

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

---



**“Evaluación de extractos vegetales para el control biológico de  
*Spodoptera frugiperda*”**

Tesis que presenta  
**Analleli Jiménez Durán**

Para obtener el grado de  
**DOCTORA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dra: Josefina Barrera Cortés**

Ciudad de México.

Julio de 2022.

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. El desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio No. 36 “Control inteligente de procesos biológicos, redes neuronales y sistemas expertos” del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología. Los bioensayos con larvas se prepararon en el Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

# Agradecimientos

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)** por la beca N° 48399.

A la **Dra. Josefina Barrera Cortés** por la asesoría, el tiempo y le dedicación que tuvo para que este proyecto llegara a su finalización, gracias por las enseñanzas y vivencias durante este período. Que siga teniendo mucho éxito en todos los proyectos que se proponga.

**A mis asesores:** Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, Dra. Ana Camela Ramos Valdivia, Dra. María Teresa Ponce Noyola y Dra. Rosa Luisa Santillán Baca. Fueron pieza clave y agradezco sus valiosos aportes y apoyos para concluir con éxito el presente proyecto.

A la **Q.F.B Elvira Ríos**, y a su personal de apoyo I.Q.I. Gustavo Gerardo Medina y Óscar Rojas. A todos les agradezco su apoyo en el análisis por CG-MS de los extractos fitoquímicos.

A las auxiliares del Laboratorio 20 y 22 del departamento de Química del Cinvestav. **Sonia Araceli Sánchez Ruiz** y **Ma. Eugenia Ochoa Becerra**. Gracias por su cariño, paciencia y disposición en el estudio de RMN.

A la **M.C. Laura Patricia Lina García** de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Gracias Maestra por su apoyo en los bioensayos, pero sin duda alguna agradezco su confianza, apoyo y amistad.

A la **M.C. Ernestina Cedillo Portugal**, de la Universidad Autónoma de Chapingo, por el apoyo con la identificación de las especias estudiadas.

# Dedicatorias

**A Dios:** Gracias por permitirme a estar siempre rodeada de personas maravillosas que sin duda alguna forman parte de mi felicidad y por protegerme en todo momento. Gracias, mi Dios.

**A mi hermosa familia:** Esta tesis la dedico a mi esposo y a mis dos hijas, William eres el soporte de mi vida y el motivo a seguirme preparando en el área académica, gracias por tu compañía y los desvelos te amo. Jana mi niña hermosa, desde que estas a mi lado eres mi motor, con tu sonrisa iluminas mis días oscuros gracias por tu apoyo siempre, te amo. Sicarú mi rayito de luz, tus besos y platillos son la mejor medicina cuando me siento sin fuerzas, te amo.

**A mis papás:** Mamita Estela eres la mujer más valiente, trabajadora y amorosa del mundo, siempre estas a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida y por eso estoy tan adradecida con usted mami. Papi Hipólito gracias por su sacrificio y darnos lo mejor que pudo. Los amo mucho a los dos y agradezco a Dios por sus vidas.

**A mis hermanos:** Mi luchadora Hortencia, hermanita gracias por dar todo sin pensarlo, se que siempre cuanto contigo y eres un ejemplo de fortaleza. Mi ratita Lupita, gracias por la unión que desde niña nos mantiene, se que me amas tanto como yo te amo. Mi Chinita, hermanita guapa agradezco tu apoyo con las niñas y tus consejos sobre la comida, se que siempre estarás cuando te necesite. Mi Layito, Lan y Toñito gracias, hermanos por sus consejos, risas y vivencias. A todos los amo, soy afortunada por tenerlos.

**A mi abuelita:** Para la mejor abuelita del mundo, Carmelita que me brinda todo su amor y cariño, te amo abuelita.

**A mis sobrinos:** cada uno de ustedes son muy especiales y agradezco su cariño. Los quiero mucho.

**A mis amigos:** Sonia, Jeny, Marcos, Galdy, Oscar, Ray, Lucy, Dra. Angelina, Dr. Raúl, Utzel, Ana, etc. Agradezco sus convivencias, risas, comida y juegos. Hicieron que este proceso fuera más agradable.

# ÍNDICE GENERAL

---

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> ( <i>S. frugiperda</i> ) .....	1
1.1.1. Ciclo de vida .....	1
1.1.2. Distribución .....	2
1.2. Insecticidas para combatir a <i>S. frugiperda</i> .....	3
1.2.1. Control químico .....	3
1.2.2. Control biológicos .....	4
1.2.3. Prácticas culturales .....	5
1.2.4. Control botánico.....	5
1.2.5. Mecanismos de acción y actividades de los metabolitos sobre insectos.....	14
1.2.6. Toxicología de las plantas Meliaceae y Piperaceae. ....	19
1.3. Métodos para la extracción, separación e identificación de metabolitos. ....	20
1.3.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	20
1.3.2. Cromatografía en columna (CC).....	21
1.3.4. Técnicas espectroscópicas . ....	23
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. Objetivo general.....	30
4.2. Objetivos específicos .....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. Colecta de plantas e identificación.....	31
5.1.1. Cálculo de la humedad .....	31

5.2. Extracción de compuestos fitoquímicos.....	32
5.3. Análisis por GC-MS de los metabolitos.....	33
5.4. Actividad larvicida.....	33
5.7.1. Análisis de metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). ....	41
5.8. Actividad larvicida de fracción importante y metabolito aislado sobre <i>S. frugiperda</i> . ....	42
5.9. Análisis estadístico.....	42
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
6.1. Identificación y registro de los ejemplares. ....	44
6.2. Determinación de humedad total.....	44
6.3. Extracción de fitoquímicos. ....	45
6.4. Análisis por GC-MS de los metabolitos.....	46
6.5. Estudio fitoquímico de los extractos de EtOH y hexano de <i>Piper auritum</i> .....	57
6.5.1. Tamizaje fitoquímico .....	58
6.6. Actividad larvicida.....	59
6.6.1. Disminución del peso y longitud larval.....	63
6.7. Actividad biológica de <i>P. auritum</i> sobre el ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> .....	67
6.7.1. Alteración de los tiempos de desarrollo. ....	70
6.7.2 Actividad pupicida y fertilidad. ....	71
6.7.3 Daño en la fisiología de <i>S. frugiperda</i> .....	72
6.8. Extracción y purificación de safrol .....	76
6.8.1. Rendimiento del extracto de hoja deshidratada de <i>P. auritum</i> .....	76
6.8.2. Estudio fitoquímico bio guiado del extracto etanólico de hoja de <i>Piper auritum</i> .....	76
6.9. Actividad larvicida de la fracción 2 y safrol sobre <i>S. frugiperda</i> . ....	82
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>99</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

---

<i>Tabla 1. Familias de plantas con actividad insecticida sobre S. frugiperda.</i>	7
<i>Tabla 2. Extractos y limonoides de especies Meliaceae.</i>	8
<i>Tabla 3. Especies del género Piper con actividad insecticida.</i>	12
<i>Tabla 4. Grupos de metabolitos extraídos con hexano y EtOH como disolventes.</i>	20
<i>Tabla 5. Soportes para separar compuestos</i>	21
<i>Tabla 6. Métodos para el revelado de grupos de metabolitos.</i>	23
<i>Tabla 7. Características de los grupos.</i>	26
<i>Tabla 8. Condiciones de las pruebas químicas aplicadas a los extractos etanólicos y hexánicos de P. auritum</i>	37
<i>Tabla 9. Concentraciones aplicadas de fracción y compuesto aislado.</i>	42
<i>Tabla 10. Humedad total en hojas frescas y deshidratadas.</i>	44
<i>Tabla 11. Rendimiento (% medio (wt<sub>s</sub>/wt<sub>m</sub>) en materia seca) de fitoquímicos extraídos con hojas frescas y deshidratadas de plantas Meliaceae y Piperaceae.</i>	45
<i>Tabla 12. Compuestos identificados en extractos crudos de EtOH de las cuatro especies vegetales.</i>	48
<i>Tabla 13. Compuestos identificados en los extractos de hexano de las cuatro especies.</i>	50
<i>Tabla 14. Valores de R<sub>f</sub> de los metabolitos contenidos en los extractos de hexano y EtOH de Piper auritum .</i>	58
<i>Tabla 15. Análisis fitoquímico de los extractos de hexano y EtOH de las hojas de P. auritum.</i>	59
<i>Tabla 16. Concentración letal del extracto etanólico de las hojas deshidratadas de P. auritum en larvas de S. frugiperda de primer instar.</i>	70
<i>Tabla 17. Duración de los estadios de larva, pupa, adulto, huevo, ciclo completo de S. frugiperda en diferentes tratamientos.</i>	71
<i>Tabla 18. Actividad pupicida, fertilidad total e índice de actividad de oviposición.</i>	72
<i>Tabla 19. Rendimiento de extracción de hoja deshidratada de P. auritum.</i>	76
<i>Tabla 20. Porcentajes de rendimiento de extracción.</i>	76
<i>Tabla 21. Desplazamientos químicos (<math>\delta</math> en ppm) y constantes de acoplamiento (J en Hz)</i>	82
<i>Tabla 22. Concentración letal de safrol y de la fracción 2 en larvas de S. frugiperda primer instar expuestas a 7 días.</i>	83

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1. Ciclo de vida de S. frugiperda.</i>	2
<i>Figura 2. Distribución geográfica de S. frugiperda.</i>	3
<i>Figura 3. (a) Árbol de C. odorata (b) distribución global de C. odorata nativo (■) e introducido (■).</i>	9
<i>Figura 4. (a) Árbol de M. azedarach y (b) distribución global de M. azedarach nativo (■) e introducido (■).</i>	10
<i>Figura 5. Distribución global del género Piper de Global biodiversity information facility.</i>	11
<i>Figura 6. (a) Arbusto de P. umbellatum y (b) distribución global de P. umbellatum nativo (■) e introducido (■).</i>	12
<i>Figura 7. (a) Arbusto de P. auritum; (b) distribución global de P. auritum nativo (■) e introducido (■).</i>	13
<i>Figura 8. Esquema de la inhibición por metabolitos en la fosforilación oxidativa.</i>	15
<i>Figura 9. Esquema del sistema nervioso.</i>	16
<i>Figura 10. Diagrama del control hormonal de la metamorfosis en insectos.</i>	17
<i>Figura 11. Ejemplos de algunos disruptores endocrinos y su inhibición.</i>	17
<i>Figura 12. Diagrama de los daños genéticos producidos por insecticidas.</i>	18
<i>Figura 13. Aparato digestivo de los insectos.</i>	19
<i>Figura 14. Diferencia de población en niveles.</i>	26
<i>Figura 15. Metodología para la extracción de los metabolitos.</i>	32
<i>Figura 16. Diagrama del bioensayo de S. frugiperda.</i>	34
<i>Figura 17. Diagrama general de la metodología del ciclo biológico de S. frugiperda.</i>	36
<i>Figura 18. Estudio bioguiado del extracto etanólico de P. auritum.</i>	41
<i>Figura 19. Cromatogramas de los extractos etanólicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) C. odorata; B) M. azedarach.</i>	53
<i>Figura 20. Cromatogramas de los extractos hexánicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) C. odorata; B) M. azedarach.</i>	54
<i>Figura 21. Cromatogramas de los extractos etanólicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) P. auritum and B) P. umbellatum.</i>	56
<i>Figura 22. Cromatogramas de los extractos hexánicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) P. auritum and B) P. umbellatum.</i>	57
<i>Figura 23. Gráfica de efectos principales para la mortalidad (%).</i>	60

<i>Figura 24. Mortalidad (media (%) ± SE) de larvas de primer estadio de S. frugiperda por efecto de la concentración (µg/cm<sup>2</sup>) de extractos fitoquímicos obtenidos con EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes.</i>	61
<i>Figura 25. Efectos principales para (a): el peso (mg) y (b): la longitud (mm) en larvas.</i>	64
<i>Figura 26. Longitud (media (mm) ± SE) de larvas de S. frugiperda expuestas durante siete días a extractos fitoquímicos obtenidos con disolventes de EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes.</i>	65
<i>Figura 27. Peso (media (mg) ± SE) de larvas de Spodoptera frugiperda expuestas durante siete días a extractos fitoquímicos obtenidos con disolventes de EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes.</i>	66
<i>Figura 28. Ciclo de vida de S. frugiperda control.</i>	68
<i>Figura 29. Actividad larvaria a los 7 y 28 días de exposición del extracto etanólico de P. auritum en el rango de concentración de 0-37 µg/cm<sup>2</sup>.</i>	69
<i>Figura 30. Anomalías fisiológicas en larvas, pupas y adultos de Spodoptera frugiperda causados por el extracto de EtOH de P. auritum dentro del rango de concentración de 0 - 37 µg/cm<sup>2</sup>.</i>	74
<i>Figura 31. Mortalidad larval de S. frugiperda por efecto de los disolventes de CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, hexano y agua, después del séptimo día de aplicación.</i>	77
<i>Figura 32. Mortalidad larval de S. frugiperda por efecto de los extractos de P. auritum con los diferentes disolventes, después del séptimo día de aplicación.</i>	77
<i>Figura 33. Cromatograma de las particiones. Fase móvil: hexano/ EtOAc (7:3).</i>	78
<i>Figura 34. Actividad larvicida de las fracciones de la columna del extracto hexánico.</i>	79
<i>Figura 35. Cromatograma de la fracción 2.</i>	80
<i>Figura 36. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (arriba) y <sup>13</sup>C-RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el safrol aislado de P. auritum.</i>	81
<i>Figura 37. Mortalidad larval de la fracción 2 y de safrol en larvas de primer instar de S. frugiperda.</i>	82

