

**INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA A PARTIR DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE CORALES  
BLANDOS COMO POTENCIAL PARA EL CONTROL DE LA MOSCA BLANCA**  
*Trialeurodes vaporariorum*

**ANGIE PATRICIA DUARTE TAYO**

**Trabajo de grado para optar al título de Bióloga Marina**

**Directora**  
**MÓNICA PUYANA HEGEDUS Ph.D.**

**Asesora**  
**LUZ STELLA FUENTES M.Sc. Cand. Dr.**

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO**  
**PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA**  
**BOGOTÁ**  
**2017**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN Y ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3. RESULTADOS .....	14
4. DISCUSIÓN .....	21
5. CONCLUSIONES.....	26
6. RECOMENDACIONES.....	27
7. AGRADECIMIENTOS .....	27
8. BIBLIOGRAFÍA.....	29

**INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA A PARTIR DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE CORALES  
BLANDOS COMO POTENCIAL PARA EL CONTROL DE LA MOSCA BLANCA**

*Trialeurodes vaporariorum*

Angie Patricia Duarte Tayo

**RESUMEN**

Los corales blandos son organismos importantes de la fauna marina caribeña y representan un alto potencial de aprovechamiento ya que compuestos aislados de ellos presentan actividad biológica significativa incluyendo actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE). Los inhibidores de la AChE (AChEI), tienen un gran interés en la industria agroquímica como potenciales plaguicidas, por sus efectos negativos sobre el sistema nervioso de los insectos causando toxicidad y muerte. La mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*, es una de las plagas más importantes en los cultivos hortícolas en Colombia, por esta razón se constituye en un organismo modelo para evaluar sustancias de origen natural que puedan contribuir a su control. Se evaluó la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChEI) a partir de extractos orgánicos de 16 especies de corales blandos de Santa Marta y Providencia. Los extractos se evaluaron mediante el ensayo de bioautografía de Marston. Si bien todos los extractos de corales blandos mostraron actividad AChEI, los extractos de *Eunicea palmeri* (P), *Pseudoplexaura* sp. y *Plexaura nina* mostraron ser los más promisorios. Para el bioensayo con ninfas del instar II de *T. vaporariorum* se evaluaron los extractos de *E. palmeri* (P) y *Plexaurella grisea*, en diferentes rangos de concentración (0,01-100 mg/ml) y luego un rango menor seleccionadas a partir del primer ensayo (20-80 mg/ml). El extracto de *E. palmeri* (P) mostró una CL<sub>50</sub> de 0,001 mg/ml y el extracto de *P. grisea* mostró una CL<sub>50</sub> de 0,003 mg/ml pero no se detectaron diferencias significativas en los valores de mortalidad entre extractos (Valor-P= 0,914). El tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) superó dos días para ambos extractos pero no se encontraron diferencias significativas (P= 0,3313) entre los mismos aunque se requieren tiempos de exposición mayores para *P. grisea*. Este estudio demuestra el potencial de los corales blandos para el desarrollo de productos dirigidos hacia el control de plagas importantes para el sector agrícola.

**Palabras clave:** inhibición de la acetilcolinesterasa (AChEI), corales blandos, bioplaguicidas, *Trialeurodes vaporariorum*.

## INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE BY ORGANIC EXTRACTS OF SOFT CORALS AS A POTENTIAL CONTROL FOR THE GREENHOUSE WHITE FLY *Trialeurodes vaporariorum*

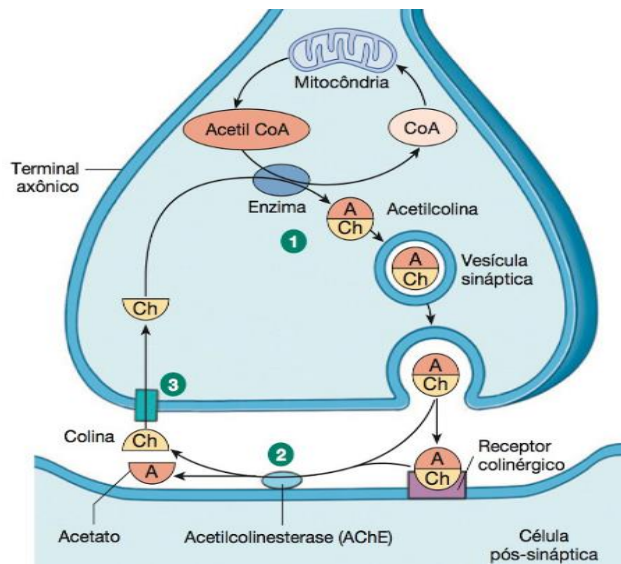
### ABSTRACT

Soft corals are important organisms of the Caribbean marine fauna and represent a great potential for useful applications due to their significant bioactivity including acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity. AChE inhibitors (AChEI), have a great interest as potential pesticides in the agrochemical industry, due to their negative effects on the nervous system of the insects causing toxicity and death. The greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, is one of the most important pests in horticultural crops in Colombia, therefore it is a promising model organism to evaluate substances of natural origin that can contribute to its control. We evaluated the inhibitory acetylcholinesterase (AChEI) activity of organic extracts from 16 species of soft corals from Santa Marta and Providencia. The extracts were evaluated by the Marston bioautography test. All soft coral extracts showed AChEI activity, being *Eunicea palmeri* (P), *Pseudoplexaura* sp. and *Plexaura nina* the most promising. For the bioassay with instar II nymphs of *T. vaporariorum*, extracts of *E. palmeri* (P) and *Plexaurella grisea* were evaluated at different concentrations (0.01-100mg/ml) followed by a narrower range after the first test (20-80 mg/ml). Lethal doses were LC<sub>50</sub> 0.001 mg/ml for the extract of *E. palmeri* (P) and 0.003 mg / ml for the extract of *P. grisea*. But there were no significant differences between extracts (P value= 0.914). The mean lethal time (TL<sub>50</sub>) surpassed two days for both extracts, but no significant differences were found (P value= 0.3313) between them, although a greater exposure time was required for the extract of *P. grisea*. This study demonstrates the potential of soft corals for the development of products aimed at controlling important pests in the agricultural sector.

**Key words:** Acetylcholinesterase inhibition (AChEI), soft corals, biopesticides, *Trialeurodes vaporariorum*

## 1. INTRODUCCIÓN

La acetilcolina (ACh) es un importante neurotransmisor en animales, siendo uno de los primeros en ser identificados y caracterizados (Semba, 2008). La acetilcolina al ser liberada en el espacio sináptico, y posteriormente al llegar a la estructura postsináptica, es recibida por dos tipos de receptores específicos (Mendoza, 2008). Los receptores nicotínicos, ionotrópicos, de potenciales rápidos y los receptores muscarínicos, metabotrópicos, de potenciales lentos estimulados por la nicotina y la muscarina, respectivamente (Carlson, 1994). La unión de la ACh con los receptores debe ser breve y rápida para evitar parálisis en la neurotransmisión y asegurar la disponibilidad de las células efectoras ante un nuevo impulso (Alcaraz, 2001; Lorenzo *et al.*, 2008). Para ello es fundamental la acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) para terminar dicho efecto (Sánchez y Salceda, 2008; Dee Unglaub, 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Síntesis y reciclaje de la acetilcolina (ACh) en la sinapsis neuronal. La ACh es sintetizada a partir de la colina y el acetil CoA. En la hendidura sináptica, la ACh es rápidamente hidrolizada por la AChE y la colina es transportada de vuelta al terminal axónico para ser utilizada en la síntesis de más ACh (Dee Unglaub, 2010).

Debido a la capacidad de la AChE de evitar la parálisis neuronal, la inhibición de esta enzima ha sido objeto de estudio, para evaluar su uso terapéutico o como insecticidas para el control de plagas (Alpízar y Morales, 2003; Rebello *et al.*, 2007). Es así como el potencial de sustancias inhibitoras de la AChE (AChEI) ha ocasionado que la investigación científica para dicho fin sea muy competitiva, los AChEI son usados en la industria agroquímica como plaguicidas por los efectos que tienen sobre el

sistema nervioso de los insectos. Éstos interactúan con el sitio activo de la enzima, de dos formas, irreversible y reversible. Con esta interacción se busca una sobreexpresión de ACh que conlleve a la parálisis neurológica y consecuente muerte del organismo diana (si bien se conoce que pueden afectar a organismos no objetivo en cultivos no controlados) (Dee Unglaub, 2010; Castellanos, 2014).

Algunos de los organismos en los que se ha detectado una promisorio actividad AChEI son los corales blandos, agrupados en el orden Alcyonacea, con una amplia distribución en todos los océanos del planeta en particular el Indopacífico y el Atlántico Occidental Tropical incluyendo el Caribe (Braekman, 1977; Chanmethakul *et al.*, 2010). Estos organismos se caracterizan por ser vistosos, presentarse libres de colonización y tener bajas tasas de depredación, lo cual se atribuye a la gran diversidad química encontrada en ellos (O'Neal y Pawlik, 2002; Ordaz *et al.*, 2010). Los corales blandos son organismos sésiles que carecen de estructuras físicas de defensa. Por eso se podría suponer que son una fuente de alimento fácil para un amplio rango de depredadores, pero están defendidos químicamente por una gran variedad de compuestos que les han conferido un gran éxito evolutivo y que hacen que sea un grupo promisorio en iniciativas de bioprospección (Ferchmin *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2012).

En varias zonas del mundo los corales blandos han mostrado ser fuentes prolíficas de compuestos bioactivos con actividad antiparasitaria, antiinflamatoria y antiviral, entre otras (Berrue y Kerr, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2012; Richmond, 2014). El potencial bioactivo de los compuestos aislados a partir de corales blandos del Caribe colombiano se ve reflejado en compuestos antiinflamatorios, analgésicos y antimicrobianos de *Antillogorgia elisabethae* (Puyana *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2004, 2006; Correa *et al.*, 2009; Correa, 2012) y *Eunicea fusca* (Reina *et al.*, 2011), inhibidores de *Quorum Sensing* a partir de cembranoides de *Eunicea knighti* y *Pseudoplexaura flagellosa* (Tello *et al.*, 2013), así como actividad *antifouling* de *P. flagellosa* y *Eunicea laciniata* (Cuadrado *et al.*, 2010; Tello *et al.*, 2011).

Respecto al sector agrícola, el manejo de plagas es un tema de preocupación, por la resistencia que han generado los insectos a numerosos plaguicidas sintéticos, problema que se exagera con el aumento de sus poblaciones por el calentamiento global (Cannon, 1998; Dukes y Mooney, 1999).

