

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTENONAS  
DE ESPECIES DE BARBASCO EN EL MUNICIPIO DE POPAYÁN.**

**DORA LILIANA CASTILLO OCAMPO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN, 2002**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTENONAS  
DE ESPECIES DE BARBASCO EN EL MUNICIPIO DE POPAYÁN.**

**DORA LILIANA CASTILLO OCAMPO**

**Trabajo de grado presentdo como requisito paracial para optar al título de  
QUIMICO**

**Director :**

**Mg. NELSON ROJAS MARTÍNEZ**

**Asesores:**

**Mg. MEDARDO VANEGAS TORRES**

**Especialista BERNARDO RAMÍREZ PADILLA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN, 2002**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

**Mg. Nelson Rojas Martínez**

**Director**

---

**Mg. Isabel Bravo Realpe**

**Jurado**

---

**Dr. Fabio Antonio Cabezas**

**Jurado**

**Fecha de sustentación: Popayán \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2002.**

## **DEDICATORIA**

La meta que he logrado quiero dedicarla de corazón a toda mi familia, a mi esposo Victor Hugo, a mis hijas Victoria Alejandra y María Camila, a mis padres Mireya y Sigi, a mi abuela Elvia, a mis hermanos Alex y Elvia, quienes me apoyaron en todo los momentos que necesite de ellos, gracias por su paciencia y dedicación, por que sin ellos no hubiera sido posible culminar una de mis metas fijadas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Presento mis sinceros agradecimientos a todas y cada una de las personas que me colaboraron para lograr a feliz término mi trabajo de grado que hoy presento ante Ustedes, a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca quien financió el proyecto, a la Universidad de Antioquia quien me brindó toda la colaboración solicitada para el desarrollo del mismo.

A Ustedes señores de corazón mis más sinceros agradecimientos:

Director del proyecto Magíster Nelson Rojas

Jurados Magíster Isabel Bravo y Fabio Cabezas

Asesores Magíster Medardo Vanegas y Bernardo Ramírez

Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca

A mis amigos Ingeniero Diego Martínez y Alma Rocío Imbachí C.

A mi esposo Ingeniero Victor Hugo Rodríguez López

Decano Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación Magíster

Alvaro Tascón

Departamento de Biología de la Universidad del Cauca

Grupos de Estudios Ambientales de la Vicerrectoría de Investigaciones Catalina

Segura y Diana López

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.	
ABSTRACT	
INTRODUCCION.	1
1. MARCO REFERENCIAL.	3
1.1 JUSTIFICACION.	3
1.2 OBJETIVOS.	5
1.2.1 Objetivo General.	5
1.2.2 Objetivos Específicos.	4
1.3 MARCO TEORICO.	6
1.3.1 Antecedentes.	7
2. MATERIALES Y METODOS	11
2.1 TRABAJO DE CAMPO	11
2.2 TRABAJO DE LABORATORIO	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1 ANALISIS DE CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA O PAPEL	20

3.2	ANALISIS ESPECROSCOPICO	26
3.2.1	Espectro de IR	26
3.2.2	Espectro UV (Ultravioleta)	29
3.2.3	Espectro de RMN $^1\text{H}$	30
3.2.4	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN	34
4.	CONCLUSIONES.	45
5.	BIBLIOGRAFIA	47

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Resultados de separación de flavonoides de <i>Dichondra microcalyx</i> .	20
<b>Tabla 2.</b> Resultados de separación de flavonoides de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	22
<b>Tabla 3.</b> Resultados de separación de flavonoides de <i>Polygonum punctatum</i> Elliott.	24
<b>Tabla 4.</b> Datos espectrales IR experimentales de <i>Dichondra microcalyx</i> .	27
<b>Tabla 5.</b> Datos espectrales de <sup>1</sup> H RMN del isoflavonoide obtenido de <i>Dichondra microcalyx</i> . (Hallier f.) Fabris.	32
<b>Tabla 6.</b> Datos espectrales de <sup>13</sup> C RMN del isoflavonoide obtenido de <i>Dichondra microcalyx</i> . (Hallier f.) Fabris.	36
<b>Tabla 7.</b> Correlación de protones en el espectro homonuclear COSY del isoflavonoide aislado <i>Dichondra microcalyx</i> . (Hallier f.) Fabris.	39
<b>Tabla 8.</b> Correlación del protón -Carbono en el espectro heteronuclear HMBC del isoflavonoide aislado.	42



## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	Núcleos de flavonoides	7
<b>Figura 2</b>	Flujo de electrones durante la fosforilación oxidativa	10
<b>Figura 3.</b>	Protocolos para la extracción y obtención de isoflavonoides.	13
<b>Figura 4.</b>	Protocolo para separación de flavonoides (Mabry et al. 1970).	15
<b>Figura 5.</b>	Imágenes de <i>Dichondra microcalyx</i> (Hallier f.) Fabris B. <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill , C. <i>Polygonum punctatum</i> Elliott.	18
<b>Figura 6.</b>	Cromatografía bidimensional de <i>Dichondra microcalyx</i> (Hallier f.) Fabris.	21
<b>Figura 7</b>	Plantilla de distribución de los flavonoides según Mabry	22
<b>Figura 8.</b>	Cromatografía bidimensional de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	23
<b>Figura 9.</b>	Cromatografía bidimensional de <i>Polygonum punctatum</i> Elliott.	24

<b>Figura 10</b>	Espectro IR del isoflavonoide extraído de <i>Dichondra microcalyx</i> (Hallier f.) Fabris	27
<b>Figura 11</b>	Espectro de UV visible del isoflavonoide de <i>Dichondra microcalyx</i>	29
<b>Figura 12</b>	Proyección de Newman para el acoplamiento de C – H.	31
<b>Figura 13</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del isoflavonoide	32
<b>Figura 14</b>	Fórmula estructural del isoflavonoide aislado.	34
<b>Figura 15</b>	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear <sup>13</sup> C.	39
<b>Figura 16</b>	Espectro COSY del compuesto aislado	42
<b>Figura 17</b>	Espectro HMBC del compuesto aislado	45
<b>Figura 18.</b>	Fórmula estructural del isoflavonoide referencial.	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta Visible
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( <sup>1</sup> H)
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C.
HMBC	Heteronuclear Múltiple-Bond Connectivity.
TBA	Terbutanol, Acido Acético, Agua.
2D	Bidimensional.
HOAC	Acido Acético.
μl	Microlitros.
mL	Mililitros.
TLC	Cromatografía en placa fina.
Rf	Distancia Recorrida.
λ	Longitud de onda en nm.

## RESUMEN

Este estudio se diseñó para investigar algunos biopesticidas presentes en plantas localizadas en la meseta de Popayán, averiguando otra posibilidad para el control de insectos que afectan los cultivos. Estos compuestos conocidos como insecticidas botánicos fueron usados por comunidades nativas en diferentes lugares del mundo, pero ahora esta práctica no es común respecto a la utilización de pesticidas sintéticos. Aunque estos compuestos son efectivos contra plagas, representan un riesgo para la salud humana debido a que se mueven a través de los diferentes ecosistemas y niveles tróficos en la cadena alimenticia.

Hablando acerca de la diversidad biológica podemos decir que los recursos regionales de plantas (“barbascos”) para producir compuestos activos es amplio. Este trabajo confirma la presencia de varias plantas que contienen principios activos tipo isoflavonoides. A nivel preliminar se estudiaron dos plantas *Indigofera suffruticosa* Mill (Papilionaceae), *Polygonum punctatum* Elliott (Poligonaceae) con excelentes posibilidades para proveer flavonoides y una tercera planta *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris que produce un rotenoide. Este compuesto se extrajo, purificó y finalmente se estableció la estructura química del biopesticida.

## ABSTRACT

This study was conducted to research some biopesticides presents in plants localized in the Popayán table-land to find out other possibility to insects control that affect crops. Compounds known which botanical insecticides were used by native communities in different places of the world, but this is not a common practice respect of synthetic pesticides. Although this compounds are effective against plagues, represent a risk to human health, because it moves across different ecosystems and trophic levels in the alimentary chain.

Talking about of biological diversity we can say that regional plant resources (“barbascos” ) to produce active compounds is wide. This work confirm the presence of several plants that it contain active principles isoflavonoids type. We were studied two plants at preliminary level *Indigofera suffruticosa* Mill (Papilionaceae), *Polygonum punctatum* Elliott (Poligonaceae) with excellent possibilities to provide flavonoids, a third plant *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris that produce an rotenoid, this compound was extracted, purified and finally established the chemical structure of this biopesticide.

## INTRODUCCIÓN

Las rotenonas son compuestos presentes en varias especies de los denominados barbascos, de amplia utilización como ictiotóxicos y biopesticidas. Estas rotenonas químicamente son compuestos de tipo flavonoide e isoflavonoide y el efecto tóxico se atribuye a la inhibición de la actividad NADH: ubiquinona oxidoreductasa, afectando la respiración mitocondrial (Fukami, 1976; Hollingworth, 1995). Esta investigación está dirigida a la evaluación de la presencia de rotenonas en las especies *Indigofera suffruticosa*, Mill. (Papilionaceae), *Dichondra microcalyx* (Hallie f.) Fabris (Convolvulaceae) y *Poligonum punctatum* Elliot (Poligonaceae) presentes en la meseta de Popayán.

Los géneros antes mencionados según los reportes bibliográficos contienen compuestos flavonoides que se han usado tradicionalmente en las comunidades indígenas y campesinas como ictiotóxico y para el control de ectoparásitos. En nuestro medio se conoce el uso tradicional en la pesca y para control de pulgas y piojos en animales (Miller, 1998) Estos compuestos se acumulan prácticamente en partes aéreas y subterráneas de las plantas dependiendo de cada especie.

La importancia del trabajo de investigación está relacionada con la posibilidad de utilizar este compuesto para control de insectos del espárrago, agroindustria que

tiene una alta productividad y actualmente constituye una empresa de gran proyección regional para la exportación a los mercados internacionales.

El trabajo comprende dos fases importantes, la fase de campo para identificar y coleccionar las plantas, la preparación de extractos para el aislamiento, la caracterización química del compuesto mediante técnicas espectroscópicas y la segunda fase corresponde a la evaluación biológica del principio activo que se realizará durante el desarrollo del proyecto 551.

## **1. MARCO REFERENCIAL.**

### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Actualmente las empresas dedicadas al cultivo del espárrago (6) tienen una producción anual de aproximadamente 40.000 cajas/año por empresa (comunicación personal, Empresa Agrícola Palacé). El producto post-cosecha del espárrago (turión) presenta una serie de escamas triangulares, especialmente numerosas en la cabeza del mismo. En estos espacios se desarrollan una variedad de insectos que deben eliminarse antes del empacado final. Para esto se realiza una inmersión del espárrago durante 20 minutos en una solución de Lannate, compuesto altamente tóxico (etiqueta roja, <http://LANNATE/DuPont.Poductos Agrícolas – precauciones.html>) cuyo compuesto activo es el Metomilo: S-Metil-N-((metil carbamoil)oxi) tioacetamidato, insecticida sintético de tipo carbamato, inhibidor de la acetilcolinesterasa y agrotín como adherente del insecticida.

La vida media del lannate es de 54 semanas, de tal manera que los residuos de este compuesto pueden constituir un problema de tipo sanitario si no se realiza una limpieza adecuada, ocasionando un serio problema para la exportación del espárrago. Además, estos compuestos generan residuos tóxicos que afectan directamente a la fauna y flora asociada a los agroecosistemas constituyendo un problema de impacto ambiental. Este tratamiento genera igualmente costos en la producción y produce riesgo ambiental en quienes manipulan el plaguicida. La ingestión produce ceguera, si se inhala o se absorbe puede causar daños



irreversibles en los ojos y además los residuos podrían ser fácilmente detectables para el control sanitario que realizan los países importadores.