# RESUMEN

---

*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) es un insecto plaga polífago originario de América. Debido a su capacidad de adaptación y migración, actualmente se encuentra en África, Asia y Oceanía, donde amenaza los cultivos agrícolas. La capacidad de *S. frugiperda* de desarrollar resistencia a los insecticidas es una de las razones de la continua búsqueda de medidas de control más eficaces, de bajo costo y respetuosas con el medio ambiente. En el presente trabajo se estudió la actividad insecticida de los extractos etanólicos y hexánicos obtenidos de las hojas frescas y deshidratadas de *Piper auritum* Kunth (Piperales:Piperaceae), *Piper umbellatum* L. (Piperales:Piperaceae) y *Cedrela odorata* L. (Sapindales:Meliaceae) contra las larvas de primer estadio de *S. frugiperda*. Los extractos etanólicos de las hojas deshidratadas de *C. odorata* y *P. auritum* presentaron una actividad insecticida tan elevada (100% de mortalidad a una concentración de 92 mg/cm<sup>2</sup>) como la obtenida con el control positivo, *Melia azedarach* L. (Sapindales:Meliaceae). El análisis GC-MS de los extractos reveló la presencia de fitoquímicos clasificados en los grupos de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, fenilpropanoides, alcoholes y ácidos grasos, principalmente. De manera particular, el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *P. auritum* mostró la presencia de alcaloides, alcoholes, aminoácidos, ion fosfato, fenoles, taninos, hidrocarburos aromáticos y terpenos. Así mismo, la exposición de larvas de *S. frugiperda* a bajas concentraciones de extracto etanólico de *P. auritum* permitió observar deformidades en el desarrollo de este insecto y una LC<sub>50</sub>= 22.1 µg/cm<sup>2</sup>. Por otro lado, el safrol aislado de esta planta presentó una mortalidad de 90% a una concentración del 92 mg/cm<sup>2</sup> y una LC<sub>50</sub>= 33.1 µg/cm<sup>2</sup>. *P. auritum* crece y se propaga rápidamente, además, presenta baja toxicidad en mamíferos e insectos no objetivo, por eso puede considerarse una alternativa contra el control de *S. frugiperda*

# ABSTRACT

---

*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera:Noctuidae) is a polyphagous pest insect native to the Americas. Due to its ability to adapt and migrate, it is now found in Africa, Asia, and Oceania, where it threatens crops. The ability of *S. frugiperda* to develop resistance to insecticides is one of the reasons for the continuous search for more effective, low-cost, and environmentally friendly control measures. In the present work, the insecticidal activity of ethanolic and hexanolic extracts obtained from fresh and dried leaves of *Piper auritum* Kunth (Piperales:Piperaceae), *Piper umbellatum* L. (Piperales:Piperaceae) and *Cedrela odorata* L. (Sapindales:Meliaceae) against first instar larvae of *S. frugiperda* was studied. Ethanolic extracts of the dried leaves of *C. odorata* and *P. auritum* exhibited a high insecticidal activity (100% mortality at a concentration of 92 mg/cm<sup>2</sup>) as that obtained with the positive control, *Melia azedarach* L. (Sapindales:Meliaceae). The GC-MS analysis of the extracts revealed the presence of phytochemicals classified in the groups of monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, phenylpropanoids, alcohols and fatty acids, mainly and particularly, the phytochemical screening of the ethanolic extract of *P. auritum* showed the presence of alkaloids, alcohols, amino acids, phosphate ion, phenols, tannins, aromatic hydrocarbons, and terpenes. Likewise, the exposure of *S. frugiperda* larvae to low concentrations of ethanolic extract of *P. auritum* allowed observing deformities in the development of this insect and an LC<sub>50</sub>= 22.1 µg/cm<sup>2</sup>. On the other hand, the safrole isolated from this plant presented a mortality of 90% at a concentration of 92 mg/cm<sup>2</sup> and an LC<sub>50</sub>= 33.1 µg/cm<sup>2</sup>. *P. auritum* grows and spreads rapidly and has low toxicity to mammals and non-target insects, so it can be considered an alternative for the control of *S. frugiperda*.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*).

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es un insecto lepidóptero de la familia Noctuidae, que durante su fase larvaria ataca a 353 plantas hospederas (Day et al. 2017; Niassy et al. 2021). Se conocen dos biotipos de *S. frugiperda*, una llamada del "arroz" y la otra del "maíz" con base en la diversidad genética del gen mitocondrial COI, debido a que los organismos pertenecientes al biotipo maíz tienen una alta preferencia por los cultivos de maíz, sorgo y algodón y el biotipo del arroz prefiere el arroz y la hierba (Paredes-Sánchez et al. 2021).

### 1.1.1. Ciclo de vida

*S. frugiperda* es un insecto que durante su ciclo de vida pasa por 4 etapas; larva, pupa, adulto y huevo (Figura 1). Luego de emerger, las larvas permanecen agrupadas en la parte baja de las plantas, refugiadas entre las hojas. El primer alimento de éstas es el corion de los huevos. Durante los primeros estadios, las larvas comen durante el día mientras que en los últimos estadios son más activas de noche. El número de estadios de la etapa larval depende de la temperatura ambiente y la dieta alimentaria, éstos pueden ser entre 6 u 8. El control biológico de las larvas durante los tres primeros estadios es más recomendable debido a la mayor sensibilidad de éstas a bajas concentraciones del insecticida. En los penúltimos instares se observa una mayor afectación en los cultivos (García-Lara y Bergvinson 2007). Para completar su desarrollo, las larvas consumen un promedio total de 179.7 cm<sup>2</sup> de superficie foliar de hojas y dejan de alimentarse justo antes de alcanzar el último instar larval. Las larvas son usualmente percibidas hasta que alcanzan una longitud de 2.0 a 2.5 cm o cuando es notorio el daño que han causado a las hojas de las plantas. Para pupar, en su último instar, las larvas se entierran en el suelo, entre

3 y 5 cm de profundidad, donde forman una cámara pupal, y en la cual permanecen entre 7 y 13 días aproximadamente, antes de emerger como adultos (Casmuz et al. 2010). En promedio el adulto ovipone de 100 a 150 huevos por día.

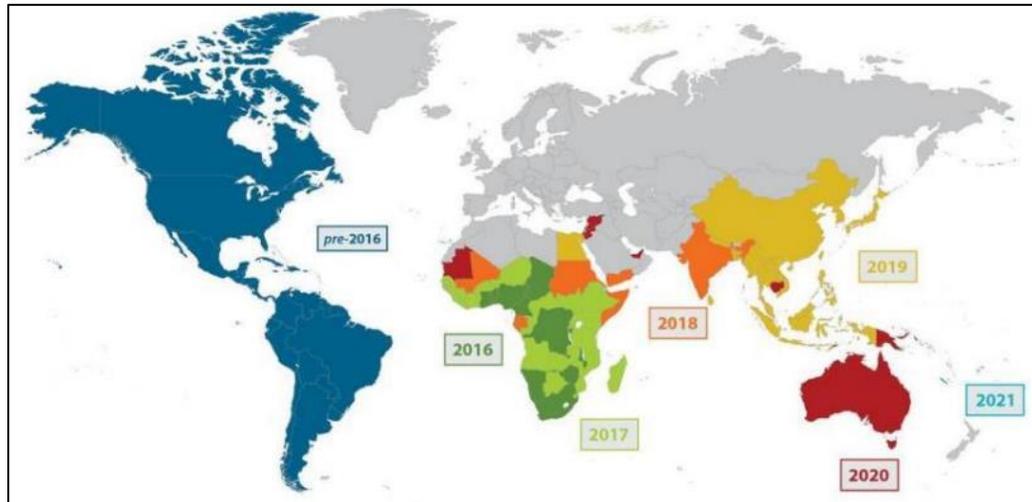


**Figura 1.** Ciclo de vida de *S. frugiperda*.  
(All 1988; Murúa et al. 2008)

### 1.1.2. Distribución

*S. frugiperda* es nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América, sin embargo, en los últimos años se observó una invasión debido a su capacidad de dispersión, adaptación y al cambio climático, llegándose a considerar un problema de plaga mundial (Sun et al. 2021). En 2016 apareció por primera vez en África, en 2018 en Asia y en 2020 invadió Oceanía (Wan et al. 2021). En la Figura 2, se presenta la distribución de *S. frugiperda* a nivel mundial (<https://www.fao.org/fall-armyworm/monitoring-tools/en/>).

La propagación incontrolada de *S. frugiperda* ha reducido el rendimiento de los cultivos de maíz hasta en un 60% y en zonas tropicales hasta en un 100% (Rioba y Stevenson 2020; Sarkowi y Mokhtar 2021).



**Figura 2.** Distribución geográfica de *S. frugiperda*.  
(Fuente: mapa mundial de las Naciones Unidas, enero de 2022)

## 1.2 Insecticidas para combatir a *S. frugiperda*

Para combatir a *S. frugiperda*, se han implementado prácticas de control químico, biológico, botánico y estrategias de prácticas culturales.

### 1.2.1 Control químico

Se refiere al uso de insecticidas químicos, que son compuestos o moléculas químicas que se usan para matar insectos (Belay et al. 2012). Los insecticidas químicos son ampliamente usados por su fácil aplicación y sus resultados satisfactorios no obstante, los problemas que pueden causar al ser humano y al medio ambiente. Además, debido al uso indiscriminado y a la baja degradación este tipo de productos ha favorecido al desarrollo de resistencia en *S. frugiperda* (Paredes-Sánchez et al. 2021).

La organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO 2016) reportó que en México se usaron en promedio 4.55 Ton de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1000 hectáreas entre el año 2009 y 2010 y sólo en 2013 se emplearon 37,455 Ton de insecticidas, 31,195 Ton de herbicidas y 42,223 Ton de fungicidas.

Los compuestos más usados para el control de *S. frugiperda* son: clorpirifos, lindano, lambdacialotrina, carbaryl y benzoato de emamectina (Difabachew et al. 2012; Paredes-Sánchez et al. 2021)

### 1.2.2 Control biológicos

Se refiere al uso de organismos, o de metabolitos producidos por éstos con la capacidad para combatir insectos plaga. (Fontes y Laumann 2019). Uno de éstos organismos, y el más estudiado, es *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*). *B.t.* es un bacilo gram positivo, que produce uno o más cristales proteicos que son tóxicos para larvas de insectos. Sin embargo, en los últimos años, se han detectado poblaciones de *S. frugiperda* resistentes a las proteínas Cry1, debido a su inserción en plantas (Machado et al. 2020). Para reducir la velocidad desarrollo de resistencias en el insecto plaga, se ha sugerido utilizar más de una protoxina Cry en la misma planta (Soares et al. 2019). Otras bacterias con capacidad para el control biológicos son: *Saccharopolyspora spinosa*, *Rhizobacteria* y *Xenorhabdus* (Elbrense et al. 2021; Palermo et al. 2021). Por otro lado, el hongo más conocido por su poder entomopatógeno es el ascomiceto *Beauveria bassiana*. Este hongo es un parásito que se adhiere a la cutícula del insecto, produce conidios que germinan y crea hifas en el interior del insecto causando la muerte (Peteira et al. 2011). Otros hongos de interés en control biológico son: *Metarhizium anisopliae*, que causa la enfermedad de la muscardina verde, *Hypocrea lixii* y *Nomuraea rileyi* (Chebet et al. 2021). Los virus entomopatógenos también se han utilizado como controles biológicos, debido a su especificidad y virulencia. Cuando los virus son ingeridos por el insecto, le genera pérdida de apetito, letargo, hundimiento del cuerpo, reblandecimiento del tegumento y la tendencia a perder el color. Algunos virus estudiados contra *S. frugiperda* son Rhabdovirus (Sf-RV), granulovirus granulovirus (SfGV ARG) tipo 1, 2 y 3,

ascovirus (SfAV-1a), icnovirus (HdIV) y el más estudiado, nucleopoliedrovirus (SfMNPV) (Chebet et al. 2021; Hussain et al. 2021).

Otros organismos que participan en el control biológico son los nemátodos, los más comunes son: *Steinernema carpocapsae*, *S. sangi*, *S. surkhetense*, *Hererorhabditis indica* y *H. Baujardi* (Huot et al. 2019; Lalramnghaki et al. 2021), También existen enemigos naturales, dentro de ellos encontramos a *Telenomus remus*, *Cotesia icipe*, *C. luteum* y *Charops* sp (Abang et al. 2021).

### **1.2.3 Prácticas culturales**

El control cultural hace referencia al grupo de técnicas y prácticas que se llevan a cabo con el fin de generar un agroecosistema que desfavorezca el desarrollo y sobrevivencia de plagas (Kumela et al. 2018). Dentro de las técnicas encontramos la siembra temprana, que permite una menor invasión de *S. frugiperda*. La inspección visual temprana y continua de los cultivos es una posibilidad para detectar la presencia de la plaga. De igual manera, se recomienda intercalar los cultivos con otros que no sean huéspedes y la rotación de cultivos (Assefa 2018; Kumela et al. 2018). Para impedir el movimiento de las plagas de zonas infestadas a las no infectadas, después de la cosecha se recomienda eliminar y destruir todos los residuos de los cultivos que fueron infestados. Aarar con profundidad el suelo para exponer pupas y larvas es una estrategia para eliminar plagas pero mantener a los insectos beneficios. La fertilización de suelos es la estrategia más común para mantener la vitalidad en los suelos agrícolas. (Prasanna et al. 2018).

### **1.2.4 Control botánico**

Se refiere al uso de material vegetal, en forma de metabolitos aislados o mezclas complejas (Isman 2006). Los metabolitos que han presentado actividad tóxica contra insectos están clasificados como ácidos grasos, glicolípidos, fenoles aromáticos, aldehídos, alcaloides, cetonas,

alcoholes, terpenoides, flavonoides, limonoides, naftoquinonas, sacáridos, polioléteres, saponinas y sapogeninas. Estos metabolitos pueden tener uno o varios efectos como son: repelente, antialimentario, ovicida, insecticida, infertilidad e inhibidor del crecimiento (Corzo et al. 2012; Wu et al. 2021). La aplicación de plaguicidas botánicos fue una de las primeras estrategias implementadas para proteger los cultivos agrícolas (Campos et al. 2018). Actualmente, resurgen debido a la necesidad de reducir el impacto negativo generado por los insecticidas químicos y a su amplia gama de acción mencionados anteriormente. Las especies de las familias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae y Canellaceae fueron las primeras usadas desde 1989 para el control de plagas (Jacobson 1989). Actualmente se usan 2500 especies de plantas que pertenecen a 235 familias (Lopes-Souto et al. 2021). De manera particular 30 familias han sido reportadas para el control de *S. frugiperda*. De estas familias 69 especies de plantas presentan control biológico contra *S. frugiperda* (Rioba y Stevenson 2020). En México se han identificado 11 familias, 16 especies y 42 metabolitos con actividad insecticida contra *S. frugiperda*. De la familia Meliaceae, *Cedrela salvadorensis* y *Cedrela dugessi* cultivadas en México han presentado actividad insecticida contra *S. frugiperda* y de la familia Piperaceae no se ha reportado ninguna especie (Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo 2019). Los metabolitos analizados se clasifican dentro del grupo de los terpenos, flavonoides, estilbenos, ácidos grasos y alcaloides. En la [Tabla 1](#), se presentan algunas familias y especies de plantas que han presentado afectación en contra de *S. frugiperda*.

