

La composición y proporción de los componentes de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) varía dependiendo de la técnica utilizada para su aislamiento

José Manuel Pineda-Ríos¹, Juan Cibrián Tovar¹, Jorge Macías Sámano⁴, Luis Francisco Salomé Abarca¹, Rosa María López Romero², Enrique de Jesús Arjona Suárez³.

¹Postgrado en Fitosanidad, Programa de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México- Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

²Postgrado en Edafología, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México- Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

³Postgrado en Estadística, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México- Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, México.

⁴El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antigua Aeropuerto Km 2,5; 30700 Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

RÍOS JMP, TOVAR JC, MACÍAS SÁMANO J, ABARCA LFS, ROMERO RML, SUÁREZ EJA. 2016. La composición y proporción de los componentes de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) varía dependiendo de la técnica utilizada para su aislamiento. ENTOMOTROPICA 31(21): 172-185.

Hypsipyla grandella es la principal plaga de la caoba (*Swietenia* sp.) y del cedro (*Cedrela* sp.) en América Latina y el Caribe. La hembra produce una feromona sexual que puede ser usada en el manejo de esta plaga. El objetivo de este estudio fue determinar si el número y proporciones de los componentes de la feromona sexual de *H. grandella*, varían a través de las técnicas usadas para su aislamiento. Las técnicas usadas fueron microextracción en fase sólida (MEFS) en diferentes modalidades, aireación dinámica y microextracción en disolvente orgánico. La identificación de los componentes feromonales se hizo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos identificados fueron: (Z)-9-tetradecen-1-ol; (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ol; acetato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ilo en diferentes proporciones, dependiendo de la técnica de aislamiento utilizada. Las mejores técnicas para aislamiento de los componentes de la feromona fueron la microextracción en fase sólida y la microextracción en disolvente orgánico.

Palabras clave Adicionales: Diclorometano, MEFS, (Z)-9-tetradecen-1-ol.

Abstract

RÍOS JMP, TOVAR JC, MACÍAS SÁMANO J, ABARCA LFS, ROMERO RML, SUÁREZ EJA. 2016. The composition and proportions of the *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) sex pheromone varies depending on the isolation technique. ENTOMOTROPICA 31(21): 172-185.

Hypsipyla grandella is the main pest of mahogany (*Swietenia* sp.) and cedar (*Cedrela* sp.) in Latin America and the Caribbean. This pest female produces a sex pheromone which could be used in its handling. The aim of this study was to determine if the number and proportions of the sex pheromone components of *H. grandella* vary across isolation techniques. The techniques used were solid phase microextraction in different modalities, dynamic aeration and organic solvent microextraction. Identification of pheromone compounds was made using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Compounds were identified as: (Z)-9-tetradecen-1-ol; (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ol; (Z)-9-tetradecen-1-yl acetate and (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-yl acetate in different proportions depending on the isolation technique. The best techniques for pheromone components isolation were solid phase microextraction and organic solvent microextraction.

Additional key words: Dichloromethane, SPME, (Z)-9-tetradecen-1-ol.

Introducción

Hypsipyla grandella (Zeller, 1848) es considerada la principal plaga de la caoba (*Swietenia* sp.) y el cedro (*Cedrela* sp.). El cultivo de estas especies es difícil debido a los frecuentes ataques de la larva, la cual hace túneles en tallos jóvenes, destruyendo el meristemo apical (Mayhew y Newton 1998). Han sido muchos los intentos por llevar a cabo un manejo integrado de esta plaga, se han empleado sustancias químicas, control biológico y estrategias silviculturales; sin embargo, hasta ahora el resultado no es satisfactorio (Grijpma 1970, Whitmore 1976, Mayhew y Newton 1998). El uso de la feromona sexual producida por la hembra, podría ser una eficiente estrategia para el manejo de esta plaga, principalmente en programas de detección y monitoreo, trapeo masivo, impregnación atmosférica y atracción-liberación (Macías-Sámano 2001). Existen avances importantes en la identificación de los compuestos feromonales de *H. grandella*, la mayoría basados en microextracción orgánica con hexano, sin embargo, aún no se ha podido establecer su efectividad en campo (Borek et al. 1991, Effraim 1997, Hilje et al. 2002, Macías-Sámano et al. 2006).

De manera general, las feromonas, son mezclas de varios compuestos, los cuales se encuentran en cantidades muy bajas (ng o pg) en el insecto, por lo cual resulta necesario el uso de técnicas de alta resolución y sensibilidad, para su extracción y determinación (Jones y Holdham 1999). La extracción en disolvente orgánico se basa en la extracción sólido-líquido que ocurre cuando un material sólido entra en contacto con un disolvente, y los componentes solubles en el material sólido se transfieren al disolvente. Por tanto, la extracción con disolventes resulta en la transferencia de masa del analito o analitos solubles al disolvente, en un gradiente de concentración (Handa 2008). La tasa de extracción sólido-líquido, en general, es afectada por las características de matriz, la elección del disolvente, el método de contacto, la

temperatura de extracción, el número de lavados y las condiciones para la extracción (por ejemplo: agitación) y los siguientes factores deben ser considerados al seleccionar un disolvente para uso comercial: el poder disolvente (selectividad), temperatura de ebullición, reactividad, viscosidad y presión de vapor (Tandon y Rane 2008).

Otra técnica para aislamiento de volátiles es la microextracción en fase sólida (MEFS) la cual se desarrolló a partir de la técnica de extracción en fase sólida, pero en este caso, el material adsorbente está unido de forma permanente a la fibra, lo que permite la reutilización de la fase de extracción. La MEFS utiliza un pequeño volumen de absorbente, típicamente dispersado en la superficie de pequeñas fibras, para aislar y concentrar analitos de la matriz de la muestra. Después del contacto con la muestra, los analitos son absorbidos o adsorbidos por la fase de fibra (dependiendo de la naturaleza del revestimiento). Después de la etapa de extracción, las fibras se transfieren, con una jeringa como dispositivo de manipulación, en el instrumento de análisis para la separación y cuantificación de los analitos. Esta técnica integra muestreo, extracción e inyección de la muestra, y es una manera sencilla de realizar un seguimiento in situ (Harlalka 2008). En MEFS, los analitos normalmente no se extraen cuantitativamente a partir de la matriz. Los métodos de equilibrio son más selectivos, ya que toman ventaja de las diferencias de la fase de extracción y las constantes de distribución de la matriz para extraer analitos de interés, de analitos de interferencia. La extracción exhaustiva se puede lograr en MEFS, y se puede lograr para la mayoría de los compuestos mediante la aplicación de una fibra internamente fría. En la extracción exhaustiva, la selectividad se sacrifica para obtener la transferencia cuantitativa de analitos blanco, a la fase de extracción. No es necesario medir el volumen de la muestra extraída, y por lo tanto el dispositivo de MEFS puede ser expuesto directamente al

material investigado para la cuantificación de dichos compuestos. Una deficiencia es que si no se cuenta con un agente silanizante para el material de vidrio donde se realiza la extracción, los compuestos pueden perderse en la superficie del frasco contenedor del material biológico (Demeestere et al. 2007).

