

Apéndice Digital 1

Obtención del extracto crudo y de las particiones de la flor de *B. candida*: La finalidad del proceso de partición fue comparar la actividad fagodisuasiva de las particiones fitoquímicas obtenidas entre ellas, y con la del extracto crudo. Para la preparación del extracto crudo se siguió la metodología empleada por Barboza et al. (2010a).

Las flores de *B. candida* se secaron en un horno de convección (Honeywell), a 40 °C; la masa de material seco obtenida fue de 502.3800 g ± 0.0001 g. Una vez seco, se pulverizó el material en un molino (Thomas-Wiley 4), y después se maceró en acetona ACS durante 24 h, a temperatura ambiente. La disolución obtenida se filtró en papel Whatman N° 4 y el residuo sólido se extrajo de nuevo con acetona ACS, para aumentar el rendimiento del proceso. Los productos de las dos extracciones se mezclaron y después se concentraron al vacío, hasta lograr una consistencia viscosa en un baño de maría a 40-45 °C, para lo cual se empleó un evaporador rotatorio (Brinkmann Büchi CH9230). Posteriormente, el extracto se liofilizó (liofilizador VirTis Untrap II), para eliminar el agua remanente de los residuos. La masa final neta obtenida fue de 49.1920 g ± 0.0001 g de extracto crudo, lo cual equivale a un porcentaje de rendimiento del proceso de extracción del material vegetal seco de 9.79 %.

A partir del extracto crudo se obtuvieron las particiones fitoquímicas, mediante la técnica de extracción líquido-líquido. Para esto se tomaron 23.397 g ± 0.001 g del extracto crudo previamente liofilizado y se redisolvió en 150 mL de agua. La disolución resultante se trasvasó en un embudo de extracción de 500 mL y se realizaron tres extracciones de 150 mL cada una (450 mL) con cada uno de los solventes, siguiendo un orden de polaridades ascendentes (hexano, diclorometano y acetato de etilo).

Se recolectaron las particiones y se concentraron en un evaporador rotatorio (Brinkmann Büchi CH9230) para eliminar el solvente, hasta alcanzar la sequedad. La partición acuosa fue liofilizada. Del proceso de extracción líquido-líquido, iniciado a partir de 23.397 ± 0.001 g de extracto crudo liofilizado, obtuvieron 2.854 g de concentrado de la partición de hexano, 0.583 g de concentrado de la partición de diclorometano, 1.179 g de concentrado de la partición de acetato de etilo, y 11.039 g de liofilizado de la partición acuosa. El rendimiento total de dicho proceso fue del 66.910%.

Para evitar la descomposición química o la contaminación por hongos, el extracto crudo y las particiones extraídas se mantuvieron en frascos color ámbar herméticos, en refrigeración y en la oscuridad. Se preservaron así, hasta su utilización para determinar la fracción y dosis óptimas que podrían causar fagodisuasión.

Larvas de *H. grandella*: Las larvas, en el instar apropiado para los bioensayos, se tomaron de una colonia existente en el Laboratorio de Entomología del CATIE. Para el mantenimiento de éstas, los dos primeros instares se alimentan con hojas tiernas de cedro (*Cedrela odorata*) y después se transfieren a una dieta artificial (Vargas et al., 2001), en frascos de vidrio de 30 mL. Las larvas se mantienen en una cámara bioclimática (Percival I-35L), a 25 °C y un fotoperíodo de 8L:16O, hasta su empupamiento. A continuación, las pupas se colocan en jaulas de muselina de 50 x 50 x 55 cm (ancho x largo x alto), dentro de un invernadero; al emerger los adultos, ocurre la cópula y las hembras ovipositan en las paredes de las jaulas. Estas mallas se remueven cada tres días y se llevan

al laboratorio, para remojarlas en un recipiente y así separar los huevos. Éstos se succionan con una jeringa y se depositan en trozos de papel toalla, que se colocan entre hojas de cedro, dentro de una caja plástica, para que eclosionen ahí y las larvas recién nacidas se alimenten de dicho follaje.