**Tabla 1.** Familias de plantas con actividad insecticida sobre *S. frugiperda*.

Familia (especie)	Concentración (ppm)	Toxicidad (aplicación)	Etapas del insecto	Referencia
Euphorbiaceae ( <i>Actinostemon concolor</i> )	1000	36.1% de mortalidad (Ingesta)	Larvas de 1 <sup>er</sup> instar	Alves et al. (2018)
Quillajaceae ( <i>Quillajo saponaria</i> )	1000	20-50% de inhibición de crecimiento (Ingesta)	Larvas de 1 <sup>er</sup> instar	Dowd et al. (2011)
Asteraceae ( <i>Vernonanthura nebularum</i> )	300 µg/g	mortalidad pupal de 30%	Pupa	Sosa et al. (2019)
Asteraceae (Fracción rica en lactona de <i>Vernonanthura nebularum</i> )	300 µg/g	Índice de oviposición control=743 ± 74, tratados=185 ± 18 (Ingesta)	NA	Sosa et al. (2019)
Burseraceae ( <i>Bursera copallifera</i> )	1000	73±0.005% y 35±0.04% reducción en peso y tamaño (Ingesta)	Larvas neonatas	Cárdenas et al. (2012)
Annonaceae ( <i>Duguetia lanceolata</i> )	946.5	50 % de mortalidad (Ingesta)	Larvas de 48 hrs de edad	Alves et al. (2018)
Meliaceae ( <i>Toona ciliata</i> :cedrelona)	1000	100% de mortalidad (Ingesta)	Larvas 3 <sup>er</sup> instar	Giongo et al. (2016)
	8.6 µg/cm <sup>2</sup>	23.5 % de disuasión (Ingesta)	Larvas 4 <sup>to</sup> instar	
Meliaceae ( <i>Trichilia pallens</i> :escopoletina)	1000	14.2% de mortalidad y 23 % de reducción del peso larval (Ingesta)	Larvas 3 <sup>er</sup> instar	Giongo et al. (2016)
Piperaceae ( <i>Piper nigrum</i> :piperina)	20,000	80% de mortalidad (Ingesta)	larvas neonatas	Tavares et al. (2011)
Piperaceae ( <i>Piper cenocladum</i> :piplartina y 4-desmetilpiplartina)	1009, 783 y 574	8, 62 y 20 % reducción peso larval. Pupa 1.1, 1.9 y 1.1 veces menor con respecto al control (Ingesta)	Larvas 1 <sup>er</sup> instar	Dyer et al. (2003)

NA= No aplica.

#### 1.2.4.1. Plantas de la familia Meliaceae

La familia Meliaceae comprende 50 géneros y 1400 especies, distribuidas ampliamente en el Trópico (Castellanos et al. 2002). El árbol del neem (*azadirachta indica*), es una planta relacionada con *M. azadarach*, pertenecientes a la familia de las Meliaceae, contienen diferentes grupos de metabolitos, de los cuáles los limonoides han presentado mayores propiedades como, insecticidas, repelentes y antihormonales. En la [Tabla 2](#) se presentan algunos extractos y limonoides, así como la toxicidad que generan. Azadiractina, 1-cinamoilmelianolona, 1-cinamoil-3-11-dihidroximeliacarpina y gedunina, son los compuestos tóxicos reportados hasta el momento como altamente efectivos en contra *S. frugiperda*.

**Tabla 2.** Extractos y limonoides de especies Meliaceae.

Planta (Origen)	Compuesto (Concentración)	Modo de acción	Referencia
<i>Cedrela salvadorensis</i> y <i>Cedrela dugessi</i> (Mexico)	Mezcla de $\alpha$ y $\beta$ fotogedunina (LC <sub>50</sub> =10 ppm); Mezcla de $\alpha$ y $\beta$ acetatos de acetafotogedunina (LC <sub>50</sub> =8 ppm); Gedunina LC <sub>50</sub> =39 ppm)	Larvicida, antialimentario e inhibidor de crecimiento	Céspedes et al. (2000)
<i>Trichilia pallida</i> , <i>Trichilia pallens</i> , y <i>Toonaciliata</i> (Brasil)	Cedrelona (LC <sub>50</sub> =365.33 ppm) Índices de disuasión fueron 23.5 y 36.3% a concentraciones de 365 y 659 ppm, respectivamente	Larvicida y disuasivo	Giongo et al. (2016)
<i>Melia azedarach</i> (Argentina)	Meliatoxina Azadiractina Extracto de fruta AI (60%)=2000 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	Larvicida y antialimentario	Carpinella et al. (2003)
<i>Melia azedarach</i> y <i>Azadirachta indica</i> (USA)	Azadiractina (LC <sub>50</sub> =1.0; EC <sub>50</sub> =0.08) 1-cinamoilmelianolona (LC <sub>50</sub> =1.30; EC <sub>50</sub> =0.04) 1-cinamoil-3-11-dihidroxi meliacarpina (LC <sub>50</sub> =1.6; EC <sub>50</sub> =0.04)	Inhibidor de crecimiento y Larvicida	Capinella et al. (2006)
<i>Melia azedarach</i> (Brasil)	Extracto de <i>M. azedarach</i> (LC <sub>50</sub> =376.74) (LC <sub>100</sub> =500)	Larvicida y antialimentario	Scapinello et al. (2014)
<i>Azadirachta indica</i> (Brasil)	Azadiractina (EC <sub>50</sub> =0.001)	Inhibidor de crecimiento	Mordue y Nisbet et al. (2000)
<i>Melia azedarach</i>	Extracto de <i>M. azedarach</i> (500 $\mu$ g/ml índice disuasivo de 80% y reducción larval de 3.7.	Inhibidor de crecimiento y antialimentario	Macleod et al. (1990)
<i>Melia azedarach</i> (Tailandia)	Extracto de <i>M. azedarach</i> (LC <sub>100</sub> =12000 mg/L)	Larvicida e inhibidor de crecimiento	Bullangpoti et al. (2012)

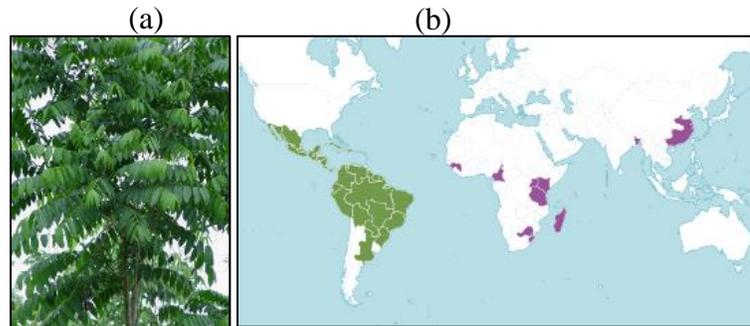
LC<sub>50</sub>= Concentración de mortalidad media; GI<sub>50</sub>= Inhibición de crecimiento media; AI(%)=Índice antialimentario.

#### 1.2.4.1.1. Plantas de la familia Meliaceae a estudiar.

##### a) *Cedrela odorata* L. (*C. odorata*)

Es un árbol de 25 m aproximadamente, corteza café muy fisurada, de hojas alternas paripinadas, de 7 a 9 folíolos de bases marcadamente asimétricas, con borde entero (Figura 3a). La inflorescencia que presenta es un racimo compuesto de 20-25 cm, las flores son bisexuales, pequeñas, con 4-5 pétalos, de color blanco azuladas, con cáliz y corola presente (Quichimbo 2012). Es una de las especies de mayor valor económico porque la madera se utiliza para construcción, artesanías, muebles y carpintería. Uno de los productos principales es la madera aserrada, también se generan residuos como ramas y hojas que provienen de aclareos y podas, así como aserrín y costeras generados en la industrialización de la madera, sin valor comercial.

El cultivo de *C. odorata* se encuentra distribuido en 42 países como se observa en el mapa de la [Figura 3\(b\)](#). Las regiones de color morado son los lugares donde *C. odorata* fue introducido y las regiones de color verde, de donde es nativo. Se observa que es nativo de México.



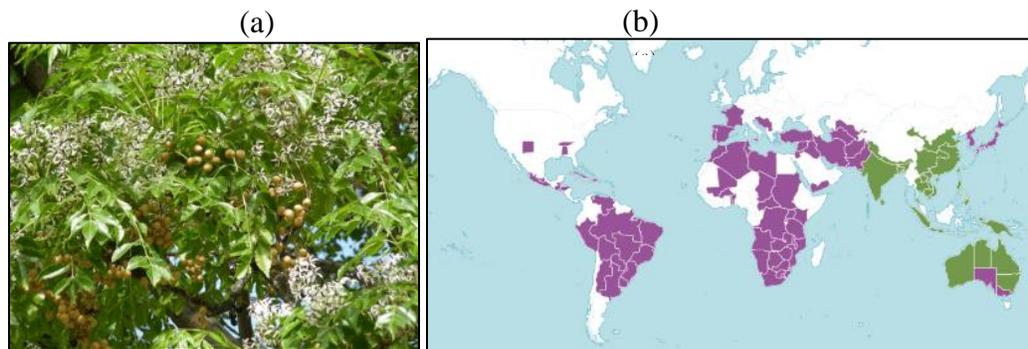
**Figura 3.** (a) Árbol de *C. odorata* (b) distribución global de *C. odorata* nativo (■) e introducido (■). (Royal Botanic Gardens kew. 2021).

Los compuestos químicos que se han identificados en *C. odorata* son los ácidos grasos, alcoholes grasos, ácido resínicos, terpenos, fenoles, taninos, esteroides, alcaloides, compuestos nitrogenados, azúcares, grasas y ceras ([Rowell et al. 2005](#)). En mayor número se encuentran los sesquiterpenos con 75 compuestos, seguido de 40 limonoides. De las hojas se han aislado 54 metabolitos ([Mariscal-Lucero et al. 2015](#); [Chini et al. 2016](#); [Wan et al. 2018](#); [Nogueira et al. 2020](#)). Estos compuestos son de interés por su aplicación en medicina, cosméticos, añejamiento de bebidas alcohólicas, como preservadores, en la obtención de aceites esenciales y como insecticidas ([Giordani et al. 2015](#)). [Céspedes y col. \(2000\)](#) aislaron compuestos de las especies de *Cedrela salvadorensis* y *Cedrela dugessi* ([Tabla 2](#)), y observaron actividad larvicida, antialimentaria e inhibidor de crecimiento sobre larvas de *S. frugiperda*.

#### **b) *Melia azedarach* L (*M. azedarach*)**

*M. azedarach*, es un árbol ([Figura 4a](#)), originario del sur y del este de Asia, se encuentra cultivada en algunas regiones tropicales y subtropicales de México; también en Centroamérica y las

Antillas. En la [Figura 4\(b\)](#), se observan regiones de color morado donde *M. azedarach* fue introducido y las regiones de color verde, de donde es nativa. A pesar de que no es nativa de México, se cultiva por su madera. La actividad insecticida de *M. azedarach* se debe a triterpenoides biológicamente activos, los cuales han presentado efecto antialimentario, produciendo muerte y malformaciones de generaciones subsecuentes de insectos plaga ([Chiffelle et al. 2009](#)).



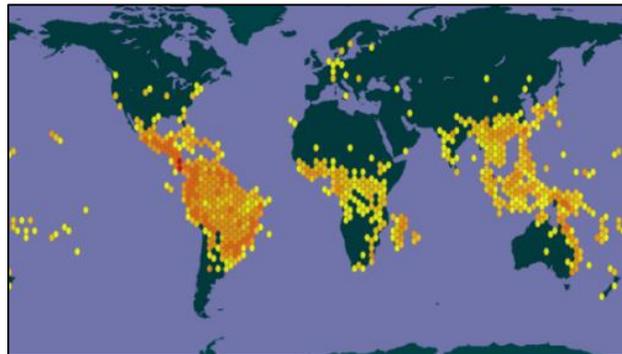
**Figura 4.** (a) Árbol de *M. azedarach* y (b) distribución global de *M. azedarach* nativo (■) e introducido (■). (Royal Botanic Gardens kew. 2021).

De las hojas de *M. azedarach* se han aislado compuestos como son la rutina, quercitina y kaempferol 3-*O*-rutinosido ([Tang y Eisenbrand, 1992](#)). Por otro lado, [Sen y Brata. \(2012\)](#) identificaron en el extracto metanólico de hojas de *M. azedarach* a la quercitina (16.5 %), ácido palmítico (15.5 %) y fitol (11.4 %) en mayor concentración. Extractos de *M. azedarach* han mostrado actividad antidiabética, citotóxica, antibacteriana y antioxidante. Y de manera particular los triterpenoides de esta planta han mostrado actividad antifúngica, antialimentaria y citotóxica ([Carpinella et al. 2003](#)). En la [Tabla 2](#) se presentan actividades tóxicas que se observaron de *M. azedarach* contra *S. frugiperda*.