Para superar las desventajas de los métodos de captura de espacio de cabeza, pueden ser utilizadas técnicas de captura dinámica del espacio de cabeza o aireación dinámica. Una vez más, el material biológico se coloca en un recipiente y los compuestos de evaporación son arrastrados continuamente por una corriente de gas inerte o aire filtrado, en una trampa que contiene un polímero poroso, que adsorbe más o menos los constituyentes orgánicos dependiendo de la polaridad del adsorbente. Este método produce una cantidad mucho mayor de compuestos volátiles atrapados de manera que, después de la desorción, ya no es problemática la obtención de una señal en espectrometría de masas (Tholl et al. 2006).

Con lo anteriormente descrito, se evidencia que cada una de las técnicas para aislamiento de compuestos volátiles posee sus características físico-químicas particulares, por lo que podría haber variación tanto en la cantidad de compuestos aislados, como en las proporciones en que estos son extraídos. Si bien es de vital importancia la identificación de los compuestos de la mezcla feromonal de *H. grandella*, también lo es, determinar las proporciones de los compuestos dentro de esta mezcla, que correspondan a la mezcla biológicamente activa. Como se mencionó anteriormente, la feromona de *H. grandella* ha sido identificada pero sin tener efectividad en campo, por lo que en este estudio se propone, como posible explicación, que la proporción entre compuestos usados en las mezclas de feromona, la cual hasta este momento se ha basado mayoritariamente en extracción en disolvente orgánico, pudiera no ser la correcta, debido a que, tanto la formulación,

como las proporciones, varían dependiendo del método de extracción utilizado. Por lo que el objetivo de este estudio fue comparar técnicas de aislamiento de los componentes de la feromona sexual de *H. grandella* a través del número de compuestos aislados y las proporciones en que se obtienen.

Materiales y métodos

Insectos

Se recolectaron 187 larvas de *H. grandella* en una plantación de cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus, 1759) en la población de Las Cruces, municipio de Chontla, Veracruz (lat 21° 14' 46, 11" N, long 97° 56' 35,2" W, a 356 m), México. Estas se colocaron de manera individual en recipientes de plástico tipo tarro de 40 mL y se alimentaron con tallos y hojas de cedro. Una vez formadas las pupas, fueron extraídas de los recipientes y se hizo una diferenciación de hembras y machos a través de la abertura genital, con base en la descripción de Vargas et al. (2001). Posteriormente se colocaron separadas hasta la emergencia del adulto en jaulas de 35 cm x 25 cm x 25 cm (largo x ancho x alto), elaboradas de metal con una funda de tela tipo tul. Las condiciones de cría fueron 25 ± 2 °C, humedad relativa de 70 ± 10 % y fotoperiodo de 12:12 h luz: obscuridad (L: O).

Corroboración de la especie

Esta se realizó en el laboratorio de Taxonomía de Insectos del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, con base en las características taxonómicas de la genitalia del macho y a través de los caracteres morfológicos de los adultos de esta especie siguiendo a Becker (1973). Los ejemplares identificados fueron depositados en la Colección de insectos del programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

Extracción de los compuestos feromonales

Microextracción en fase sólida (MEFS)

Se usaron viales de cristal de 25 mL, los cuales fueron lavados en la siguiente secuencia: extran, agua, acetona, diclorometano y hexano, posteriormente fueron calentados a 300 °C por 3 h para eliminar presencia de compuestos volátiles contaminantes. Una vez listo el material se colocó una hembra por vial y este fue cerrado con un tapón de caucho tipo septa y sellado con crimpers marca Sigma Aldrich®. Para hacer la captura de volátiles se introdujo una fibra de MEFS de 100 µm de grosor de fase adsorbente, compuesta de polidimetilsiloxano, marca Supelco®, en el momento en que la palomilla mostró la posición de llamado con exposición de la glándula sexual (de 5 a 6 h después de iniciada la escotofase). El tiempo de adsorción en primera instancia fue de 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron 12 repeticiones donde una hembra fue una repetición. Como testigo se usó la fibra expuesta al interior de un vial vacío y sellado sin material biológico.

Debido a que en el experimento anterior no se registró captura de compuestos volátiles, nuevamente en viales de vidrio de 25 mL, se colocaron de manera individual hembras de 2 d de emergidas, y durante el llamado sexual se expuso la fibra de MEFS hasta que no se observó más el llamado sexual (1 hora antes de terminar la escotofase), la fibra usada en un holder para muestreo en campo fue retraída y almacenada en un tubo de ensaye de 100 mL con tapón de rosca a -20 °C y a las 48 h, al tercer día de emergidas, la misma fibra fue expuesta nuevamente por el mismo tiempo, entonces fue retirada para ser analizada en el cromatógrafo de gases. Nuevamente se usó como testigo la fibra expuesta al interior de un vial vacío y sellado sin material biológico. Para este experimento también se hicieron 12 repeticiones donde una hembra fue una repetición.

En un tercer experimento, cada vial donde se encontraban contenidas las palomillas fue

lavado con 1 mL de diclorometano grado cromatográfico (Merck), por 3 min, con agitación manual por 5 min. En un vial limpio se unieron 2 mL de disolvente de lavado (uno de cada vial) obteniendo 6 extractos. Para eliminar detritos orgánicos, los extractos fueron filtrados con una pipeta Pasteur con fibra de vidrio, previamente lavada y horneada a 300 °C, finalmente fueron concentrados a 20 µl bajo una corriente suave de nitrógeno. Los extractos concentrados se almacenaron a -5 °C hasta su análisis.

En otra prueba, repitiendo el procedimiento anteriormente descrito, se obtuvieron los 2 mL de lavado de frascos, los cuales se depositaron en un vial y se le agregaron cuatro glándulas sexuales de hembras vírgenes que estaban en postura de llamado sexual, los viales fueron cerrados con un tapón de caucho tipo septa y sellados con crimpers marca Sigma Aldrich®, los compuestos de las glándulas fueron extraídos por 24 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se colocó la fibra de MEFS en el espacio de cabeza por 1 h para ser posteriormente analizada en el cromatógrafo de gases; los análisis, para este caso, se hicieron por triplicado.