Una plaga importante en Colombia es la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*, un insecto hemimetábolo con seis etapas de desarrollo, huevo, cuatro instares ninfales y adulto (Figura 2). Estos insectos se ubican en el envés de las hojas, con un ciclo de vida de 24-28 días (Cardona *et al.*, 2005), presentan de 11 a 15 generaciones al año, y tienen reproducción de tipo sexual (o partenogénesis en raras ocasiones) (Nikolaevna *et al.*, 2010). Son cosmopolitas distribuyéndose en las regiones de clima templado o cálido, polívoros que se alimentan de diversas especies de cultivo, por lo que se consideran como una de las plagas que ocasiona las mayores pérdidas económicas de la industria agrícola a nivel mundial. Este insecto ataca 250 especies de plantas, entre las que se destacan el tomate (*Solanum lycopersicum*), pepino (*Cucumis sativus*), pimentón (*Capsicum annum*), papa (*Solanum tuberosum*) y algodón (*Gossypium hirsutum*) (García *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum*: adulto y ciclo de vida (Tomado de Cardona *et al.*, 2005).

La mosca blanca afecta principalmente hortalizas cultivadas en invernaderos, sistemas en los cuales se mantienen temperaturas óptimas para el crecimiento, reproducción y sobrevivencia de este insecto (Rodríguez y del Pozo, 2003). A partir de los años 80 en la región Andina de Colombia, la mosca blanca empezó a considerarse una plaga importante en los cultivos del área. Posteriormente, *T. vaporariorum* se convirtió en la plaga fundamental de frijol y tomate en la mayoría de los valles interandinos y regiones cálidas de Colombia y Ecuador (Cardona *et al.*, 2001).

El uso frecuente e inadecuado de plaguicidas ha propiciado el desarrollo de resistencia a los mismos por parte de numerosas especies objeto de control. Los registros de resistencia a plaguicidas son numerosos y datan desde los años 70, compuestos organofosforados, neonicotinoides,

organoclorados y carbamatos así como piretroides, presentan resistencia en diferentes regiones del planeta (Omer *et al.*, 1992; Buitrago *et al.*, 1994, Gorman *et al.*, 2007), destacándose resistencia a estos últimos principalmente en plagas como *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Centroamérica y algunas zonas de Sudamérica (el Salvador, Panamá, Cuba, México, Colombia, Venezuela y Perú) (Bisset *et al.*, 1996, 1998, 1999, 2000, 2001, 2003, 2007, 2009; Rodríguez *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2006).

Para el control de la mosca blanca de los invernaderos se han usado diversos insecticidas a los cuales este organismo ya se presenta resistencia. Entre estos se destacan los organofosforados metamidofos (Tamaron, Monitor), malation (Malathion), monocrotofos (Azodrin) y dimetoato (Roxion, Sistemín), algunos carbamatos como carbofuran (Furadan) y carbosulfan (Elthra) y piretroides como cipermetrina (Cymbush) y cialotrina (Karate) (Cardona *et al.*, 2005). El uso de plaguicidas de síntesis química para el control de la mosca blanca de los invernaderos, no solo puede generar mecanismos de resistencia en los organismos, sino además tener consecuencias ambientales negativas por el uso de éstos, por su de alta persistencia, y por la inadecuada manipulación de los mismos (Orta, 2002; Del Puerto *et al.*, 2014). De otra parte, por tratarse de compuestos de amplio espectro se pueden generar efectos negativos en organismos que no son objetivo de la aplicación, así como toxicidad y alteraciones en la salud humana (Ferrer, 2003).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

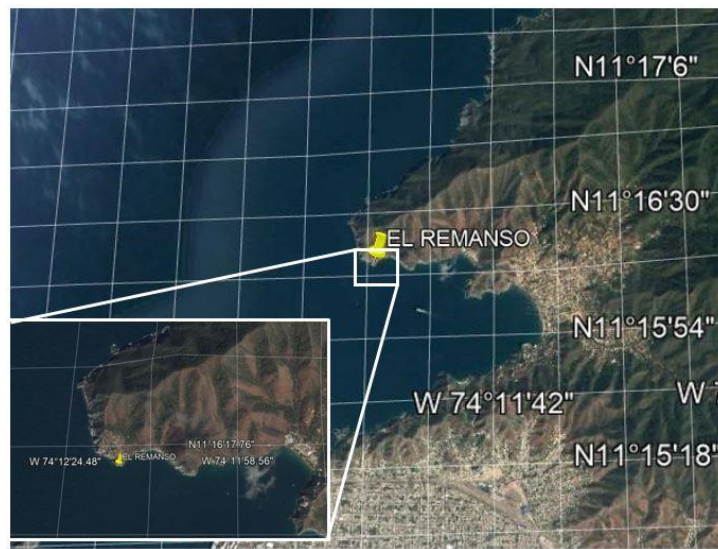
### Área de estudio

Todas las muestras usadas en este estudio fueron recolectadas bajo el Permiso Marco de Colecta de la Universidad Jorge Tadeo Lozano Resolución 1271 del 23 de octubre de 2014 IDB 0401 que cubre los proyectos de investigación de la Universidad. Para el estudio se utilizaron muestras provenientes de Santa Marta y la isla de Providencia.

Las muestras de Santa Marta fueron recolectadas en la bahía de Taganga, sector El Remanso (11°16'26.00"N, 74°12'24.00"W) (Coronado *et al.*, 2015), en mayo del 2017. De otra parte, muestras



de *Eunicea palmeri*, *Plexaurella grisea*, *Antillologorgia americana* y *Pseudoplexaura* sp. provinieron de la isla de Providencia y se encontraban almacenadas en el Laboratorio de Bioprospección y Biotecnología de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (UJTL). La zona del Remanso se encuentra en el extremo nororiental de la bahía de Taganga (Figura 3), y se caracteriza por presentar un litoral rocoso con un arrecife franjeante a unos 14 m de profundidad. Esta formación arrecifal presenta baja cobertura coralina (10,4%) (García *et al.*, 2015) y es una zona fuertemente influenciada por eventos de surgencia que hacen un aporte importante de nutrientes (García *et al.*, 2010). Adicionalmente, el área es afectada por descarga continental hacia mar abierto. La temperatura del agua fluctúa entre 22,5 y 26°C, la salinidad es mayor a 36 y la intensidad del oleaje es máxima para los meses de Diciembre-Abril, por darse la mayor intensidad de los vientos Alisios (Díaz, 2002; Arévalo y Franco, 2008). Las muestras de Providencia fueron recolectadas en el arrecife Felipe's Place, un sitio ubicado en el sector este de la isla con 10 a 25m de profundidad.



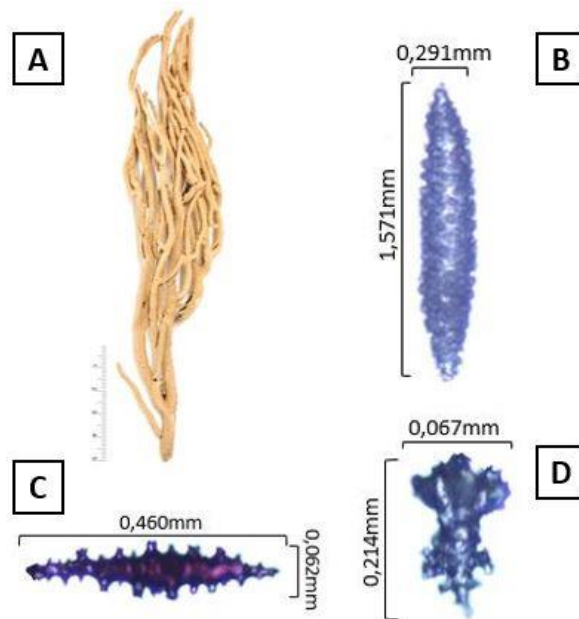
**Figura 3.** Mapa de la ubicación geográfica del litoral rocoso del Remanso (Modificado de: Google Earth, 2017).

### **Recolección e identificación de corales blandos**

Todas las muestras se recolectaron mediante buceo autónomo. Para ello, se cortaron fragmentos terminales (de aprox. 30 cm) de las colonias de corales blandos con tijeras de trauma sin causar daño ni realizar una manipulación excesiva de las colonias. En Taganga se recolectaron 16 muestras de corales blandos y una muestra proveniente de un esqueleto de coral blando colonizado por esponjas e hidroides, entre 3-7m de profundidad. Las cuatro muestras provenientes de Providencia

se recolectaron en mayo de 2015 en la localidad de Felipe's Place a 20 m de profundidad. Posterior a la recolección, las muestras se empaclaron individualmente en bolsas ziplock debidamente rotuladas. Las muestras se secaron a temperatura ambiente, bajo sombra y se enviaron al Laboratorio de Bioprospección y Biotecnología de la UJTL, Sede Bogotá, con el fin de identificar las especies y obtener los extractos orgánicos.

La identificación de los corales blandos se realizó con las claves de Bayer (1961), Sánchez (1998) y Sánchez y Wirshing (2005), bajo la asesoría de la profesora Mónica Puyana. Para ello, además de la observación de la morfología externa del organismo se realizó una extracción de escleritos (mazas, husos y antocodiales) con repetidos lavados con hipoclorito de sodio seguidos de centrifugación y remoción del hipoclorito en lavados sucesivos. Las dimensiones, forma y disposición de los escleritos son caracteres taxonómicos para reconocer géneros y especies (Figura 4). Los escleritos fueron observados bajo un microscopio óptico (Nikon), acoplado a una cámara digital. Las imágenes captadas fueron analizadas con el *software* NIS-Elements Br 2.30 Imaging Software de Nikon, el cual permite realizar las mediciones necesarias respectivas para cada clase de esclerito bajo diferentes aumentos, hasta 1000 magnificaciones.



**Figura 4.** Morfología y escleritos de *Eunicea palmeri* (Providencia) **A.** Colonia seca, **B-D.** Detalle de los escleritos (B. Husos, C. Bastones antocodiales y D. Mazas).

### **Preparación de extractos**

Porciones de colonias secas de corales blandos se cortaron en pequeños trozos para realizar extracciones repetidas con mezclas de diclorometano: metanol (DCM: MeOH 1:1). De cada muestra, se sometieron a extracción 10 g (con excepción de *Plexaura nina* y *Antillogorgia americana*, de las que se extrajeron 4,3 y 6,2 g, respectivamente). Todas las extracciones se realizaron en una proporción 1:10 (p/v), y se realizaron repeticiones de la extracción cada 24 horas, 2 veces por muestra, con solvente nuevo. Entre cada repetición las muestras se filtraron con papel de filtro Whatman No.1, y se concentraron en un rotoevaporador a 30°C. Una vez los extractos fueron concentrados se introdujeron en viales y se sometieron a liofilización por 4 días con el fin de garantizar la completa remoción de agua en los mismos.