#### ***1.2.4.2. Plantas de la familia Piperaceae.***

El género *Piper*, está ampliamente distribuido en el Trópico. En el 2019 se reportaron 3,021 especies ([Figura 5](#)) en todo el mundo. En México, se estima que existen alrededor de 200 especies

del género *Piper*. Algunas especies han presentado efecto insecticida, bactericida, fúngica y genotóxicos (Pereira et al. 2008 y Scott et al. 2008). Son plantas con capacidad para bloquear el crecimiento de insectos, repelentes, antihormonales y otras propiedades de control. De las semillas, hojas, y corteza, se han extraído compuestos fitoquímicos como son las amidas, alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, glucósidos, terpenoides y compuestos fenólicos, (Mgbeahuruike et al. 2017).



**Figura 5.** Distribución global del género *Piper* de Global biodiversity information facility (Gbif 2019).

El efecto insecticida de los extractos o metabolitos depende del tipo de planta, disolvente, parte de la planta, tipo de aplicación, y tipo de extracción. En la [Tabla 3](#) se presenta información sobre algunas especies del género *Piper* con actividad insecticida.

**Tabla 3.** Especies del género *Piper* con actividad insecticida.

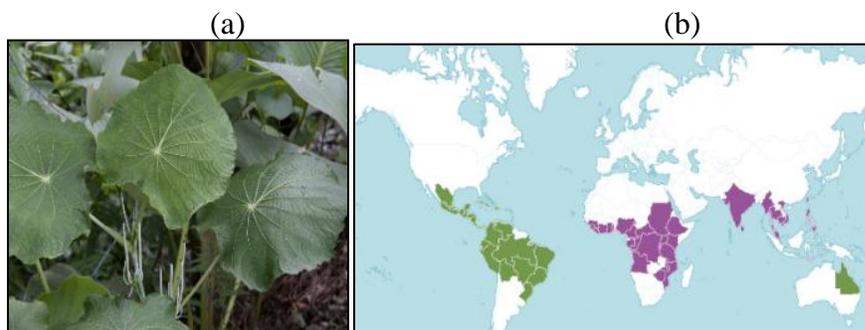
Larva	Planta y disolvente	Concentración y aplicación	Mortalidad (%)	Referencia
<i>S. frugiperda</i> 3 <sup>er</sup> instar	<i>Piper tuberculatum</i> Espiga (EtOH)	1000 µg/ml (tópica)	50 Cesó la alimentación	Soberón- Risco et al. (2012)
<i>Anticarsia gemmatalis</i> 4 <sup>to</sup> instar	<i>Piper tuberculatum</i> Semilla (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH 2:4 v/v)	302.1 µg/insecto (tópica)	90	Navickiene et al. (2000)
<i>Anticarsia gemmatalis</i> 4 <sup>to</sup> instar	<i>Piper tuberculatum</i> Hojas (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH 2:4 v/v)	586.2 µg/insecto (tópica)	90	Navickiene et al. (2000)
<i>Anticarsia gemmatalis</i> 4 <sup>to</sup> instar	<i>Piper tuberculatum</i> Tallos (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH 2:4 v/v)	599.7 µg/insecto (tópica)	90	Navickiene et al. (2000)
<i>S. frugiperda</i> 3 <sup>er</sup> instar	<i>Piper aduncum</i> L. Hojas (agua, obtiene aceite)	1169.7µg/ml (conta cto) y 1.07 µL/mg insecto (tópica)	50 y 50	Fazolin et al. (2016)
<i>S. frugiperda</i> Huevos	<i>Piper nigrum</i> L. Frutos (EtOH)	10000 µg/ml	88.8 (recién puestos), 36.3 (1 día) y 150 (2 días)	Tavares et al. (2011)
<i>Yponomeuta Cagnagella</i> larva prepupal	<i>Piper nigrum</i> L. Frutos (EtOAc: agua (1:1 v/v))	0.08% (ingesta)	50	Scott et al. (2005)

#### 1.2.4.2.1. Plantas de la familia Piperaceae a estudiar.

##### a) *Piper umbellatum* L. (*P. umbellatum*)

La hierba de culebra, como se conoce comúnmente, es un arbusto subleñoso (Figura 6a) que puede crecer hasta 4 m de altura, es nativa de México, Guatemala y otros países (Figura 6b).

Los Chinantecos la utilizan como medicamento; sin embargo, en otros lugares es considerada maleza invasiva, sin valor comercial (García-Mendoza et al. 2004).

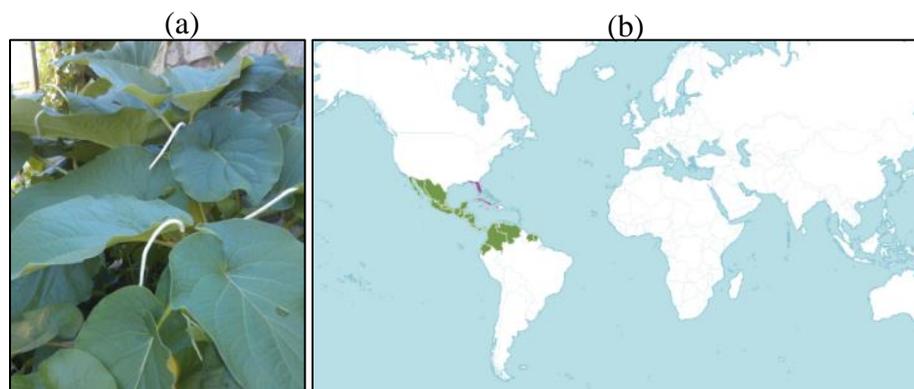


**Figura 6.** (a) Arbusto de *P. umbellatum* y (b) distribución global de *P. umbellatum* nativo (■) e introducido (■). (Royal Botanic Gardens kew. 2021).

Del aceite esencial de *P. umbellatum* se han identificado al germacreno D (55.8%), biciclogermacreno (11.8%), trans-cariofileno (6.3%) y  $\beta$ -cubebeno (3,2%) como compuestos mayoritarios. Este aceite presentó actividad inhibitoria contra *E. Coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *C. xerosis*. (Perigo et al. 2016). También Maia y Andrade (2009), identificaron del aceite esencial de hoja de *P. umbellatum* de Brasil, al  $\beta$ -cariofileno (37.5%), germacreno D (11.9%) y E-nerolidol (9.1%). De igual manera Pino y colaboradores (2005), identificaron en el aceite esencial de hojas de *P. umbellatum* cultivado en Cuba, safrol (48.7%), germacreno D (7.9%) y  $\delta$ -cadineno (5.6%). Con respecto a la toxicidad, Carmona-Hernandez y col. (2014), observaron que el extracto etanólico de *P. umbellatum* a 34.54  $\mu\text{g/ml}$  mostró una mortalidad del 50% de *D. Melanogaster*, y se reportó que el 4-nerolidilcatecol compuesto mayoritario de *P. umbellatum* presentó actividad antifúngica contra cepas de *Trichophyton rubrum* (Greatti et al. 2020).

#### b) *Piper auritum* Kunth (*P. auritum*)

La planta es un arbusto subleñoso de hasta 4 m de altura (Figura 7a), conocida como hierba santa o acuyo, usada como condimento en países de América Central. *P. auritum* es nativa de Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guayana Francesa, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Surinam y todo México. Fue introducido a Cuba, Florida, Haití, Hawái, Jamaica, Islas de Sotavento (Figura 7b).



**Figura 7.** (a) Arbusto de *P. auritum*; (b) distribución global de *P. auritum* nativo (■) e introducido (■). (Royal Botanic Gardens kew. 202. <http://powo.science.kew.org/taxon/680520-1>).

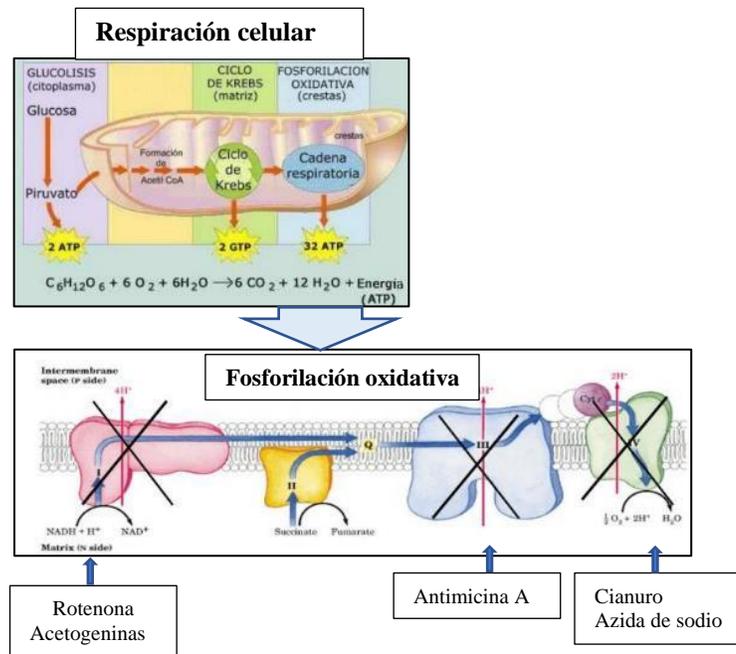
Sabemos que *P. auritum* es ampliamente conocida por ser usada como condimento, pero también por poseer actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica y antidermatofítica (Ríos et al. 2007). Por otro lado, se conoce que *P. auritum* presenta alcaloides, kavapironas, piperólidas, fenilpropanoides, amidas y compuestos aromáticos con cadenas alquílicas largas (Mata et al. 2004). En total 104 metabolitos se han aislado de las diferentes partes de la planta de *P. auritum* (Parmar et al. 1997; Pino et al. 1998; Rodríguez et al. 2013). Del aceite esencial de hojas deshidratadas de *P. auritum* se ha identificado safrol (93.24%), miristicina (4.34%), metil eugenol (0.46%) y  $\gamma$ -terpineno (Ríos et al. 2007). Por otro lado, Conde-Hernández y Guerrero-Beltrán (2014), identificaron, safrol, fitol y hexadecen-1-ol, siendo el safrol el compuesto mayoritario al que se le atribuye su actividad antibacteriana e insecticida (Bhardwaj et al. 2010)

### **1.2.5. Mecanismos de acción y actividades de los metabolitos sobre insectos.**

Los metabolitos de origen botánico con actividad tóxica pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología de los insectos. Los mecanismos de acción que se han reportado son aquellos que afectan lo siguiente:

**(a) Producción de energía.** Se trata de un proceso catabólico, llevado a cabo por las células con la finalidad de librar energía (ATP) de los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) provenientes de la alimentación o de los depósitos celulares, son degradados a moléculas sencillas como ácido láctico, CO<sub>2</sub> o urea. El proceso se divide en tres etapas: la primera, glucólisis, se lleva a cabo en el citosol; la segunda, el ciclo de Krebs, se lleva a cabo en la matriz mitocondrial; y la tercera, la fosforilación oxidativa (Figura 8). En esta última división, se ha observado que metabolitos como las acetogeninas y la rotenona inhiben enzimas implicadas en la respiración celular (interfieren en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa) como

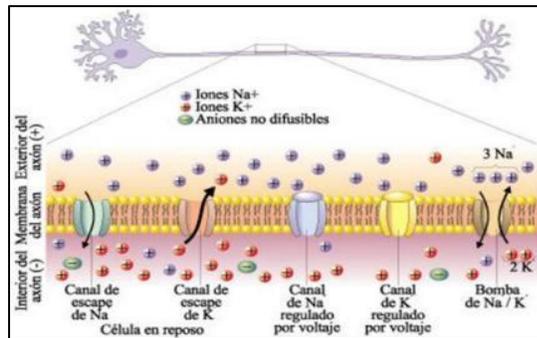
el NADH mitocondrial: ubiquinona oxidorreductasa (complejo I de la cadena respiratoria). Impiden la transferencia electrónica desde un centro Fe-S a la ubiquinona (Figura 8) (Álvarez-Colom et al. 2009).



**Figura 8.** Esquema de la inhibición por metabolitos en la fosforilación oxidativa (Garret y Grisham 2008).

**(b) Sistema nervioso.** Este se divide en dos partes, sistema simpático y sistema nervioso central. El **sistema simpático**, encargado de manejar órganos viscerales y sistema sanguíneo de los insectos, está conectado al sistema central por medios del sistema endocrino o glándulas internas de secreción, los órganos o tejidos que segregan hormonas al torrente sanguíneo y que regulan algunas de las funciones del cuerpo. El **sistema nervioso central**, consiste en un cerebro y un ganglio subesofágico conectados entre sí por cadenas ventrales de nervios. El impulso nervioso es captado por las dendritas y viaja por la neurona por medio del axón, se encuentra con los canales de sodio, estas se abren y se cierran a su paso, por el gradiente de iones (Figura 9). Sin embargo, algunos metabolitos derivados de plantas entran al sistema nervioso y generan una alteración en el intercambio catiónico, ya que estos se adhieren impidiendo el cierre de los canales de sodio, provocando una despolarización por la acumulación de iones de sodio dentro del axón

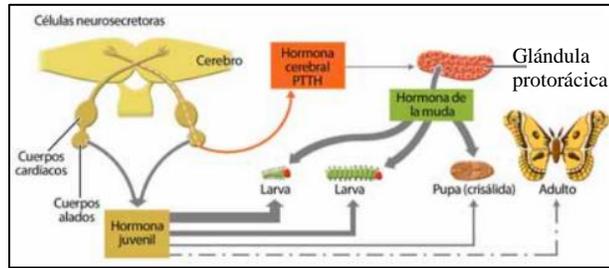
de la neurona, esto provoca que las células nerviosas se mantengan excitadas y los insectos sufren ataxia, convulsiones y muerte (Coronado 1994).