### **1.1.1 Hipótesis**

La especie *Dichondra microcalyx* contiene isoflavonoides tipo rotenona que podría sustituir el empleo del insecticida lannate en el control de insectos del espárrago. Este compuesto se puede extraer, purificar y caracterizar químicamente mediante técnicas espectroscópicas.

## 1.2 OBJETIVOS.

### 1.2.1 Objetivo General.

Extraer, aislar, purificar y caracterizar los flavonoides presentes en diferentes especies, *Dichondra microcalyx* (Convolvulaceae), *Indigófera suffruticosa* Mill (Papilionaceae) y *Polygonum punctatum* Elliot (Poligonaceae).

### 1.2.2 Objetivos Específicos.

- Mediante diferentes técnicas (TLC, cromatografía en papel 2D, columna cromatográfica, cristalización y recristalización) aislar y purificar los flavonoides de algunas especies de barbascos.
- Caracterizar químicamente los compuestos flavonoides encontrados en *Dichondra microcalyx* (Convolvulaceae) y proponer estructura del compuesto obtenido utilizando diferentes técnicas de resonancia magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMBC y COSY).

### 1.3 JUSTIFICACION

Las rotenonas son compuestos de tipo isoflavonoide presentes en varias familias botánicas, algunas de ellas presentes en la meseta de Popayán. Estos compuestos en extracto crudo se han utilizado hace varias décadas como ictiotóxicos y biopesticidas. La aguda toxicidad de rotenonas para los insectos, peces y mamíferos se atribuye a la inhibición de la actividad de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa como el blanco primario (Fukami, 1976; Hollingworth, 1995).

La tendencia mundial está orientada hacia la sustitución de los pesticidas químicos o sintéticos, muchos de ellos de impactos negativos sobre la salud y el ambiente, por pesticidas naturales, tanto de compuestos químicos obtenidos de plantas como de control biológico (Matsumura, 1985).

La bioeficacia de esta molécula está probada empíricamente y mediante abundantes bioensayos en una gran variedad de organismos o algunos estados larvarios de insectos (Rechcigl, 2000).

En nuestro medio también existen varias especies correspondientes a géneros de plantas nativas o introducidas que según la literatura poseen este tipo de metabolitos secundarios. El trabajo de campo que se ha desarrollado previamente

ratifica la presencia en los géneros *Dichondra*, *Indigofera*, *Polygonum*, plantas promisorias para la obtención del biopesticida rotenona.

### 1.3.1 Marco teórico y antecedentes.

Las rotenonas y compuestos relacionados más ampliamente denominados rotenoides son los ingredientes activos de insecticidas botánicos usados desde hace 150 años para controlar plagas de cultivos (Figura 1) . Hace mucho tiempo las comunidades nativas lo han utilizado en la pesca para obtener alimento (Neguerbohn, 1959; Fukami, 1971) y mas recientemente en el manejo de peces para establecer un balance deseado de especies, por ejemplo en 1997 el tratamiento del lago Davis en California (The Resources Agency, Sacramento, CA).

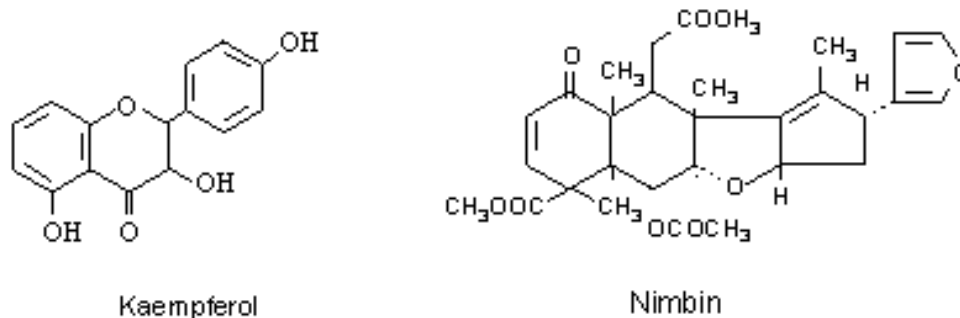


Figura 1. Núcleos de flavonoides

Los rotenoides se conocen no sólo como tóxicos sino también como candidatos a agentes anticáncer basados en tres observaciones: la dieta basada en rotenonas reduce la incidencia de tumores en el hígado de ratones (Cunningham, 1995) y tumores de mama en ratas (Hansen, 1965), previene la proliferación celular

inducida por una proliferación de peroxisomas en el hígado de rata (Cunningham, 1995) y la deguelina, uno de sus tres derivados inhibe la actividad de forbol éster ornitina carboxilasa (ODC) como una medida de potencia quimopreventiva de cáncer (Gerhäuser, 1995; Luyengi, et al. 1994). Los extractos botánicos o comerciales que contienen rotenonas por lo tanto son mezclas complejas de rotenoides y otros productos naturales que proveen la oportunidad para la acción sobre múltiples blancos bioquímicos. Una de las hipótesis propone que las rotenonas y otros rotenoides inhiben la actividad de NADH:ubiquinona oxidoreductasa e inducen actividad ODC mediante mecanismos totalmente diferentes. Teniendo en cuenta esta actividad podría haber una relación entre actividad y estructura para los dos ensayos y probablemente diferentes constituyentes del insecticida de origen vegetal más activo en los dos sistemas.

Una hipótesis alternativa es que la inhibición de NADH:ubiquinona oxidoreductasa está acoplada a la acción quimopreventiva del cáncer (Figueras, 1973; Gosálvez, 1976) y la disminución de actividad ODC (Gerhäuser, 1995; Rowlands, 1997) como el mismo blanco primario que está involucrado.

La especie *Dichondra microcalyx*. crece en un clima cálido es una planta rastrera, sus hojas son redondas anchas y el modo de proliferación tiene una forma de alfombra espesa. Es muy resistente a enfermedades, por lo cual puede formar grandes áreas de sembrado en jardines donde se adapta fácilmente y no requiere poda, pero sí exige una irrigación profunda para tener una germinación adecuada.

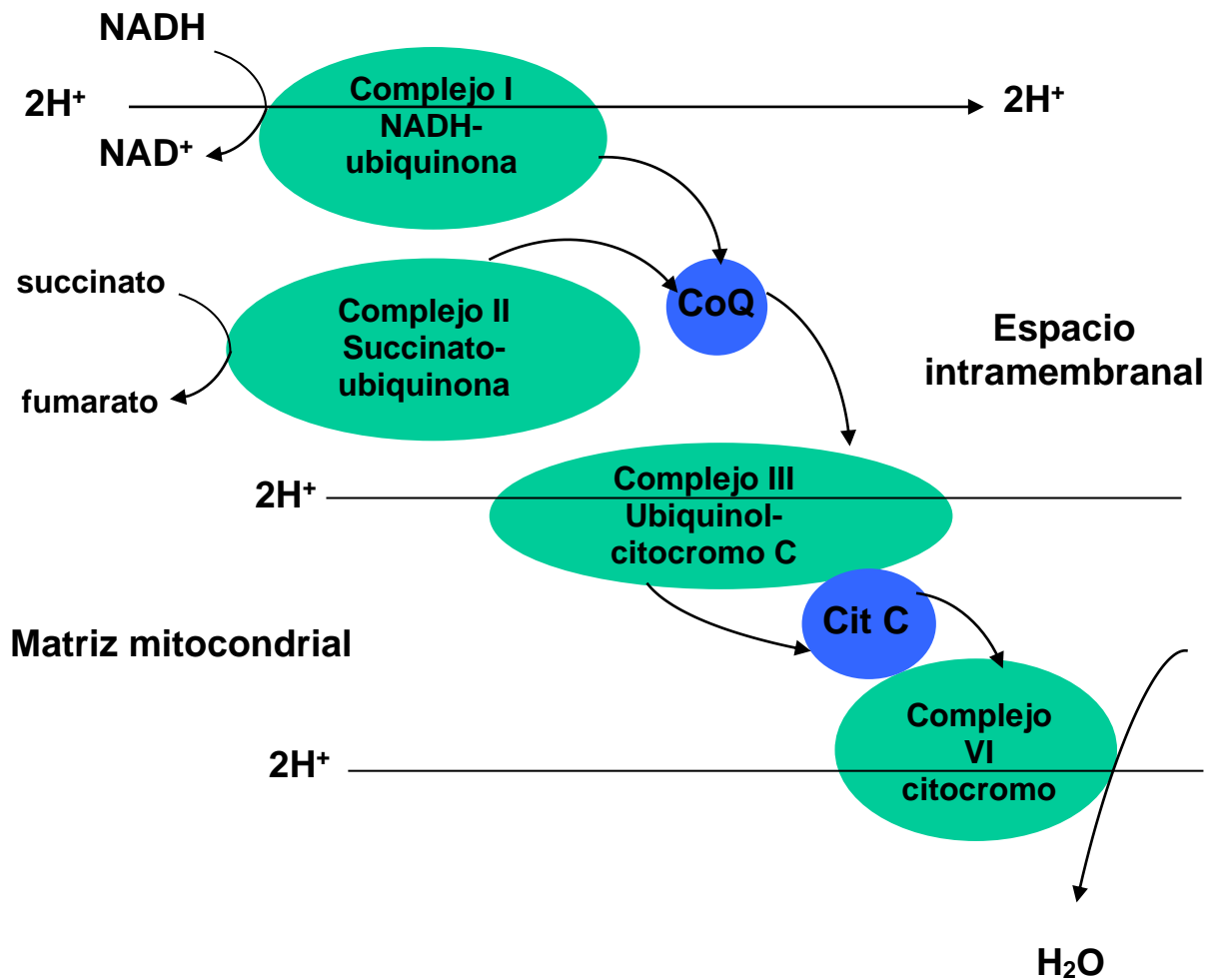
Esta especie necesita un riego abundante y frecuente cuando se encuentra en tierras arcillosas, la obtención de un cultivo de *Dichondra* se realiza mediante semilleros y división (Matsumura, 1985). Esta planta contiene un componente activo el cual es un insecticida orgánico que puede ser utilizado para el control de plagas en agricultura y ganadería, también tiene usos industriales, siendo el uso agrícola el principal por la creciente demanda mundial de alimentos orgánicos (Cunningham, 1995).

Actualmente se propone la sustitución de insecticidas químicos por insecticidas orgánicos para favorecer al ecosistema mundial y de esta manera contribuir con la salud de la población y el desarrollo teniendo en cuenta la creciente demanda de productos orgánicos. También en otros países como México y Perú se está investigando el uso de compuestos flavonoides para la lucha contra la malaria, paludismo y como anticancerígenos y vermífugos. (Thomson, 1994).

El insecticida botánico rotenona ( $C_{23}H_{22}O_6$ ) se identificó como un veneno para peces a partir del extracto de plantas de *Derris*. La fuente original fue la planta de *Derris elliptica*, una leguminosa de Malaya. La rotenona tiene una toxicidad oral aguda en ratas, 133 mg/kg (Merck Catalog, aunque en la lista de (Thomson, 1994) la toxicidad es de 39 mg/kg. El modo de acción de la rotenona es a nivel de la fosforilación en la respiración mitocondrial. Teniendo en cuenta esta acción, la rotenona es un veneno general para todos los animales lo cual explica su alta toxicidad (Michael, 1999).

Los síntomas típicos del envenenamiento con rotenonas en insectos son la disminución del latido cardíaco y respiración. Debido a la estructura, la rotenona es fácilmente degradada, pero es muy tóxica para peces debido a la insolubilidad en agua, resultando en particiones disponibles en tejidos biológicos lipofílicos si se dispersan en un lago o un río. Se considera que la rotenona actúa inhibiendo uno de los pasos de la oxidación en el sistema de transporte electrónico mitocondrial de producción de ATP. Recientemente la rotenona ha sido objeto de un estudio de la estructura-actividad. El estudio reportado por (Hirosuke Yoshioka, 1992) (En: Rational Approaches to structure, Activity, and Ecotoxicology of Agrochemical, Ed. By W. Draber and T. Fujita, CRC Press, Boca Ratón, FL, 1992, pp. 185-217).