En un último experimento de MEFS, se disecaron glándulas sexuales de hembras vírgenes de 2 a 3 d de emergidas que presentaban la postura de llamado (después de 5 o 6 h de iniciada la escotofase). Para la escisión de las glándulas sexuales, las palomillas se tomaron de manera individual, se les presionó suavemente el abdomen hasta lograr la exposición total de la glándula, la cual se frotó sobre la superficie de la fibra de MEFS de acuerdo con la metodología de Frérot et al. (1997). Posteriormente con una pinza entomológica número 5, se disecó la glándula y se frotó nuevamente sobre la superficie de la fibra para ser inmediatamente analizada en el cromatógrafo de gases. Para esta prueba se hicieron seis repeticiones y en cada repetición se usaron tres glándulas.

Aireación dinámica

Se colocaron 18 hembras vírgenes de 2 a 3 d de emergidas en un recipiente con capacidad de 3,5 L. Las palomillas se encontraban aisladas de manera individual en frascos de plástico tipo tarro de 40 mL, a los cuales se les realizaron aberturas en las paredes laterales y en la tapa, que fueron cubiertas con tela de tul. Con una bomba de aire Elite 802[®] se hizo pasar a través del sistema, un flujo de aire de 1 L min⁻¹. Como filtro para el aire se colocó en el extremo de la fuente de aire un cartucho de 150 mg de Tenax[®] que previamente fue lavado con hexano, se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente y posteriormente fue calentado a 250 °C para eliminar compuestos volátiles; posterior al filtro, se utilizó como fuente de humedad un matraz kitasato de 500 mL con 300 mL de agua estéril. Como adsorbente de los compuestos volátiles se utilizó un segundo cartucho colocado al final del sistema, el cual también contenía 150 mg de Tenax[®]. El tiempo de captura de volátiles fue de 12 h, a 24 ± 2 °C y 60 ± 2 % de humedad relativa dentro del frasco contenedor de hembras. Los compuestos adsorbidos se recuperaron lavando el segundo cartucho con 8 mL de *n*-hexano grado cromatográfico (Merck), el extracto hexánico se concentró a 50 µL bajo una corriente de nitrógeno, para después ser analizado por cromatografía de gases. Estas pruebas se hicieron por triplicado, siendo el conjunto de 18 hembras una repetición. Como testigo se usó el mismo sistema en las condiciones descritas anteriormente pero sin hembras. Y como control positivo un frasco con compuestos estándares colocados en una cuerda de algodón.

Extracción en disolvente orgánico

Se extirparon glándulas de hembras vírgenes de 2 y 3 d de emergidas, y modificando la metodología empleada por Bosson y Gallois (1982) para *Hypsipyla robusta* (Moore, 1886) (Lepidoptera: Pyralidae), las glándulas fueron colocadas en 200 µL de *n*-hexano, se extrajeron por 3 h y posteriormente se retiraron del

disolvente. El extracto se concentró a 20 µl bajo una corriente suave de nitrógeno y se almacenó a -5 °C hasta su análisis. Se hicieron tres repeticiones y para cada repetición o extracto se usaron 11 glándulas sexuales. Como testigo se usó solo hexano.

Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-EM).

Para la separación y detección de la feromona de la especie bajo estudio se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 Series[®] acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973. El sistema CG-EM usó una columna HP 5-M/ 5 % de fenil polisilfenileno-siloxano, 30 m x 0,250 µm y 0,25 µm de grosor de fase estacionaria; como gas acarreador, se usó Helio con grado de pureza 99,9 % a flujo de 1 mL min⁻¹. El inyector se usó en modo splitless (0,75 min) a 220 °C. La temperatura del horno comenzó en 40 °C y se mantuvo por 5 min, posteriormente la temperatura aumentó 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar 150 °C y se mantuvo así por 5 min, para finalmente aumentar 10 °C min⁻¹ hasta 230 °C. La temperatura de interfase fue de 280 °C. Para el detector de masas en modo SCAN, la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y la del cuadrupolo de 150 °C. La energía de ionización fue de 70 eV. Para el caso de inyección con fibra de MEFS, el tiempo de desorción de la fibra fue de 2 min, y en los extractos orgánicos el volumen de inyección fue de 1 µL.

La identificación de los compuestos se realizó mediante búsqueda y comparación de los espectros de iones de los compuestos obtenidos de las muestras con los de la biblioteca NIST V. 2002. También se hizo una inyección de *n*-alcanos para calcular los índices de Kovats modificados (*I_k*) para cada compuesto. Los *I_k* fueron calculados con la fórmula de Van de Dool y Kratz:

$$Ik = 100 \cdot C + 100 \frac{(t'_R)^x - (t'_R)^c}{(t'_R)^{c+1} - (t'_R)^c}$$

Donde C es el número de carbonos en el compuesto; $(t'_R)^x$ es el tiempo de retención corregido de los compuestos, el cual se calculó usando un compuesto de bajo tiempo de retención (tolueno), el tiempo de retención de este compuesto se restó al tiempo de retención de los n -alcanos y picos de muestra; $(t'_R)^{c+1}$ es el tiempo de retención corregido del alcano después del pico de interés y $(t'_R)^c$ es el tiempo de retención corregido del alcano antes del mismo pico (Hübschmann 2009).

La confirmación de la identidad de los compuestos se realizó a través de la comparación de los tiempos de retención e Ik de los compuestos de las muestras con los de los siguientes estándares: (Z)-9-tetradecen-1-ol (Z9-14:OH), (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ol (Z9E12-14:OH), acetato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo (Z9-14:Ac) y acetato de (Z,E)-9,12-tetradecadien-1-ilo (Z9E12-14:Ac), obtenidos de Bedoukian Research Inc. Estados Unidos.

Para determinar la concentración de los componentes de la feromona, se realizaron curvas de calibración de los estándares anteriormente mencionados en concentraciones crecientes de 0,1 a 1 ng μL^{-1} . Para el caso de la curva para fibra de MEFS, las soluciones de estándares preparados a las concentraciones anteriormente mencionadas, se sometieron a las mismas condiciones de procesamiento de las muestras (Ouyang and Pawliszyn 2008). La concentración de los compuestos encontrados fue reportada en ng por hembra equivalente.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, con un nivel de significancia del 95 %.

Resultados y Discusión

Corroboración de la especie

Las características morfológicas de los adultos y la de los órganos genitales del macho (Figura 1), coincidieron con la descripción realizada por Becker (1973), lo cual confirma la identidad de la especie como *H. grandella*.