**Figura 9.** Esquema del sistema nervioso

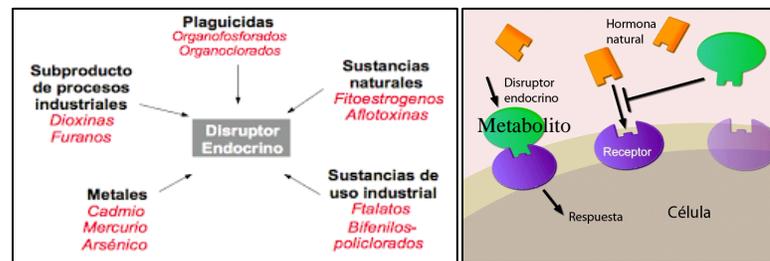
(<https://fabiola.game.blog/2019/08/26/potenciales-de-membrana-y-potenciales-de-accion/>)

**(c) Sistema endocrino.** Involucra la compleja metamorfosis de los insectos, en la que intervienen varias hormonas producidas por neuronas secretoras y glándulas endocrinas (Figura 10). Las neuronas secretoras, a través de los ganglios cerebrales, producen la hormona ecdisiotropina que se acumula en los cuerpos alados. Bajo la acción de la ecdisiotropina, las glándulas protorácicas, secretan ecdisona (hormona de la muda). Los efectos de la hormona de la muda varían respecto a la concentración de la hormona juvenil (Neotenina), producida por los cuerpos alados, en la hemolinfa. Cuando los cuerpos alados dejan de producir la hormona juvenil, la larva ya no experimenta una simple muda, sino que comienza su metamorfosis, esto sucede de manera normal. Sin embargo, se sabe que algunos metabolitos derivados de plantas como: azadiractina, gedunina, macdougalina, cedrelona, roliniastatina-1, trans-anetol y limoneno (Aribia et al. 2017) actúan como disruptores endocrinos (Figura 11) regulando el crecimiento, la regeneración de tejidos, la reproducción, la muda y la metamorfosis debido a la inhibición de las hormonas ecdisona y juvenil (Neotenina) (Álvarez-Colom et al. 2009).



Las glándulas y hormonas que regulan la metamorfosis (larva, pupa y adulto) son:  
**Células neurosecretoras:** segregan hormona de activación  
**Glándula protorácica:** estimulada por la hormona de activación y segrega la ecdisona  
**Cuerpos alados:** segrega hormona juvenil

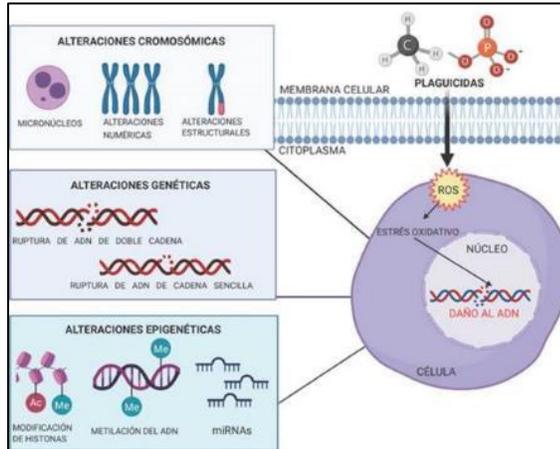
**Figura 10.** Diagrama del control hormonal de la metamorfosis en insectos.  
 (mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448154630.pdf)



**Figura 11.** Ejemplos de algunos disruptores endocrinos y su inhibición.  
 (https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/)

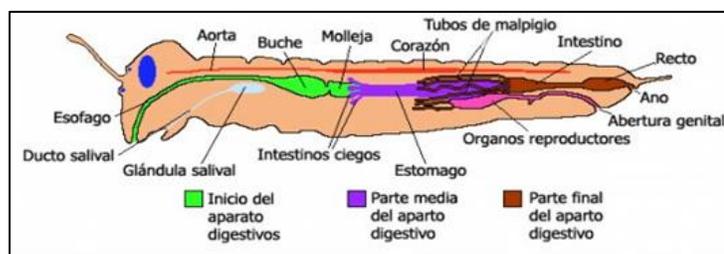
**(d) Replicación del ADN.** El ADN es una biomolécula en donde se encuentran los genes que dan origen al ARN mensajero para la síntesis de proteínas que tienen participación en la función celular. La replicación es el proceso de síntesis de ADN que da origen a una copia de otra previa que actúa como modelo. Por otro lado, se sabe que algunos insecticidas inducen mecanismos genotóxicos, relacionados con su potencial para afectar el material genético en forma directa o indirecta. El daño directo puede ser de tipo estructural o funcional y se produce en los cromosomas, el ADN y las proteínas histonas, conduciendo a la inhibición de los procesos de replicación y transcripción (Figura 12). Si no se reparan pueden conducir al desarrollo de enfermedades. El daño indirecto modula la expresión génica a nivel de ARNs no codificantes, patrones de metilación del ADN e histona desacetilasas, induciéndose a modificaciones en la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular (Kvitko et al.

2012). Por otro lado, la curcumina y la piretrina inducen la muerte celular autofágica en la línea celular Sf9 de *S. frugiperda* (Xu et al. 2017). Además, la azadiractina inhibe la proliferación e induce la apoptosis, debido a los cambios en los lisosomas causados por la apoptosis inducida por la azadiractina en las células Sf9 de *S. frugiperda* (Wang et al. 2015).



**Figura 12.** Diagrama de los daños genéticos producidos por insecticidas.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-74882020000200025#B34](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882020000200025#B34)

**(e) Proceso digestivo.** El sistema digestivo de los insectos (Figura 13), consiste en un largo tubo abierto por los dos extremos, con regiones especiales para triturar y almacenar el alimento, la producción de enzimas y la absorción de nutrientes, va desde la boca hasta el ano (Vázquez-Luna et al. 2007). En la digestión se lleva a cabo la ruptura de proteínas, lípidos y glúcidos a moléculas más pequeñas, tales como aminoácidos, ácidos grasos y monosacáridos. Por otro lado, se ha reportado que algunos metabolitos como la 1-cinamoilmelianolona, meliatoxina, cis-annonacina-10-ona, pinocembrina y gedunina por mencionar algunos; originan la disminución enzimática, en la que se reduce la actividad de  $\alpha$ -amilasa, quitinasa y proteasa. También son la causa de que las células del intestino medio no sean reemplazadas y generen la inhibición del peristaltismo (Toto-Blessing et al. 2010; Bezzar-Bendjazia et al. 2015). Además, inhiben la actividad de enzimas hidrolíticas, disminuyendo la digestibilidad de las moléculas que generan energía.



**Figura 13.** Aparato digestivo de los insectos.

([http://fomax.inbio.ac.cr/cibercolmenas/index.php?option=com\\_zoom&Itemid=28&page=view&catid=17&key=8&hit=](http://fomax.inbio.ac.cr/cibercolmenas/index.php?option=com_zoom&Itemid=28&page=view&catid=17&key=8&hit=))

### 1.2.6. Toxicología de las plantas Meliaceae y Piperaceae.

Una ventaja de gran relevancia que han presentado algunos extractos de plantas es la de presentar bajos niveles de toxicidad, provocando bajo riesgo a la salud. Estrada-Reyes y col. (2013), realizaron estudios sobre la toxicidad aguda que causan los extractos de hexano, EtOAC, MeOH y acuoso de *P. auritum* sobre ratones, con valores de  $LD_{50} = 1264 \text{ mg/kg}$ ,  $LD_{50} = 1264 \text{ mg/kg}$ ,  $LD_{50} > 2900 \text{ mg/kg}$  y  $LD_{50} = 3800 \text{ mg/kg}$  respectivamente. Ellos mencionan que las pruebas de toxicidad aguda muestran que la ingesta de extractos de diferentes polaridades de *P. auritum* no implica ningún riesgo para la salud. También el extracto hidroetanólico de *P. umbellatum*, presentó baja toxicidad in vitro ( $LD_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ), y en vivo, en dosis superiores a  $LD_{50} = 2000 \text{ mg/kg}$  no causaron signo o síntoma alguno de toxicidad (da Silva et al. 2014). Así mismo, el extracto etanólico de corteza de *C. odorata* al 70%, en una concentración de  $5000 \text{ mg/kg}$ , no generaron alteraciones de comportamiento y mortalidad en ratones (Giordani et al. 2015). De igual manera, Zakir-ur-Rahman y col. (1991), observaron que extractos acuosos y alcohólicos de flores y semillas de *M. azedarach* no presentaron toxicidad en ratones y ratas a dosis de  $1500 \text{ mg/kg}$  por vía oral. Por otro lado, se sabe que azadiractina a concentraciones superior de  $3540 \text{ mg/kg}$  presenta baja toxicidad en los mamíferos (Mpumi et al. 2016). *Nicotiana tabacum* L., *Anadenanthera colubrina* Vell y *Agave americana*, en concentraciones de  $7 \text{ mg}$  por abeja, no afectaron el proceso de polinización (Pereira et al. 2020).

### 1.3. Métodos para la extracción, separación e identificación de metabolitos.

Las plantas contienen metabolitos secundarios que pueden ser de utilidad para el control biológico. Para tener acceso a estos metabolitos se debe realizar una extracción que puede realizarse tanto con métodos convencionales clásicos, como con métodos innovadores, y ya sea a escala laboratorio o industrial (Azmir et al. 2013).

Un aspecto que se debe de considerar a la hora de realizar la extracción es el tipo de disolvente, ya que se recomienda que el disolvente sea afín al grupo de compuestos o metabolitos que se quieran extraer. En la [Tabla 4](#) se presentan algunos grupos de metabolitos extraídos con hexano y EtOH.

**Tabla 4.** Grupos de metabolitos extraídos con hexano y EtOH como disolventes.

Extracto hexánico	Extracto etanólico
Aceites esenciales	Taninos gálicos
Triterpenos	Taninos y catequinas
Esteroles	Alcaloides
Carotenoides	Aminas cuaternarias
Acidos grasos	Antocianinas
Alcaloides	Leucoantocianinas
Agliconas flavonoides	Cumarinas
Cumarinas	Antracénoides
Emoides	Flavonoides
	Chalconas
	Esteroides
	Triterpenos
	Esteroles insaturados
	Antraquinonas

(Bruneton 2001).

#### 1.3.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El ultrasonido permite reducir el tiempo de extracción, la energía y el volumen de disolventes. Este método, se aplica a la matriz vegetal en el rango de frecuencias de 20 kHz a 100 MHz, donde mediante un fenómeno de cavitación, la mezcla de fitoquímicos es extraída por difusión a través de la pared celular y por enjuague del contenido de la célula después del rompimiento de la pared

celular. Durante la cavitación se produce una gran cantidad de energía que puede incrementar la temperatura del extracto hasta 5000 K, por lo cuál es recomendable utilizar un sistema de enfriamiento a fin de evitar la pérdida por evaporación de los compuestos altamente volátiles; el proceso de extracción con ultrasonido puede alcanzar presiones de 1000 atm. El contenido de humedad de la muestra, el grado de molienda, el tamaño de las partículas y el disolvente, son factores muy importantes para obtener una extracción eficiente y eficaz ([Azmir et al. 2013](#)).

La separación e identificación de una mezcla compleja de fitoquímicos puede realizarse con el apoyo de diferentes técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Debido a su fácil implementación, la cromatografía en columna y la cromatografía en capa fina (TLC) son las comúnmente utilizadas en el análisis de fitoquímicos ([Sasidharan et al. 2011](#)).

### 1.3.2. Cromatografía en columna (CC).

Involucra una fase estacionaria, conocida como soporte ([Tabla 5](#)), y una fase móvil o eluyente. La fase estacionaria, usualmente gel de sílice (SiO<sub>2</sub>) o alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), se utiliza empacada en una columna de vidrio ([Sasidharan et al. 2011](#)).

**Tabla 5.** Soportes para separar compuestos

<b>Soportes</b>	<b>Usado para separar</b>
Gel de sílice	Aminoácidos, alcaloides, azúcares, ácidos grasos, lípidos, etc.
Alúmina	alcaloides, fenoles, esteroides, vitaminas y carotenos
Celite	Esteroides y cationes inorgánicos
Celulosa	Aminoácidos y alcaloides
Almidón	Aminoácidos
Sephadex	Aminoácidos y proteínas

La muestra es colocada en la parte superior de la columna, en solución o sólida, y posteriormente eluída mediante un solvente. El eluyente se colecta por la parte inferior de la columna en volúmenes de 5-15 mL, dependiendo de la forma como se lleve a cabo el proceso de separación de la mezcla de fitoquímicos.

***(a). Cromatografía en Capa Fina (TLC).***

Es una técnica de separación (afinidad) en la que la fase estacionaria está extendida sobre un soporte (placa vertical), y la muestra es aplicada en puntos o en banda en un extremo inferior. La placa es sumergida en un solvente (o mezcla de solventes) dentro de una cámara cromatográfica para la elusión de la muestra. La elusión es la migración de cada componente de la mezcla hacia la parte superior de la placa. Estos compuestos son identificados a partir del cálculo de su coeficiente de reparto, que es característico de todo compuesto. El factor de retardo ( $R_f$ ), es el cociente entre la distancia recorrida por la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil. El valor de  $R_f$  depende de la polaridad del solvente o mezcla de solventes utilizado(a) como fase móvil (Kumar et al. 2007). Los valores de  $R_f$  siempre son menores o iguales a uno ( $R_f=1$ ). Compuestos incoloros pueden ser observados mediante el revelado de la placa. Este se puede realizar por métodos químicos, mediante el uso de reactivos (Tabla 6), o métodos físicos (ópticos), por exposición de la placa a irradiación UV de 254 nm y/o 365 nm.