Se basó en la premisa que la rotenone presenta una semejanza estructural a la coenzima respiratoria ubiquinona (Michael, 1999).



**Figura 2.** Flujo de electrones durante la fosforilación oxidativa. (Editado de: Michael, 1999)

Alternativamente, mediante la vía sintética se han preparado una serie de análogos basados en la rotenona, usando la ubiquinona como guía para la síntesis y optimización de varios compuestos como inhibidores respiratorios, quinazolina, piradazinonas y pirimidinas (Miller, 1998)

## **2. MATERIALES Y METODOS.**

El presente trabajo se realizó en dos fases bien definidas :

### **2.1 Trabajo de Campo.**

#### **2.1.1 Recolección**

En esta fase del trabajo se llevó a cabo el reconocimiento botánico y recolección de las muestras de las plantas a estudiarse. *Dichondra microcalyx* se colectó en la vereda Quintana en potrero con borde de arbustos y cercana a quebradas a una altitud de 2300 msnm. *Indigofera suffruticosa* se colectó en los alrededores de la urbanización Villa del Viento en área ruderal, asociada con pastos en sitios abiertos, altitud 1850 msnm. *Polygonum punctatum* colectada en la vereda Pomona en sitios inundados al borde de carretera a una altitud de 1850 msnm.

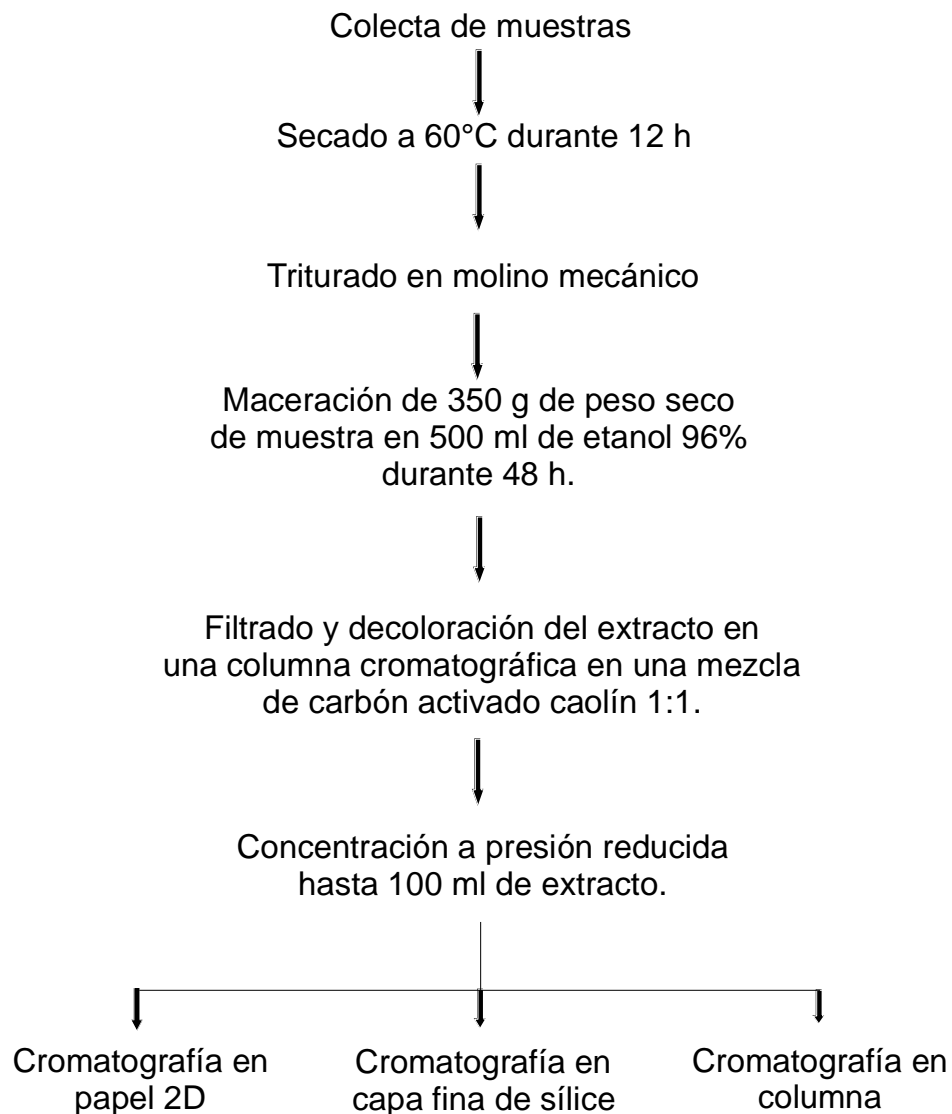
#### **2.1.2 Reconocimiento botánico.**

Una muestra de cada especie fue reconocida botánicamente en el Herbario CAUP de la Universidad del Cauca, bajo la asesoría del especialista Bernardo Ramírez .



## 2.2 Trabajo de Laboratorio.

### 2.2.1 Extracción y separación de los flavonoides



**Figura 3.** Protocolo para la extracción y separación de compuestos flavonoides.

Esta parte del trabajo experimental se realizó como una alternativa para separación específica de flavonoides, considerando que es una técnica sencilla y altamente eficiente. Este protocolo fue descrito por (Mabry et al. 1970). La extracción y separación de flavonoides se realiza teniendo en cuenta el protocolo presentado en la Figura 3.

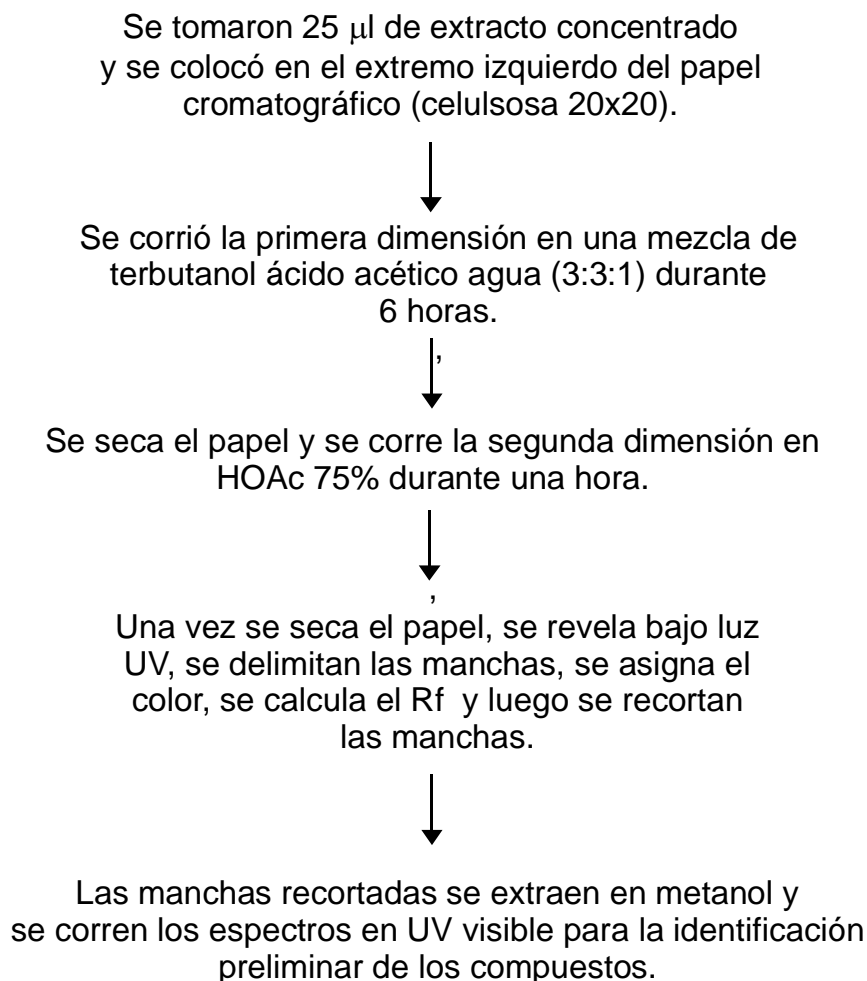
- Las muestras colectadas (parte aérea) se cortaron en trozos muy pequeños y se secaron en el equipo del herbario CAUP para la extracción y aislamiento del compuesto.
- La muestra seca se sometió a pulverización en molino mecánico en el laboratorio de agroquímica y se pesó el material con el objeto de encontrar el rendimiento para realizar las extracciones adecuadas del biopesticida.
- La muestra pesada se somete a maceración en distintos solventes orgánicos (metanol, cloroformo y una mezcla de los dos en proporción 15:1) para extracción y obtención del biopesticida.
- Los extractos de la maceración se pasan a través de una columna cromatográfica empacada con los adsorbentes carbón activado-caolín (1:1) para la eliminación de pigmentos.

- El extracto libre de pigmentos se concentró a presión reducida o mediante liofilización y se llevó a cromatografía 2D (bidimensional) en papel de celulosa Whatman N°3 (20x20) en TBA (terbutanol, ácido acético, agua) 3:3:1 para la primera dimensión. La segunda dimensión de la cromatografía se corrió en HOAc -agua (15:85). Se aplican 20  $\mu$ l de extracto concentrado libre de pigmentos en el extremo derecho del papel cromatográfico y se corre la primera dimensión. Este corrimiento tarda aproximadamente 4 o 5 horas. Una vez que ha llegado al tope previamente establecido se saca de la cámara y se seca utilizando un secador. Nuevamente se corre la segunda dimensión girando 90° el papel cromatográfico para la separación de los compuestos.

Una vez corrida la segunda dimensión se secó el papel y se reveló en cuarto oscuro con una lámpara de luz UV. Se señalaron los compuestos presentes y se les asignó un código para realizar la descripción que incluye color y Rf para realizar la comparación con la plantilla (Mabry, 1970) que indica una posible estructura general del flavonoide

Las manchas señaladas se recortaron y extrajeron en metanol para espectroscopía de UV que indicó los máximos de absorción del flavonoide separado. Concentración de la muestra aislada para cromatografía en papel 2D, CCI y TLC.

### 2.2.2 Purificación y obtención de isoflavonoides.



**Figura 4.** Protocolo para obtención y purificación de flavonoides. (Mabry, 1970).

A continuación se llevó a cabo la separación de isoflavonoides mediante columna cromatográfica, utilizando una columna (24x45) empacada con sílica gel (200 mesh). La cantidad de sílica utilizada fue de 150 g, disuelta en cloroformo y posteriormente se vertió en la columna evitando la presencia de burbujas para lograr una buena separación de los compuestos.

Inicialmente se recogieron 5 fracciones de 100 ml, las cuales contenían algún residuo de pigmentos. Posteriormente se colectaron nuevas fracciones, se concentraron a 20 mililitros para verificar el procedimiento de separación mediante espectroscopia de UV visible. Finalmente se eluyó la columna con una mezcla cloroformo-metanol en proporción 15:1, según (Mabry, 1970). Las fracciones recogidas en este último paso de la separación se reunieron en una sola muestra y luego se separaron mediante cromatografía de placa fina (TLC) en una mezcla de cloroformo metanol 15:1. Esta cromatografía se reveló con una lámpara de luz UV y las manchas se demarcaron con lápiz para medir el R<sub>f</sub>, asignar color según la fluorescencia de las manchas y la realización de la extracción de los compuestos separados. Estas muestras separadas se corrieron simultáneamente con el estándar para verificar la presencia del compuesto de interés que se estaba separando mediante esta técnica.

El paso final para la obtención del compuesto de las muestras reunidas se llevó a cabo previamente mediante liofilización de las fracciones finales de la columna y como último proceso se purificó mediante cristalización y recristalización.

