

TOXICIDAD DE ALCALOIDES DE *Erythrina americana* EN LARVAS DE MOSQUITO *Culex quinquefasciatus*

TOXICITY OF ALKALOIDS OF *Erythrina americana* ON LARVAE OF MOSQUITO *Culex quinquefasciatus*

Rosario García-Mateos^{1*}, Rafael Pérez- Pacheco², Cesáreo Rodríguez-Hernández³ y Marcos Soto-Hernández⁴

¹Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230 Chapingo, Edo. de México. Tel: 01 (595) 95-215 00 Ext. 5797. Correo electrónico: rosgar08@hotmail.com ²Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional. C. P. 68000 Oaxaca, Oax. ³Instituto en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, Edo. de México. ⁴ Programa en Botánica, Colegio de Postgraduados.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

Este trabajo describe el efecto de varias fracciones de alcaloides obtenidas de las semillas de *Erythrina americana* (*Fabaceae*); tales fracciones permitieron evaluar *in vivo* su toxicidad en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La fracción de alcaloides liberados no presentó actividad, sin embargo, la fracción de alcaloides libres mostró alta toxicidad (88 % de mortalidad) en las larvas. Por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y RMN-¹H se detectó, en la fracción de alcaloides liberados, la presencia de los alcaloides diénicos erisopina, erisovina y erisodina; también se identificaron los alcaloides lactónicos α y β -eritroidina en la fracción de alcaloides libres. Para la evaluación insecticida se eligieron los dos principales alcaloides presentes: erisovina y β -eritroidina. Ambos alcaloides causaron 60 % de mortalidad y una CL₅₀ en los insectos modelo fueron de 225 y 394 mg L⁻¹, respectivamente. Los resultados muestran que la β -eritroidina resultó ser más tóxica que la erisovina.

Palabras clave: *Erythrina americana*, *Culex quinquefasciatus*, toxicidad, alcaloides, espectrometría de masas.

SUMMARY

This work describes the effect of several alkaloid fractions obtained from the seeds of *Erythrina americana* (*Fabaceae*); these fractions allowed to evaluate their *in vivo* toxicity for the mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. The fraction of liberated alkaloids in the methanolic extract did not show any activity; however, the fraction of free alkaloids showed high toxicity (88 % of mortality) on larvae. By gas chromatography-mass spectrometry and ¹H-NMR the presence of dienoic alkaloids erysopine, erysovine and erysodine was detected in the free alkaloids fraction. Also in the free alkaloid fraction, two lactonic alkaloids, α and β -erythroidine, were identified. Two of the main alkaloids were chosen for the insecticide test, β -erythroidine and erysovine. Both alkaloids, showed a 60% mortality on the insect model and their LC₅₀ were 225 and 394 mg L⁻¹, respectively. The results show that β -erythroidine was more toxic than erysovine.

Index words: *Erythrina americana*, *Culex quinquefasciatus*, toxicity, alkaloids, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan numerosas sustancias, entre las cuales están los metabolitos secundarios de gran diversidad química y fisiológica, agrupados principalmente en: alcaloides, flavonoides, terpenoides etc. Éstos son importantes por su interacción con otros organismos, hecho que se encuentra ampliamente documentado (Taiz y Zeiger, 1998; Gershenzon y Croteau, 1991; Elakovich, 1988; Robinson, 1979).

Los metabolitos secundarios juegan un papel ecológico relevante y el hombre ha aprovechado el potencial que ofrecen para convertirlos en tema de investigación en diferentes áreas, como es la búsqueda de nuevos insecticidas (Khambay y O'Connor, 1993; Ley, 1990). Numerosas investigaciones realizadas en los últimos años han permitido detectar plantas con propiedades insecticidas, de las cuales se han encontrado aproximadamente 1000 especies y entre ellas destacan las familias Euphorbiaceae, Asteraceae, Labiatae, Fabaceae, Meliaceae y Solanaceae (Rodríguez, Com. personal)¹.

En México también se han buscado productos naturales con actividad insecticida. Lagunes *et al.* (1984), al

¹ C Rodríguez H (1986) Tesis de MC. Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados. Actualmente es investigador del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

evaluar 437 especies de plantas encontraron cierta especificidad para algunos insectos, ya que solamente siete especies mostraron toxicidad en el mosquito doméstico *Culex quinquefasciatus*; tres de las cuales pertenecen a la familia Fabaceae, dos a Asteraceae, una a Hypocrateaceae y la última a la familia Solanaceae.