Extracción de los compuestos de la feromona

Microextracción en fase sólida (MEFS)

Los análisis no mostraron la presencia de posibles componentes de la feromona sexual de la especie bajo estudio, a diferencia de lo señalado por García (2002) que con esta misma técnica y para esta misma especie, obtuvo el Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac. Por su parte, Kenari et al. (2011) encontraron que al colocar la fibra de MEFS en el espacio de cabeza de recipientes contenedores de hembras de *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Pyralidae), es detectado solo un compuesto. Lo anterior puede sugerir que a pesar de que la MEFS es una técnica muy sensible y es usada en diversos tipos de estudios, las hembras de *H. grandella* utilizadas posiblemente produjeron una concentración muy baja de los compuestos, los cuales pudieron ser adsorbidos por la fibra, pero no detectados por el equipo de CG. Lo anterior pudo corroborarse ya que al recuperar los compuestos adheridos a la superficie de viales, mediante extracción en disolvente orgánico, de los frascos donde estas palomillas se encontraban contenidas, se observó la presencia de los compuestos Z9-14:OH y Z9-14:Ac, de los cuales el alcohol no fue detectado por García (2002) (Figura 2).

La presencia de estos dos compuestos puede ser explicada posiblemente por la morfología de la misma palomilla, puesto que al encontrarse la abertura genital muy cercana a la abertura anal, y considerando que la glándula sexual es protruida por la abertura genital, esta puede rozar el espacio del abdomen que hay entre ambas aberturas y por tanto también la abertura anal puede quedar impregnada de los componentes



Figura 1. Órgano genital masculino de *H. grandella*, a: valva derecha, b: gnathos, c: transtilla, d: anellus.

de la feromona provenientes de la misma glándula sexual. Con respecto a lo mencionado previamente, la palomilla arroja excretas antes, durante y después del comportamiento de llamado sexual, posiblemente quedando cierta proporción de estos compuestos retenidos en las mismas, como fue observado en el caso de *E. ceratoniae*, que al poner en contacto la fibra con las papilas anales de esta misma, se detectaron tres componentes de la feromona (Kenari et al. 2011). Otro factor que pudo haber contribuido al aislamiento de compuestos, en los viales que contenían a la palomilla, fue la superficie del vial, que actuó como una barrera física, reteniendo cierta cantidad de estos compuestos, tal como lo menciona Frérot et al. (1997). Si consideramos lo anterior, y tomando en cuenta que la cantidad de analito extraído por MEFS es directamente proporcional a la concentración en que el analito se encuentra en la muestra (Pranovich et al. 2002), esto pudo disminuir aún más la disponibilidad de los componentes de la feromona en el espacio de cabeza y consecuentemente reducir la concentración de

compuestos adsorbidos por la fibra de MEFS, haciéndolos no detectables por el equipo de GC-EM. Aun así, los compuestos retenidos son fácilmente recuperables o extraídos con un solvente de la polaridad adecuada como lo fue el diclorometano.

El diclorometano ayudó a mejorar la extracción, puesto que es un disolvente capaz de extraer compuestos, que van de mediana polaridad a no polares, y los compuestos de la feromona de *H. grandella* son de polaridad intermedia, debido a la presencia de grupos funcionales hidróxidos, en el caso de los alcoholes y de acetatos en los otros dos componentes de la feromona. Además, la menor retención de los electrones del enlace pi en su cadena de carbono, hace a estos electrones más polarizables, contribuyendo a un momento dipolar instantáneo (Wade 2011), lo que hace al diclorometano un disolvente de polaridad más adecuada que el n-hexano, para la extracción de estos compuestos. Lo anterior pudo ser corroborado a través de la colocación de la fibra de MEFS en el espacio de cabeza del vial contenedor de extracto en diclorometano y su análisis por cromatografía de gases, donde se determinó la presencia de los compuestos Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac (Figura 3), con tiempos de retención que coinciden con los de estándares comerciales. Chu et al. (2005) hicieron uso de una técnica de MEFS similar a la mencionada y aislaron del espacio de cabeza de frascos contenedores de glándulas, los dos componentes de la feromona de *Eucosma notanthes* (Meyrick, 1936) (Lepidoptera: Tortricidae). El frotado directo de glándulas sobre la superficie de la fibra mostró la presencia de Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac (Figura 4), que coinciden con los compuestos detectados en la técnica de adsorción del espacio de cabeza de extractos de frascos y glándulas, mencionados anteriormente en este estudio. Avand- Faghieh y Frérot (2008) obtuvieron los compuestos feromonales de *Sesamia cretica* (Lederer, 1857)