### **2.2.3 Caracterización del isoflavonoide**

Las muestras obtenidas se enviaron a la Unidad de Espectroscopía de la Universidad de Antioquia para tomar espectros de <sup>13</sup>C RMN, DEPT, <sup>1</sup>HRMN, COSY, y HMBC.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1. reconocimiento y descripción botánica

Las especies recolectadas para el trabajo fueron reconocidas como, *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris (Convolvulaceae), *Indigofera suffruticosa* Mill (Papilionaceae), *Polygonum punctatum* Elliott (Poligonaceae). (Figura 5).



**Figura 5. A. *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris B. *Indigofera suffruticosa* Mill , C. *Polygonum punctatum* Elliott**

La anterior propuesta se fundamenta en las características de crecimiento rastrero de la planta y la presencia de este compuesto principalmente a nivel foliar. También es importante notar que esta planta presenta un excelente grado de aclimatación en la ciudad de Popayán, según los ensayos previos realizados durante la ejecución de este trabajo. En la Figura 4A se muestra una planta de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris.

Esta planta es una hierba pequeña, rastrera, que enraiza en los nudos, hojas alternas, orbiculares, cordadas. Flores axilares, solitarias, de color blanco; Fruto cápsula esférica. Crece en taludes, bordes de caminos, potreros y en sotobosque de áreas con vegetación secundaria y suficiente luz. Crece desde los 600 hasta los 3000 msnm. Se encuentra en la región andina, especialmente en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Se tienen también registros de Australia.

Otra especie Figura 5B, *Indigofera suffruticosa* Mill. también se evaluó para isoflavonoides, aunque no se llegó a resultados finales. Esta especie se caracteriza por ser un arbusto, 1-2 m; hojas imparipinnado compuestas; folíolos oblongos, mucronados. Inflorescencias en racimos. Fruto en vaina. Crece en áreas descubiertas, bordes de caminos, terrenos abandonados, potreros. Crece desde el nivel del mar hasta 2.700 m.s.n.m. Presenta una distribución muy amplia; se encuentra en Estados Unidos, Centroamérica, Antillas, región Andina y Paraguay, Africa y Madagascar.

### 3.2 Porcentaje de rendimiento en peso seco

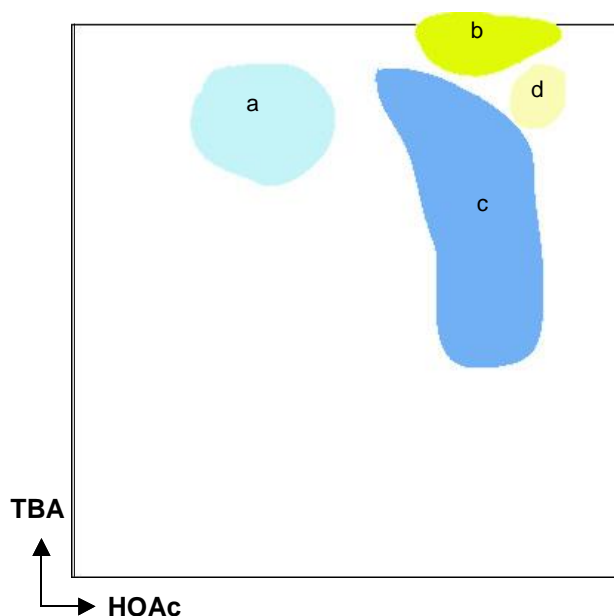
De la misma manera *Polygonum punctatum* Elliott, (Figura 5C) es una planta con usos potenciales como biopesticida. Este barbasco también es una hierba de 0.3 -1 m de altura; hojas alternas, lanceoladas. Inflorescencias terminal racemosa, erguida. Flores blancas. Fruto una nuececilla trigona. Crece en áreas muy húmedas o inundadas, expuestas a radiación directa. Se halla desde el nivel del mar hasta los 3300 msnm. Muestra una distribución amplia en el continente americano, que comprende los Estados Unidos, Centroamérica, Antillas, región andina y Paraguay.

La primera de las anteriormente mencionadas es potencialmente la más promisorio como fuente de rotenona. Los cálculos de rendimiento indican que se obtuvo  $9.74 \times 10^{-3}$  / 60 g de peso seco, comparado con *Teprhosia voguelii*, planta de la cual se obtiene 0.127 g de rotenona / kg de semilla (Barnes, 1969). El valor obtenido en este trabajo aunque es relativamente bajo para *Dichondra*, representa una buena alternativa tecnológica como fuente para materia prima que se podría obtener mediante la utilización de cultivo hidropónico.



### 3.3 ANALISIS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA O PAPEL.

Los resultados de la cromatografía bidimensional en papel de celulosa (TBA/HOAc) indican la presencia de varios flavonoides (Figura 6). En esta cromatografía se distinguen claramente cuatro manchas con su respectivo Rf, fluorescencia y la asignación de los máximos de absorción para cada mancha extraída en metanol.



**Figura 6.** Cromatografía bidimensional de *Dichondra microcalyx* .

**Tabla 1.** Resultados de la separación de flavonoides de *Dichondra microcalyx* .

<b>Flavonoide</b>	<b>Rf</b>	<b>Color</b>	<b>Máy. de absorción</b> □ □
a	0.82	Azul ciano claro	323
b	0.62	Amarillo verdoso	290
(c) isoflavonoide	0.86	Azul ciano	317
d	0.96	Amarillo	300

Comparando resultados comparando con el diagrama de (Mabry, 1970), se observa que la ubicación de la mancha, los datos de color y máximo de absorción coinciden con compuestos isoflavonoides, en este caso particular las rotenonas.

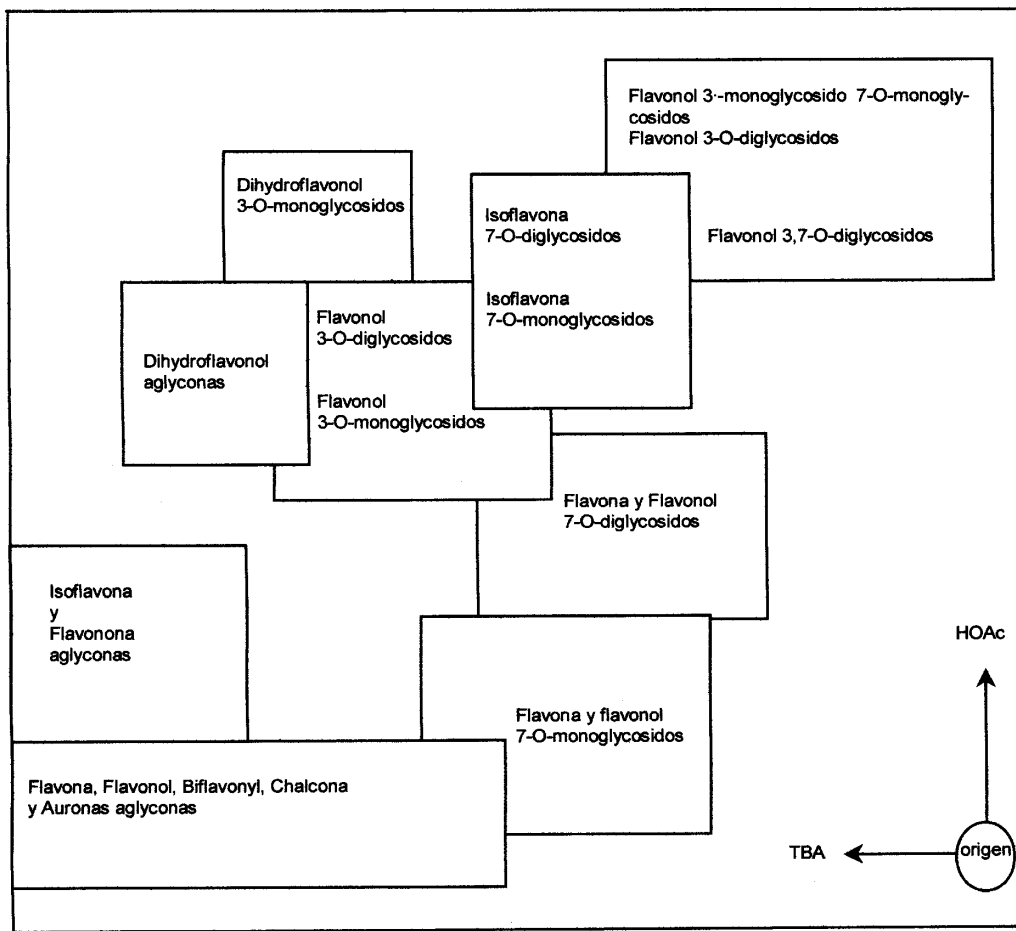
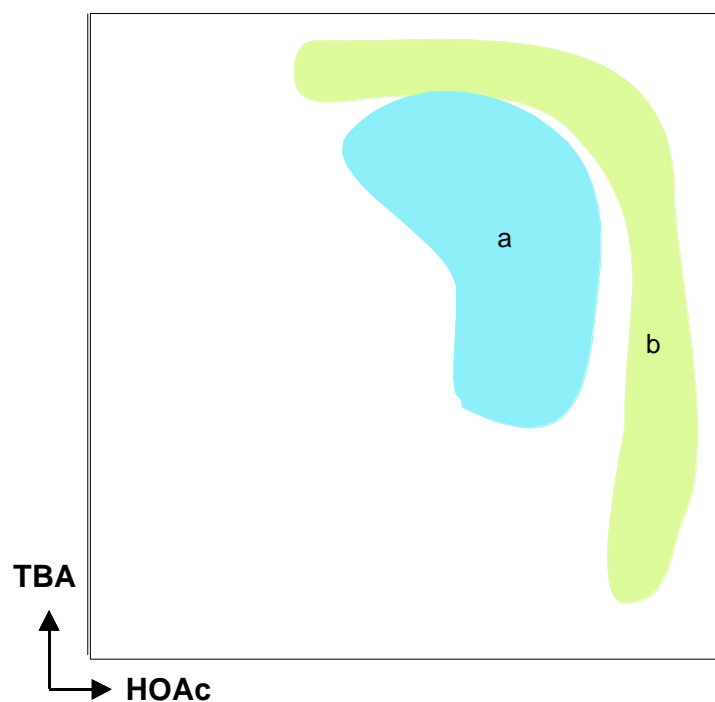


Figura 7. Plantilla de distribución de los flavonoides según (Mabry, 1970)

En la Tabla N°2 (Figura 8) se presentan los resultados preliminares de la cromatografía bidimensional en papel de la especie *Indigofera suffruticosa* Mill., otra de las plantas seleccionadas para el estudio de rotenonas.

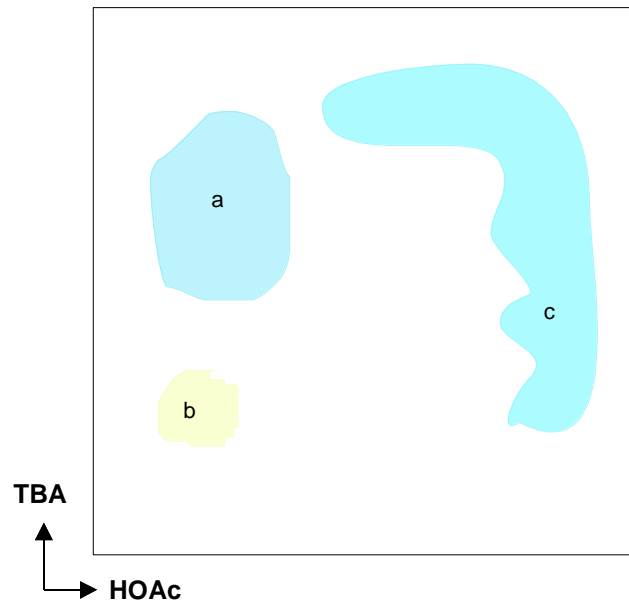


**Figura 8.** Cromatografía bidimensional de *Indigofera suffruticosa* Mill

**Tabla 2.** Resultados de la separación de flavonoides de *Indigofera suffruticosa* Mill.

Flavonoide	Rf	Color	Máx. de absorción $\lambda$
a	0.73	Azul ciano claro	313
b	0.93	Amarillo verdoso	329

La cromatografía bidimensional demuestra claramente la presencia de flavonoides de *Polygonum punctatum* Elliott (Figura 9).