Bioensayo general de laboratorio: A partir del extracto crudo previamente obtenido, se prepararon cinco tratamientos de concentraciones crecientes (0.1; 0.3; 1.0; 3.2 y 10.0 % m/v); se compararon con un testigo absoluto (agua destilada) y un testigo relativo, que correspondió al respectivo solvente. Los tratamientos se prepararon el mismo día de su aplicación. El extracto crudo liofilizado fue redisoluelto en acetona. A cada tratamiento, incluyendo también el testigo relativo, se le agregó acetona hasta alcanzar una concentración del 24 % v/v, así como el agente emulsificante Citowett (100 % de ingrediente activo, BASF Alemania) a una concentración de 0.04 % v/v; dicho agente no se aplicó al testigo absoluto, pues en experimentos previos se demostró que es inocuo para las larvas de *H. grandella*.

Los tratamientos se aplicaron a discos de hojas de cedro de 2.3 cm de diámetro. Estos se cortaron con un sacabocados, en hojas frescas, tiernas y bien formadas, recolectadas en el campo el mismo día de cada experimento. Los cortes se realizaron de manera que los discos no contuvieran parte de la nervadura central del folíolo, para evitar que la larva barrenara allí. Los discos se sumergieron por 10 s en la solución del respectivo tratamiento, y se les dejó secar a temperatura ambiente antes de ser expuestos a larvas de 3er. instar de *H. grandella*. Las larvas seleccionadas permanecieron en ayuno por 3 h, en frascos de vidrio de 30 mL.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con sub-muestreo, con cuatro repeticiones. Cada bloque estuvo representado por una bandeja plástica, y la unidad experimental estuvo conformada por 10 larvas, cada una de las cuales se consideró como una sub-muestra.

Las bandejas se colocaron dentro de una cámara bioclimática (Percival I-35L), a 25 °C y un fotoperíodo 12L:12O. Después de 24 h de exposición se retiró el disco tratado, y se midió el porcentaje de área foliar consumida, según la escala visual del programa Distrain 1.0 (Tomerlin & Howell, 1988).

Bioensayos específicos de laboratorio: Para determinar la partición con mayor poder fagodisuasivo, se evaluaron las particiones del extracto crudo de *B. candida* correspondientes a los concentrados de las particiones de hexano, diclorometano y acetato de etilo, así como el liofilizado de la partición acuosa. Los tratamientos correspondieron a las concentraciones en que cada partición se encontraría dentro del extracto crudo de la flor de *B. candida*, cuando éste se aplicó a las concentraciones de 0.1; 0.3; 1.0; 3.2 y 10.0 % (m/v) y según los rendimientos del proceso de particionamiento.

Por tanto, los tratamientos (concentraciones) evaluados fueron (% m/v): 1.220; 0.390; 0.122; 0.039 y 0.012 (partición de hexano); 0.249; 0.080; 0.025; 0.008 y 0.003 (partición de diclorometano); 0.504; 0.161; 0.050; 0.016 y 0.005 (partición de acetato de etilo) y 4.718; 1.510; 0.473; 0.151 y 0.047 (partición acuosa).

Los tratamientos se prepararon por dilución, a partir de una disolución madre, el mismo día de su aplicación. Para las disoluciones preparadas de las particiones de hexano, diclorometano y acetato de etilo, se emplearon mezclas al 10 % v/v con el respectivo solvente, con 0.12 % v/v del agente

emulsificante Citowett. A la partición acuosa solamente se le agregó el emulsificante, en una concentración de 0.04 % v/v.

Bioensayo con un patrón de escopolamina: Debido a su abundancia en la flor de la planta, se evaluó la posible fagodisuasión del alcaloide escopolamina sobre *H. grandella*, para lo cual se realizó una comparación puntual del consumo foliar, en discos impregnados con los tratamientos testigos (absoluto y relativo) contra otros impregnados con un tratamiento de escopolamina.

Para esto se utilizó un patrón de hidrobromuro de escopolamina trihidratado (Sigma Aldrich, pureza $\geq 98\%$, grado HPLC). Se aplicó un tratamiento al 0.38 % m/v del patrón ya mencionado, y se comparó con un testigo absoluto (agua), y un testigo relativo (disolución del agente emulsificante Citowett al 0.04 % v/v en agua). Se procedió de la misma manera que la descrita para el bioensayo general.

En este caso no se efectuó una prueba de dosis: respuesta, sino que se seleccionó un solo valor de concentración, intermedio, entre el tratamiento de concentración inmediatamente inferior y el primer tratamiento cuya concentración fuera suficiente para observar actividad fagodisuasiva al aplicar el extracto crudo.