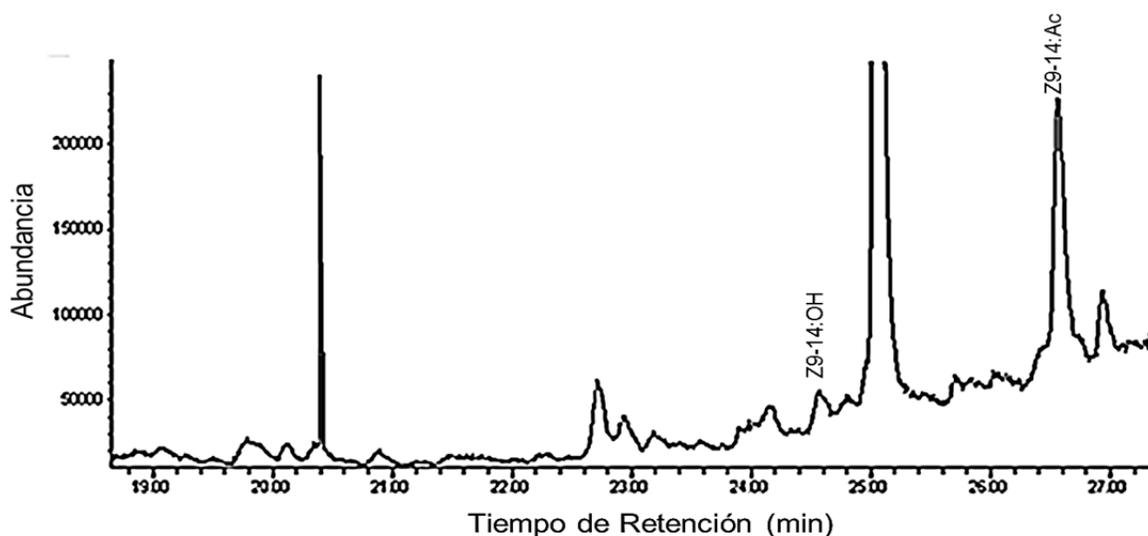


Figura 2. Cromatogramas de compuestos obtenidos de la superficie de viales

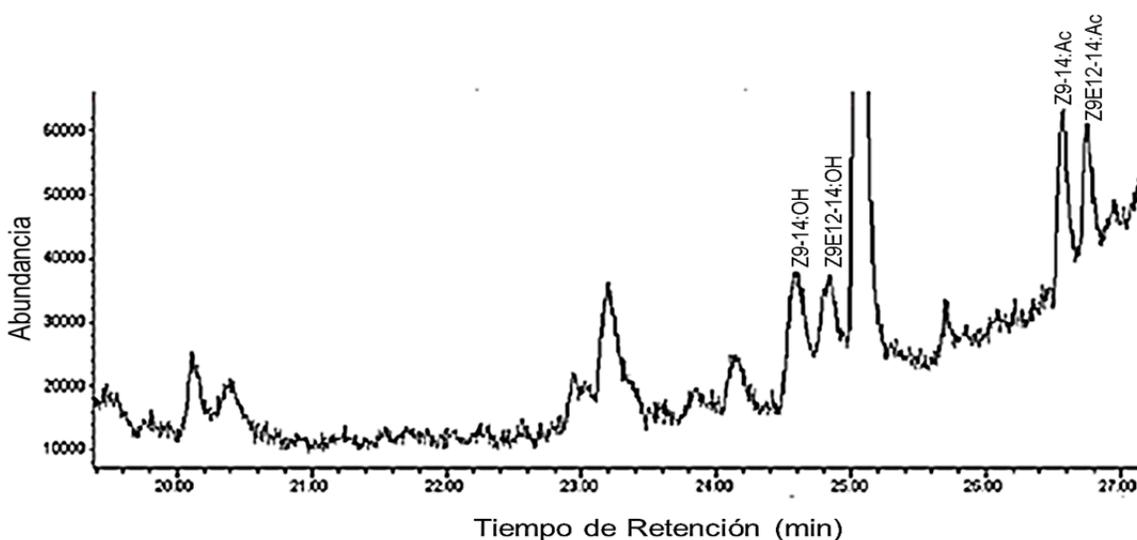


Figura 3. Cromatograma de compuestos procedentes del espacio de cabeza de diclorometano y cuatro glándulas.

(Lepidoptera: Noctuidae) usando la misma técnica. Esta tendencia también fue observada por Kenari et al. (2011), quienes detectaron todos los componentes de la feromona de *E. ceratoniae*, al poner en contacto directo la fibra de MEFS con las papilas anales.

Aireación dinámica

No fue posible capturar los componentes de la feromona, a pesar de que se le proporcionaron al

insecto las condiciones adecuadas para realizar el llamado, lo cual también es señalado por García (2002) para *H. grandella*, quien atribuye esto a que posiblemente los insectos no se encontraban en las mejores condiciones fisiológicas, pues estaban confinados y además, el desprendimiento de escamas, provocado por el choque contra las paredes de los contenedores al volar, pudo influir en la adsorción de otros compuestos. Heath et

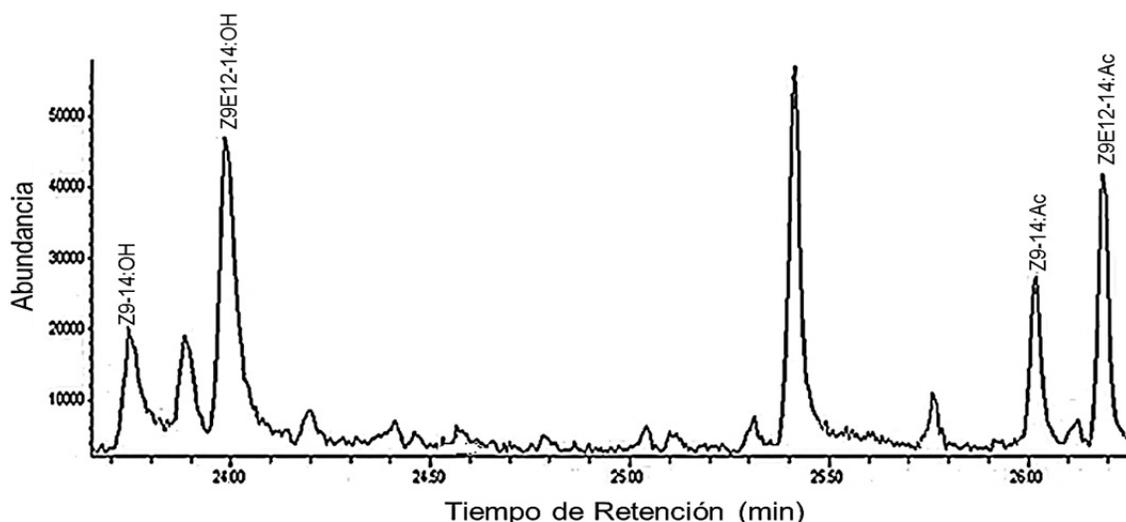


Figura 4. Cromatograma de compuestos obtenidos del frotado de glándulas sobre la fibra de MEFS.

al. (2006) también hicieron uso de la misma técnica para el aislamiento de los compuestos de la feromona de *Cactoblastis cactorum* (Berg, 1885) (Lepidoptera: Pyralidae), donde a pesar de realizar cambios en las condiciones y tiempo de captura, así como en el número de hembras por experimento, no encontraron diferencias al comparar con el testigo.

Microextracción en disolvente

Se observó la presencia de los mismos cuatro compuestos obtenidos mediante el frotado directo de glándulas sobre la fibra de MEFS: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac, con tiempos de retención 23,74; 23,99; 26,01 y 26,19 min respectivamente (Figura 5), corroborándose con los estándares (Figura 6). Frérot et al. (1997), para lepidópteros, hicieron una comparación entre ambas técnicas y encontraron que la fibra adsorbió una gran cantidad de los componentes de la feromona (120 ng / glándula de Z11-16:Ac), comparado con los extractos glandulares (60 ng / glándula de Z11-16:Ac). Los mismos autores mencionan que los extractos glandulares no son apropiados para medir la producción completa de feromona del contenido de la célula glandular y la

superficie glandular. Una gran cantidad de la mezcla de la feromona se pierde, posiblemente en la superficie del vial de vidrio. Por su parte, Chu et al. (2005) encontraron que la MEFS tiene una mayor eficiencia de extracción que los extractos en solvente y se utiliza una menor cantidad de tiempo para la obtención de los compuestos. Esta conclusión la obtienen al realizar una comparación entre los resultados obtenidos al colocar la fibra de MEFS en un vial con cinco glándulas a temperatura de 170 °C por 10 min, y los señalados por Hung et al. (2001), quienes obtienen los mismos componentes, pero utilizaron 52 820 glándulas de *E. notanthès*.