**Tabla 6.** Métodos para el revelado de grupos de metabolitos.

Grupo de metabolito	Metodología (Referencia)	Nombre de la prueba	Resultado
Alcaloides	Se roció la placa con reactivo de Dragendorff. (Kumar et al. 2007)	Prueba de Dragendorff	Mancha naranja
	1ml del extracto con 6 gotas de reactivo de Wagner. (Chanda et al. 2006)	Prueba de Wagner	Precipitado rojo-marrón
Saponinas	Añadir 0.5ml de filtrado con 5ml de agua destilada y agitar bien. (Parekh y Chanda 2007)	Prueba de espuma	Presencia de espuma
Taninos	Se añadirá FeCl <sub>3</sub> al 10% a 2-3ml de extracto metanólico (1:1). (Kumar et al. 2007)	Prueba de Braemer	Solución color azul oscuro o gris verdoso
Terpenos	A 1ml de extracto metanólico, añadir 1ml de CHCl <sub>3</sub> , 2 ml de anhídrido acético, 2 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado. (Kumar et al. 2007)	Prueba de Liebermann-Burchard	Mancha azul verdoso
Alcoholes	Aplicar solución de vainillina al 1% en etanol al 95% sobre la placa y se calentó a 100 °C. (García 2004)	Vainillina	Mancha violeta y azul verdoso
Aminoácidos	Asperjar solución de ninhidrina al 1% en n-butanol sobre la placa y calentar a 100 °C por 5 min. (García 2004)	Ninhidrina	Mancha azul/violeta presencia de aminoácidos y aminos
Carbonilos: aldehidos y cetonas	La placa se reveló con el reactivo de Fehling. (García 2004)	Reactivo de Fehling	Precipitado rojo indica la presencia del grupo carbonilo
Hidroxilo: fenoles y taninos	Disolver 0.5 g de FeCl <sub>3</sub> en 50 ml de agua destilada, asperjar sobre la placa. (García 2004)		Manchas azul oscuro

### (c). Cromatografía de gases (GC)

Se aplica al análisis de sustancias volátiles. Sustancias no volátiles a presiones ordinarias pueden analizarse por GC previa transformación de éstos (Herbert y Johnstone 2002).

### 1.3.4. Técnicas espectroscópicas.

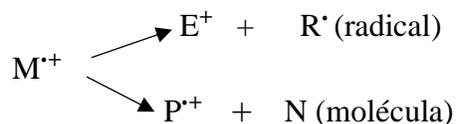
La espectroscopia se basa en un conjunto de técnicas que miden la respuesta de un analito (elemento, compuesto o ion) a la aportación de energía (absorción, emisión o luminiscencia). Las técnicas espectroscópicas se diferencian según la forma en la que se encuentra el analito en el momento de sufrir el proceso espectroscópico Según el rango de energía que presente la radiación electromagnética existen diferentes métodos; ultravioleta (UV), espectroscopia visible, espectroscopia de fluorescencia, resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR). Por otro

lado, una técnica analítica ampliamente usada es la espectrometría de masas (MS), se usa para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas espectroscópicas (Saavedra-Charca et al. 2015).

**(a) Espectrometría de masa (MS)**

Es una técnica analítica donde, las moléculas (M) de interés se someten a electrones acelerados a través de un campo eléctrico y originan especies cargadas:  $M + e^- \longrightarrow M^{*+} + 2e^-$ .

En este caso  $M^{*+}$  es un catión-radical molecular. Por lo general  $M^{*+}$  sufre una fragmentación debido a su estado excitado y forma iones:



Los iones  $E^+$  y  $P^{*+}$  pueden fragmentarse sucesivamente. El tipo de fragmentación depende del tipo de estructura de la molécula. La carga total de los iones se representa por  $q(q=ze)$ , la cual es la carga del electrón y  $z$  el número de cargas sobre el ión. Los iones producidos atraviesan el analizador de masa de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los iones son detectados como corrientes iónicas cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas. El pico más intenso observado en el EM se denomina pico base y se usa como intensidad de referencia para el resto de los picos significativos. La ionización de la muestra se puede llevar a cabo por condiciones de alto vacío, por impacto electrónico (EI), o a presión atmosférica (API). En este último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realiza una ionización por electrospray

(ESI), mientras que, si es en una fase gaseosa, se efectúa una ionización química (APCI) o bien una fotoionización (APPI) (Saavedra-Charca et al. 2015).

**(b) Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

La RMN una técnica espectroscópica de absorción usada para determinar la estructura de compuestos orgánicos y organometálicos, cuyo fundamento radica en la propiedad que tienen ciertos núcleos atómicos de absorber energía cuando son sometidos a un campo magnético y radiación de frecuencia. Cuando cesa el campo magnético, la energía absorbida es liberada de los núcleos atómicos y es recibida por la antena y analizada

**Momento magnético ( $\mu$ ).** Las partículas cargadas que giran sobre su propio eje crean un campo electro-magnético. Es decir, cuando un núcleo atómico (protones y neutrones) cargado gira, arrastra la carga en un círculo y la circulación de carga que resulta genera también un campo magnético llamado momento magnético ( $\mu$ ), y hace que el núcleo actúe como un dipolo magnético similar al de un imán.

**Momento angular L.** De igual manera, el giro del núcleo alrededor de su eje provoca un momento angular, que se expresa como  $L = I h_{\text{mod}}$ , la cual  $h_{\text{mod}} = h/2\pi$  ( $h$  es la constante de Planck).

**Estados cuánticos de espín ( $m_I$ ).** El cálculo del número cuántico de espín para un núcleo se realiza sumando los espines de protones y neutrones desapareados. Los estados cuánticos de espín vienen dados por  $m_I$ , y toma valores de:  $m_I = -I, -I+1, \dots, I-1, I$ .

No todos los núcleos de los isótopos presentan espín nuclear ( $I$ ), sólo lo presenta aquellos cuyos números de masa atómica, carga o ambos sean impares. Los isótopos que tienen número de masa impar, independientemente de su número de carga, tendrá por espín nuclear un número impar

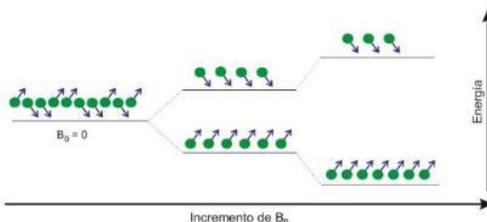
dividido por dos tal como 1/2, 3/2, etc., y los núcleos con masa par y carga impar tendrán valores de espín nuclear en números enteros.

Existen diferentes tipos de núcleos, clasificados en tres grupos como se presenta en la [Tabla 7](#).

**Tabla 7.** Características de los grupos.

Características	Grupo 1:	Grupo 2:	Grupo 3:	
	Esfera Sin giro	Esfera Con giro	Elipsoide con giro Alargado	Elipsoide con giro Aplastado
Figura				
Observable en RMN	No	Si	Si	Si
Espín nuclear (I)	0	1/2	1	>1
Momento angular (L)	0	1/2	$I \hbar_{mod}$	$I \hbar_{mod}$
Momento magnético ( $\mu$ )	0	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$
Momento cuadrupolar (Q)	0	0	> 0	< 0
Ejemplo de núcleos	$^{12}\text{C}$ , $^{18}\text{C}$ , $^{32}\text{S}$	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{19}\text{F}$	$^2\text{H}$ y $^{14}\text{N}$	$^{17}\text{O}$ y $^{35}\text{Cl}$

Cuando aplicamos un **campo magnético externo ( $B_0$ )**,  $m_I = 1/2$  y  $\mu$  de los núcleos se alinean con el campo y con  $m_I = -1/2$ ,  $\mu$  esta opuesto al campo magnético ([Figura 14](#)).



**Figura 14.** Diferencia de población en niveles. ([Laurella 2016](#)).

Al aplicar una radiación electromagnética de frecuencia (ondas de radio) adecuada, se les proporciona a los núcleos energía para pasar de un nivel de energía inferior a un nivel de energía superior. Cuando la radiación electromagnética y la precesión del núcleo entran en resonancia se produce la absorción ([Joseph 1982](#); [Laurella 2016](#)).

## 2. JUSTIFICACIÓN

---

*Spodoptera frugiperda* es un insecto originario de América. No obstante, debido a su gran capacidad de adaptación y migración, actualmente se le ubica en África, Asia y Oceanía. En México, cultivos de maíz invadidos con las voraces larvas de *S. frugiperda* han generado pérdidas superiores al 50%. El control de *S. frugiperda* ha sido efectivo al aplicar insecticidas químicos; sin embargo, debido a problemas de salud detectados en personas expuestas a este tipo de productos (trastornos neurológicos y reproductivos, cáncer e incluso la muerte), su uso está restringido y actualmente se impulsa el desarrollo de productos inocuos para el hombre y organismo benéficos, así como amigables con el medio ambiente. Es importante mencionar que algunos insecticidas químicos tienden a ser recalcitrantes y su larga permanencia en el medio ambiente, además de contaminarlo, ha favorecido el desarrollo de resistencias en los insectos plaga, entre ellos *S. frugiperda*.

Los insecticidas derivados de plantas se consideran una alternativa amigable para el hombre y el medio ambiente, así como con baja posibilidad de generar resistencias debido a sus diversos modos de acción. Se ha reportado que México cuenta con 200 especies de plantas de la familia Piperaceae y 126 especies de la familia Meliaceae. Dado que plantas de estas familias son actualmente explotadas en la producción de madera y otras están catalogadas como malezas, se considera que ambas especies de plantas deben ser estudiadas para su aprovechamiento en la producción de insecticidas.

Por lo anterior, el presente proyecto propone evaluar el efecto tóxico de los extractos crudos de *Melia azedarach*, *Cedrela odorata*, *Piper umbellatum* y *Piper auritum*, en contra de larvas primer instar de *Spodoptera frugiperda*. Dado el uso de *P. auritum* como condimento en países de

Latinoamérica como es México, el efecto de su extracto etanólico en el ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* también fue estudiado.

### 3. HIPÓTESIS

---

Los extractos de *C. odorata*, *P. umbellatum* y *P. auritum* cultivadas en México, presentarán actividad tóxica en contra de larvas de *S. frugiperda*, en magnitud comparable con la obtenida con el extracto de *M. azedarach*, planta utilizada como control positivo.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo general

Disponer de información sobre el nivel de toxicidad en contra de *S. frugiperda* de extractos etanólicos y hexánicos obtenidos de las hojas secas y deshidratadas de las plantas *M. azedarach*, *C. odorata*, *P. umbellatum* y *P. auritum* en contra de *S. frugiperda*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar y realizar un análisis comparativo de la actividad tóxica en contra de *S. frugiperda* de los extractos etanólicos y hexánicos obtenidos de las hojas frescas y deshidratadas de *M. azedarach*, *C. odorata*, *P. umbellatum* y *P. auritum*.
2. Determinar la actividad biológica en el ciclo de vida de *S. frugiperda*, del extracto etanólico o hexánico que generó los mayores porcentajes de mortandad en contra de las larvas de este insecto.
3. Identificar los grupos de fitoquímicos predominantes en el extracto identificado como el más tóxico en contra de *S. frugiperda* y aislar el compuesto predominante para la evaluación de su toxicidad en contra de larvas de *S. frugiperda*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1. Colecta de plantas e identificación

*Cedrela odorata*, *Piper umbellatum*, *Melia azedarach* y *Piper auritum* fueron las plantas seleccionadas para esta investigación. Las hojas de las dos primeras especies se recolectaron en Santos Reyes Nopala, Oaxaca, municipio ubicado a una altitud de 474 m (16°06'23"N, 97°08'39"W; <https://www.los-municipios.mx/municipio-santos-reyes-nopala.html>). Las plantas de *Piper auritum* y *Melia azedarach* se recolectaron en el municipio de: San Pedro Atoyac, Oaxaca, el cual se ubica a una altitud de 242m (16°29'17"N, 97°59'14"W; <https://www.los-municipios.mx/municipio-san-pedro-atoyac.html>). La familia y especie de las plantas recolectadas fueron identificadas por la M.C. Ernestina Cedillo Portugal, de la Universidad Autónoma de Chapingo, México. Muestras de cada planta fueron depositadas en el herbario Jorge Espinosa Salas ("JES") de la misma Universidad. Cada especie de planta recolectada se dividió en dos lotes para eliminar las hojas frescas molidas (FL) y las hojas secas (LD) de cada una. Las hojas se secaron a temperatura ambiente y luego se redujeron de tamaño a malla 34 (0,45 mm) con una licuadora (Oster® Modelo BPST02-B00-013) (Viji y Murugesan 2010). Las hojas frescas se congelaron con nitrógeno líquido antes de molerlas. Los polvos obtenidos de las hojas de cada planta se vertieron en botellas de color ámbar para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso.

#### 5.1.1. Cálculo de la humedad

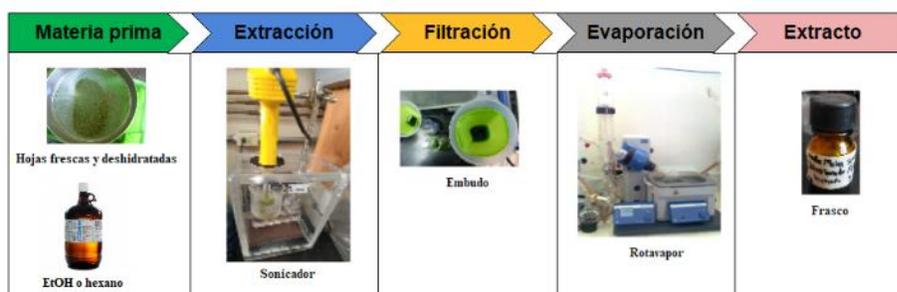
Después del secado de las hojas, se procedió a calcular el porcentaje de humedad con la Ecuación (1) usada para obtener la humedad total (Método 930.15 de la AOAC 1999).

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W} \right) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Dónde:  $W_1$ = peso crisol más muestra húmeda;  $W_2$ = peso crisol más muestra seca;  $W$ = peso muestra húmeda.

## 5.2. Extracción de compuestos fitoquímicos

La extracción fitoquímica se realizó en lotes de 5 g de polvo de cada hoja fresca o deshidratada de *Cedrela odorata*, *Piper umbellatum*, *Melia azedarach* y *Piper auritum*. Posteriormente se sumergió en 30 mL de disolvente, ya sea EtOH (Macron Fine Chemicals TM, grado reactivo ACS) o hexano (J.T. Baker, 98.5%). La extracción se llevó a cabo durante 10 minutos a 25-30 °C usando un homogeneizador ultrasónico (Hielscher UP200Ht, sonotrodo S26D7). Los fitoquímicos en solución se separaron por filtración (filtro Whatman nº 3) y la operación de extracción se realizó tres veces, cada vez utilizando una porción nueva de 30 mL de disolvente. Los filtrados de las tres extracciones se mezclaron y concentraron en un rotavapor (Büchi modelo R-124), como se presenta en la [Figura 15](#). Los extractos crudos se vertieron en viales de color ámbar de peso conocido y se almacenaron a -4 ° C hasta su uso ([Kimbaris et al. 2006](#)).