### **Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa**

Para evaluar la actividad inhibitoria de la AChE se usó el método de bioautografía de Marston *et al.* (2002) modificado por Castellanos (2014) y Patiño y Castellanos (2017). Los extractos se disponen en una placa cromatográfica y posteriormente se exponen a una solución enzimática de acetilcolinesterasa, albúmina de Suero Bovino y Buffer Tris HCl (pH 7,8). Después de incubar la placa a 3 °C por 30 min, ésta se asperja con solución de acetato de 1- naftilo en etanol y sal Fast Blue. La AChE convierte el acetato de 1-naftilo en  $\alpha$ -naftol. El  $\alpha$ -naftol reacciona con un agente cromogénico, en este caso el Fast Blue Salt (FBS), lo que genera que en las placas cromatográficas se presente un fondo púrpura. Las sustancias AChEI bloquean la formación del  $\alpha$ -naftol produciéndose entonces manchas blancas en la placa, siendo éstas las indicadoras de la actividad en el ensayo. El tamaño de las manchas se compara con las del control de galantamina, y se considera que hay actividad si el halo es igual o superior al 50% del generado por el control.

Para el ensayo, los extractos a evaluar se disolvieron en diclorometano (1 mg/ml) y se aplicó 0,1 mg de la disolución en una placa cromatográfica de sílica gel. Seguidamente la placa se corrió con cloroformo: metanol 9:1. Una vez retirada de la cámara cromatográfica, la placa se secó al aire y se roció con la solución enzimática que consistió en una dilución de 0,53 mg de AChE en 1,0 ml de solución de Tris-HCl 0,005 M (pH 7,8) y 1 ml de solución de albúmina de suero bovino (ASB) (50mg de ASB en una solución de 50 ml de Tris-HCl buffer pH 7,8 a 0,05M). Las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, la placa se roció con una solución etanólica de acetato de 1-naftilo

(2,5 mg/mL) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Finalmente, una solución de Fast Blue Salt (FBS) a 2 mg/mL fue asperjada como revelador.

La solución reveladora consistió en una mezcla de acetato de 1- naftilo en etanol (2,5 mg/ml) y Fast Blue Salt en agua (2,5 mg/ml) en una proporción 1:4. Después de 2-3 minutos la placa se torna púrpura y se evidencian los halos de inhibición blancos si se presenta la actividad. El control positivo fue galantamina en agua (0,05 mg) (Castellanos, 2014).

### **Bioensayo con la mosca blanca de los invernaderos**

Para la realización del ensayo con mosca blanca, se seleccionaron dos de los extractos con la mayor actividad AChEI, es decir los halos de inhibición más prominentes determinados mediante el ensayo de bioautografía. Por esa razón, se seleccionaron los extractos de *Plexaurella grisea* y *Eunicea palmeri* proveniente de Providencia para evaluar sobre la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*). Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Entomología del Centro de Bio-Sistemas Alberto Lozano Simonelli de la UJTL en Chía, de acuerdo con protocolos previamente establecidos en el Laboratorio. El laboratorio está avalado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para realizar evaluaciones de bioinsumos agrícolas. El insecto plaga provino de una cría establecida y mantenida en las instalaciones del Centro bajo condiciones de invernadero.

En cada planta de tomate, sobre una hoja (para 5 hojas por planta), se dispusieron trampas que consistían de un anillo de acrílico sellado con una rejilla de metal en el que se introducían entre 8-10 parejas de adultos de la mosca blanca. Los montajes se mantuvieron en un cuarto de calor por 24 horas para acelerar el metabolismo de las moscas y garantizar el apareamiento y la puesta de huevos. Cada planta correspondida a un tratamiento. Después de 24 horas, cuando los adultos depositaron los huevos en el envés de la hoja, éstos fueron removidos para garantizar que todos provinieran de la misma cohorte. Posteriormente se retiraron los anillos, se marcaron las hojas que fueron cubiertas con bolsas de tela transpirable para evitar alteraciones en la evaluación. La aplicación de los tratamientos se realizó 15 días después de retirarse los anillos, para que los huevos llegasen al estadio de ninfa II.

Para el bioensayo, los extractos se resuspendieron en una solución de acetona: etanol: agua en una

proporción 1:1:3 para alcanzar una concentración de 100 mg/ml, las diluciones se realizaron con agua destilada a un volumen de 5 ml. Las ninfas fueron expuestas a los extractos a evaluar, aplicando los extractos mediante aspersion directa, para lo cual se usó alrededor de 1,5ml de muestra por tratamiento. La aspersion se realizó con un aerógrafo sobre cada hoja de las 20 plantas de tomate (18 para tratamientos para 9 concentraciones por extracto, 1 para el control negativo con el solvente usado en la resuspension del extracto y 1 para el testigo absoluto) a una distancia de 30 cm y un ángulo de 45°, para lograr un cubrimiento uniforme. Se denomina en este estudio como testigo absoluto al tratamiento en el que no se realizó ninguna aplicacion sobre las ninfas de *T. vaporariorum*.

Durante este estudio se realizaron dos ensayos. El primero con una serie de diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1 y 0.01 mg/ml) con el objetivo de determinar la concentración y el tiempo en la que cada extracto evaluado actuó de manera más eficaz y así de determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) mediante el método Probit. A partir de los resultados de ese primer ensayo, se prepararon diluciones a cuatro nuevas concentraciones (80, 60, 40 y 20 mg/ml) entre el rango en el que se presentó el mayor porcentaje de mortalidad que fue de 100-10 mg/ml, para evidenciar la concentración en la que el extracto actuaría de manera más eficiente. La corrección en los valores de mortalidad se realizó con la fórmula de Abbott (Figura 5) y se realizó debido a que la mortalidad en el testigo no superó el 10%. Como control negativo, se usó la mezcla de solventes empleada para resuspender los extractos.

$$\text{Mortalidad corregida} = \left( \frac{\% \text{Mortalidad tratamiento} - \% \text{Mortalidad testigo absoluto}}{100 - \% \text{Mortalidad testigo absoluto}} \right) \times 100$$

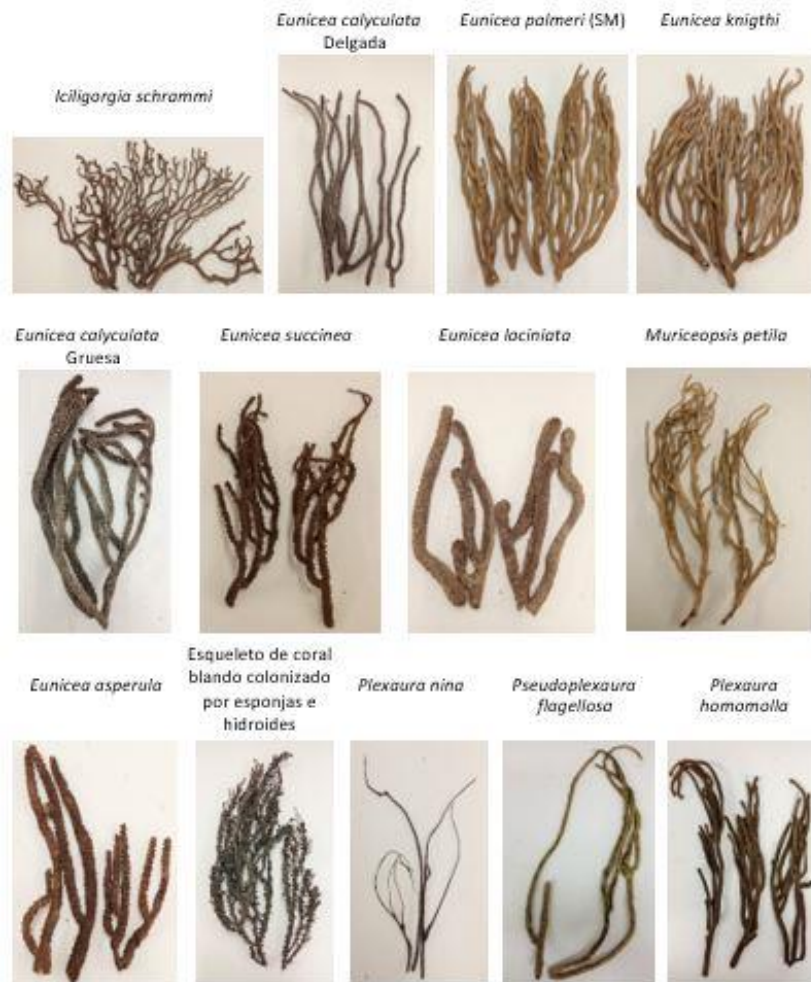
**Figura 5.** Ecuación de Abbott para la corrección de la mortalidad con los datos del testigo absoluto (Abbott, 1925 en: Orozco, 2011).

Los montajes se mantuvieron en cuartos de ambiente controlado, a una temperatura de 20±1°C, humedad relativa 70±10% y fotoperíodo 12 h Luz: Oscuridad. Se realizó una evaluación durante 10 días, diariamente durante los tres primeros días, y en los restantes siete días del ensayo cada día por medio. En estas evaluaciones, se cuantificó la cantidad de individuos vivos en cada unidad experimental.

### 3. RESULTADOS

#### Especies de corales blandos y rendimientos de extracción

Las imágenes de las diferentes especies evaluadas se muestran en las Figuras 6 y 7. En la Tabla 1 se incluye la identidad y proveniencia de las diferentes especies de corales blandos evaluadas en este estudio. En esta tabla también se incluye el rendimiento de extracción para cada una de ellas. Los rendimientos no fueron mayores al 10% en ninguna de las muestras, el mayor porcentaje fue para la muestra correspondiente a una esponja con hidroide creciendo sobre octocoral (8,67%) mientras que el menor rendimiento se obtuvo para *Eunicea palmeri* recolectada en Providencia (0,51%).



**Figura 6.** Fotografías de las muestras de corales blandos provenientes de El Remanso, Tanganga, Santa Marta.



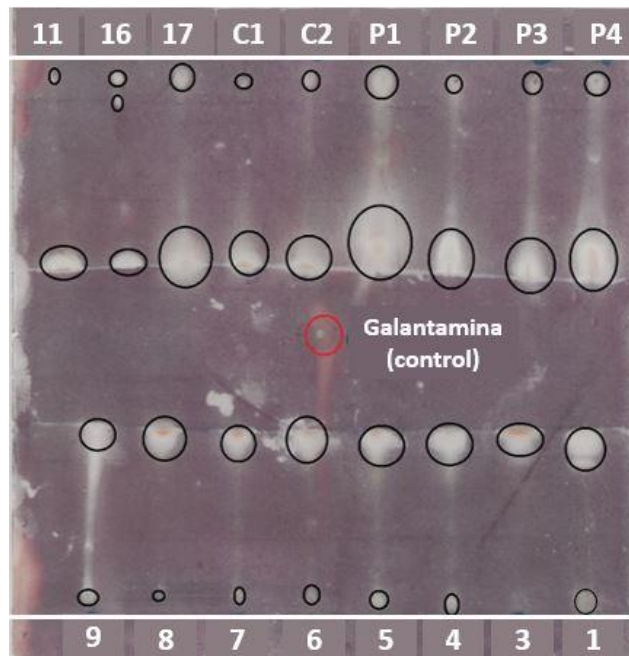
**Figura 7.** Fotografías de las muestras de corales blandos provenientes de Felipe's place, Providencia.