En la familia Fabaceae se encuentra al género *Erythrina*, ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales del país. Los estudios etnobotánicos realizados por Hastings (1990) señalan la elevada toxicidad que en diferentes organismos manifiestan las semillas de algunas de sus especies, entre ellas las de *E. americana*, *E. flabelliformis* y *E. herbacea* por la presencia de alcaloides del tipo eritranino; se han identificado las α y β -eritroidinas como los de mayor toxicidad en animales de laboratorio (García-Mateos *et al.*, 2000a). Asimismo, estudios entomológicos describen alta mortalidad de larvas y pupas de varias especies de lepidópteros producida por los extractos de *Erythrina indica* (Senthamizhselvan y Muthukrishnan, 1992).

En tres de doce especies estudiadas del género *Cocculus* (Menispermaceae) se identificaron alcaloides del tipo eritranino, de las cuales la cocculolidina manifestó gran actividad como insecticida (Dyke y Quessy, 1981; Wada *et al.*, 1966), lo que permitió inferir que su homólogo más cercano, la β -eritroidina, metabolito de *E. americana*, pudiera tener actividad similar. En la presente investigación se evaluó la toxicidad de las fracciones alcaloideas de *Erythrina americana* Miller, en larvas de cuarto ínstar temprano del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), así como se aisló e identificó a los alcaloides responsables de la actividad tóxica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio Fitoquímico

Colecta del material vegetal. Las semillas se colectaron en el mes de mayo de 1999, en Colorines, Méx., población que se ubica a una altitud de 1680 m y cuyo clima es (A)Ca(w¹)(w)(i')gw", con temperatura media anual de 19 °C y precipitación media anual de 1007 mm (García, 1973). Las semillas colectadas se secaron y se molieron mecánicamente. La autenticidad de las muestras hasta ahora mencionadas fueron certificadas por el curador M. en C. Manuel González del herbario del Programa de Botánica del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México.

Preparación de los extractos crudos de alcaloides. Se siguieron los métodos descritos por Millington *et al.*

(1974) y Games *et al.* (1974) que a continuación se detallan:

Alcaloides libres. La muestra en polvo (451 g) se desengrasó con hexano en un Soxhlet por 48 h; el disolvente se evaporó al vacío y el extracto crudo hexánico se lavó con una solución de H₂SO₄ a 2 %. La separación de la grasa se llevó a cabo con lavados consecutivos de diclorometano (3 x 100). La fase acuosa se basificó con NaHCO₃ hasta alcanzar un pH entre 8-9, seguida de una extracción con diclorometano (3 x 100). El extracto de diclorometano se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó bajo presión reducida para obtener la fracción de alcaloides libres del extracto hexánico. El residuo se secó a temperatura ambiente y se extrajo con metanol en un Soxhlet durante 48 h, y el disolvente se evaporó a sequedad. El extracto crudo se disolvió en una solución de H₂SO₄ a 2 %; después se hicieron varios lavados con diclorometano (3 x 100). El disolvente libre de humedad se evaporó para obtener la fracción de alcaloides libres.

Alcaloides liberados. El remanente de la fase acuosa se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se llevó a reflujo durante 3 h a una temperatura entre 60 y 70 °C. La mezcla fría se alcalinizó con NaHCO₃ hasta obtener pH 8 y se extrajo con diclorometano (3 X 100); el disolvente se secó con Na₂SO₄ anhidro y posteriormente se evaporó, para obtener la fracción de alcaloides liberados (Millington *et al.*, 1974; Games *et al.*, 1974).