**Figura 9.** Cromatografía bidimensional de *Polygonum punctatum* Elliott.

Los datos obtenidos también revelan la presencia de flavonoides y los máximos de absorción están muy cercanos a 315 nm, absorción que caracteriza a la rotenona extraída y corrida en metanol.

**Tabla 3.** Resultados de la separación de flavonoides de *Polygonum punctatum* Elliott

Flavonoide	Rf	Color	Máx. de absorción $\lambda$
a	0.94	Azul ciano claro	311
b	0.95	Amarillento	302
c	0.82	Azul ciano	310

Los resultados cromatográficos indican claramente que se deben realizar los protocolos establecidos por (Mabry, 1970) para flavonoides de las especies estudiadas.

De las tres plantas evaluadas se encontró que *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris muestra según las cromatografías 2D los resultados más contundentes respecto a los isoflavonoides que se estudian en este trabajo. De acuerdo a lo antes mencionado se profundizó en la elucidación estructural del compuesto obtenido de esta planta. Para las otras especies, a pesar de los óptimos resultados en la cromatografía bidimensional no se realizaron las pruebas de espectroscopia debido a las reacciones fotoquímicas de los compuestos, que produjeron oxidación de las muestras dejando esta labor como un trabajo adicional que se continuará durante el desarrollo de la segunda fase del proyecto 551 (VRI).

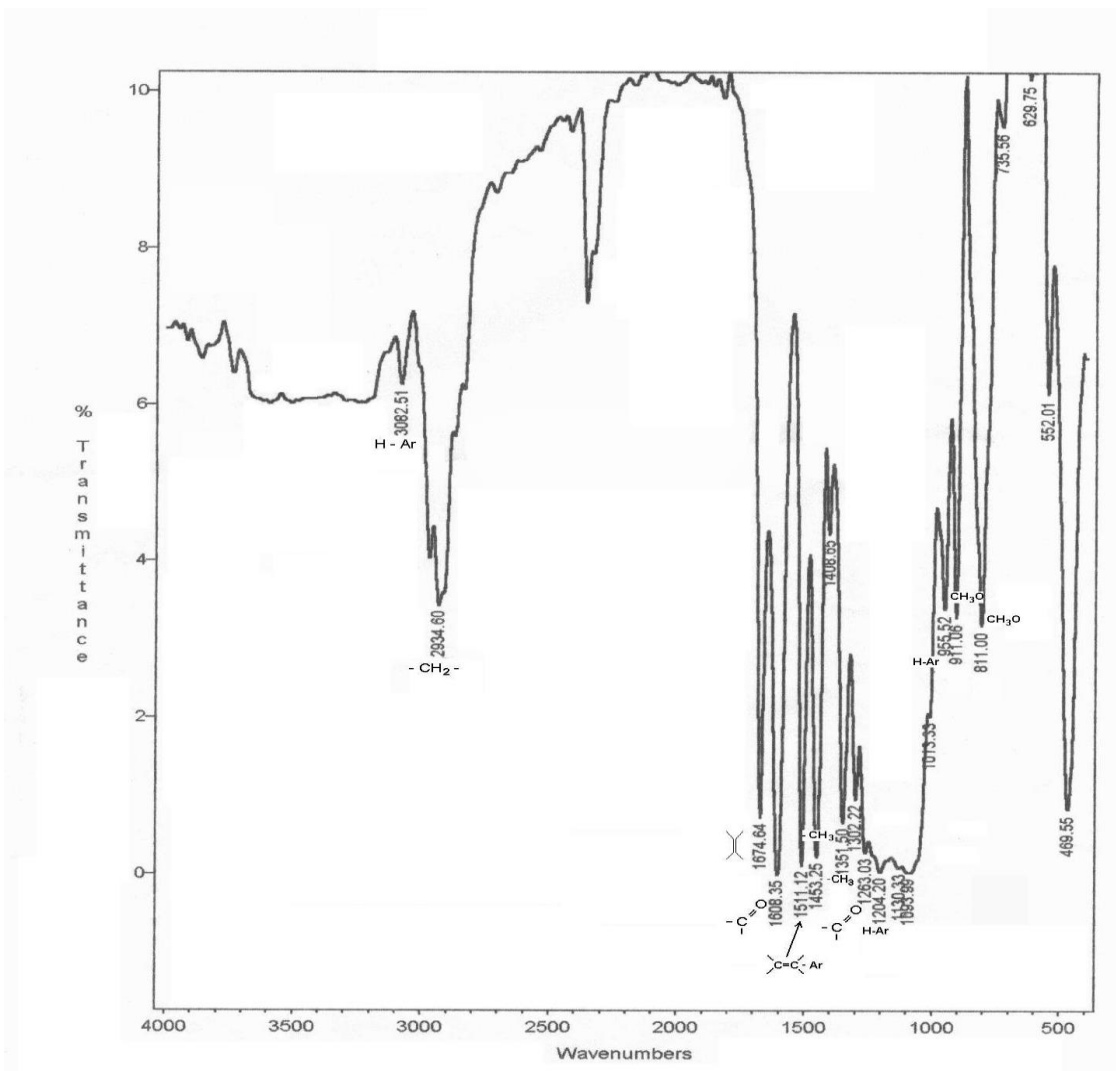
### 3.4 CARACTERIZACION: ANALISIS ESPECTROSCOPICO

A continuación se presentan y discuten los espectros de IR, UV,  $^{13}\text{C}$  RMN (DEPT),  $^1\text{H}$  RMN y la correlación de un RMN  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (heteronuclear, HMBC) y un homonuclear COSY H-H RMN del compuesto isoflavonoide aislado de *Dichondra*.

#### 3.4.1 Espectro de IR.

Los espectros de IR se corrieron en un equipo Genesis FT-IR Mattson (ATI) modelo 240 Resolución  $4000\text{ cm}^{-1}$  –  $400\text{ cm}^{-1}$  mediante pastilla de KBr, en el laboratorio de Organometálica del Dpto. de Química.





Las asignaciones para el espectro de infrarrojo del compuesto obtenido de *Dichondra* se muestran en la tabla N° 10.



**Figura 10.** Espectro de IR del isoflavonoide extraído de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris.



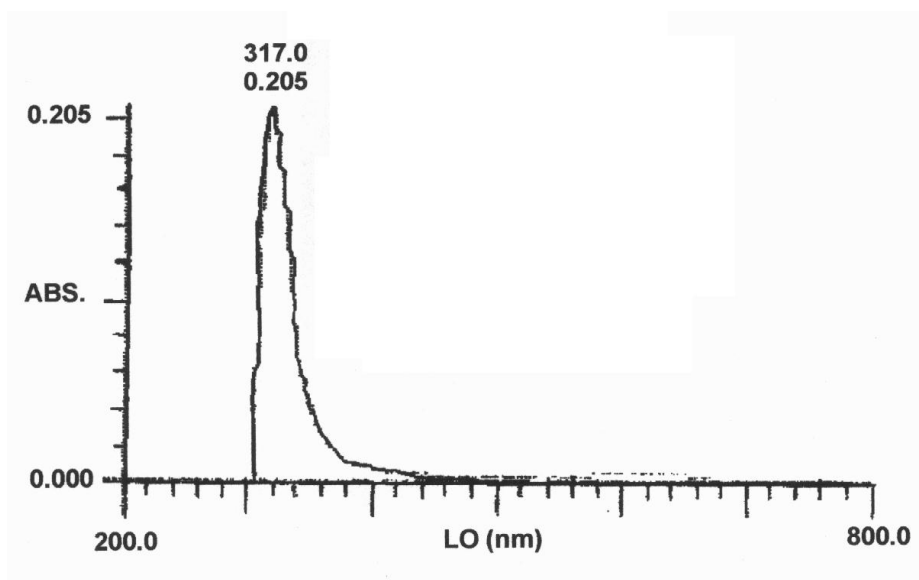
Tabla 4. Datos espectrales de IR experimentales del isoflavonoide de *Dichondra microcalyx*

Valor experimental	Valor teórico	Grupo funcional
3082	3080	H - Ar
2934	2925	-CH <sub>2</sub> -
1675	1652	
1608	1610	
1511	1519	 Aromático
1453	1450	metilo – Vibración esquelética
1352	1355	- CH <sub>3</sub> -
1263	1265	
1204	1216	ArH Deformación fuera plano
956	965	H-Ar deformación en el plano
912	900	CH <sub>3</sub> O Metoxilo

Los valores asignados a las distintas bandas presentadas en la tabla anterior están representados en el espectro de infrarrojo (Figura 10).

### 3.4.2 Espectro UV (ultravioleta)

Adicionalmente al mismo compuesto aislado se le tomó un espectro de UV tomado en un equipo Génesis 5 del laboratorio de biología celular y Molecular Dpto. de Biología, el cual presenta un UV  $\lambda_{\text{Máx.}}^{\text{MeOH}}$ : 317 nm. (Figura 10). Este dato obtenido experimentalmente es muy cercano al  $\lambda_{\text{Máx.}}^{\text{MeOH}}$ : 315 nm que reporta la literatura para rotenonas en el mismo solvente (Merck Index, 1974).



**Figura 11.** Espectro de UV visible del isoflavonoide extraído de *Dichondra microcalyx*.

### 3.4.3 Espectro de RMN $^1\text{H}$ .

El compuesto cristalizado que se obtuvo se envió a la unidad de espectroscopia de la Universidad de Antioquia para tomar los diferentes espectros de RMN en un equipo Bruker AMX de 300 MHz. El espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto aislado de *Dichondra* presenta dos singuletes, a 3.75  $\delta$  y 3.8  $\delta$  los cuales integran para tres protones cada uno asignado a dos grupos metoxilos en las posiciones 2 y 3 del anillo aromático. Se observan las siguientes señales (Figura 13) de protones aromáticos H1 y H4 en forma de singulete a 6.8 y 6.43 ppm, respectivamente.

A 3.9 ppm para H12a se observa un singulete desplazado a campo bajo por la influencia del grupo carbonilo. También se observa un singulete que integra para tres protones 1.8 ppm asignado a un grupo metílico que se une al C6'. Las señales a 6.7 y 7.88 ppm en forma de doblete asignados a H10 y H11 respectivamente, los cuales se acoplan respectivamente ( $J = 8.55$  Hertz.), por su proximidad integrando para un protón y sus desplazamientos a campo bajo se atribuye a la influencia del anillo aromático y H10 está próximo al heteroátomo. El doblete que se encuentra a 5.1 ppm para un protón H6a se ha desplazado a campo bajo por la influencia del heteroátomo y acopla con H6 $\alpha$  y H6 $\beta$  ( $J = 12.03$ ).

Para H7' $\alpha$  y H7' $\beta$  están desplazados a campo bajo por la cercanía espacial del átomo de oxígeno y se observan las señales de doblete y doble doblete a 4.91 y 4.6 ppm indicando un acoplamiento entre ellos, cuyas constantes son 3.14 y 3.15

Hertz. Presenta desplazamiento a campo bajo debido al doble enlace. El doble doblete a 3.4 ppm se asigna a  $H4\alpha$  acoplado con  $H5'$  ( $J = 8.04$  y  $9.78$  Hertz. ).  $H3$  y a su vez acopla con  $H4\beta$ , cuya constante es  $9.76$ . El protón  $H6a$  presenta un doble doblete acoplado con  $H6a$  y con  $H6\beta$ , el cual aparece a 4.5 ppm y  $H6\beta$  acopla con  $H6a$  el cual está en posición  $\beta$  según la proyección de Newman, entre  $C6$  y  $C6a$  se confirma con el modelo estructural.