Se hizo una comparación de los espectros de iones de los compuestos de la muestra, con los de la biblioteca NIST V. 2002 (Figura 7), donde se puede observar la similitud que existe, entre los patrones de fragmentación de masas de los compuestos aislados de las muestras y los de la biblioteca. Para el Z914:OH se obtuvo una similitud del 83 % coincidiendo en al menos 5 iones mayoritarios y el pico base en la masa 55; para el Z9E12-14:OH, una similitud de 96 % con coincidencia en 9 iones mayoritarios y el pico base en la masa 68 a la misma intensidad, además de la formación del ion molecular

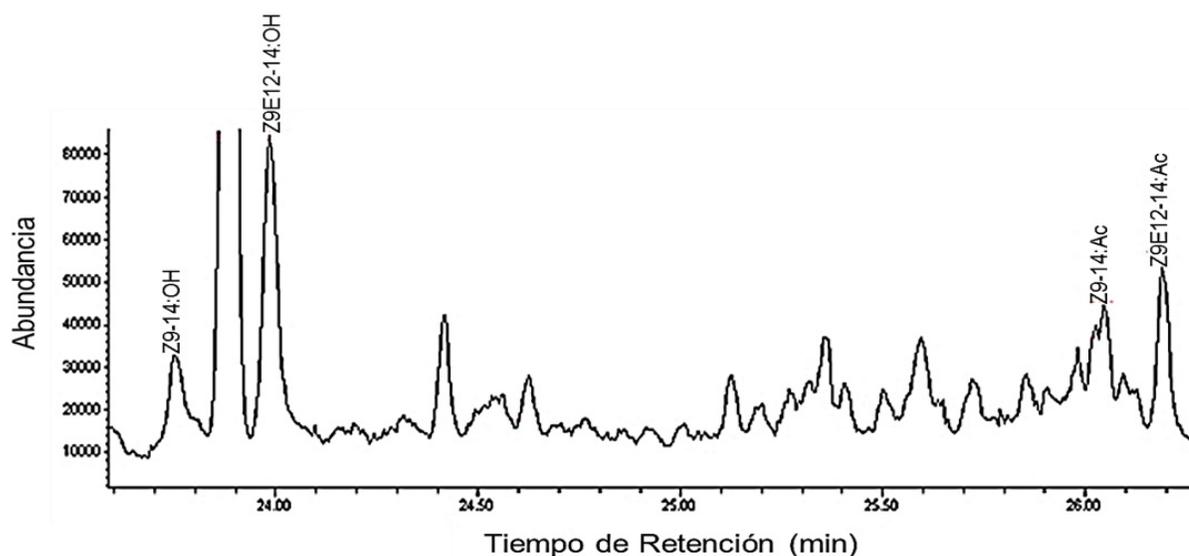


Figura 5. Cromatograma de compuestos obtenidos por extracción de glándulas sexuales en n-hexano.

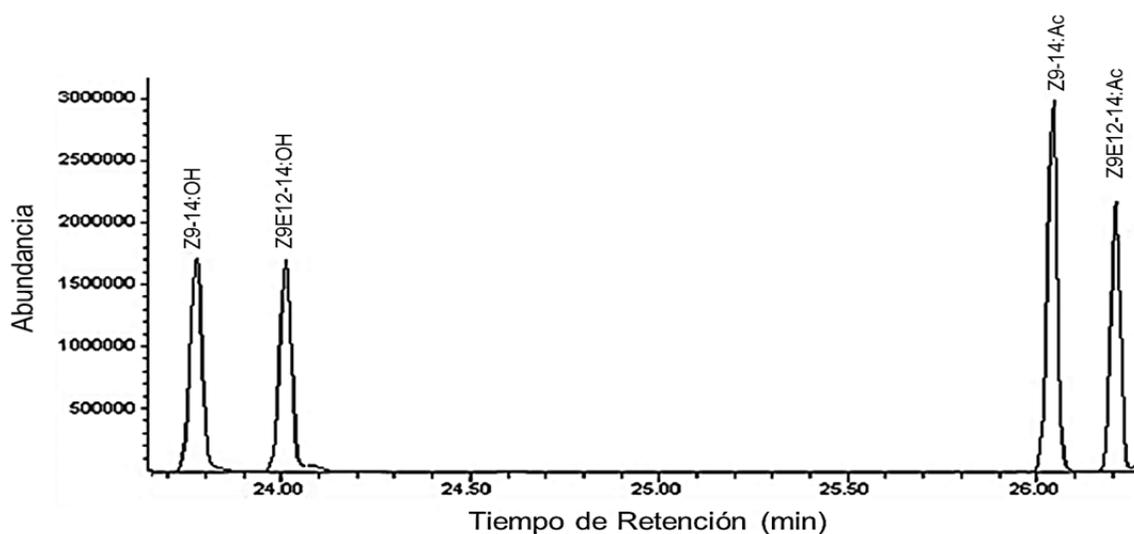


Figura 6. Cromatogramas de compuestos estándares: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac.

correspondiente a la masa 210; para ambos acetatos, existió coincidencia con los espectros de la biblioteca del 94 %, coincidiendo en 15 y 18 iones mayoritarios para el Z9-14:Ac. y el Z9E12-14:Ac, respectivamente, ambos compuestos presentaron fragmentación completa de su estructura.

En este estudio se determinó que son cuatro los posibles componentes de la feromona sexual de *H. grandella* en México, lo cual coincide con lo señalado por Macías-Sámamo et al. (2006), quienes identificaron cuatro compuestos de 14 carbonos (dos alcoholes y dos acetatos), sin mencionar la estructura química. Además, también coinciden con la identidad de los