Purificación de alcaloides. La separación de los compuestos se realizó mediante un fraccionamiento por cromatografía preparativa en columna, al utilizar sílicagel (gel de sílice G 60 Merck 70-230 mallas) como adsorbente; el proceso de elución se efectuó con diclorometano:metanol en diferentes proporciones (v:v). Se recogieron un total de 148 fracciones de 10 mL cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, y se combinaron aquéllas cromatográficamente similares. De las fracciones 21 a la 29 se aislaron β -eritroidina y de las fracciones 30 a la 43 se identificaron una mezcla de α y β -eritroidina; de las fracciones 73 a la 97 se separó una mezcla de erisovina/erisodina. La separación de la erisovina de su isómero erisodina se realizó a través del fraccionamiento en una segunda columna cromatográfica en donde el eluyente inicial fue cloroformo, y el eluyente final con una mezcla de cloroformo:metanol 95:5. El punto de fusión registrado fue de 168 - 169 °C, idéntico al descrito para el compuesto de referencia erisovina. Los puntos de fusión de los compuestos purificados se determinaron en un aparato Electrothermal, (Electrothermal, Co. U.K.), sin corrección de temperatura.

Formación del iodhidrato derivado. Para mantener los compuestos estables y evitar modificaciones estructurales por luz y temperatura, se transformaron en las sales de sus respectivos iodhidratos (Cordell, 1981). Se disolvió β -eritroidina en etanol absoluto y se adicionó NaI hasta que se logró la solubilidad completa. La solución se acidificó con una cantidad calculada de ácido acético, hasta la precipitación del iodhidrato. Se filtró el precipitado y se lavó con etanol absoluto hasta que desaparecieron los residuos de ácido. Para realizar las evaluaciones de toxicidad se transformaron en los alcaloides libres en el momento de hacerlas.

Preparación de trimetilsililderivados para GC y GC/EM. La mezcla de alcaloides crudos (1- 2 mg) fueron derivados como trimetilsililderivados al disolverlos en acetonitrilo y posterior adición de 25 μ L de N,O-bis (trimetilsilil)-acetamida (BSA); esta reacción se hizo en un vial con tapa de teflón (screw-cap) para evitar la evaporación. Después de 30 min la muestra (1 μ L) se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Cromatografía en capa fina (CCF). Los análisis cromatográficos en capa fina se hicieron con las técnicas convencionales en placas recubiertas de gel de sílice (silicagel 60 GF₂₅₄, Merck); el eluyente empleado fue diclorometano: metanol en una proporción de 8:2 (v:v). Las placas se revelaron con el reactivo de Dragendorff, específico para alcaloides.

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/EM). La caracterización de los alcaloides de los extractos crudos se realizó mediante el análisis con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, Serie II, con una columna capilar empacada con silicona 1701 y un separador de Watson-Biemann de dos pasos acoplado a un espectrómetro de masas JMSAX 505 HA (JEOL). La temperatura de la fuente de iones fue de 220 °C y los potenciales de aceleración y de ionización fueron de 3 kV y 70 eV, respectivamente. Los espectros de masas registrados se compararon con muestras auténticas y biblioteca de espectros para su identificación (Boar y Widdowson, 1970).

Análisis por ¹H-RMN. Los compuestos puros se analizaron por ¹H-RMN para su identificación y pureza. Los espectros de ¹H-RMN se determinaron en un espectrómetro Bruker-300 de 360 MHz, con DMSO como disolvente DMSO y TMS como referencia interna.

Evaluación de toxicidad en mosquitos *Culex quinquefasciatus*

Cría del mosquito. La cría del mosquito *C. quinquefasciatus* se hizo en laboratorio con la metodología descrita

por Georghiou *et al.* (1966, citado por Rodríguez, *Op. cit.*). Se colectaron masas de huevecillos en agua estancada en el área de Montecillo y Chapingo, y se colocaron en agua para su eclosión. Dos o tres días después, al emerger las larvas se trasladaron a un recipiente de plástico (30 x 30 x 10 cm) con agua donde se les proporcionó el alimento adecuado. Después de 15 d en estado larval se formaron las pupas, las cuales se colectaron y trasladaron a jaulas entomológicas hasta obtener los mosquitos adultos (Rodríguez, *Op. cit.*). Después de la oviposición, se colectaron las masas de los huevecillos y se continuó el ciclo biológico para obtener larvas de cuarto ínstar temprano para la evaluación de las fracciones de alcaloides.

Preparación de las soluciones a evaluar. Las fracciones de alcaloides libres y liberados del extracto metanólico se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO \leq 0.2 %), para formar una solución patrón de 1000 mg L⁻¹, a partir de la cual se prepararon las diluciones para obtener diferentes concentraciones. De la misma forma se prepararon las soluciones de los alcaloides puros, erisovina y β -eritroidina.