**Tabla 1.** Identidad, procedencia, profundidad y rendimiento de extracción de las diferentes especies de corales blandos evaluados en este estudio.

Identidad	Procedencia	Profundidad	Rendimiento
<i>Iciligorgia schrammi</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,23%
<i>Eunicea calyculata</i> (delgada)	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	2,09%
<i>Eunicea palmeri</i> (SM)	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,09%
<i>Eunicea knigthi</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,95%
<i>Eunicea calyculata</i> (gruesa)	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,74%
<i>Eunicea succinea</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	7,45%
<i>Eunicea laciniata</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	3,72%
<i>Muriceopsis petila</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	3,96%
<i>Eunicea asperula</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,90%
Esqueleto de coral blando colonizado por esponjas e hidroides	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	8,67%
<i>Plexaura nina</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	4,38%
<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	1,94%
<i>Plexaura homomalla</i>	El Remanso, Santa Marta	3-7 m	3,81%
<i>Eunicea palmeri</i> (P)	Felipe's place, Providencia	20 m	0,51%
<i>Plexaurella grisea</i>	Felipe's place, Providencia	20 m	3,29%
<i>Antillogorgia americana</i>	Felipe's place, Providencia	20 m	2,02%
<i>Pseudoplexaura</i> sp.	Felipe's place, Providencia	20 m	1,69%

### Actividad inhibitoria de la Acetilcolinesterasa (AChEI)

El ensayo de inhibición de la AChE se utilizó como un *screening* primario para determinar cuáles especies de corales blandos tendrían un mayor potencial insecticida contra la mosca blanca de los invernaderos. La imagen de la placa resultante del ensayo se muestra en la Figura 8 y los resultados se presentan en la Tabla 2. Cabe resaltar que todos los extractos evaluados presentaron al menos un halo de inhibición, evidenciándose así el potencial de los corales blandos como AChEI. Los extractos que presentaron más de un halo de inhibición fueron *Plexaura nina*, *Eunicea palmeri* recolectada en Providencia (de aquí en adelante *Eunicea palmeri* (P)) y *Pseudoplexaura* sp. Con base en estos resultados, se seleccionaron los extractos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea* por tener los halos de inhibición más prominentes, además de ser mayores al 50% del halo control que fue de 5 mm. El extracto de *E. palmeri* (P) mostró dos halos de inhibición de 4 y 9 mm mientras que el extracto de *P. grisea* mostró un halo de inhibición de 6mm.



**Figura 8.** Placa de ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa por bioautografía de extractos de corales blandos. 1: *Icilligorgia schrammi*, 3: *Eunicea calyculata* (delgada), 4: *Eunicea palmeri* (SM), 5: *Eunicea knighthi*, 6: *Eunicea calyculata* (gruesa), 7: *Eunicea succinea*, 8: *Eunicea laciniata*, 9: *Muriceopsis petila*, 10: *Eunicea asperula*, 16: esqueleto de coral blando colonizado por esponjas e hidroides, 17: *Plexaura nina*, C1: *Pseudoplexaura flagellosa*, C2: *Plexaura homomalla*, P1: *Eunicea palmeri* (P), P2: *Plexaurella grisea*, P3: *Antillologorgia americana* y P4: *Pseudoplexaura* sp.. Placa desarrollada en un sistema de dilución de CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9:1) y revelada con una solución de Fast Blue Salt (FBS) a 2 mg/ml.



**Tabla 2.** Resultados del ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa para los extractos orgánicos de octocorales evaluados sobre ninfas de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*.

Identidad	Halos de inhibición	Identidad	Halos de inhibición
<i>Iciligorgia schrammi</i>	1	Esqueleto de coral blando colonizado por esponjas e hidroides	1
<i>Eunicea calyculata</i> (delgada)	1	<i>Plexaura nina</i>	2
<i>Eunicea palmeri</i> (SM)	1	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	1
<i>Eunicea knigthi</i>	1	<i>Plexaura homomalla</i>	1
<i>Eunicea calyculata</i> (gruesa)	1	<i>Eunicea palmeri</i> (P)	2
<i>Eunicea succinea</i>	1	<i>Plexaurella grisea</i>	1
<i>Eunicea laciniata</i>	1	<i>Antillogorgia americana</i>	1
<i>Muriceopsis petila</i>	1	<i>Pseudoplexaura</i> sp.	2
<i>Eunicea asperula</i>	1	galantamina (control)	1

### Ensayo insecticida sobre la mosca blanca de los invernaderos

En el ensayo contra la mosca blanca de los invernaderos se observaron respuestas diferenciales de mortalidad entre los tratamientos. En ambos extractos evaluados, se detectó menor mortalidad en los extractos más diluidos en los rangos de 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml. La corrección de la mortalidad con la fórmula de Abbott se realizó utilizando el valor de mortalidad de 8,3% en el testigo absoluto, debido a que este valor no superó el 10%.

En las Tablas 3 y 4 se evidencia como la mortalidad de las ninfas superó el 50% en casi todos los tratamientos para los días de evaluación (excepto el extracto de *P. grisea* de Providencia a 0,1 y 0,01 mg/ml, con 49,6% y 45,7% de mortalidad, respectivamente). El mayor valor de mortalidad se obtuvo con el extracto de *E. palmeri* (P) a 80 mg/ml con un 94,5% y la menor mortalidad se evidenció para el extracto de *Plexaurella grisea* a 0,01 mg/ml con 45,7%. En general, se presentó una mayor mortalidad en el extracto de *E. palmeri* (P) con respecto a *P. grisea* si bien no se presentaron diferencias significativas entre ambos extractos (ANOVA Valor-P: 0,914). Se observó además como la concentración con mayor porcentaje de mortalidad en *P. grisea* fue menor a la encontrada con *E. palmeri* (P), siendo ésta de 60 mg/ml, mientras que en *E. palmeri* (P) fue de 80 mg/ml. Los valores

menores de mortalidad estuvieron tanto para *E. palmeri* (P) como para *P. grisea* en el tratamiento 0,01 mg/ml.

**Tabla 3.** Mortalidad corregida (fórmula de Abbott) de los tratamientos 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml de extractos orgánicos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea*, el solvente y el testigo sobre ninfas en instar II de mosca blanca de los invernaderos, después de 10 días de evaluación en condiciones de laboratorio. Entre paréntesis se incluyen los valores de intervalo de confianza al 95%.

		100 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,001 mg/ml	Testigo	Solvente
<i>Eunicea palmeri</i> (P)	% Mortalidad obtenida	78,1 ± 1,2 (73,0-83,2)	71,5 ± 6,0 (45,6-97,4)	68,3 ± 2,0 (59,6-76,9)	60,2 ± 7,2 (29,4-91,1)	60,8 ± 3,4 (46,3-75,3)	8,3 ± 1,2 (5,3-9,7)	17,7 ± 2,1 (14,3-21,2)
	% Mortalidad corregida	76,1 ± 1,2 (70,6-81,7)	68,9 ± 6,6 (40,7-97,2)	65,4 ± 2,2 (55,9-74,8)	56,6 ± 7,8 (22,9-90,2)	57,2 ± 3,7 (41,4-73,0)	N.A.	N.A.
<i>Plexaurella grisea</i>	% Mortalidad obtenida	75,7 ± 4,6 (55,8-97,8)	65,3 ± 2,4 (55,1-75,4)	62,2 ± 2,7 (50,4-73,9)	53,8 ± 5,7 (29,2-78,4)	50,2 ± 5,9 (24,7-75,8)	8,3 ± 1,2 (5,3-9,7)	17,7 ± 2,1 (14,3-21,2)
	% Mortalidad corregida	73,6 ± 5,0 (51,7-95,3)	62,1 ± 2,6 (51,0-73,2)	58,8 ± 2,9 (45,9-71,6)	49,6 ± 6,2 (22,8-76,4)	45,7 ± 6,5 (17,8-73,6)	N.A.	N.A.

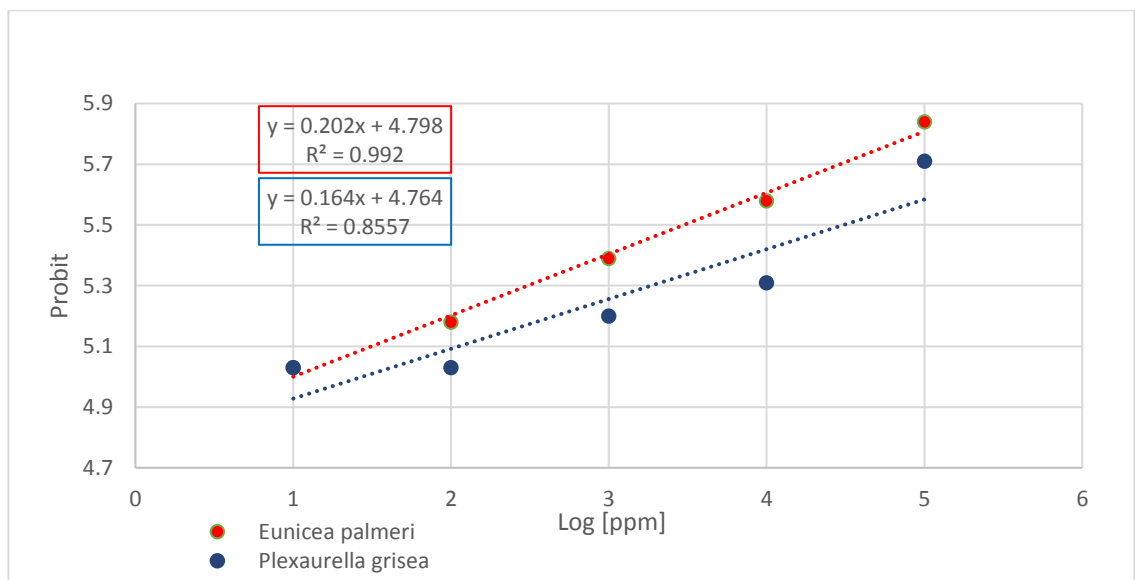
**Tabla 4** Mortalidad corregida (fórmula de Abbott) de los tratamientos 80, 60, 40 y 20 mg/ml de extractos orgánicos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea*, el solvente y el testigo sobre ninfas en instar II de mosca blanca de los invernaderos, después de 10 días de evaluación en condiciones de laboratorio. Entre paréntesis se incluyen los valores de intervalo de confianza al 95%.