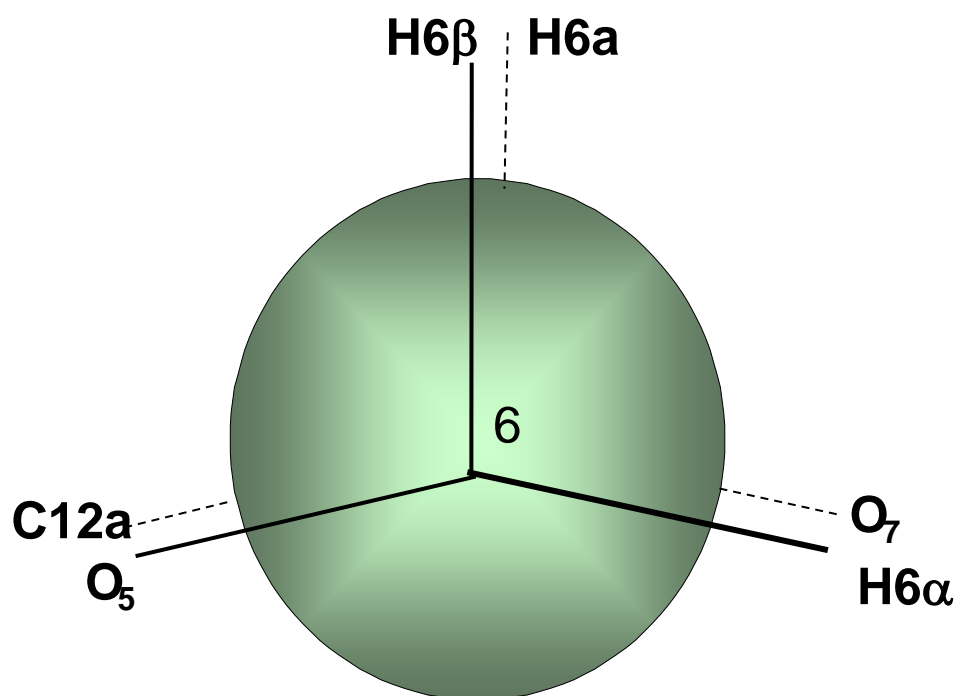


Figura 12. Proyección de Newman para el acoplamiento de C e H.

A 5.3 ppm aparece un doble doblete integrando para un protón  $H5'$ , el cual acopla con  $H4'\alpha$  ( $J = 9.78$  Hertz) y con  $H'\beta$  ( $J = 9.76$  Hertz. ), los cuales aparecen a 3.0 y 3.4 ppm.

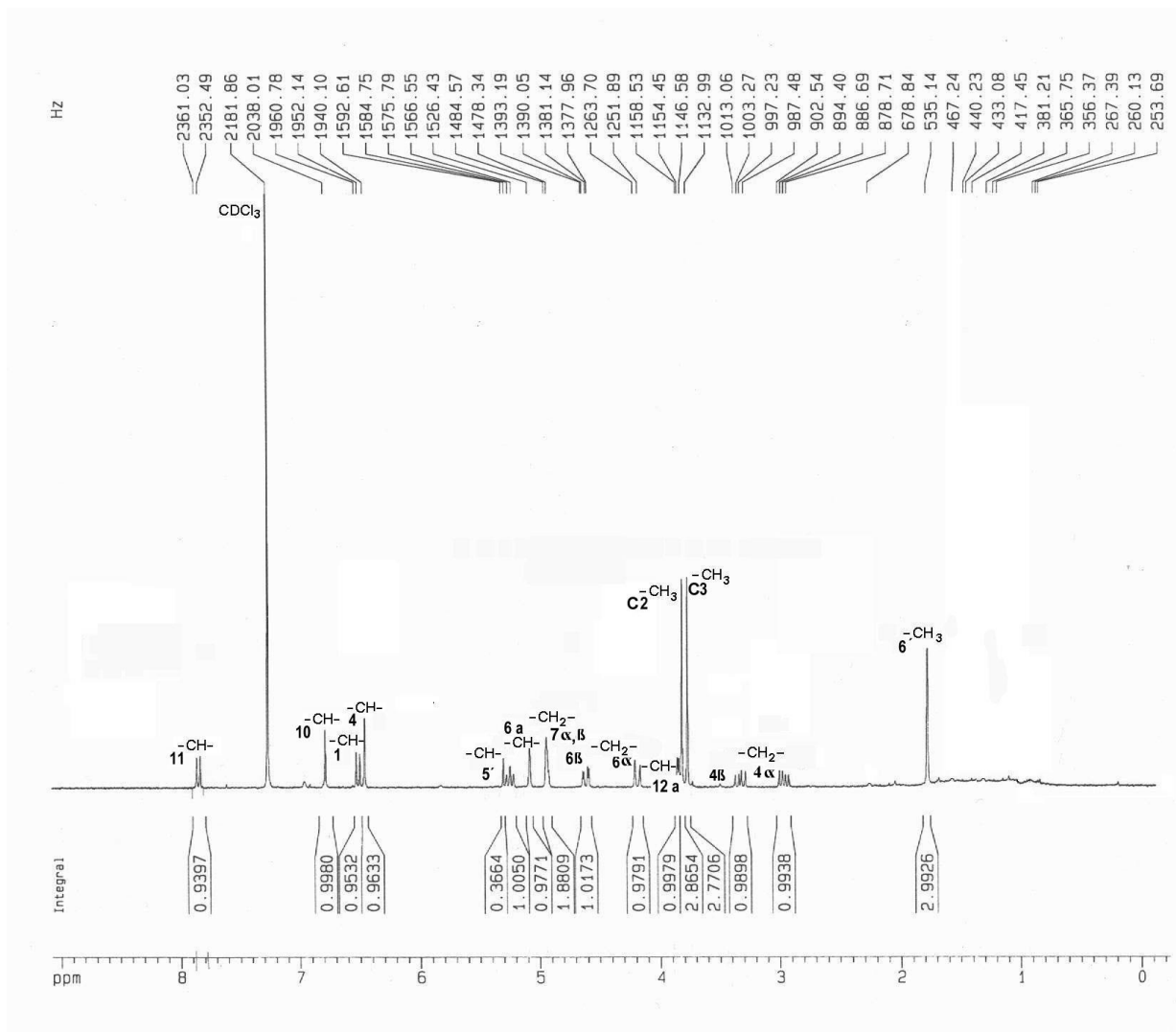


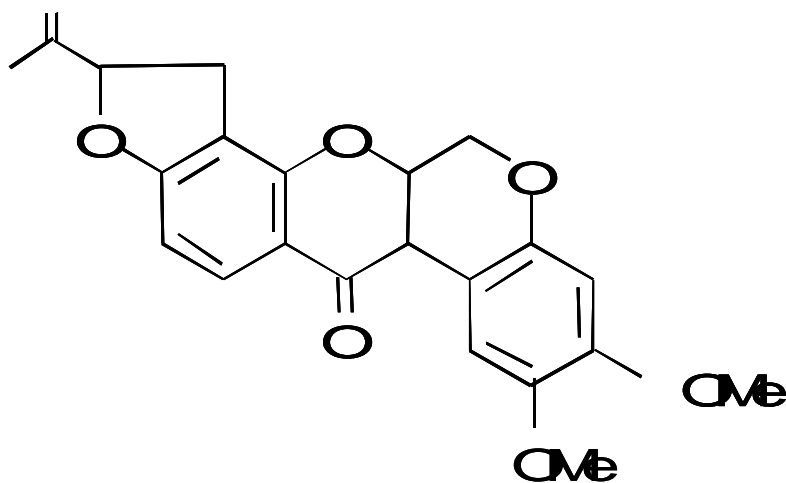
Figura 13. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del isoflavon

**Tabla 5.** Datos espectrales de  $^1\text{H}$  RMN del isoflavonoide obtenido de

*Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris

Protón	Número de H	Multiplicidad	$\delta$ señal ppm		J (Hz)
			Experimental	Teórico	
6 a	1H	d	5.1	5.001	6.23– 12.01
6 $\alpha$	1H	dd	4.2	4.24	12.03 - 3.14
6 $\beta$	1H	dd	4.5	4.49	12.03– 3.14
12a	1H	s	3.9	3.85	-
4' $\alpha$	1H	dd	3.0	3.4	9.78 – 9.76
4' $\beta$	1H	dd	3.4	3.5	9.76 – 9.78
5'	1H	dd	5.3	5.29	8.04 – 9.06
10	1H	d	6.7	6.71	8.55 – 8.04
11	1H	d	7.88	7.8	8.55
4	1H	s	6.43	6.71	-
1	1H	s	6.8	7.0	-
7' $\beta$	1H	d	4.91	4.94	3.14 – 3.15
7' $\alpha$	1H	dd	4.6	4.89	3.15 – 3.14
-	OCH <sub>3</sub> (C <sub>3</sub> )	s	3.75	3.7	-
-	OCH <sub>3</sub> (C <sub>2</sub> )	s	3.8	3.8	-
-	3H(C <sub>6</sub> )	s	1.8	1.79	-

Los datos espectrales de  $^1\text{H}$  RMN resumidos en la tabla anterior permiten determinar que el número de protones obtenidos a partir del espectro coinciden con los valores teóricos asignados al isoflavonoide  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$ .



**Figura 14.** Fórmula estructural del isoflavonoide referencial.

#### 3.4.4 Espectro RMN $^{13}\text{C}$

Una vez asignados los protones de la molécula se procedió a analizar los carbonos mediante un espectro RMN (DEPT-HMBC), el cual determina los grupos metínicos, metílicos, metilenos.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan 13 señales de carbonos atribuidos a 7 grupos metínicos, 3 metilénicos y 3 metílicos. Las señales a 56.3 ppm se asignan a grupos metoxilos unidos respectivamente a C2 y C3 del anillo aromático. La

señal a 17.5 ppm indica un grupo metilo, el cual no presenta desplazamiento a campo bajo y está unido al C6' . Las señales que se encuentran a 31.7 ppm C4' y 66.71 ppm C6 se asignan a grupos metilénicos, los cuales se encuentran a campo alto debido a la presencia de heteroátomos ocasionando un desapantallamiento de dichos carbonos. Los carbonos metínicos C6a, C12a, C5' aparecen respectivamente a 72.71, 45.1 y 88.2 ppm observando su mayor desplazamiento de C5' con la influencia de un heteroátomo, de la proximidad de un anillo aromático y los C10, C11, C4 y C1 se desplazan a campo bajo ya que pertenecen a los anillos aromáticos.