Bioensayos. La evaluación se inició con la preparación de diferentes concentraciones de las fracciones metanólica de alcaloides libres y de alcaloides liberados. Posteriormente, se evaluaron en forma separada diferentes concentraciones de los dos alcaloides puros, más los testigos de agua y de agua-DMSO.

Los experimentos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorio, con cuatro repeticiones incluyendo los testigos. Se utilizaron larvas de mosquito *C. quinquefasciatus* de cuarto ínstar temprano. Para cada unidad experimental se depositaron 20 larvas en un vial, al cual se adicionaron previamente 25 mL de las soluciones preparadas. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

La evaluación de mortalidad de larvas se registró a las 24 h después de la aplicación de los tratamientos. Con la fracción de alcaloides liberados y los alcaloides puros se procedió de manera similar. La concentración letal 50 (CL₅₀) se determinó a través del análisis Probit (Finney, 1972).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio fitoquímico

Se obtuvieron 63.1 g de extracto crudo hexánico y 62.3 g de extracto crudo metanólico. El contenido de alcaloides de la fracción de alcaloides libres del extracto crudo metanólico fue de 0.30 g por 100 g de muestra (peso seco), que fue mayor al de las fracciones de alcaloides libres del

extracto hexánico y al de la fracción de alcaloides liberados del extracto metanólico: 0.04 y 0.05 g por 100 g de muestra (materia seca), respectivamente.

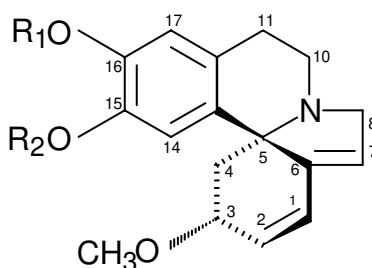
Según Robinson (1979), una planta puede considerarse fuente de alcaloides cuando contiene más de 0.05 % de alcaloides con base en peso seco, y para Hegnauer (1993) debe contener más de 0.01 %. Los resultados del presente trabajo indican que la especie evaluada rebasa las concentraciones señaladas por esos autores. Es importante señalar que en casi todos los estudios previos (García-Mateos *et al.*, 1996; 1998) realizados en especies de *Erythrina*, las semillas y las flores presentaron las más altas concentraciones de alcaloides, lo cual coincide con la hipótesis de que las semillas son los sitios de acumulación de este tipo de metabolitos secundarios (Robinson, 1979), lo que explica su toxicidad.

Los análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas permitieron identificar los alcaloides de los extractos. Sus estructuras se muestran en la Figura 1. La distribución de alcaloides en las fracciones analizadas (Cuadro 1) contrastan con la reportada en trabajos previos (García-Mateos *et al.*, 1996; 1998).

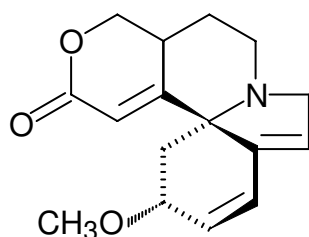
Cuadro 1. Alcaloides identificados por CG/EM en las fracciones de *Erythrina* americana.

Alcaloide	Fracción hexánica (alcaloides libres)	Fracción metanólica (alcaloides libres)	Fracción metanólica (Alcaloides liberados)
Erisodina	-	-	39.6
Erisovina	4.2	-	56.8
Erisopina	-	-	3.6
α -Eritroidina	80.9	82.6	-
β -Eritroidina	14.9	17.4	-

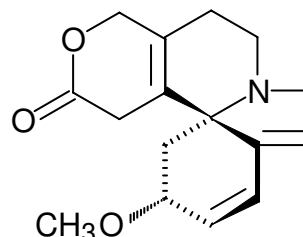
(-) Ausente. Las proporciones relativas de los alcaloides fueron calculadas de las áreas de los picos de cromatografía de gases.



Alcaloides diénicos	R ₁	R ₂
Erisopina	H	H
Erisodina	H	Me
Erisovina	Me	H



α -Eritroidina



β -Eritroidina

Figura 1. Estructuras de los alcaloides identificados por CG/EM en *Erythrina* americana (Amer, 1991).