**Figura 15.** Metodología para la extracción de los metabolitos.

La masa seca de los fitoquímicos extraídos se determinó por diferencia de peso, como se muestra en la Ecuación (2) para obtener el cálculo del rendimiento de cada extracción.

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Peso de extracto seco}}{\text{Peso de material vegetal}} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

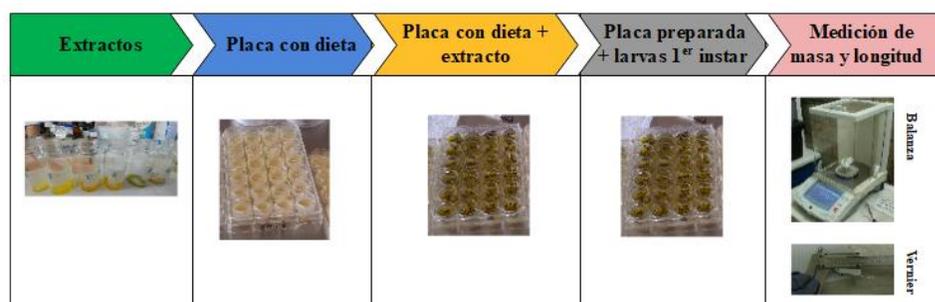
### 5.3. Análisis por GC-MS de los metabolitos

Para la identificación de los componentes presentes en los extractos de hexano y EtOH se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a masas (GC-MS) PerkinElmer Clarus® 580 y masas Clarus® SQ8S. Se empleó una columna capilar Elite-5MS (PerkinElmer®) de 30 m x 0.32 mm, con fase estacionaria apolar de 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano de 0.25 µm. Se inyectaron 3 µL de muestras líquidas filtradas (0.2 µm GHP Acrodisc 13 PALL) en modo *split*, realizado de modo manual. La temperatura del horno se programó de: 100 °C durante 3 min incrementando de 50 °C/min hasta 150 °C y 10°C/min hasta 260. Como gas de arrastre se empleó helio que fue alimentado a 0.8 mL/min y la energía de ionización fue de 70 eV. El barrido en el rango de masas m/z fue de 40-350 Dalton. La identificación de los compuestos fue basada en la comparación de su espectro de masas con la base de datos NIST ([Conde-Hernández y Gerrero-Beltrán 2014](#)).

### 5.4. Actividad larvicida

La actividad larvicida se evaluó in vitro mediante bioensayos con larvas de primer instar de *S. frugiperda* obtenidas de los criaderos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. Éstas fueron mantenidas con una dieta artificial que contenía 800 mL de agua estéril, 10 g de agar, 50 g de harina de soya, 96 g de harina de maíz, 40 g de extracto de levadura, 4 g de germen de trigo, 2 g de ácido sórbico, 2 g de cloruro de colina, 4 g de ácido ascórbico, 2.5 g de éter metílico del ácido *p*-hidroxibenzóico, 15 mL de mezcla de vitaminas de Vanderzant para insectos, 2.5 mL de formaldehído y 20 g de maíz molido (para un kilogramo de dieta). El bioensayo se centró en determinar el efecto de los siguientes factores: polaridad del disolvente utilizado en la extracción,

tipo de planta utilizada, si los extractos se obtuvieron de hojas frescas o secas y la concentración de extracto a la que estuvo expuesta la larva. Placas de 24 pozos de poliestireno (Nunc™; 1 mL de volumen por pocillo y superficie de pocillo de 1,9 cm<sup>-2</sup>) fueron llenadas con líquido de la dieta, se dejaron solidificar por 30 min bajo condiciones estériles. Los extractos fueron disueltos en hexano o EtOH y colocados (35µL) en la superficie de cada pozo que contenía la dieta artificial solidificada, se usaron 4 concentraciones de 4 plantas y dos controles (EtOH y hexano puros), después, se esperó hasta evaporación del disolvente. A cada pozo con dieta y extracto se le colocó una larva neonata de primer estadio de *S. frugiperda*. Después de 7 días de la aplicación, se contabilizó la mortalidad, longitud y peso de las larvas como se observa en la [Figura 16](#). Todos los tratamientos fueron controlados a una temperatura de 25°C con humedad al 80% ([García-Gutiérrez et al. 2011](#)). El porcentaje de actividad larvicida fue calculada como el número de larvas muertas tratadas sobre el total de larvas del tratamiento.



**Figura 16.** Diagrama del bioensayo de *S. frugiperda*.

### 5.5. Actividad biológica de *Piper auritum* sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda*

La metodología de la actividad del ciclo biológico de manera general se presenta en la [Figura 17](#). Este estudio se realizó con el extracto etanólico crudo obtenido de las hojas deshidratadas de *P. auritum*.

El estudio consistió en exponer a las larvas de primer estadio de *S. frugiperda* al extracto seleccionado en concentraciones de 2, 9, 18 y 37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El diseño experimental se realizó por cuadruplicado siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado anterior; los controles fueron el agua esterilizada y el EtOH utilizado para solubilizar el extracto crudo. Las larvas supervivientes expuestas durante 7 días al extracto etanólico de *P. auritum* fueron transferidas por separado a recipientes de plástico de 200 mL para continuar su crecimiento con el mismo tipo de dieta artificial gelificada pero libre de fitoquímicos (da Silva et al. 2017). Las larvas se observaron cada 12 horas hasta la metamorfosis en pupas. Las pupas se colocaron en placas Petri de 5.7 cm de diámetro, sobre un algodón humedecido con agua esterilizada. El porcentaje de actividad pupicida se calculó con el número de adultos emergidos sobre el número total de pupas formadas por 100. Los adultos emergentes se colocaron por parejas (macho y hembra) en un recipiente de 1L, que se forró con papel de filtro y se cubrió con un paño para permitir la entrada de aire. Los adultos fueron alimentados con agua azucarada al 10 %. Los huevos depositados en el papel de filtro se retiraron del recipiente y se colocaron en una placa de Petri previamente preparada con un algodón humedecido con agua esterilizada.

Los datos experimentales registrados para cada estadio de *S. frugiperda* fueron los siguientes: número de larvas vivas y muertas, tiempo necesario para que las larvas se conviertan en pupas, número de pupas, tiempo de pupación, número de adultos que emergieron del estadio de pupa y el número de huevos puestos por los adultos hembra. Además de esta información, se registraron las características morfológicas de cada estadio de *S. frugiperda*. Esta actividad se llevó a cabo mediante la observación en un microscopio (Olympus CH30) a 10X y 20X.

El índice de actividad de oviposición (OAI) se calculó como sigue (Soonwera y Phasomkusolsil 2017):

$$OAI = \frac{NT - NC}{NT + NC}$$

La cuál  $NT$  es el número de huevos en los tratamientos, y  $NC$  es el número total de huevos en el tratamiento de control. El índice de actividad de oviposición osciló entre -1 y +1, indicando 0 una respuesta neutra. Los valores positivos del índice indicaron un efecto atrayente de los extractos fitoquímicos y los negativos un efecto disuasorio.



**Figura 17.** Diagrama general de la metodología del ciclo biológico de *S. frugiperda*.

### 5.6. Estudio fitoquímico del extracto etanólico y hexánico de *Piper auritum*

Se realizó el estudio fitoquímico de los extractos etanólico y hexánico de *Piper auritum* obtenidos en la Sección 5.2. Para esto se usaron placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Analytical Chromatography, Merck) de tamaño 2.5 x 5 cm. Los extractos se aplicaron en forma de puntos con la ayuda de un capilar sobre la placa cromatográfica. Posteriormente, se introdujo en la cámara cromatográfica la cual previamente contenía la fase móvil correspondiente a la prueba química, como se indica en la [Tabla 8](#). Se tapó y se dejó transcurrir el tiempo hasta que el eluyente llegó a la línea marcada como frente de disolvente, enseguida, se sacó la placa y se dejó secar para continuar con las pruebas químicas. Se prepararon dos placas cromatográficas por cada

prueba, una para el extracto hexánico y otra para el extracto etanólico. Posteriormente, se realizó el asperjado con los reveladores como se muestra en la [Tabla 8](#) y se midieron las manchas en cada placa para calcular los valores de Rf (factor de retardo). Para su cálculo, se utiliza el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto (a o b) y la distancia recorrida por el eluyente usado.

**Tabla 8.** Condiciones de las pruebas químicas aplicadas a los extractos etanólicos y hexánicos de *P. auritum*

Metabolitos	Fase móvil	Pruebas químicas (reveladores)	Características
Alcaloides	Hexano / EtOAc (96:4)	Dragendorff	Naranja/rojizo
Alcoholes	Hexano / EtOAc (96:4) Hexano / EtOAc (98:2) Hexano (100)	Vainillina	Azul verdoso Calefacción
Alcoholes secundarios y metilcetonas	Hexano / EtOAc (96:4)	Yodo	Marrón
Aminoácidos	Hexano / EtOAc (96:4) EtOH (100)	Ninhidrina	Mancha azul violeta Calefacción
General: ion fosfato	Hexano / EtOAc (96:4)	Molibdato cerico de amonio	Azul oscuro Calefacción
Carbonilos: aldehídos/cetonas	No aplica	Fehling	Precipitado rojo
Hidroxilo: fenoles/taninos	Éter de petróleo / EtOAc/ ác. formico (40:60:1)	FeCl <sub>3</sub>	Azul oscuro
Terpenos	Hexano / EtOAc (96:4)	Liebermann-Burchard	Azul verdoso

(Jork et al. 1990; García 2004; Kumar et al. 2007).

A continuación, se presenta la metodología para llevar a cabo cada prueba química.

❖ Alcaloides (Reactivo de Dragendorff).

Se asperjó el reactivo de Dragendorff sobre la placa cromatográfica; la aparición de manchas color marrón indica la presencia de alcaloides (Kumar et al. 2007).

❖ Alcoholes: glucósidos cardiotónicos (Vainillina).

Se aplicó una solución de vainillina sobre la placa a revelar, luego la placa se calentó a 100 °C;

mancha violeta sobre la placa da positivo para compuestos terpénicos y manchas color azul verdoso indica la presencia de glicósidos cardiotónicos (García 2004). La solución de vainillina fue preparada con 0.5 g de vainillina en 50 mL de EtOH al 95 % y posteriormente se agregó 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

❖ Carbonilos: aldehídos/cetonas (Reactivo de Fehling).

1 mL del extracto se le agregó 1 mL del reactivo de Fehling A más 1 mL del reactivo de Fehling B, se llevó a baño maría a 60°C por 5 min. Reactivo de Fehling solución A: se disolvieron 0.4157 g de sulfato de cobre en 6 mL de agua. Solución B: se pesaron 2.076 g de tartrato de sodio y potasio más 0.72 g de hidróxido de sodio disueltos en 6 mL de agua. Las soluciones se mezclan justo antes de su uso (García 2004).

❖ Hidrocarburos aromáticos y /o insaturados (Yodo).

La placa se introdujo en el recipiente que contenía los cristales de yodo; mancha marrón sobre fondo naranja, indica la presencia de compuestos aromáticos y/o insaturados. Se preparó mezclando cristales de yodo con gel de sílice y se guardó en un recipiente bien cerrado (Jork et al. 1990).

❖ Ion fosfato (Molibdato cérico de amonio)

Se asperja la solución de molibdato cérico de amonio; la aparición de manchas color azul oscuro indica la presencia del ion fosfato. Se requiere calentamiento para su visualización. Para su preparación se añadió sulfato de cerio (5 g) a una solución de molibdato de amonio (25 g en 450 mL de agua) a 0°C y con agitación. La solución turbia de color amarillo brillante resultante se agita vigorosamente y se agrega ácido sulfúrico (50 mL) lentamente durante 90 min. A

continuación, se deja que la solución amarilla resultante alcance la temperatura ambiente (Jork et al. 1990).

❖ Aminoácidos (Ninhidrina),

Se asperjó la solución de ninhidrina sobre la placa, y se dejó evaporar antes de calentar la placa a 100 °C por 5 min; mancha azul/violeta indica la presencia de aminoácidos y aminas. La solución se preparó con 0.75 g de ninhidrina en 50 mL de n-butanol y luego se añadió 1.5 mL de ácido acético al 10% (García 2004).

❖ Hidroxilo: fenoles/taninos ( $\text{FeCl}_3$ )

Este revelador permite detectar la presencia de hidroxilos: taninos-fenoles, es positiva si se forman manchas de un color azul oscuro. El reactivo en solución se asperja sobre la placa y se deja secar a temperatura ambiente. Se prepara con 0.5 g de cloruro férrico solubilizados en 50 ml de agua destilada (García 2004).