Para detectar posibles efectos sub-letales, se registró la mortalidad de las larvas expuestas a los tratamientos en los que se observó actividad contra *H. grandella*. Para esto se seleccionaron los más prometedores del extracto crudo y de las particiones obtenidas, además de uno de la escopolamina (0.38 % m/v). Los tratamientos seleccionados fueron aplicados en la concentración más baja que demostró causar fagodisuasión en cada caso, y fueron comparados con un testigo absoluto.

Las larvas, después de su exposición a cada uno de estos cuatro tratamientos, fueron transferidas de manera individual a frascos que contenían aproximadamente 6 mL de dieta artificial, y se les permitió completar su desarrollo, hasta la emergencia de los adultos. Se registró su vitalidad a lo largo de ocho evaluaciones, distribuidas en los siguientes intervalos, después de estar expuestas al respectivo tratamiento: 1, 5, 7, 14, 32, 48, 55 y 64 días. El criterio usado para determinar la muerte de las larvas fue la ausencia de movimiento al ser estimuladas con un pincel fino bajo un estereoscopio, así como su cambio de color, a negro. Además, se observó cualquier aspecto morfológico o etológico que pudiera sugerir algún efecto sub-letal de cada uno de los tratamientos evaluados. Asimismo, se registró el número de individuos que lograron alcanzar el estado de pupa y, finalmente, emerger como adultos.

Tamizaje fitoquímico de la flor de *B. candida*: El procedimiento que se empleó para la realización del tamizaje fitoquímico, detallado a continuación, corresponde al método descrito por Sharapin et al. (2000). Como lo indican dichos autores, se utilizaron 10 g de material vegetal seco y molido, el cual se extrajo con 250 mL de hexano, utilizando un Soxhlet. El residuo se secó y se sometió a otra extracción en Soxhlet, con 250 mL de etanol. Finalmente, se realizó una extracción del material con 200 mL de agua, bajo reflujo.

A los extractos en hexano, etanólico y acuoso obtenidos, se les sometió a pruebas químicas, para la identificación de los principales grupos de compuestos químicos presentes

Extracto hexano: El extracto hexano se concentró en un evaporador rotatorio, hasta un volumen aproximado de 200 mL. Una vez concentrado se dividió en dos alícuotas, una de 20 mL, que se evaporó hasta sequedad y fue disuelta en 20 mL de alcohol (fracción A), y otra de 180 mL, que se concentró hasta un volumen de 50 mL (fracción B).

De la fracción A se tomaron 10 mL, que se concentraron hasta sequedad, y seguidamente se le realizaron dos extracciones de 20 mL, cada una con éter. Al volumen restante se le agregaron 10 mL de KOH 0.5 M y se sometieron a reflujo por 2 h; después se adicionaron 20 mL de agua, y el etanol se evaporó. A continuación, se realizaron tres extracciones con 10 mL de éter cada una, para obtener una fase orgánica y otra acuosa.

La fase etérea fue examinada para determinar la presencia de triterpenos y/o esteroides, mediante el reactivo de Liebermann-Burchard. Por otro lado, la fase acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta conseguir un intervalo de pH= 3-4. Una vez alcanzado este ámbito de pH, se realizaron dos extracciones con 10 mL de éter cada una. El extracto obtenido se evaporó hasta sequedad. De formarse cristales, se comprobaba la existencia de ácidos grasos en la muestra.

En cuanto a la fracción B, se tomaron 10 mL y se evaporaron. El residuo se disolvió en 3 mL de HCl al 2% v/v y se dividió en tres partes iguales, que se depositaron en tubos de ensayo, en los cuales se realizaron las pruebas de Mayer y Ácido Sílico-Túngstico, mientras que el tercero sirvió como control. La aparición de un precipitado en las pruebas, sugiere la presencia de alcaloides.

Se evaporaron otros 5 mL, y el residuo se disolvió en 2 mL de metanol caliente. Luego se adicionaron limaduras de Mg y 1 mL de HCl concentrado. Después de dejar la mezcla en reposo durante unos 10 min, la aparición de una coloración rojiza es positiva para la mayoría de las agliconas de flavonoides.