En las semillas analizadas de *E. americana* se detectaron alcaloides del tipo diénico identificados en especies del nuevo mundo: erisopina, erisodina y erisovina y los alcaloides lactónicos α y β -eritroidina, estos últimos estudiados por sus efectos farmacológicos (García-Mateos *et al.*, 1998, 2000a; Sotelo *et al.*, 1993; Abdullah *et al.*, 1979; Hargreaves *et al.*, 1974), y que fueron detectados previamente en semillas y flores, como se muestra en el Cuadro 2. No se encontraron alcaloides del tipo alquénico. Los espectros de masas de los alcaloides detectados en los extractos analizados por CG-EM presentaron el patrón de fragmentación característico de los alcaloides del tipo eritrinano (Boar y Widdowson, 1970). La identificación de los alcaloides se basó en la comparación con los espectros de muestras auténticas.

Cuadro 2. Alcaloides identificados en *Erythrina americana* previamente estudiados por otros autores.

Referencia	Especie	Tejido	Alcaloide identificado
Hargreaves <i>et al.</i> (1974)	<i>E. americana</i>	Semillas	Erisodina, Erisovina, α -Eritroidina, β -Eritroidina
Sotelo <i>et al.</i> (1993)	<i>E. americana</i>	Semillas	Erisodina, Erisovina, α -Eritroidina, β -Eritroidina
Abdulah <i>et al.</i> (1979)	<i>E. americana</i>	Semillas	Erisovina, Erisopina, α -Eritroidina, β -Eritroidina

EL espectro de masas de la erisovina mostró el ión molecular (M^+) en m/e 371. El ión molecular (M^+) del derivado trimetilsililado de la erisopina se observó en m/e 429. Los alcaloides lactónicos presentaron el ión molecular (M^+) m/e en 273 para ambos isómeros (Amer, 1991; García-Mateos *et al.*, 1998). Los espectros de RMN- 1H de la β -eritroidina y erisovina presentaron los desplazamientos típicos de un alcaloide lactónico y uno diénico del tipo eritrinano, lo cual confirmó su identificación (Amer, 1991).

Evaluación de toxicidad en mosquitos *C. quinquefasciatus*

Fracciones de alcaloides contra larvas de mosquitos

Las seis concentraciones evaluadas de la fracción de alcaloides libres del extracto metanólico, causaron una mortalidad de 25 a 88.3 % (Cuadro 3). El análisis Probit proporcionó una CL_{50} a 87.5 mg L $^{-1}$ con límites fiduciales entre 75.7 y 100.7 ($\chi^2=7.74$). De la fracción de alcaloides liberados se evaluaron siete concentraciones las cuales causaron baja mortalidad, razón por la que no se aplicó el análisis Probit. El análisis cromatográfico permitió detectar que la fracción de alcaloides libres está formada por tres componentes que muestran un efecto sinérgico en la toxicidad; lo mismo sucede con la fracción de alcaloides liberados. Por tanto, la toxicidad de la fracciones se debió a la presencia de alguno de los componentes de la mezcla que mostró actividad importante.

Cuadro 3. Porcentajes de mortalidad con la aplicación de las fracciones de alcaloides obtenidos de *Erythrina americana*.

Fracción de alcaloides libres		Fracción de alcaloides liberados	
Tratamientos (mg L $^{-1}$)	% de Mortalidad	Tratamientos (mg L $^{-1}$)	% de Mortalidad
300	88.3	1000	16.6
200	86.6	700	0
100	66.6	400	0
50	25.0	100	0
25	0	70	0
10	0	40	0
DMSO 0.2 %	0	10	0
Agua	0	DMSO 0.2 %	0
		Agua	0

Alcaloides puros contra larvas de mosquitos. Se evaluaron cuatro concentraciones de β -eritroidina, en las cuales se presentó mortalidad en un rango de 15 a 60 % (Cuadro 4); a los datos obtenidos se les realizó un análisis Probit, y se encontró una CL_{50} igual a 225 mg L $^{-1}$ y límites fiduciales de 205 y 258 ($\chi^2=5.78$). De erisovina se evaluaron tres concentraciones, y se detectó una mortalidad entre 40 y 61.7 % (Cuadro 4), cuyo análisis Probit permitió determinar su CL_{50} de 399, con límites fiduciales de 304 y 547 ($\chi^2=0.61$).

Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad con la aplicación de los alcaloides β -eritroidina y erisovina obtenidos de *Erythrina americana*.