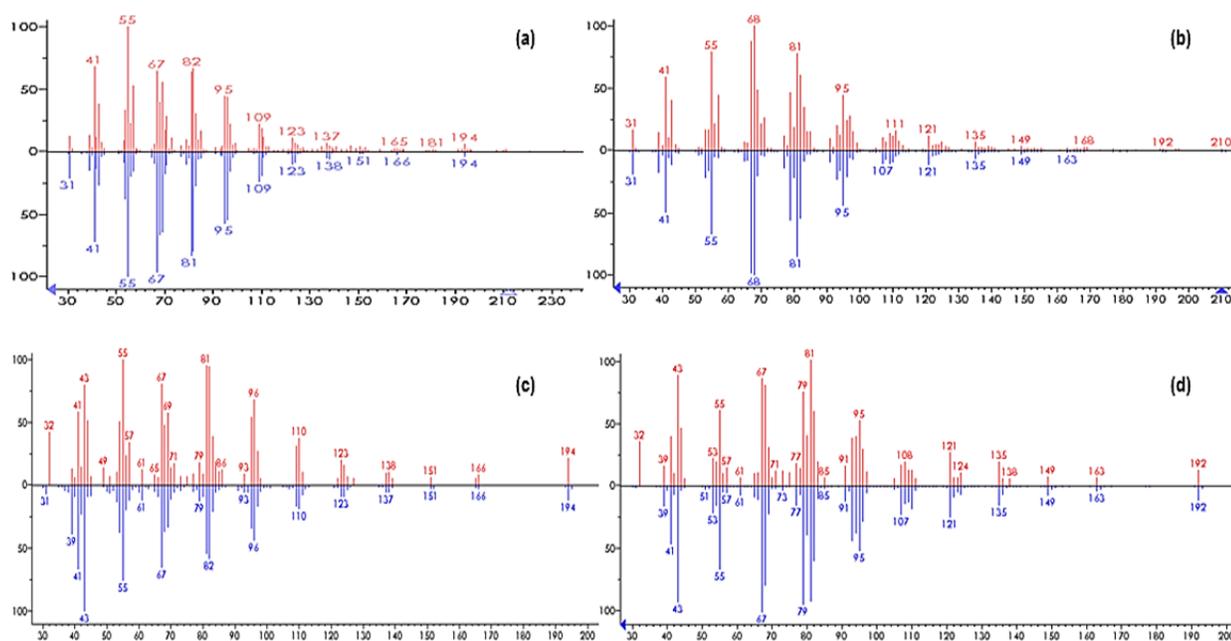


Figura 7. Comparación de Espectros de Iones (a) Z9-14:OH, (b) Z9E12-14:OH, (c) Z9-14:Ac. Y (d) Z9E12-14:Ac, obtenidos de las muestras (Rojo) y de la Biblioteca de espectros NIST (Azul).

compuestos identificados por Hilje et al. (2002), quienes obtuvieron de extractos abdominales de hembras vírgenes, los compuestos de la feromona Z9E12-14:OH, Z9-14:OH, Z9E12-14:Ac y Z9-14:Ac. Effraim (1996) realizó extractos hexánicos de glándulas sexuales de *H. grandella* provenientes de Costa Rica, obteniendo sólo tres compuestos: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH y Z9E12-14:Ac, que coinciden también con los obtenidos en este estudio, pero difiriendo únicamente en la presencia del Z9-14:Ac. Por otro lado, difiere en gran proporción con lo encontrado por Borek et al. (1991) que con insectos procedentes de Cuba, identificaron como compuestos volátiles de la glándula sexual, al acetato de hexadecanilo (16Ac), acetato de (Z)-3-hexadecenilo (Z3-16:Ac) y un compuesto de 18 carbonos no definido, y sólo coincide con el Z9E12-14:OH.

En cuanto a otra especie de la misma familia, *H. robusta*, Bosson y Gallois (1982) identificaron tres componentes de la feromona de los cuales,

dos de ellos, el Z9-14:Ac y el Z9E12-14:Ac, se encontraron en este trabajo.

Comparación de las técnicas de extracción

A excepción de la exposición de la fibra de MEFS y aireación dinámica, todas las técnicas empleadas en este estudio lograron extraer los componentes de la feromona sexual de *H. grandella*, sin embargo difirieron en el número de compuestos obtenidos, ya que de la superficie interna de viales, únicamente se recuperaron dos, a diferencia de la fibra expuesta en el espacio de cabeza de glándulas en diclorometano, frotado sobre superficie de fibra y extractos hexánicos, que aislaron los cuatro de interés (Cuadro 1).

Las diferencias en el número de compuestos, así como las proporciones de cada uno de ellos observados en cada técnica de extracción, pueden ser debidas a los principios físico-químicos que rigen a cada técnica de aislamiento. Por ejemplo, en la extracción con disolvente orgánico, la capacidad de extracción es un parámetro que depende tanto de la polaridad de los compuestos, como del contacto del analito con el disolvente.

Cuadro 1. Comparación de técnicas de extracción empleadas para el aislamiento de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller.

Compuesto	TRest	IKest	TRm (min)	IKm	Técnica de extracción (ng/hembra equivalente)					
					MEFS				ADI	EDO
					INS	CSV	ECF	FGH		
Z9-14:OH	23,74	937	23,74	937	--	5,028	0,085	0,103	--	0,622
Z9E12-14:OH	23,99	1118	24,00	1125	--	--	0,084	0,279	--	1,869
Z9-14:AC	26,01	1380	26,02	1388	--	14,148	0,038	0,033	--	0,313
Z9E12-14:AC	26,19	1410	26,19	1410	--	--	0,034	0,061	--	0,417

TRest= Tiempo de retención de los estándares, TRm= Tiempo de retención de los compuestos presentes en la muestra, IKest= Índices de Kovats de los estándares, IKm= Índices de Kovats de los compuestos presentes en la muestra, MEFS= Microextracción en fase sólida, INS= Exposición de fibra a palomilla, CSV= Recuperación de compuestos adheridos a la superficie de viales, ECF= Espacio de cabeza de frasco con extracto de lavado y cuatro glándulas, FGH= Frotado de glándulas sobre superficie de fibra de MEFS, ADI= Aireación dinámica y EDO= Extracción en disolvente orgánico.

Por lo anterior, la extracción en disolvente orgánico es capaz de extraer compuestos de matrices tales como tejidos glandulares, excretas y paredes del vial, donde el material biológico es contenido. Por su parte, la MEFS sólo es capaz de adsorber compuestos que sean capaces de saturar el espacio en cabeza, o compuestos que entren en contacto directo con la fibra, como en el caso del frotado directo de glándulas. Por otro lado, las características fisiológicas del insecto, las condiciones ambientales predominantes, así como el estrés generado por la manipulación y confinamiento, son factores que pueden influir en la baja o nula producción de los componentes de las feromonas.

Con base en el frotado de glándulas y extracción en disolvente orgánico, que son las técnicas donde se obtuvieron los cuatro compuestos de interés, y concentración significativa ($\alpha=0,05$), el orden de importancia de los compuestos en la mezcla feromonal es el siguiente: Z9E12-14:OH > Z9-14:OH > Z9E12-14:Ac > Z9-14:Ac, en proporción: 5,8 : 1,9 : 1,3 : 1,0 respectivamente. Lo anterior difiere de las proporciones obtenidas de la MEFS del espacio en cabeza del frasco con glándulas. Las diferencias en capacidad de extracción entre técnicas como MEFS en sus diferentes modalidades y extracción en disolvente

orgánico con diferentes disolventes, dan como resultado la obtención de diferentes mezclas de feromona, lo cual nos lleva a formular la siguiente pregunta: ¿cuáles son las proporciones correctas o biológicamente activas?. Lo anterior es de vital importancia puesto que como se ha observado en otros estudios que prueban las posibles mezclas de feromona en el campo, no han tenido los resultados esperados (Effraim 1997, Hilje et al. 2002, Macías-Sámano 2006), por lo cual es recomendable probar diferentes métodos de aislamiento y probar cada una de las mezclas resultantes en el campo, para observar cual es la mezcla activa en cuanto a atracción.