También se evaporaron 5 mL y su residuo se disolvió en 1 mL de agua hirviendo. Se tomaron algunas gotas de la disolución obtenida, de la cual se aplicaron dos manchas sobre un papel de filtro, con un capilar. A una de las manchas se le agregó una gota de KOH 0.5 M. El papel fue expuesto a una longitud de onda de 366 nm y, de observar fluorescencia, la prueba se considera positiva para cumarinas.

Se concentraron hasta sequedad 5 mL de la fracción B. El residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo y se adicionó el reactivo de Liebermann-Burchard. Se evaporaron 5 mL y al residuo se le añadió 1 mL de hidróxido de amonio al 25 % v/v. La aparición de una coloración roja indica la posible presencia de emodinas.

Extracto alcohólico: El extracto obtenido se concentró hasta un volumen aproximado de 200 mL y se dividió en dos partes iguales, a las que se denominó fracciones A y B. La primera se concentró a 30 mL y la segunda hasta un volumen aproximado de 50 mL.

De la fracción A se tomó un volumen de 5 mL, y se le agregaron 2 mL de agua. A esta disolución se le añadieron cinco gotas del reactivo de FeCl₃ al 1 % m/v. La aparición de una coloración azul indica la presencia de taninos gálicos, mientras que una verde denota la posible presencia de taninos catéquicos.

Se tomaron 5 mL más de la misma fracción, se le agregaron 2 mL de agua y 5 mL del reactivo de Fehling. La mezcla resultante fue sometida a reflujo durante 30 min. La presencia de compuestos reductores se detecta al aparecer un precipitado de tonalidad ladrillo.

Otros 20 mL se concentraron hasta alcanzar sequedad. El remanente se disolvió en 20 mL de HCl al 10% v/v, y de esta disolución se tomaron 3 mL (muestra 1). Los 17 mL restantes fueron alcalinizados con una disolución de NaOH 1 + 1, hasta pH 9. A continuación se realizaron tres extracciones con éter (10 mL cada una). La fracción etérea se evaporó y al residuo se le añadieron 3 mL de HCl 10 % v/v (muestra 2). Las muestras 1 y 2 se dividieron en tres tubos de ensayo, cada una como sigue: control, Mayer y Ácido Sílico-Túngstico. Al presentarse una precipitación en los tubos a los que se les practican las pruebas, el resultado es positivo para alcaloides.

A la fracción B (50 mL) se le agregaron 20 mL de HCl 20 % v/v, y seguidamente se sometió a reflujo por 30 min; después se le adicionaron 20 mL de agua. La disolución resultante se evaporó hasta a un volumen aproximado de 30 mL. A la disolución concentrada se le realizaron tres extracciones con éter (20 mL cada una) y se separó la fase acuosa de la etérea. La fase orgánica se concentró hasta conseguir 30 mL. A la fase acuosa se le elevó el pH a 9-10, con una disolución de NaOH 1 + 1. La aparición de una coloración verde-castaño o azul indica la presencia de antocianinas.

Por otra parte, se depositaron gotas de la fase etérea sobre un papel de filtro, hasta formar dos manchas. A una de las manchas se le aplicó una gota de KOH 0.5 M. La prueba es positiva para cumarinas cuando se observa fluorescencia utilizando luz UV a una longitud de onda de 366 nm.

Además, se concentraron 5 mL de la misma fase, hasta sequedad. El residuo se disolvió en 3 mL de hidróxido de amonio al 25 % v/v. La aparición de una coloración roja es positiva para antracénosidos.

Otros 10 mL de la fase etérea se evaporaron, y el concentrado se disolvió en metanol al 50 % v/v en agua. De seguido se le adicionó 1 mL de HCl concentrado y limaduras de Mg (prueba de Shinoda), y se dejaron transcurrir 10 min. La prueba es positiva para flavonoides al aparecer una coloración roja. Finalmente, se concentraron 10 mL hasta sequedad para realizar la prueba con el reactivo de Liebermann-Burchard que determina la presencia de triterpenos y/o esteroides en la muestra.

Extracto acuoso: El extracto se dividió en dos partes de 100 mL cada una, y se les denominó fracciones A y B, respectivamente. A la segunda se le adicionaron 20 mL de HCl concentrado, y se calentó hasta alcanzar su punto de ebullición, en posición de reflujo, durante 30 min.

De la fracción A se tomaron 5 mL y se le añadieron 3 mL de agua, más dos gotas del reactivo de Lugol. Una coloración azul indica la presencia de almidón.