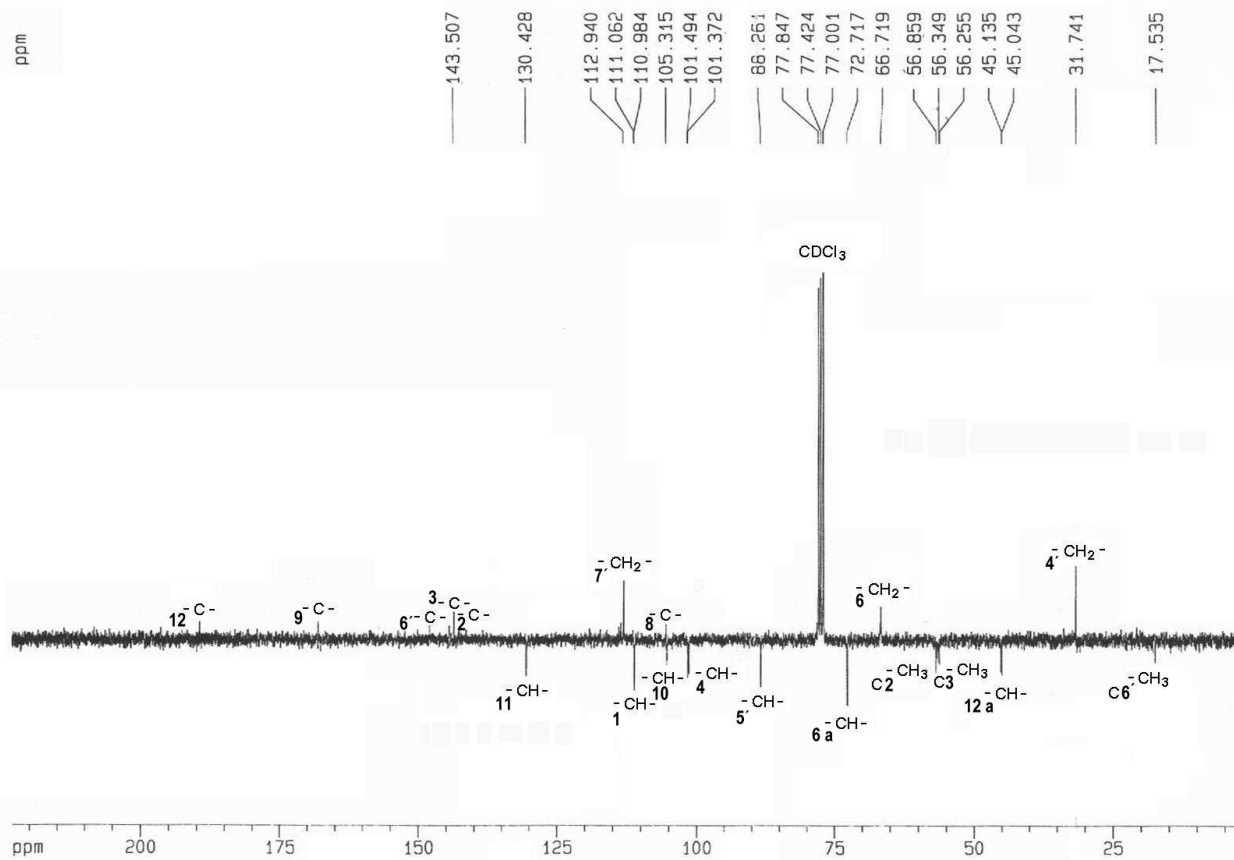


Figura 15. Espectro de resonancia Magnética Nuclear C<sup>13</sup>

**Tabla 6.** Datos espectrales de  $^{13}\text{C}$  RMN del isoflavonoide aislado de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris

Carbono	Tipo de carbono	$\delta$ señal ppm	
		Valor experimental	Valor teórico (Chem. Draw)
6a	-CH-	72.71	77.4
6	-CH <sub>2</sub> -	66.71	76.8
4a	-C-	-	151.9
1a	-C-	115.0	117.8
12a	-CH-	45.1	48.8
12	-C-	188.5	197.6
11a	-C-	114.0	114.6
7a	-C-	-	158.5
8	-C-	105.3	11.5
4'	-CH <sub>2</sub> -	31.7	26.7
5'	-CH-	88.2	83.3
9	-C-	170.0	163.2
10	-CH-	101.5	105.6
11	-CH-	130.1	127.0
4	-CH-	101.3	100.9
3	-C-	144.5	145.5
2	-C-	143.5	139.3
1	-CH-	111.1	115.5
6'	-C-	147.5	146.9
7'	-CH <sub>2</sub> -	112.9	107.7
-	-CH <sub>3</sub> (C <sub>3</sub> )	56.3	56.3
-	-CH <sub>3</sub> (C <sub>2</sub> )	56.3	56.3
-	-CH <sub>3</sub> (C <sub>6'</sub> )	17,.5	17.1

Con la técnica COSY se pueden observar, analizar y presentar las correlaciones homonucleares, (H-H) del compuesto aislado así: protones metílicos ( $\delta$  1.8, s) con el H7' $\beta$  ( $\delta$  4.91, d). De igual manera el H4' $\alpha$  y H4' $\beta$  con H5' ( $\delta$  5.3, dd). Dicha relación se asigna con base en la proximidad por su estructura y en la determinación de su estereoquímica.

La correlación de OCH<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>) OCH<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>) con H1 se da a dos y tres instancias de comunicación. Estas correlaciones en protónico muestra señales correspondientes a singuletes ya que se puede mencionar que el tener un entorno igual hace que posean un ambiente químico similar.

Los protones restantes (H7' $\alpha$ , H7' $\beta$  y H5') presentan una correlación no directa dadas las condiciones de ubicación estereoquímica y forma de la molécula.

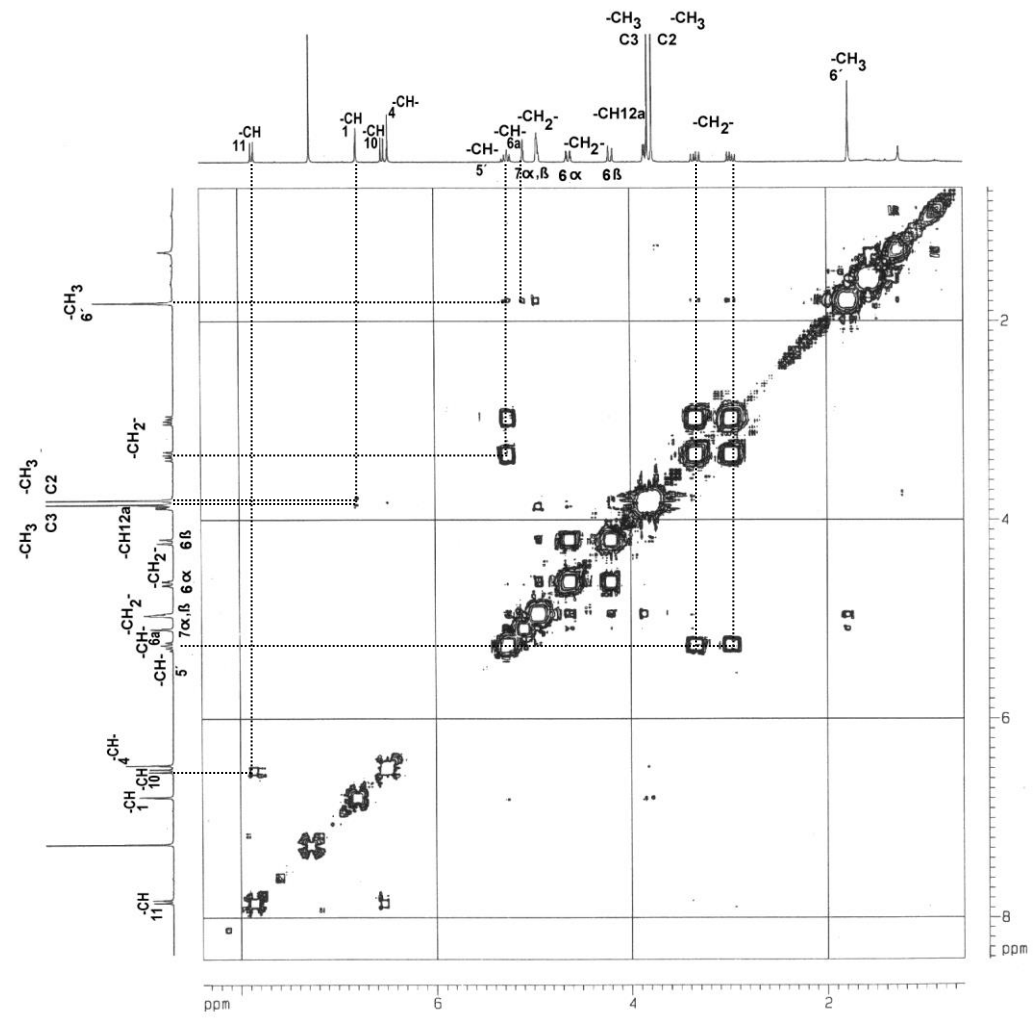


Figura 16. Espectro COSY del compuesto aislado.

**Tabla 7.** Correlación de protones en el espectro homonuclear COSY del isoflavonoide aislado de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris

Protón	COSY
H metílico en C6'	H7 $\beta$
H4' $\alpha$	H5'
H4' $\beta$	H5'
OCH <sub>3</sub> (C <sub>3</sub> )	H <sub>4</sub> ; H <sub>1</sub>
OCH <sub>3</sub> (C <sub>2</sub> )	H <sub>1</sub>
H <sub>12a</sub>	H <sub>1</sub>
H <sub>6<math>\beta</math></sub>	H <sub>6a</sub>
H7' $\beta$	H5'
H7' $\alpha$	H <sub>8</sub> '; H7' $\alpha$ ; H4' $\beta$
H5'	H7' $\beta$ ; H4' $\beta$
H <sub>11</sub>	H <sub>10</sub>

La técnica COSY permite mostrar las interacciones protónicas mas importantes dentro de la molécula propuesta.

En el análisis de espectroscopía heteronuclear HMBC (Figura 16) se observan asignaciones de correlación a dos y tres enlaces de C-H : CH<sub>3</sub>(C6') correlacionado con C5', C7' y C4', el protón H4'β con y el con C5' y C7' ; el OCH<sub>3</sub>(C<sub>3</sub>) y el OCH<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>) respectivamente con C2 y C3 y el H6α y H6β con C6a y el H7'β con C5' y finalmente los protones 10 y 11 se relacionan con C10 y C12a.

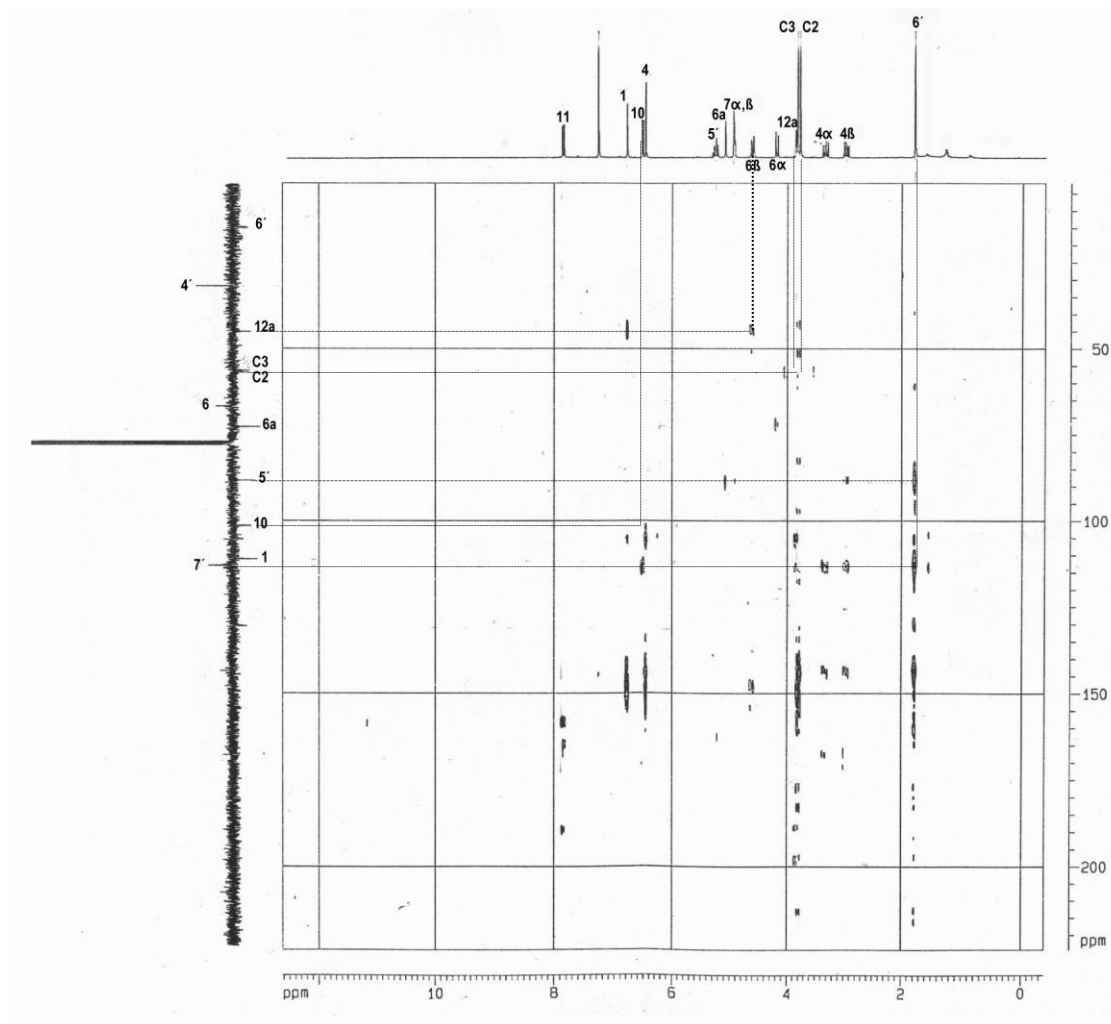


Figura 17. Espectro HMBC del compuesto aislado.

