arce-Pérez, R. (2014). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85:298-302.
- Morón, M.A. (1999). Belleza, diversidad y rareza de escarabajos mexicanos. *Biodiversitas* (CONABIO), (26), 1-6.
- Nieves-Silva, E., y Romero-López, A.A. (2019). Perfil químico de volátiles de *Baccharis salicifolia* (Asteraceae) e integración con *Macroductylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Agronómica*, 68(3): 222-227.
- Oviedo-Zamora, C.D. y Orochena-Jiménez, S. A. (2011). Métodos de extracción de aceites esenciales, comparación y empleo en productos de perfumería. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, 1-130.
- Paternina-Gómez. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. *UNIAGRARIA*, 1-56.
- Pérez-Lainez, M.D., García-Mateos, M.R. (2014). Perfil fitoquímico del aceite esencial del fruto de tejocote mexicano (*Crataegus* ssp.) Universidad Autónoma Chapingo.
- Rico-Arce, M. L. (2001). El género *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae) en el estado de Oaxaca, México (parte A). *Anales Jardín Botánico de Madrid*: 58 (2): 251-275.

- Romero-López, A.A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a una década de distancia. *Dugesiana*: 59-73.
- Roveré, A., Knaak, N. y Fiuza, L.M. (2011). Efectos tóxicos de aceites vegetales esenciales en adultos *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomología*, 55 (1); 116-120.
- Ruiz, C., Díaz, C. y Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(2): 81-94.
- Ruíz-Reyes, E. y Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *CENIC. Ciencias Biológicas*, 46 (1): 9-24.
- Song, J. H., Md, A. A., Choi, E. D., Choi, D. S. y Seo, H. J. (2018). Detección de repelentes de aceites esenciales contra plaga de pera orgánica *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Scaranaeidae). *Korean Journal of Organic Agriculture*. 26 (2), 259-268.
- Soto-Vásquez, M. R., Alvarado-García, P. A., Rosales-Cerquin, L. E., Rengifo-Penadillos, R. A. y Sagástegui-Guarniz, W. A. (2019). Composición química y efecto del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* (Verbenaceae) en los niveles de estrés académico de estudiantes universitarios. *Arnaldoa*, 26 (1):381-390.
- Stashenko, E. (2018). El desarrollo y perspectivas de la industria de aceites esenciales en Colombia. *Memorias Institucionales*, 1(1): 1-15.
- Tlapa-Almonte, M. (2005). Conservación y restauración del cerro zapotecas. *Elementos*. 57: 39-45.
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J. y Vivas-Reyes, R. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*. 42(1): 1-8.
- Villegas, N.P., Gaigl, A. y Vallejo, L.F. (2006). Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas al cultivo de

cebolla y pasto kikuyo del departamento de Risaralda, Colombia.
Agronomía. 14(1): 51-63.