Conclusiones

Los posibles componentes de la feromona de *H. grandella* son el Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac. El número, concentración y proporción de los compuestos dentro de la feromona sexual de *H. grandella*, varía entre técnicas de aislamiento. Las mejores técnicas de aislamiento son el frotado de glándulas sobre la fibra de MEFS y la extracción en disolvente orgánico. El orden en concentración de mayor a menor en que se presentan los compuestos aislados en al menos dos técnicas fue el siguiente: Z9E12-14:OH

>Z9-14:OH > Z9E12-14:Ac > Z9-14:Ac, en las proporciones 5,8 : 1,9 : 1,3 : 1,0 respectivamente. Es necesario probar las diferentes proporciones de mezcla obtenidas en las diferentes técnicas, para conocer si estas presentan diferencias en cuanto a su atracción en el campo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría del primer autor, a la línea prioritaria de investigación 16 (LPI-16) Innovación Tecnológica del Colegio de Postgraduados y al Fideicomiso para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico N°. 167304, por el apoyo económico para la realización de este trabajo de investigación.

Referencias

- AVAND-FAGHIH A, FRÉROT B. 2007. Identification of the sex pheromone of *Sesamia cretica* Lederer. *Journal of Chemical Ecology* 34: 103-106.
- BECKER VO. 1973. Microlepidópteros asociados con Carapa, Cedrela y Swietenia en Costa Rica. [Tesis de grado]. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 108 p.
- BOREK V, KALINOVA B, VALTEROVA I, HOCHMUT R, VRKOC J. 1991. Sex-pheromone gland volatiles from *Hypsipyla grandella* females (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae). *Acta Entomológica Bohemoslovaca* 88: 181-186.
- BOSSON AG, GALLOIS M. 1982. Analyse de la secretion pheromonale emise par les femelles vierges de la Mineuse Des Pousses de L'acajou: *Hypsipyla Robusta* (Moore) (Lepidoptere, Pyralidae, phycitinae). *Comptes rendus des seances de l'Academie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie* 294: 819-822.
- CHU TZU-YUN, HUNG CHAU-CHIN, HSU CHUNG-YUAN. 2005. Solid-phase microextraction for the investigation of sex pheromone of *Eucosma notanthus* Meyrick. *Talanta* 65(3): 743-749.
- DEMEESTERE K, DEWULF J, DE WITTE B, VAN LANGENHOVE H. 2007. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. *Journal of Chromatography* 1153: 130-144.
- EFFRAIM, N. 1997. Biology, economic impact and potential for semiochemical-based control of mahogany shootborer, *Hypsipyla robusta* (Moore) (Lepidoptera: Pyralidae), african rhinoceros beetle, *Oryctes monoceros* (Oliver) (Coleoptera: scarabaeidae) and maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae). [Tesis de grado]. Canadá: Simon Fraser University. 45 p.
- FRÉROT B, MALOSSE C, CAIN A. 1997. Solid-phase microextraction (SPME): a new tool in pheromone identification in lepidoptera. *Journal of High Resolution Chromatography* 20: 340-342.
- GARCÍA-GODÍNEZ ML. 2002. Estudio morfológico y químico de la glándula productora de feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). [Tesis de grado]. México: Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Químicas. 65 p.
- GRIJPMAN P. 1970. Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae. Vol. I. IICA Miscellaneous Publications No. 101, CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 77-80.
- HANDA SUKHDEV SWAMI. 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants, in: Handa SS, Singh SP, Longo G, Rakesh DD (Eds.), *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, ICS-UNIDO, Trieste, Italy. pp. 21-52.
- HARLALKA RAMA KANT. 2008. Solid Phase Microextraction and Headspace Trapping Extraction, in: Handa SS, Singh SP, Longo G, Rakesh DD (Eds.), *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, ICS-UNIDO, Trieste, Italy. pp. 145-167.
- HEATH RR, TEAL PE, EPSKY ND, DUEBEN BD, HIGHT SD, BLOEM S, CARPENTER JE, WEISSLING TJ, KENDRA PE, CIBRIAN-TOVAR J. 2006. Pheromone-based attractant for males of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* 35: 1469-1476.
- HILJE L, OEHLISCHLAGER C, MACÍAS-SÁMANO J. 2002. Desarrollo comercial de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella*: Informe Final. CATIE. 136 p.

- HÜBSCHMANN, HANS-JOACHIM. 2009. Handbook of GC/MS, Fundamentals and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co (Ed.). Second edition. Ed. KGaA, Weinheim. 89 p.
- HUNG C, HWANG J, HUNG M, YEN YCC, HOU R. 2001. Isolation, identification and field tests of the sex pheromone of the carambola fruit borer, *Eucosma notanthus*. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1855- 1866.
- KENARI SF, FAGHIH AA, IMANI S, TABRIZIAN M. 2011. Comparison of two different extraction techniques by SPME, in study of female specific volatile components of the iranian populations of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera.: Pyralidae). *Annals of Biological Research* 2: 258-262.
- JONES GR, HOLDHAM JN. 1999. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography* 843: 199-236.
- MACÍAS-SÁMANO JE, ARGUEDAS M, ZANUNCIO J, HILJE L. 2006. Plagas Forestales Neotropicales: La feromona de *Hypsipyla*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 19: 102-103.
- MACÍAS-SÁMANO JE. 2001. Interacciones químicas entre *Hypsipyla grandella* y sus plantas hospedantes. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 60: 15-21.
- MAYHEW JE, NEWTON AC. 1998. The silviculture of mahogany. CABI Publishing, New York. 226 p.
- OUYANG G, PAWLISZYN J. 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* 627: 184-197.
- PRANOVICH A, ECKERMAN, C, HOLMBOM B. 2002. Determination of methanol released from wood and mechanical pulp by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Pulp and Paper Science* 28(6): 199-203.
- TANDON SUDEEP, RANE SHAILENDRA. 2008. Decoction and Hot Continuous Extraction Techniques, in: Handa SS, Singh K. SP, Longo G, Rakesh DD (Eds.), Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, ICS-UNIDO, Trieste, Italy. pp. 93-106.
- THOLL D, BOLAND W, HANSEL A, LORETO F, RÖSE USR, JÖRG-PETER S. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal* 45: 540-560.
- VARGAS C, SHANNON P, TAVERAS R, SOTO F, HILJE L. 2001. Un nuevo método para la cría masiva de *Hypsipyla grandella*. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 1-4.
- WADE LG. 2011. Química Orgánica. Pearson educacion, México. 744 p.
- WHITMORE JL. 1976. Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae. Vol. II. IICA Miscellaneous Publications No. 101, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 139 p.