β -Eritroidina		Erisovina	
Tratamientos (mg L $^{-1}$)	% de Mortalidad	Tratamientos (mg L $^{-1}$)	% de Mortalidad
250	60.0	500	61.7
200	53.3	400	58.3
150	18.3	300	40.0
100	15.0		
DMSO 0.2 %	0	DMSO 0.2 %	0
Agua	0	Agua	0

Los resultados muestran diferencias importantes en la toxicidad de las dos fracciones probadas, ya que la de alcaloides libres superó en toxicidad a la fracción de alcaloides liberados, ambas del extracto metanólico. Esto se justifica al considerar que de la primera fracción se aisló y purificó el alcaloide β -eritroidina, el cual resultó más tóxico que la erisovina identificada en la fracción de alcaloides liberados. En la literatura no se encontraron pruebas de la toxicidad de metabolitos de naturaleza alcaloidal, en particular de extractos o de los alcaloides provenientes de *E. americana* (β -eritroidina o erisovina) en el mosquito *C. quinquefasciatus*, que pudieran utilizarse como punto de comparación.

En contraste, en un estudio previo (García-Mateos *et al.*, 2000b) realizado con fracciones de *E. americana* se detectó mayor toxicidad en la fracción que contiene erisovina, como componente mayoritario de la mezcla, pero sin actividad importante en la fracción que contiene

β -eritroidina, al aplicarlos al crustáceo *Daphnia magna* (CL₅₀ de 92.8 y 78.6 mg L⁻¹) y al nemátodo *Panagrellus redivivus* (0.10 y 0.05 %); sin embargo en tal estudio no se hizo la evaluación de los compuestos puros. Al comparar ambos resultados, éstos permitieron inferir mayor sensibilidad de estos organismos para las fracciones de *E. americana*.

No obstante, la información sobre la toxicidad de la especie en organismos superiores así como la de la β -eritroidina se describe insistentemente. Estudios previos hechos en animales de laboratorio señalan su elevada toxicidad (García-Mateos *et al.*, 2000a; Berger y Schwartz, 1948; Unna *et al.*, 1944).

Numerosas investigaciones han tenido como finalidad la búsqueda de plantas con actividad insecticida, mediante pruebas de extractos acuosos, aceites y esencias y la aplicación directa de polvos de plantas completas o de diferentes tejidos; se ha encontrando actividad tóxica a concentraciones más elevadas (5 - 10 %) en larvas de mosquito que las evaluadas en la presente investigación (Lagunes *et al.*, 1984; Rodríguez, *Op. cit.*).