A 5 mL se les agregó 1 mL de la solución de Fehling y se dejó en reflujo durante 30 min. La formación de un precipitado color ladrillo evidencia la presencia de compuestos reductores.

Se evaporaron a sequedad 5 mL de la fracción A, y posteriormente al residuo se le adicionaron cinco gotas de ácido sulfúrico concentrado y 3-4 gotas de timol. La aparición de una coloración rojiza señala la presencia de polisacáridos en la muestra.

Se añadieron 45 mL de agua a 5 mL de la fracción A y se agitó durante 10 min. La formación de espuma persistente por 20 min, es positiva para saponinas.

Otros 3 mL de la misma fracción fueron adicionados con 2 mL de agua y 3-4 gotas de FeCl₃ al 1% v/v. Una coloración azul es positiva para taninos gálicos y una verde para taninos catéquicos.

Se tomaron 30 mL y se ajustó el pH a 9 con hidróxido de amonio. La disolución resultante se extrajo con éter (3 x 30 mL). La fase etérea se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió con 10 mL de HCl 10 % v/v, y seguidamente este volumen se dividió en tres tubos de ensayo. Uno de los tubos se utilizó como control, mientras que en los otros se realizaron pruebas con el reactivo de Mayer y Ácido Sílico-Túngstico, respectivamente.

A la fracción B se le realizaron las mismas pruebas efectuadas para detectar la presencia de polisacáridos, saponinas, taninos y alcaloides en la fracción A.

Detección de la escopolamina en el extracto crudo de la flor de *B. candida* y en su partición más prometedora: En la detección de la presencia de escopolamina en el extracto crudo y en la partición de hexano, se recurrió al método de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Para ello se obtuvieron sus espectros de masas con un GC-MS Agilent modelo 7890A, con un detector Agilent inert XL MSD con detector de triple eje modelo 5975C. Al respecto, se utilizaron diferentes técnicas de detección. Con el extracto crudo se optó por usar el modo de monitoreo de ión selectivo (SIM), mientras que con la partición de hexano se empleó el de detección estándar. El primero es preferible para el análisis de muestras complejas, por su alta selectividad y sensibilidad (Stashenko & Martínez, 2012).

Por tanto, para el análisis del extracto crudo se monitorearon los iones característicos del alcaloide de interés, m/z 303 (ión molecular), m/z 154, m/z 138, m/z 108 y m/z 94 (pico base), mediante el SIM. Se utilizó una columna HP-5MS, 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm grosor de película, el gas de arrastre utilizado fue helio. El inyector mantuvo una temperatura de 230 °C, mientras que el horno inició a 150 °C, y se mantuvo así por 3 min. Seguidamente se aumentó su temperatura en 5 °C/min, hasta alcanzar 280 °C; la temperatura del detector fue de 280 °C y la muestra inyectada fue de 1 µL.

Se realizaron corridas cromatográficas de un patrón de hidrobromuro de escopolamina trihidratado (Sigma Aldrich, pureza ≥ 98 %, grado HPLC), con el fin de identificar el tiempo de retención (t_r) que mostraría el alcaloide bajo las condiciones aplicadas.

En los experimentos realizados (bioensayos generales, específicos, mortalidad y efectos sobre el desarrollo) se efectuaron análisis de varianza. Para comparar las medias de cada tratamiento se utilizó la prueba de jerarquización múltiple de Tukey, con un valor de significancia fijo ($\alpha = 0.05$). Se empleó el paquete estadístico InfoStat (2001).

Apéndice Digital 2

CUADRO 1

Análisis cualitativo de los principales grupos de metabolitos en la flor de *B. candida*, detectados mediante tamizaje fitoquímico.

TABLE 1

Qualitative analysis of the main metabolites detected by phytochemical screening of *B. candida* flowers.

Extracción	Grupo de metabolitos	Fracción	
		A	B
Hexano	Triterpenos/esteroles	+	+
	Ácidos grasos	+	n.a.
	Alcaloides	n.a.	+
	Agliconas de flavonoides	n.a.	-
	Cumarinas	n.a.	+
	Emodinas	n.a.	-
Etanol	Taninos	+	n.a.
	Compuestos reductores	+	n.a.
	Alcaloides	-	n.a.
	Cumarinas	n.a.	+
	Antracenósidos	n.a.	-
	Flavonoides	n.a.	-
	Triterpenos/esteroles	n.a.	+
Antocianinas	n.a.	-	
Acuosa	Almidón	-	n.a.
	Compuestos reductores	+	n.a.
	Polisacáridos	+	+
	Saponinas	-	-
	Taninos	+	-
	Alcaloides	-	-

n.a.: indica que el grupo de metabolitos secundarios correspondiente no fue analizado mediante ninguna prueba química, en tanto que los símbolos + y - denotan la presencia o ausencia de los metabolitos correspondientes.