		80 mg/ml	60 mg/ml	40 mg/ml	20 mg/ml	Testigo	Solvente
<i>Eunicea palmeri</i> (P)	% Mortalidad obtenida	95,0 ± 1,7 (89,5-100,5)	84,9 ± 5,1 (68,8-100,9)	75,1 ± 4,2 (61,7-88,5)	63,3 ± 4,8 (47,9-78,7)	8,3 ± 1,2 (5,3-9,7)	17,7 ± 2,1 (14,3-21,2)
	% Mortalidad corregida	94,5 ± 1,9 (88,5-100,6)	83,5 ± 5,5 (65,9-101,1)	72,8 ± 4,6 (58,2-87,5)	59,9 ± 5,3 (43,1-76,8)	N.A.	N.A.
<i>Plexaurella grisea</i>	% Mortalidad obtenida	88,6 ± 5,03 (66,9-110,3)	91,9 ± 5,9 (63,4-114,5)	76,0 ± 7,7 (42,9-109,2)	79,7 ± 7,4 (47,6-111,7)	8,3 ± 1,2 (5,3-9,7)	17,7 ± 2,1 (14,3-21,2)
	% Mortalidad corregida	86,4 ± 3,4 (76,9-95,8)	91,1 ± 4,2 (79,3-102,9)	74,15 ± 4,7 (61,2-87,1)	81,3 ± 5,9 (64,9-97,6)	N.A.	N.A.

En la Figura 9 se observan las líneas de tendencia de la mortalidad corregida de cada extracto (obtenidas mediante el método Probit) sobre el logaritmo de las concentraciones de las a 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml. Con este análisis, se observaron líneas de tendencia con pendientes similares (m para *E. palmeri* (P) = 0,202; m y para *P. grisea* = 0,164), lo cual sugiere que el comportamiento

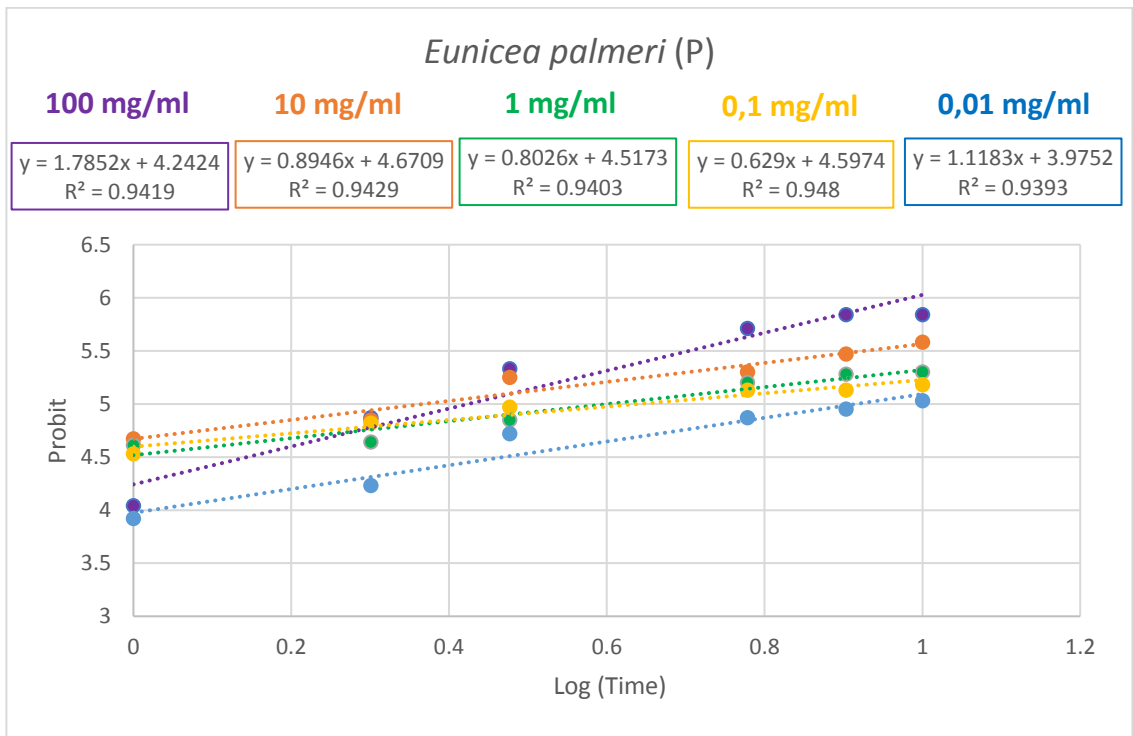
de la mortalidad en los dos extractos fue similar entre sí, además no se detectaron diferencias significativas entre ambos extractos (ANOVA Valor-P: 0,914). Los valores de  $R^2$  fueron cercanos a 1 (0,992 y 0,8557, para *E. palmeri* (P) y *P. grisea*, respectivamente), demostrando la linealidad de las funciones.

A partir de las ecuaciones de linealidad calculadas con el método Probit, se encontró que para el extracto de *Eunicea palmeri* (P) ( $Y = 0,202x + 4,798$ ) la concentración letal media  $CL_{50(10 \text{ días})} = 10 \text{ ppm}$  (0,01 mg/ml) fue menor que la del extracto de *Plexaurella grisea* ( $Y = 0,164x + 4,764$ ) la cual fue de  $CL_{50(10 \text{ días})} = 27,5 \text{ ppm}$  (0,03 mg/ml).

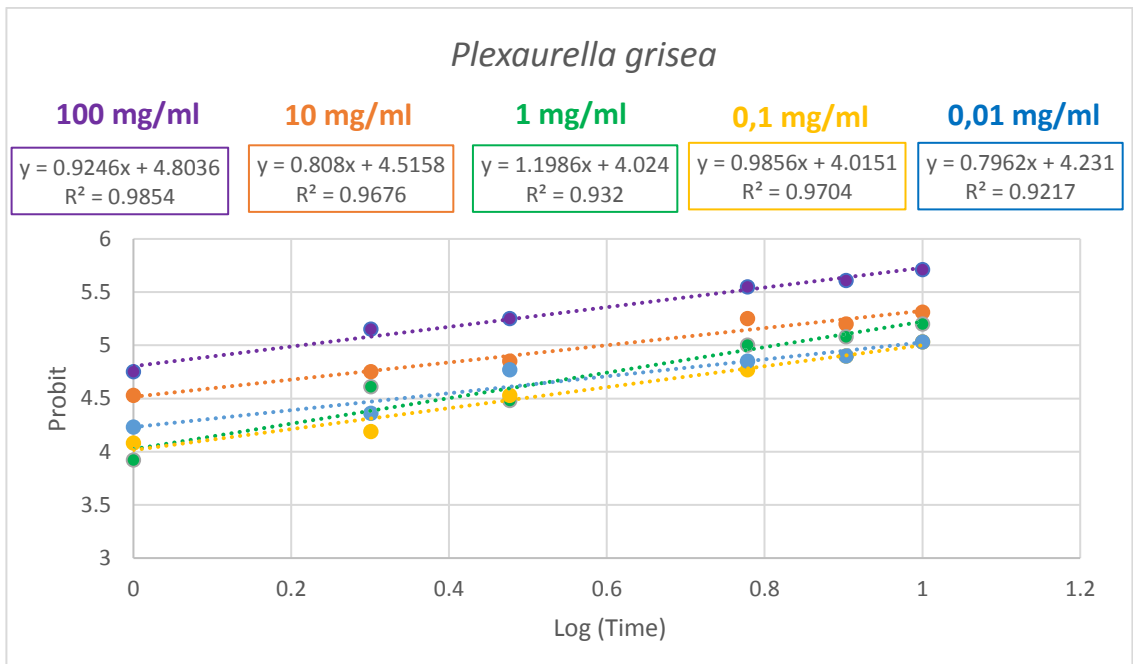


**Figura 9.** Gráfico de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de los extractos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea* sobre ninfas en instar II de *Trialeurodes vaporariorum* durante los 10 días de evaluación.

En las Figuras 10 y 11 se observan las líneas de tendencia de mortalidad en el tiempo respecto a los 5 tratamientos en los extractos de *E. palmeri* (P) y *P. grisea*, respectivamente. A partir de las ecuaciones de linealidad calculadas con el método Probit (todas con valores de  $R^2 > 0,9$ ) para cada extracto, en los cinco tratamientos, se obtuvieron los valores de tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ).



**Figura 10.** Gráfico del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) del extracto *Eunicea palmeri* (P) durante los 10 días de evaluación en los tratamientos con concentraciones 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml.



**Figura 11.** Gráfico del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) del extracto *Plexaurella grisea* durante los 10 días de evaluación en los tratamientos con concentraciones 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml.

Los valores de tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) se muestran en la Tabla 4. En todos los casos la TL<sub>50</sub> fue mayor a 2 días, además se evidenció como la disminución de la concentración implicó mayores tiempos de exposición para alcanzar la mortalidad del 50% de las ninfas de mosca blanca, por lo que el comportamiento de la mortalidad en el tiempo no presentó diferencias significativas entre los extractos para los tratamientos evaluados (ANOVA Valor-P: 0,3313, CV=56% en ambos casos). Asimismo, los tiempos de exposición para alcanzar la mortalidad media fueron más largos en los tratamientos con las mismas concentraciones para *Plexaurella grisea* que aquellos para el extracto de *Eunicea palmeri* (P).

**Tabla 4.** Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) en días sobre ninfas en instar II de *Trialeurodes vaporariorum* de los extractos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea* en los tratamientos a concentraciones de 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 mg/ml.

	100 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
<i>Eunicea palmeri</i> (P)	2,5	2,3	3,9	4,4	8,2
<i>Plexaurella grisea</i>	1,6	3,9	6,5	9,9	9,2

#### 4. DISCUSIÓN

##### Rendimiento de extracción de corales blandos

Al momento de preparar extractos orgánicos a partir de organismos terrestres o marinos, es crucial la selección de solventes que permitan obtener el mayor rango de compuestos de polaridad variable presentes en las matrices a extraer. Una mezcla de solventes que es ampliamente usada con este fin es diclorometano: metanol (1:1), pues se han encontrado mejores rendimientos de extracción además un mayor número y tipo de metabolitos usando la mezcla de estos solventes, que haciendo extracciones sucesivas con cada uno de ellos (Cronin *et al.*, 1995; Puyana, 2001; Groot, 2004; Colegate y Molyneux, 2007; Cequier *et al.*, 2008; Hyotylainen y Wiedmer, 2013; Restrepo, 2015). El rendimiento de extracción no superó el 10% en ninguna de las muestras, con rangos variables entre 0,5% (*Eunicea palmeri* (P)) y 7,5% (*Eunicea succinea*). Estos rendimientos de extracción fueron superiores a reportados para organismos como macroalgas, para el mismo sistema de solventes, especialmente de los géneros *Dictyota* y *Sargassum*, que no superaron rendimientos del 1,2% (Restrepo, 2015).