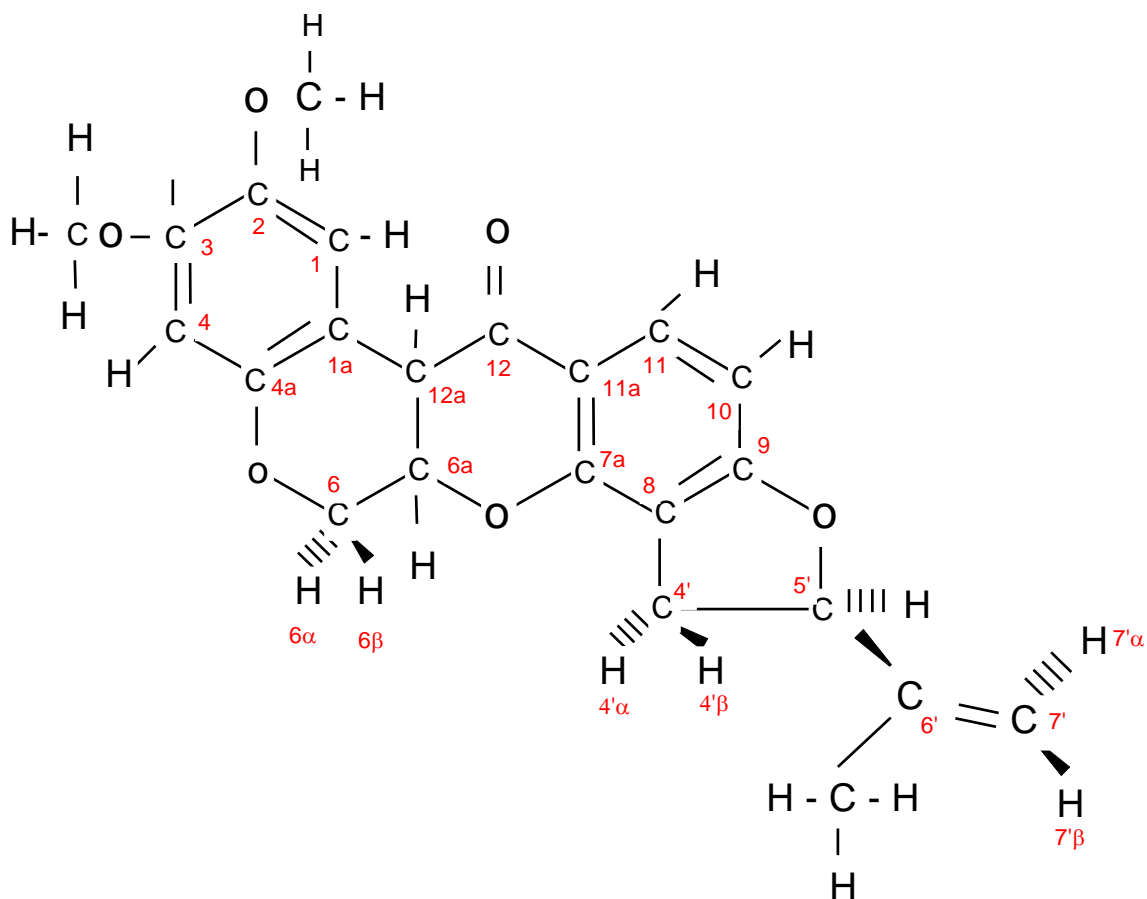
**Tabla 8.** Correlación de proton-HMBC en el espectro heteronuclear del isoflavonoide aislado de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris

Protón	HMBC
CH <sub>3</sub> (C <sub>6'</sub> )	C <sub>5'</sub> ; C <sub>7'</sub> ; C <sub>4'</sub>
4' $\beta$	C <sub>5'</sub> ; C <sub>7'</sub>
OCH <sub>3</sub> (C <sub>3</sub> )	C <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub> (C <sub>2</sub> )	C <sub>2</sub>
6 $\alpha$ y 6 $\beta$	C <sub>6a</sub>
7' $\beta$	C <sub>5'</sub>
10	C <sub>10</sub>
1	C <sub>12a</sub>

La técnica HMBC permite correlacionar varios enlaces, de tal manera que la información obtenida de estos espectros permite verificar algunas de las asignaciones para la molécula de isoflavonoide propuesta a continuación:



Finalmente, utilizando las herramientas de la RMN para la elucidación estructural del compuesto aislado de *Dichondra microcalyx*, se concluye que esta especie posee el isoflavonoide rotenona propuesto en la figura 19.



**Figura 18.** Estructura propuesta del isoflavonoide aislado.

#### 4. CONCLUSIONES

En la meseta de Popayán hay una considerable diversidad de plantas de varias familias botánicas (Convolvulaceae, Papilionaceae y Polygonaceae) con posibilidades de utilización como fuente de biopesticidas de tipo isoflavonoide.

El resultado de rendimiento de *Dichondra microcalyx*, es comparativamente bajo respecto al obtenido para plantas productoras del biopesticida como *Tefrosia voguelii*, sin embargo, los resultados obtenidos de las partes aéreas de *Dichondra* contienen el principio activo permitiendo cumplir con el objetivo propuesto para este trabajo.

Las cromatografías bidimensionales específicas para flavonoides de las tres plantas estudiadas muestran al menos 8 flavonoides, entre los cuales se obtuvo la rotenona. La cromatografía en columna permitió una adecuada separación de los compuestos encontrados. Con TLC se logró obtener el compuesto para su posterior aislamiento y purificación.

Las técnicas de espectroscopia utilizadas, definitivamente constituyeron un apoyo fundamental para la elucidación estructural del compuesto isoflavonoide obtenido de *Dichondra microcalyx* (Hallier f.) Fabris.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de un compuesto isoflavonoide, en *Dichondra microcalyx* cuya caracterización y elucidación estructural corresponde a la rotenona.

## 5. BIBLIOGRAFIA.

BARNES, D.k., and FREYRE,R.H. (1969). Seed Production Potential of *Tephrosia voguelii* in Puerto Rico. Puerto Rico Univ.. Jour. Agr. 53 (3): 207-212.

CABEZAS, F.A. Estudio químico de alcaloides en *Crinum kunthianum* ROEM y *Eucharis amazonica* PLANCHON Ex. LINDEN, familia Amaryllidaceae. Tesis doctoral, Universidad del Valle, 2002.

California Department of Fish and Game (1997) lake Davis Northern Pike eradication Project, January (1997), final Environmental Impact Report (The resources Agency, Sacramento, CA).

CONVOLVULACEAE. *Dichondra repens* Forst. et Forst. SINONIMIAS: NOMBRE(S) COMUN(ES): Bajúisuri. DESCRIPCION: Planta herbácea de 30 a 50 cm de altura. [www.semarnat.gob.mx/pfnm/DichondraRepens.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/DichondraRepens.html) - 6k - En caché - Páginas similares

Cunningham, M.L., Soliman, M.S., Badr, M.Z & Matthews, H.B. (1995) Cancer Lett. 95, 93-97. **DICHONDRA** (*Dichondra micrantha*). *Dichondra* will grow in partial shade, but it does best in full sun under cool coastal conditions. ... [www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r785900111.html](http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r785900111.html) - 14k

Figueras, M.J. & Gosalvez, M. (1973) Eur. J. Cancer 9, 529-531.

Fukami, H & Nakajima, M. (1971) In Naturally occurring Insecticides, eds. Jacobson, M. & Crosby, D.G. (Dekker, New York). pp. 71-97.

Fukami, J.I (1976) in Insecticide Biochemistry and Physiology, ed. Wilkinson, C.F. (Plenum, New York), pp 353-396.

Gosalvez, M., García-Cañero, R., Blanco, M. & Gurruchari-Lloyd, C (1976) *Cancer Treta Rep.* 60, 1-8  
HANSEN, W.H., Davis, K.J. & Fitzhugh, O.G. (1965) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7, 535-542.

HOLLINGWORTH, R.M & AHAMMADSAHIB, H.I (1995) *Rev. Pestic. Toxicol.* 3, 277-302.

GERHÄUSSER, C., mar, W., Lee, S.K., Suh, N., Luo, Y., Kosmeder, J., Luyengi, L. (1995) *Nat. med.* 1, 260-266.

GERHÄUSSER, C., Kosmeder, J.W., II, Lee, S.K. (1996) *Am. Chem. Soc. Abstr.* 211 (1-2), MEDI 81.

(HIROSUKE YOSHIOKA, 1992) (En: *Rational Approaches to structure, Activity, and Ecotoxicology of Agrochemical*, Ed. By W. Draber and T. Fujita, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 185-217)

LAWN, k. 1998. *Dichondra*. (<http://turfgrasses.com/info/dichondra.html>).

LUYENGI, L., LEE, I.S., KINGHORN, A.D., MORIARTY. (1994) *Phytochemistry* 36, 1523-1526.

MABRY, J. J. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer – verlag. Berlin – Hadelberg, N. Y.

MATSUMURA, F. 1985. *Toxicology of Insecticides* (2da. Ed.) Plenum Press, New York.

MICHAEL, K. 1998. (<http://biopesticides.biological.oxidations.html>).

MILLER, T. 1998. *Botanicals*. (<http://www.viconet.com/botanicals/roi.html>).

NAGHERBOHN, W.O. (1959) *Handbook of Toxicology* (Saunders, Philadelphia), Vol. III, pp. 661-673.

RECHCIGL E. Jack et al. *Biological and Biotechnological Control of Insects Pests*. Lewis Publishers Marzo de 2000.

ROWLANDS, J.C. & CASIDA, J.E., (1997) *The toxicologist* 36, 235.

THOMSON, W.T. 1994-5 revisión,, *Agricultural chemicals. Book I, Insecticides*, Thomson Publications, Fresno, CA.

TURFGRASSES (traduzca esta página) Seedland guide to scientific names for turf & native grasses Special GrassWeb sites on Turfgrasses.com. *Dichondra* - Used for ground covers. ...

[www.turfgrasses.com/info/dichondra.ntm](http://www.turfgrasses.com/info/dichondra.ntm) - 51k

**Tolerance to herbicides of ground cover species for New Zealand orchards.**

Harrington, K. C.; Rahman, A. *Plant Protection Quarterly*. 1998 13:111-116.

Herbicide tolerance studies were conducted on 8 species with potential for ground cover use in New Zealand orchards.

*Festuca rubra* and *F. longifolia* tolerated a wide range of grass killing herbicides and could be easily cleared of weeds. Weeds in *Trifolium repens*  
<http://www.psu.missouri.edu/lnl/v30/literature.htm>