Apéndice Digital 3

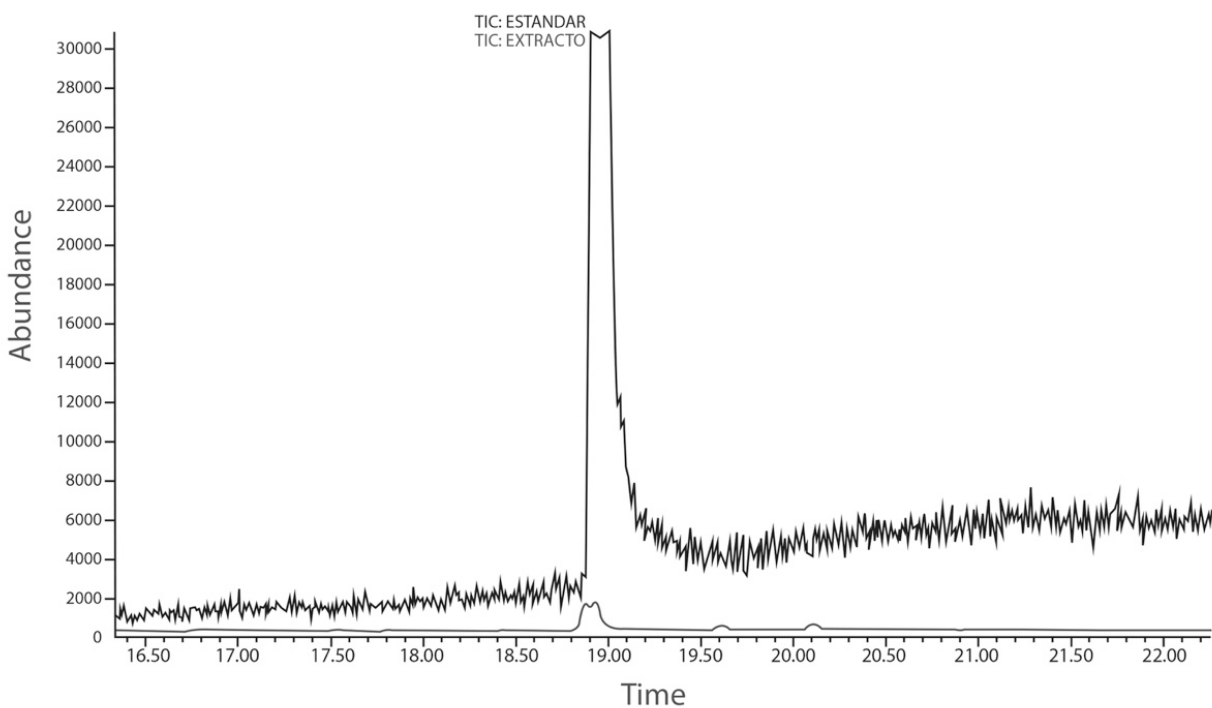


Fig. 5. Cromatograma del extracto crudo de la flor de *B. candida*, obtenido mediante el método GC-MS-SIM, en comparación con un patrón de escopolamina. TIC significa Cromatograma de Iones Totales.

Fig. 5. Chromatogram of the crude extract of *B. candida* flowers, obtained by the GC-MS-SIM method, in comparison with a scopolamine pattern. TIC stands for Total Ion Current.