### Potencial de inhibición de la acetilcolinesterasa

Los corales blandos se reconocen dentro de los organismos marinos, como una fuente importante de compuestos bioactivos, siendo productores de una gran variedad de diterpenos entre los que se destacan aquellos con esqueleto tipo briarano, cembrano y dolabellano, que son compuestos con capacidad AChEI (Castellanos, 2014; Amaya, 2016; Castellanos *et al.*, sometido).

Los ensayos de inhibición de la AChE se basan en la hidrólisis de la ACh en acetato y colina, o sobre sustratos similares a ésta. La detección de las sustancias descompuestas puede ser directa o indirecta, en este último caso son reveladas mediante la formación de complejos coloreados (Castellanos, 2014), como es el caso del ensayo de bioautografía llevado a cabo en este estudio, el cual tiene como ventaja ser rápido y sencillo, además de que se pueden examinar varios extractos de manera simultánea (Guardigli *et al.*, 2005). Una de las razones de la variabilidad en los ensayos de AChEI radica no tanto en la técnica a usar, sino en la sustancia usada como sustrato en la reacción con la AChE, debido a la especificidad de los neurotransmisores, donde por ejemplo la acetilcolina es específica para la AChE eritrocitaria, mientras que la butirilcolina lo es para la AChE plasmática, e incluso compuestos como propionilcolina tienen afinidad por ambas enzimas (Camean, 1995).

La mayoría de fuentes naturales más conocidas de AChEI provienen de plantas terrestres (Castellanos, 2014), pero se han realizado estudios para identificar esta actividad en organismos marinos como invertebrados y algas (Castellanos *et al.*, sometido), destacándose particular las algas rojas *Hypnea musciformis*, *Laurencia translucida* y *Palisada perforata* como las más promisorias (Bianco *et al.*, 2015). También hay reportes de potencial AChEI en compuestos derivados de esponjas entre los que se destacan esteroides de *Xetospongia testudinaria* (Richmond, 2014), alcaloides como la petrosamina de *Petrosia* sp. y la 4-acetoxiplaquamina B aislada de *Corticium* sp. (Castellanos, 2014).

En lo que respecta a los corales blandos, algunas especies del género *Cladiella* han sido reportadas con un rango amplio de bioactividad incluyendo la inhibición de la AChE (Ata *et al.*, 2004; Raveendran *et al.*, 2011). A partir de *Lopophytum* sp. también se han aislado terpenoides con capacidad AChEI como el crassumolido E (resumido en Castellanos, 2014).

Castellanos (2014) realizó un estudio sistemático del potencial AChEI de 117 extractos de organismos marinos del Caribe colombiano, 74 de corales blandos, 17 de esponjas y 26 de consorcios de cianobacterias bentónicas. El estudio reveló que los corales blandos fueron los más promisorios en este frente y que los géneros que se destacaron por su actividad AChEI fueron *Eunicea*, *Pseudopterogorgia* (ahora *Antillogorgia*), *Pseudoplexaura* y *Plexaura*. En este estudio, los extractos de dichos géneros presentaron actividad AChEI, destacándose *Eunicea palmeri* (P), *Pseudoplexaura* sp. y *Plexaura nina*, respectivamente ya que presentaron 2 halos de inhibición en el ensayo de bioautografía, lo cual sugiere que al menos dos compuestos presentes en cada extracto podrían ser responsables de la actividad detectada. Especies como *Eunicea knigthi*, *Pseudoplexaura flagellosa* y *Eunicea laciniata* recolectadas en otras zonas de Santa Marta (Punta las Minas), y especímenes de *Plexaura homomalla* de San Andrés y *Eunicea succinea* de Providencia ya habían demostrado tener actividad AChEI *in vitro* (Castellanos, 2014), corroborando así su potencial inhibidor de esta enzima.

Se encuentran diferencias intraespecíficas en la actividad AChEI para el caso particular de *Eunicea palmeri*, pues la muestra de Providencia mostró más de un halo de inhibición de la AChE que la de Santa Marta, diferencias químicas que seguramente obedecen a condiciones ambientales y muy probablemente a las interacciones ecológicas locales, entre las que se destaca la competencia por espacio (Sammarco y Coll, 1988; Sammarco y Coll, 1992; Puglisi *et al.*, 2000; O'Neal y Pawlik, 2002).

La diversidad y concentración de compuestos en un organismo, suele estar relacionada con la variación en la localidad de recolección y la profundidad, como se ha demostrado para *Erythropodium caribaeorum* (Look *et al.*, 1984; Tagliatalata *et al.*, 2003; Molina, 2014), corales blandos del género *Antillogorgia* (Duque *et al.*, 2004; Puyana *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2011), así como también esponjas (Puyana *et al.*, 2015) entre muchos otros organismos marinos. Esta tendencia también se evidenció en este estudio con respecto a las especies del género *Eunicea*, por las diferencias en la actividad inhibitoria de la AChE, lo cual posiblemente se deba a la variabilidad de diterpenos (Correa *et al.*, 2011; Amaya *et al.*, 2017) presentes en este género que es muy diverso en el Caribe colombiano (Sánchez, 1998).

### **Corales blandos AChEI como controladores de la mosca blanca de los invernaderos**

Las funciones biológicas de los metabolitos secundarios de organismos marinos han sido de gran interés, debido a la variabilidad de entidades químicas y estructurales que pueden ser usadas en la síntesis de sustancias para la industria agrícola y farmacéutica (Faulkner, 1977; Fenical, 1982). Cabe resaltar el reconocido potencial insecticida de ciertos metabolitos de origen marino provenientes de algas rojas, nemertinos y poliquetos (se destaca la nereistoxina aislada de *Nereis* sp. la cual tiene múltiples aplicaciones, en las que se resalta su uso como insecticida) (Darias, 1998; Lee *et al.*, 2003; Ordaz *et al.*, 2010), especialmente los compuestos con actividad AChEI, los cuales han demostrado potencial en la aplicación y diseño de insecticidas de uso comercial. Con ese fin se destacan los monoterpenoides tipo 1,8-cineol y acetato de bornilo que tienen efectos similares a los organofosforados y los carbamatos (Houghton *et al.*, 2006; Castellanos, 2014). Sobre *Trialeurodes vaporariorum*, los monoterpenoides han demostrado tener poder insecticida y de repelencia (Santiago *et al.*, 2002; Santiago *et al.*, 2007), efecto similar a aquel de los organofosforados y carbamatos (Barreto *et al.*, 2007).

Otros insecticidas con modo de acción similar a los AChEI han sido usados en el control de ninfas de la mosca blanca de los invernaderos, tal es el caso del imidacloprid, que actúa como un agonista/antagonista del receptor de ACh de tipo nicotínico, siendo un neonicotinoide (Devine *et al.*, 2008), y que tiene una CL<sub>50</sub> de 16,5 ppm (10,7-23,4), en ninfas de este insecto y una CL<sub>50</sub> de 5,7 ppm (4,6-6,9) en adultos (Rodríguez *et al.*, 2003). Otros estudios como el de Cardona *et al.* (2001) reportan valores mayores con una CL<sub>50</sub> de 17,1 ppm (12,2-29,2) en el tratamiento de adultos de *T. vaporariorum*. En el estudio de Fang *et al.* (2007) se evaluaron insecticidas de síntesis química en los que se obtuvieron mortalidades entre 0,28-4,17 ppm para todos los instar de la mosca blanca de los invernaderos.

*T. vaporariorum* ya presenta resistencia a otros tipos de insecticidas que tienen modos de acción similares a los que tienen los AChEI, como lo es la interrupción de la transmisión de impulsos entre las células nerviosas, pero que en lugar de bloquear la AChE pueden interferir en los canales de sodio ocasionando el mismo efecto, tal es el caso de los piretroides (Dennehy *et al.*, 1999; Devine *et al.*, 2008).



Es importante mencionar que, si bien la eficacia del imidacloprid es alta, ya hay estudios que reportan resistencia de diferentes plagas a este (Gutiérrez *et al.*, 2007; Matsumura *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009), incluso en *T. vaporariorum* (Gorman *et al.*, 2007). El producto sin embargo disminuye el fitness poblacional en los organismos que sobreviven al tratamiento (Roush y Daly, 1990), por lo cual se cataloga como una resistencia de tipo inestable (Bailo *et al.*, 2004).

Insecticidas como los monocrotofos (organofosfato) y el carbosulfan (carbamato), que son compuestos AChEI (Devine *et al.*, 2008), han sido evaluados en poblaciones de adultos de *T. vaporariorum* en concentraciones 0,012 y 0,004 mg/ml y se han encontrado valores de mortalidad de CL<sub>50</sub> de  $3,4 \times 10^{-4}$  y  $7,2 \times 10^{-5}$  mg/ml, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2003). En general tanto el imidacloprid como los insecticidas con mecanismos AChEI mencionados, ocasionan mayor mortalidad en adultos que en ninfas, requiriéndose concentraciones de producto mayores en el tratamiento de estas últimas.

Para los dos extractos y en todas las concentraciones evaluadas se superó el 50% de la mortalidad, exceptuando a *P. grisea* a 0,1 mg/ml, *E. palmeri* (P) a 0,01 mg/ml y al solvente en los 10 días de estudio. Sin embargo, el tiempo de exposición al que se debió someter a las ninfas para alcanzar este valor varió con respecto al tratamiento, cumpliéndose que, a mayor concentración, se requieren tiempos menores de exposición respecto a los tratamientos de concentraciones más bajas, como se ha presentado en otros estudios con este organismo, tanto en estadios ninfales como de adultos (Cardona *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2002; Morales, 2014). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los extractos *E. palmeri* (P) y *P. grisea* con respecto a estos tiempos de exposición, se requirieron exposiciones mayores para aquellas ninfas tratadas con el extracto de *Plexaurella grisea* (exceptuando a *E. palmeri* (P) a 100 mg/ml donde se requirió casi un día más para alcanzar la mortalidad del 50% de los individuos).

En general, para todos los tratamientos el tiempo requerido de exposición fue mayor a dos días. Este tiempo resulta amplio en comparación con insecticidas AChEI como el metomil, para el cual en menos de una hora de exposición se puede ocasionar la muerte del 50% de una población de adultos de *T. vaporariorum* (Vargas y Alvear, 2000; Devine *et al.*, 2008). Es así como los extractos evaluados en este estudio sugieren un efecto insecticida de tipo residual largo, dado que hay aumento de la

mortalidad en el tiempo. La eficacia y el corto efecto residual, además de aplicaciones constantes, han ocasionado que el uso del metomil ya presente resistencia en poblaciones de *T. vaporariorum* (Vargas y Alvear, 2000).

Además del metomil, otros insecticidas comerciales de corto efecto residual con mecanismos AChEI son los monocrofos, el carbosulfan (Rodríguez *et al.*, 2003), los metamidofos y el carbofuran (Cardona *et al.*, 2001), entre otros. La eficacia de estos disminuye con las aplicaciones repetidas que acarrearán la reducción de la mortalidad en el tiempo y se deben a dicho corto efecto residual (Bi *et al.*, 2002).