CONCLUSIONES

La fracción metanólica de alcaloides libres resultó ser más tóxica que la de alcaloides liberados. El alcaloide diénico erisovina presentó menor toxicidad que el alcaloide lactónico β -eritroidina, este último aislado de la fracción de alcaloides libres. La determinación de toxicidad de los extractos y alcaloides obtenidos de *E. americana* sobre larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* contribuye al conocimiento de la toxicidad de algunas especies pertenecientes al género *Erythrina*. Se recomienda evaluar estas sustancias en otras especies que son vectores de enfermedades comunes de México, así como analizar su efecto sobre la fauna acompañante de las larvas del mosquito en los cuerpos de agua.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. M. Martínez Vázquez del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades brindadas en el corrimiento de los espectros de RMN-H y al Dr. D. Kelly del Departamento de Química de la Universidad de Gales, en Cardiff, U.K. por el apoyo en el análisis de CG-EM.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah M I, I E Barakat, D E Games, P Ludgate, V G Mavraganis, A H Jackson (1979) Studies of *Erythrina* alkaloids Pt. III. GC-MS Investigations of alkaloids in the seeds of a further fourteen species. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66:533-540.
- Amer M E (1991) The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. *J. Nat. Prod.* 54:329-363.
- Berger F M, R P Schwartz (1948) The toxicity and muscular effect of d-tubocurarine combined with β -erythroidine, myanesin or evipal. *J. Pharm. Exp.* 93:362-367.
- Boar R B, D A Widdowson (1970) Mass Spectra of the *Erythrina* alkaloids. A novel fragmentation of the spiran system. *J. Chem. Soc. B*:1591-1595.
- Cordell G A (1981) Introduction to Alkaloids, a Biogenetic Approach. Wiley Interscience. U.K. 365 p.
- Dyke S F, S N Quessy (1981) *Erythrina* and related alkaloids. In: The Alkaloids Vol. 18. R F H Manske (ed). Academic Press. New York, USA. pp:1-98.
- Elakovich S D (1988) Terpenoids as model new agrochemicals. In: Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture. H G Cutter (ed). A.C.S. Symposium Series. Am. Chem. Soc. Washington D.C. pp:250-261.
- Finney D J (1972) Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge University Press. London. 333 p.
- Games D E, A H Jackson, N A Khan, O S Millington (1974) Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia* 37:581-588.
- García E (1973) Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 245 p.
- _____, B Lucas, M Zendejas, M Soto-Hernández, M Martínez, A Sotelo (1996) Variation of total nitrogen, non-protein nitrogen content, types of alkaloids at different stages of development in *Erythrina americana* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 44:2987-2991.
- García M R, M Soto-Hernández, D Kelly (1998) Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Bioch. System. Ecol.* 26:545-551.
- _____, M E Garín-Aguilar, M Soto-Hernández, M Martínez-Vázquez (2000a). Effect of β -erythroidine and dihydro- β -erythroidine from *Erythrina americana* on rats aggressive behaviour. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 10:34-37.
- _____, M Soto-Hernández, M Martínez Vázquez (2000b) Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Rev. Ciencia Ergo Sum* 7:166-170.
- Gershenzon J, R Croteau (1991) Terpenoids In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. G A Rosenthal, M R Berenbaum (eds). Academic Press. USA. pp:165-209.
- Hargreaves R T, R D Johnson, D S Millington, M H Mondal, W Breavers, L Becker, C Young, K L Rinehart Jr (1974) Alkaloids of american species of *Erythrina*. *Lloydia* 37:569-580.
- Hastings R B (1990) Medicinal legumes of México: Fabaceae Papilionoideae, Part One. *Econ. Bot.* 44:336-348.
- Hegnauer R (1993) The taxonomic significance of alkaloids In: Chemical Plant Taxonomy. T Swain (ed). Academic Press. New York. pp:389-427.
- Khambay B P S, N O'Connor (1993) Progress in developing insecticides from natural compounds. In: Phytochemical and Agriculture. Proc. Phytochemical Soc. Europe. T A Beek van, H Breteler (eds). Clarendon Press. Oxford. U.K. pp:40-61.
- Lagunes T A, L C Arenas, H Rodríguez (1984) Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. CONACYT-CP-UACH-INIA-DGSV. Editorial Futura. México. 203 p.
- Ley S V (1990) Synthesis of antifeedants for insects: novel behaviour-modifying chemicals from plants. In: Bioactive Compounds from Plants. Ciba Foundation Symposium 154. D J Chadwick, J Marsh (eds). John Wiley & Sons. U.K. pp:80-98.
- Millington S, H Steinman, K L Rinehart Jr (1974) Isolation, gas chromatography, mass spectrometry and structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* Krukoff and Moldenke and *Erythrina salviflora* Krukoff and Barneby. *J. Amer. Chem. Soc.* 96:1909-1914.

- Robinson T (1979)** The evolutionary ecology of alkaloid. *In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. G A Rosenthal, D H Janzen (eds). Academic Press. New York, USA. pp:413-448.
- Senthamizhselvan M, J Muthukrishnan (1992)** Effect of plant chemicals on food consumption of three lepidopteran larvae. *Insect Sci. Appl.*13:429-434.
- Sotelo A, M Soto, B Lucas, F Giral (1993)** Comparative studies of the alkaloidal composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the detoxified seeds. *J. Agric. Food Chem.* 41:2340-2343.
- Taiz L, E Zeiger (1998)** Plant defenses: surface protectans and secondary metabolites. *In: Plant Physiology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. pp:347-376.
- Unna K, M Kniazurk, J G Greeslin (1944)** Pharmacologic action of *Erythrina alkaloids*. I. β -Erythroidine and substances derived from it. *J. Pharm. Exp.*80:39-52.
- Wada K, S Marumo, K Munakata (1966)** An insecticidal alkaloid, cocculidine from *Cocculus trilobus* DC. *Tetrahedron Lett.* 5179-5184.