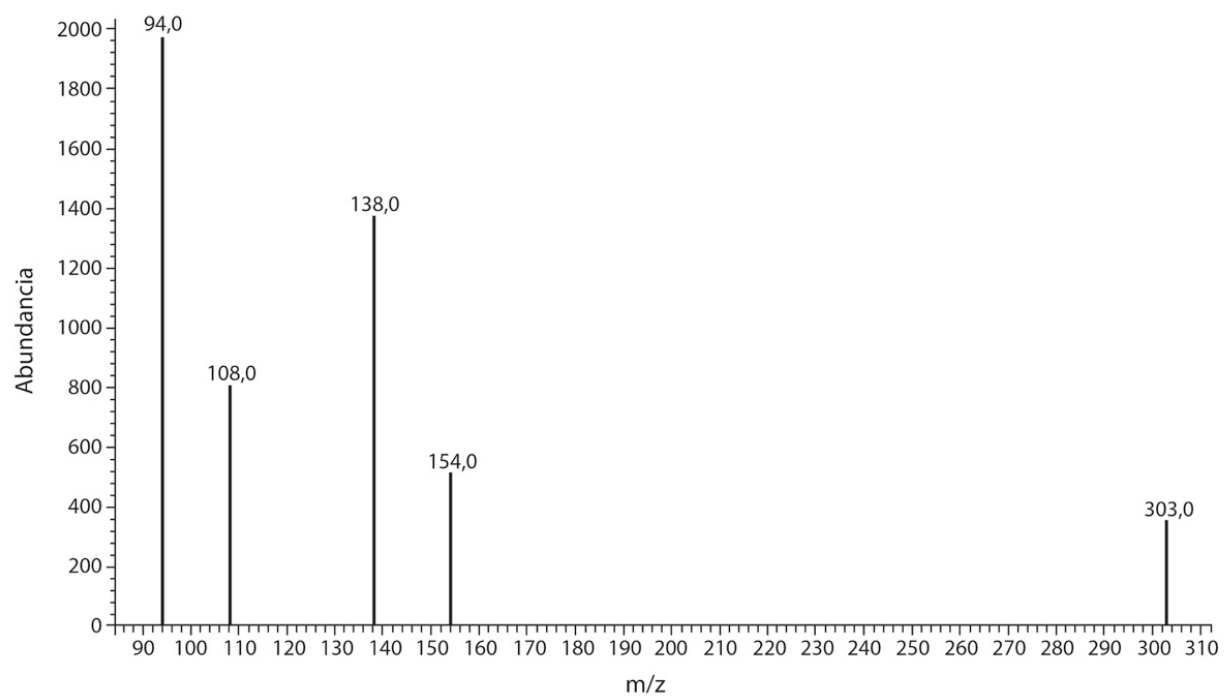


Fig. 6. Espectro de masas del extracto crudo de la flor de *B. candida*, obtenido mediante el método GC-MS-SIM.

Fig. 6. Mass spectrum for the crude extract of *B. candida* flowers, obtained through the GC-MS-SIM method.