El impacto de los extractos en estudio sobre los insectos debiera evaluarse a mediano y largo plazo, para determinar el aparente aumento de mortalidad en el tiempo, además de evaluar su nivel de persistencia en el ambiente. La persistencia es un carácter variable en los diferentes principios activos presentes en insecticidas tipo AChEI, cuya acción puede ser inmediata o residual en el tiempo, así como en sistemas físicos como suelo y fuentes de agua (NRC, 1989; Wilson *et al.*, 2002).

## 5. CONCLUSIONES

Los extractos de corales blandos en estudio, e inclusive el esqueleto de coral blando colonizado por esponjas e hidroides, presentaron actividad inhibitoria de la AChE en el ensayo de bioautografía, siendo tres de éstos, *Eunicea palmeri* (P), *Pseudoplexaura* sp. y *Plexaura nina*, los extractos con actividad AChEI más promisorios.

Los extractos seleccionados para el bioensayo de actividad insecticida contra la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*), *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea*, ocasionaron mortalidad en los estadios de ninfa II de este organismo, en concentraciones desde 0,001 hasta 100 mg/ml, presentando en todos los tratamientos una mortalidad que alcanzó el 50% en la población estudiada.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en los dos extractos no superó una concentración de 0,003 mg/ml, pero fue mayor en *P. grisea*. En lo que respecta al tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), éste fue mayor

a dos días en todos los tratamientos. A pesar que las  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$  de los productos comerciales son menores a las encontrados en los extractos en estudio, cabe resaltar que los mismos poseen un posible potencial insecticida porque *T. vaporariorum* fue sensible a éstos, y podrían ser una alternativa para el desarrollo de un producto comercial, para remplazar los productos con actividad AChEI que ya generan resistencia en diversas plagas.

## 6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar bioensayos con estos extractos en otros estadíos de la mosca blanca de los invernaderos, para identificar diferencias en las concentraciones y tiempos de mortalidad. Asimismo, se sugiere realizar bioensayos de potencial insecticida con los extractos que tengan menor actividad AChEI, para realizar una comparación con los más promisorios e identificar posibles compuestos no AChEI que puedan generar mortalidad en organismos plaga.

De igual manera, se recomienda realizar otros ensayos de actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria, para los corales blandos en los que este tipo de actividad no se ha evaluado, como *Iciligorgia schrammi* y *Muriceopsis petila*, o al menos especies pertenecientes a estos géneros, y que puedan explicar también la mortalidad del organismo objetivo.

Debido al carácter promisorio de los extractos de *Eunicea palmeri* (P) y *Plexaurella grisea* como potenciales insecticidas, se sugiere realizar ensayos con otros insectos plaga y polinizadores, para evaluar si ellos son susceptibles a los mismos, además de identificar las sustancias que causan la mortalidad, para realizar una posible síntesis y desarrollar un producto comercial. Sumado a ello se sugiere realizar estudios que evalúen el impacto ambiental en cuanto a la posible persistencia del producto en el ambiente.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la dirección, revisión y apoyo de la Profesora Mónica Puyana, y la asesoría de la Profesora Luz Stella Fuentes. Al grupo de investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Profesor Leonardo Castellanos y Albert Patiño, por su asesoría en el ensayo de

inhibición de la AChE. A Alejandra Garzón, Don Eudoro Mora y Gabriela Barrero del Centro de Biosistemas Alberto Lozano Simonelli por su apoyo en el bioensayo de potencial insecticida. A mis colegas, a mis amigos, y especialmente a mis padres y mis hermanos, los primeros por brindarme la oportunidad de estudio y los segundos por estar presentes y apoyarme durante el proceso.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W.S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2): 265–267.
- Alcaraz, V. 2001. Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. *Manual Moderno*. México. 2 ed. 229 p.
- Alpizar, C. y Morales, C. 2003. La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Médica Costarricense*, 45(2): 50-56.
- Amaya, F. 2016. Obtención de diterpenos marinos con posible actividad antiviral incrementada. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 142 p.
- Amaya, F., Sanchez, ML., Ramos, FA., Puyana, M., Nunes de Palmer, IC., Laneuville, V. y Castellanos L. 2017. Dolabellane diterpenes from the Caribbean soft corals *Eunicea laciniata* and *Eunicea asperula* and determination of their anti HSV-1 activity. *Revista Colombiana de Química*, 46(1): 5-12.
- Arévalo, D. y Franco, A. 2008. Características oceanográficas de la surgencia frente a la ensenada de Gaira, departamento de Magdalena, época seca menor de 2006. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 37(2): 131-162.
- Ata, A., Ackerman, J., Bayoud, A. y Radhika, P. 2004. Bioactive chemical constituents of *Cladiella* species. *Helvetica Chimica Acta*, 87: 592-597.
- Bailo, I., Brügggen, K., Elbert, A., Nagel, C., Nauen, R., Rauen, H., Rogers, D., Springer, B. y Steffens, R. 2004. Resistance management to neonicotinoids. Bayer Crop Science. 82 p.
- Bayer, F. 1961. The Shallow-water octocorallia of the West Indian region: a manual for marine biologists. Hague: Martinus Nijhoff. 373 p.
- Berrue, F. y Kerr R. 2009. Diterpenes from gorgonian corals. *Natural Product Reports*, 26: 681-710.
- Bi, J., Toscano, N. y Ballmer, G. 2002. Greenhouse and field evaluation of six novel insecticides against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* on strawberries. *Crop protection*, 21: 49-55.
- Bianco, É., Lenita, J., Laiz, P., Kroger, A., Paganelli, C., Boeder, A., dos Santos, L. y Tenfen, A. 2015. Antimicrobial (including antimollicutes), antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms – evaluation of extracts and pure compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(6): 668-676.
- Bisset, J., Dieguez, L., Rodríguez, M., Díaz, C., González, T y Vázquez, R. 1996. Tres combinaciones de esterases y su relación con la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 48(1): 5-11.
- Bisset, J., Rodríguez, M. y Cáceres, L. 2003. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(3): 191-195.
- Bisset, J., Rodríguez, M., Díaz, C. y Soca, A. 1998. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 50(2): 133-137.
- Bisset, J., Rodríguez, M., Díaz, C. y Soca, A. 1999. Caracterización de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del Estado de Miranda, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(2): 89-94.
- Bisset, J., Rodríguez, M., Díaz, C. y Soca, A. 2000. Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 52(3): 180-185.
- Bisset, J., Rodríguez, M., Fernández, D. y Palomino, M. 2007. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3): 202-208.
- Bisset, J., Rodríguez, M., Molina, D., Díaz, C. y Soca, A. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1): 37-43.

- Bisset, J., Rodríguez, M., San Martín, J., Romero, J. y Montoya, R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26(3): 229-234.
- Braekman, J. 1977. Recent developments in terpenoid and steroid chemistry of Alcyonacea.5-15p. En: Faulkner, D y Fenical, W. *Marine Natural Products Chemistry*. USA, Plenum Press. 425 p.
- Buitrago, N., Cardona, C. y Acosta, A. 1994. Niveles de resistencia a insecticidas en *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), plaga del frijol común. *Revista Colombiana de Entomología*, 20(2): 109-114.
- Camean, A. 1995. *Toxicología avanzada*. España. Ed. Díaz de Santos. 557 p.
- Cannon, R. 1998. The implications of predicted climate change for insects in the UK, with emphasis on non-indigenous species. *Global Change Biology*, 4 (7): 785-796.
- Cardona, C., Rendón, F., García, J., López, A., Bueno, J. y Ramírez, J. 2001. Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*, 27(1-2): 33-38.
- Cardona, C., Rodríguez, J., Bueno, J. y Tapia, X. 2005. *Biología y manejo de la mosca blanca Trialeurodes vaporariorum en Habichuela y Frijol*. CIAT. Colombia. 50 p.
- Carlson, N. 1994. *Fundamentos de psicología fisiológica* Prentice Hall Hispanoamerica. México. 3 ed. 525 p.
- Castellanos, C., Amaya, FA., Tello, E., Ramos, FA., Umaña, A., Puyana, M., Resende, J. y Castellanos, L. Sometido. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in marine organisms from the Caribbean Sea. Sometido a *Natural Product Research*.
- Castellanos, F. 2014. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano. Tesis de Maestría en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 133 p.
- Cequier, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á y Zárate, R. 2008. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of liquid classes and fatty acids from samples of different natures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4297-4303.
- Chanmethakul, T., Chansang, H. y Watanasit, S. 2010. Soft coral (Cnidaria: Alcyonacea) distribution patterns in Thai Waters. *Zoological Studies*, 49(1): 72-84.
- Colegate, S. y Molyneux, R. 2007. *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination* 2 ed. USA: CRC Press. 624 p.
- Coronado, V., García, R. y Acero, A. 2015. Comunidad de peces arrecifales en relación con la invasión del pez león: el caso del Caribe Sur. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 44(2): 291-302.
- Correa, H. 2012. Estudios de bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias con actividad biológica Fase IV. Tesis doctoral en Ciencias-Química Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 243 p.
- Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C. y Kerr, R. 2011. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterogins and seco-pseudopterogins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andres and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Marine Drugs*, 9: 334-344.
- Correa, H., Valenzuela, A., Ospina, L. y Duque, C. 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *Journal of Inflammation*, 6(5): 1-10.
- Cronin, G., Lindquist, N., Hay, M. y Fenical, W. 1995. Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the Brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. *Marine Ecology Progress Series*, 119: 265-273.
- Cuadrado, C., Castellanos, L., Osorno, O., Duque, C. y Puyana, M. 2010. Estudio químico y evaluación de la actividad antifouling del Octocoral Caribeño *Eunicea laciniata*. *Química NOVA*, 33(3): 656-661. ISSN: 0100-4042.
- Darias, J. 1998. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. *Medio Ambiente Canarias*, 9: 15-19.
- Dee Unglaud, S. 2010. *Human physiology: an integrated approach*. Pearson Education. EEUU. 5 ed. 991 p.