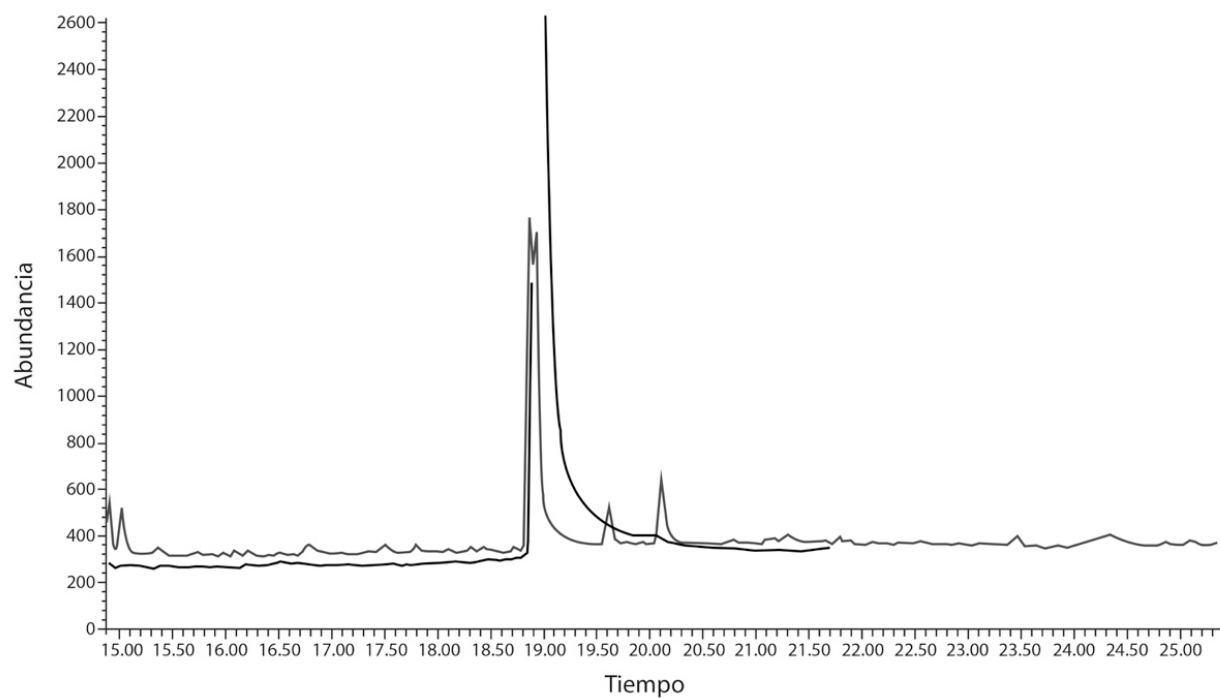


Fig. 7. Cromatograma de la partición de hexano del extracto crudo de la flor de *B. candida*, obtenido mediante el método GC-MS, en comparación con un patrón de escopolamina.

Fig. 7. Chromatogram of the hexane partition of the crude extract of *B. candida* flowers, obtained through the GC-MS-SIM method, in comparison with a scopolamine pattern.

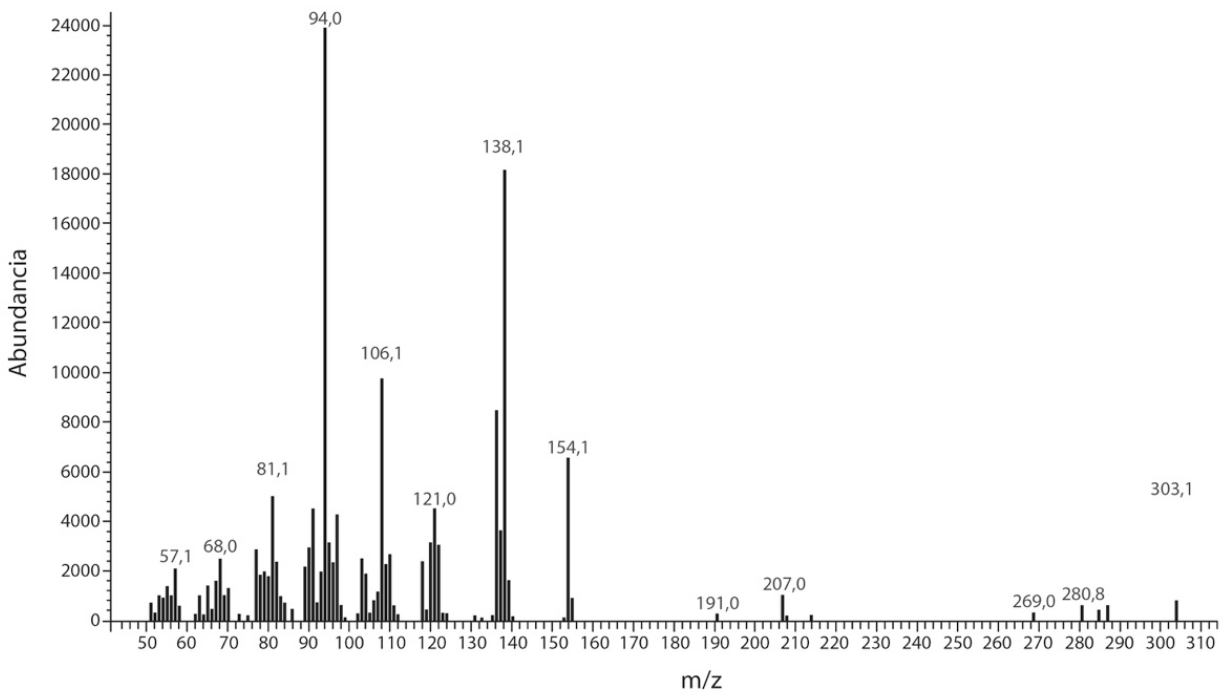


Fig. 8. Espectro de masas de la partición de hexano del extracto crudo de la flor de *B. candida*, obtenido mediante el método GC-MS.

Fig. 8. Mass spectrum for the the hexane partition of the crude extract of *B. candida* flowers, obtained through the GC-MS-SIM method.