- Del Puerto, A., Suárez, S. y Palacio, D. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3): 372-387.
- Dennehy, T., Wigert, M., Li, X. y Williams, L. 1999. Arizona whitefly susceptibility to insect growth regulators and chloronicotinyl insecticides: 1998 season summary. The University of Arizona Cooperative Extension, USA. 15 p.
- Devine, G., Eza, D., Ogusuku, E. y Furlong, M. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1): 74-100.
- Díaz, MC. 2002. Ensayos de actividad biológica y ecológica química de los extractos orgánicos crudos de algunas macroalgas del caribe colombiano. Tesis de grado, programa de Bióloga Marina. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. 94 p.
- Dukes, J. y Mooney, H. 1999. Does global warming increase the success of biological invaders?. *Trends in Ecology & Evolution*, 14 (4): 135-139.
- Duque, C., Puyana, M., Castellanos, L., Arias, A., Correa, H., Osorno, O., Asai, T., Hara, N. y Fujimoto, Y. 2006. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia Islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron*, 62:4205-4213.
- Duque, C., Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A., Osorno, O., Hara, N. y Fujimoto, Y. 2004. Pseudopterogens P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron*, 60:10627-10635.
- Fang, T., Sheng, L., Xiang, K. y Kai, W. 2007. Studies on selective toxicity of acetamiprid, imidacloprid and buprofezin to *Trialeurodes vaporariorum* and two natural enemies. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 9: 88-91.
- Faulkner, D. 1977. Interesting aspects of marine natural products chemistry. *Tetrahedron* 33: 1421-1443.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science* 215: 923-927.
- Ferchmin, P., Pagán, O., Ulrich, H., Szeto, A., Hann, R. y Eterovic, V. 2009. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon* 54(8): 1174-1182.
- Ferrer, A. 2003. Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(1): 155-171.
- García, L., Franco, A., Ramírez, J. y López, D. 2010. Dinámica océano-atmósfera y su influencia en la biomasa fitoplanctónica, en la zona costera del departamento del Magdalena, Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 39(2): 307-335.
- García, R., Acero, A. Coronado, V. 2015. Reef fish community in presence of the lionfish (*Pterois volitans*) in Santa Marta, Colombian Caribbean. *Revista MVZ Córdoba*, 20: 4989-5003.
- García, V., Soto, A. y Bacca, T. 2014. Efecto insecticida de productos alternativos en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2): 143-147.
- Gorman, K., Devine, G., Bennison, J., Coussons, P., Punchard, N. y Delhom, I. 2007. Report of resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 3: 555-558.
- Groot, P. 2004. *Handbook of stable isotope analytical techniques Vol 1*. Netherlands: Elsevier. 1258p.
- Guardigli, M., Pasini, P., Mirasoli, M., Leoni, A., Andreani, A. y Roda, A. 2005. Chemiluminescent high-throughput microassay for evaluation of acetylcholinesterase inhibitors. *Analytica Chimica Acta*, 535(1-2): 139-144.
- Gutiérrez, M., Rodríguez, C., Llanderal, C., Terán, A., Lagynes, Á. y Díaz, O. 2007. Estabilidad de la resistencia a neonicotinoides en *Bemisia tabaci* (Gennadius), biotipo B de San Luis Potosí, México. *Agrociencia*, 41(8): 913-920.
- Houghton, P., Ren, Y. y Howes, M. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23(2): 181-199.
- Hyttylainen, T. y Wiedmer, J. 2013. *Chromatographic methods in metabolomics*. United Kingdom: Royal Society of Chemistry. 536 p.

- Leal, MC., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, NCM. y Calado, R. 2012. Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades -Where and What Are We Bioprospecting?. PLoS ONE, 7(1): e30580. doi:10.1371/journal.pone.0030580.
- Lee, SJ., Tomizawa, M. y Casida, JE. 2003. Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(9): 2636-2652.
- Look, S., Fenical, W., Van Engen, D. y Clardy, J. 1984. Erythrolides: unique marine diterpenoids interrelated by a naturally occurring di-pi-methane rearrangement. Journal of the American Chemical Society, 106: 5026-5027.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M. y Portolés, A. 2008. Velázquez, farmacología básica y clínica. Médica Panamericana. España. 18 ed. 1375 p.
- Marston, A., Kissling, J. y Hostettmann, K. 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochemical Analysis, 13(1): 51-54.
- Matsumura, M., Takeuchi, H., Satoh, M., Sanada, S., Otuka, A., Watanabe, T. y Van, D. 2008. Species-specific insecticide resistance to imidacloprid and fipronil in the rice planthoppers *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* in East and South-east Asia. Pest Management Science, 64(11): 1115-1121.
- Mendoza, N. 2008. Farmacología médica. Médica Panamericana. España. 916 p.
- Molina, S. 2014. Evaluación del contenido de diterpenos del octocoral *Erythropodium caribeorum* en el Caribe colombiano. Tesis de grado. Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 119 p.
- Morales, L. 2014. Evaluación de tres ingredientes activos de diferente grupo toxicológico para el control de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* en el cultivo de tomate. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. 63p.
- NCR, National Research Council. 1989. Drinking Water and Health, Vol. 9: Selected Issues in Risk, chapter 5: Acetylcholinesterase Inhibitors: Case Study of Mixtures of Contaminants with Similar Biologic Effects. Washington (DC): National Academies Press (US); chapter Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218889/>
- Nikolaevna, S., Ruíz, E., Coronado, J. y Corona, A. 2010. Especies de *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) que parasitan *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en Tamaulipas y Morelos, México, y descripción de una especie nueva. Dugesiana, 17(2): 129-135.
- O'Neal, W. y Pawlik, R. 2002. A reappraisal of the chemical and physical defenses of Caribbean gorgonian corals against predatory fishes. Marine Ecology Progress Series, 240: 117-126.
- Omer, A., Leigh, T. y Granett, J. 1992. Insecticide resistance in field populations of greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in the San Joaquin Valley. Journal of Economic Entomology, 85 (1): 21-27.
- Ordaz, G., D'Armas, H., Yáñez, D., Hernández, J. y Camacho, A. 2010. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. Revista de Biología Tropical, 58(2): 677-688.
- Orozco, S. 2011. Suceptibilidad de *Compsus* n. sp. A *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Tesis de grado. Maestría en Entomología. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 101 p.
- Orta, L. 2002. Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. Fitosanidad, 6(3): 55-62.
- Patiño, A. y Castellanos, L. 2017. Octocorales marinos como fuente de compuestos controladores de insectos plaga. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 36 p.
- Puglisi, M.P., Paul, V.J. y Slattery, M. 2000. Biogeographic comparisons of chemical and structural defenses of the Pacific gorgonians *Annella mollis* and *A. reticulata*. Marine Ecology Progress Series, 207: 263-272.
- Puyana, M. 2001. Chemical Ecology of Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. Disertación doctoral. Universidad de California, San Diego. Scripps Institution of Oceanography. 214 p.
- Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A, Osorno, O. y Duque, C. 2004. Pseudopterostin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the Islands of San Andrés and Providencia (SW Caribbean). Journal of Chemical Ecology, 30: 1183-1201.



- Puyana, M., Pawlik, J., Blum, J. y Fenical, W. 2015. Metabolite variability in Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(6): 592-599.
- Raveendran, T., Mol, V. y Parameswaran, P. 2011. Natural product antifoulants from the octocorals of Indian waters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 265-268.
- Rebello, V., Donnici, C., Neves, J. y Marques, J. 2007. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30(1): 159-170.
- Reina, E., Puentes, C., Rojas, J., García, J., Ramos, F. A., Castellanos, L., Aragón, M. y Ospina, L. 2011. Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(19): 5888-5891.
- Restrepo, C. 2015. Extracción, purificación y análisis del contenido de fucoxantina en algas pardas del Caribe colombiano. Trabajo de grado, programa de Bióloga Marina. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 26p.
- Richmond, V. 2014. Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Tesis doctoral Área Química Orgánica Universidad de Buenos Aires. 265 p.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. y Calado, R. 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, 9: 1860-1886.
- Rodríguez, A. y del Pozo, E. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 29: 211-218.
- Rodríguez, I., Morales, H. y Cardona, C. 2003. Líneas base, dosis diagnóstico y medición periódica de resistencia a insecticidas en poblaciones de adultos e inmaduros de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 29(1): 21-27.
- Rodríguez, M., Bisset, J., Milá, L., Calvo, E., Díaz, C. y Soca, A. 1999. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 51(2): 83-88.
- Roush, R. y Daly, J. 1990. The role of population genetics in resistance research management. 97-152p. In: Roush, R y Tabashnik, T. (eds.). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall. 277 p.
- Sammarco, P.W. y J.C. Coll, 1992. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 88: 93-104.
- Sammarco, P.W. y Coll, J.C. 1988. Chemical ecology of Alcyonacean corals. 87-114 p. In: P.J. Scheuer (eds.). *Bioorganic Marine Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 185 p.
- Sánchez, G. y Salceda, R. 2008. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica REB*, 27(2): 44-51.
- Sánchez, J. y Wirshing, H. 2005. A Field Key to the Identification of Tropical Western Atlantic Zooxanthellate Octocorals (Octocorallia: Cnidaria). *Caribbean Journal of Science*, 41(3): 508-522.
- Sánchez, J.A. 1998. Sistemática Filogenética del género *Eunicea* (Lamouroux, 1816) (Octocorallia: Gorgonacea: Plexauridae) con aspectos sobre la historia natural de algunas especies en el Caribe colombiano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Biología. Bogotá. 134 p.
- Santiago, V., Montero-Pineda, A., Ayala-Escobar, V., Rodríguez-Hernández, C. y Sánchez, P. 2007. Control del hongo fitopatógeno *Pythium* sp. con monoterpenos. 37-40 p. En: Rodríguez, C., Bauer, M., Lozano, C. y Sánchez, S. (eds.). *Alternativas contra plagas*. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible.
- Santiago, V., Rodríguez, C., Ortega, A., Ochoa, M. y Said G. 2002. Propiedades plaguicidas del limoneno y su efecto en mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (West.). Memoria del VII Simposio Nacional sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Control de Plagas. San Luis Potosí, SLP, México. 18-24 p.
- Semba, K. 2008. Phylogenetic and ontogenetic aspects of the basal forebrain cholinergic neurons and their innervation of the cerebral cortex. *Progress in Brain Research*, 145: 3-45.

- Tagliatela, O., Craig, K., Reberioux, D., Roberge, M. y Andersen, R. 2003. Briarane, erythrane, and aquarane diterpenoids from the Caribbean gorgonian *Erythropodium caribaeorum*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003(18): 3515-3523.
- Tello, E., Castellanos, L. y Duque, C. 2013. Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(1): 242-256.
- Tello, E., Castellanos, L., Arévalo-Ferro, C., Rodríguez, J., Jiménez, C. y Duque, C. 2011. Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurolones. *Tetrahedron*, 67(47): 9112-9121.
- Vargas, M. y Alvear, R. 2000. Determinación de la susceptibilidad en tres poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) a metomilo y buprofezin. *Agricultura Técnica*, 60(4): 341-349.
- Wen, Y., Liu, Z., Bao, H. y Han, Z. 2009. Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of Brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94(1): 36-42.
- Wilson, L., Elliott, J., Vernon, R. y Smith, B. 2002. Persistence and retention of active ingredients in four granular cholinesterase-inhibiting insecticides in agricultural soils of the lower Fraser River valley, British Columbia, Canada, with implications for wildlife poisoning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(2): 260-268.