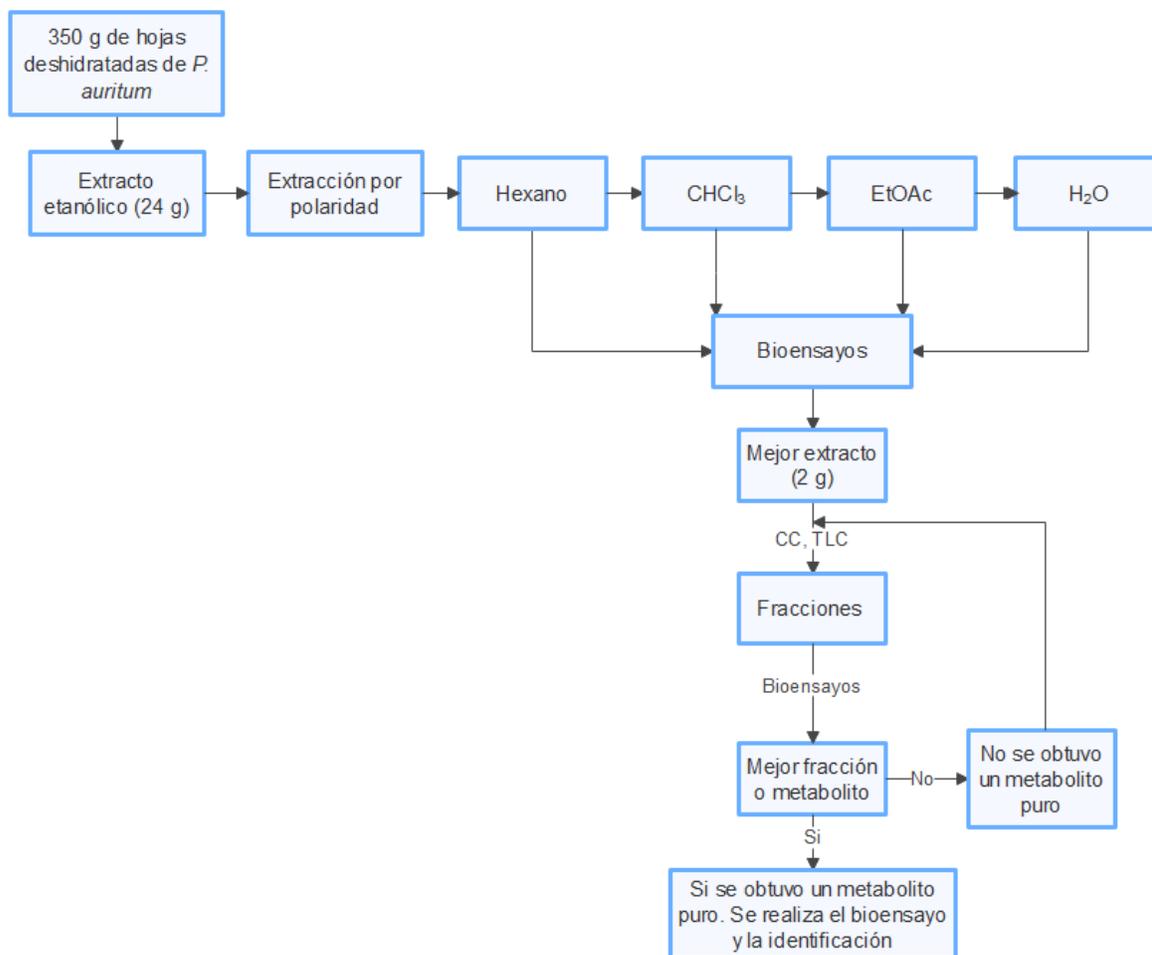
❖ Terpenos (Liebermann-Burchard).

Permite detectar la presencia de terpenos. La prueba es positiva si se forman manchas de color azul verdoso. El reactivo, se preparó con 20 ml del reactivo de Liebermann-Buchard, 10 ml de anhidro acético, 10 ml de  $\text{CHCl}_3$ , 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y una solución acuosa de cloruro férrico al 1% (Kumar et al. 2007). La mezcla se asperja sobre la placa y se deja secar a temperatura ambiente.

Las placas se examinaron a la luz del día y a la luz ultravioleta (254 nm y 366 nm) con la ayuda de una lámpara UV (entela VGL-25).

## 5.7. Extracción y purificación de metabolitos.

La metodología de extracción y purificación de metabolitos, de manera general se presenta en la [Figura 18](#). Se colocaron 350g de polvo de hoja deshidratada de *P. auritum* en un recipiente ámbar de 4 L con 1.5 L de EtOH. La extracción se llevó a cabo cada 24 hrs, por cuádruple extracción. Los fitoquímicos en solución se filtraron (filtro Whatman n° 3) y los filtrados de las cuatro extracciones se unieron y se concentraron en un rotavapor (Büchi modelo R-124). El extracto crudo se vertió en un vial color ámbar de peso conocido y se almacenó a -4°C hasta su uso ([Kimbaris et al. 2006](#)). La masa seca de los fitoquímicos extraídos se determinaron por diferencia de peso, como se muestra en la Ecuación (2). Posteriormente, se tomaron 24 g del extracto etanólico de *P. auritum* y fueron sometidos a extracción con diferentes disolventes. Primero se adicionó hexano (4 x 200 mL), posteriormente al residuo obtenido se le adicionó CHCl<sub>3</sub> (4 x 200 mL), y al residuo de CHCl<sub>3</sub> se le adicionó EtOAc (4 x 200 mL), y finalmente al residuo de EtOAc se adicionó agua (4 x 50 mL). Los extractos de cada disolvente por separado fueron filtrados y secados en un rotavapor. Después se tomaron 5000 µg/mL de cada una de las fracciones obtenidas y fueron sometidas a bioensayos de actividad larvica contra *S. frugiperda* como se muestra en la Sección 5.4. La fracción con mayor actividad larvica se sometió a cromatografía en columna sobre silica gel de malla 60-200 y fue eluido con hexano/EtOAc/acetona/CHCl<sub>3</sub>/EtOH. Las fracciones obtenidas se evaluaron su actividad larvica contra *S. frugiperda*. La fracción más tóxica se volvió a someter a una columna y así sucesivamente hasta obtener un metabolito puro que fue caracterizado por RMN.



**Figura 18.** Estudio bio guiado del extracto etanólico de *P. auritum*.

### 5.7.1. Análisis de metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

10 mg del compuestos puro separado por fraccionamiento en columna cromatográfica fue vertido en un tubo para Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y mezclado con 0.5mL de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). El análisis RMN se realizó en un equipo Bruker AVANCE III HD 300 MHz Criosonda TCI 300 H-C/N-D de 5 mm. Para el compuesto se determinaron los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , los cuáles fueron procesados con el software MestreNova. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en unidades de ppm tomando como referencia la señal del  $\text{CHCl}_3$  7.25 ppm en los

$^1\text{H}$ -RMN y a 77.0 ppm en los  $^{13}\text{C}$ -RMN. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están reportadas en Hertz (Hz) (Hoffman 2004).

### 5.8. Actividad larvica de fracción importante y metabolito aislado sobre *S. frugiperda*.

Para determinar la actividad larvica de alguna fracción o metabolito aislado, se lleva a cabo la metodología descrita anteriormente en la Sección 5.4, con las concentraciones descritas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Concentraciones aplicadas de fracción y compuesto aislado.

	Concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Fracción/Compuesto	9,18, 37 y 92

### 5.9. Análisis estadístico

El rendimiento de los extractos se analizó mediante un diseño experimental mixto. Los efectos analizados son los siguientes: tipo de solvente (hexano y etanol), tipo de hoja (fresca o deshidratada) y especie de planta (*C. odorata*, *P. umbellatum*, *M. azedarach* y *P. auritum*).

El efecto larvica de los extractos crudos y su impacto en la talla y peso de larvas fue analizado mediante un diseño experimental mixto. Los factores analizados son los mismos mencionados en el párrafo anterior (tipo de solvente, tipo de hoja y especie de planta), más la concentración del extracto: 92, 184, 921 y 1842  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  al cuál se expuso a las larvas primer instar de *S. frugiperda*. Se realizó un total de 64 ( $4 \times 2 \times 2 \times 4$ ) experimentos por cuadruplicado, para lo cuál se requirieron 3072 larvas (número de larvas:  $12 \times 4 \times 64$ ) y 144 larvas ( $12 \times 4 \times 3$ ) para los controles (agua, EtOH y hexano). Los valores reportados son la media de los resultados obtenidos en las cuatro repeticiones.

La actividad biológica del extracto etanólico de *P. auritum* en el ciclo biológico de *S. frugiperda* se determinó a partir de un diseño experimental de un factor a 4 niveles. Este estudio se realizó

por cuadruplicado con 192 larvas (12 larvas 4 réplicas 4 concentraciones), que fueron expuestas a los extractos de EtOH y 96 larvas para los controles (agua y EtOH). Los resultados presentados son la media de las 4 réplicas. La diferencia entre medias se determinó a partir de un ANOVA de una vía para  $p < 0.05$ . La CL50 del extracto etanólico de *P. auritum* y de la fracción 2 se determinaron mediante el método Probit. Para los análisis estadísticos se utilizaron, software Minitab e IBM® SPSS Statistics.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Identificación y registro de los ejemplares.

Las especies de plantas colectadas para llevar a cabo el presente trabajo fueron identificadas como: *Piper umbellatum* L, *Piper auritum* Kunth, *Melia azedarach* L y *Cedrela odorata* L, y registradas con los números 25944, 25975, 25945 y 25946 respectivamente en el Herbario “JES” (Jorge Espinosa Salas) de la Universidad Autónoma Chapingo.

### 6.2. Determinación de humedad total.

La humedad de las cuatro especies tanto en hojas deshidratadas como frescas se presenta en la [Tabla 10](#). Las hojas de las plantas de las especies *Piper* presentaron un mayor contenido de agua, lo cual podría ser explicado por su estructura celular, conformada por capas de mesófilo esponjoso y empalizado, ambas constituídas por una mayor cantidad de vacuolas ([Zhang et al. 2014](#)). En las hojas deshidratadas, el mayor contenido de humedad fue detectado en *M. azedarach* y *P. auritum* y la diferencia podría ser atribuida a la presencia de agua ligada a la estructura de las hojas ([Badui 2006](#)).

Los porcentajes de humedad obtenidos en este trabajo son congruentes a los reportados por otros investigadores como se muestra en la [Tabla 10](#).

**Tabla 10.** Humedad total en hojas frescas y deshidratadas.

Hojas	Humedad material deshidratado (%±SD)	Humedad en material fresco (%±SD)	Humedad reportada en material fresco (%)
<i>P. umbellatum</i>	9.2±0.45 <sup>b</sup>	80.7±0.50 <sup>a</sup>	60-80 ( <a href="#">Pullaguari y Maura 2014</a> ; <a href="#">Saupi et al. 2021</a> )
<i>P. auritum</i>	12.9±0.01 <sup>a</sup>	78.8±0.49 <sup>a</sup>	70-85 ( <a href="#">Conde-Hernández y Guerrero-Beltrán. 2014</a> ; <a href="#">Stashenko et al. 2014</a> )
<i>M. azedarach</i>	13.3±0.28 <sup>a</sup>	68.3±0.07 <sup>c</sup>	57-60% ( <a href="#">Venson et al. 2008</a> ; <a href="#">Chiffelle et al. 2009</a> )
<i>C. odorata</i>	7.8±0.19 <sup>c</sup>	71.2±0.32 <sup>b</sup>	76 ( <a href="#">Ofori y Brentuo 2005</a> )

SD=error estándar. ANOVA de una vía. Los valores medios que no comparten letra igual son significativamente diferentes según la prueba de Tukey's ( $\alpha = 0.05$ ) para cada columna.

### 6.3. Extracción de fitoquímicos.

El rendimiento de los extractos de EtOH y hexano obtenidos de las hojas frescas y deshidratadas de las cuatro plantas estudiadas se presenta en la [Tabla 11](#). El ANOVA mixto indica que existen diferencias significativas en los rendimientos de extracción de fitoquímicos debido al tipo de solvente ( $F = 265.063$ ;  $df = 1, 4$ ;  $P < 0.001$ ), tipo de hoja ( $F = 169.736$ ;  $df = 1, 4$ ;  $P < 0.001$ ) y especie vegetal ( $F = 31.762$ ;  $df = 3, 12$ ;  $P < 0.001$ ). También se encontraron diferencias significativas en las interacciones dobles y triples de los factores: especie vegetal, tipo de disolvente y tipo de hoja. En general, los rendimientos de las hojas deshidratadas fueron mayores en una relación promedio de  $1.7 \pm 0.9$  ( $n = 48$ ) en comparación con los obtenidos de hojas frescas. En cuanto a los disolventes, el EtOH favoreció la extracción de los fitoquímicos de las plantas Meliaceae en una relación promedio de  $3.8 \pm 1.2$  ( $n = 24$ ). Los mayores rendimientos de extracción obtenidos con el EtOH, podría asociarse a la afinidad de este solvente con un mayor número de metabolitos, si se compara con el solvente hexano ([Tabla 4](#) de la Sección 1.3). En el caso de las dos especies de plantas Piperaceae, el cambio de disolvente no mostró diferencias importantes en lo que respecta al rendimiento de extracción, excepto para las hojas frescas de *P. auritum* que se extrajo el doble de metabolitos (proporción media de  $2.2 \pm 0.2$ ,  $n = 12$ ) con EtOH.

**Tabla 11.** Rendimiento (% medio ( $w_t/w_m$ ) en materia seca) de fitoquímicos extraídos con hojas frescas y deshidratadas de plantas Meliaceae y Piperaceae.

Disolvente	Hojas	Meliaceae		Piperaceae	
		<i>C. odorata</i>	<i>M. azedarach</i>	<i>P. auritum</i>	<i>P. umbellatum</i>
		% $\pm$ SE	% $\pm$ SE	% $\pm$ SE	% $\pm$ SE
EtOH	Fresca	6.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.02 <sup>d,e</sup>	5.2 $\pm$ 0.5 <sup>b,c,d</sup>
	Deshidratada	11 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>c,d</sup>	5.9 $\pm$ 0.9 <sup>b,c</sup>	6.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
Hexano	Fresca	1.3 $\pm$ 0.19 <sup>f</sup>	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>d,e</sup>	5.2 $\pm$ 0.1 <sup>b,c</sup>
	Deshidratada	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>d,e</sup>	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>d,e</sup>	5.4 $\pm$ 0.3 <sup>b,c</sup>	6.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>

SE=error estándar;  $w_t$ =peso del extracto;  $w_m$ =peso de la hoja de la planta. ANOVA de tres vías. Los valores medios ( $\pm$  SE) que no comparten letra igual son significativamente diferentes según la prueba Tukey's ( $\alpha = 0.05$ ).

En general, la eficiencia de extracción de metabolitos está relacionada con el contenido de humedad en la muestra, el solvente extractor utilizado, y la disponibilidad de los metabolitos en el material vegetal (Azmir et al. 2013).

Los rendimientos calculados en el presente trabajo están dentro del rango de valores (0.46-11.8 %) reportado por Wan et al. 2011 y Soberón-Risco et al. 2012, quienes utilizaron una mezcla de solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (2:1)) y EtOH (96%), respectivamente, para extraer fitoquímicos de las espigas, hojas y tallos deshidratados de *P. tuberculatum* y de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

#### **6.4. Análisis por GC-MS de los metabolitos.**

El programa cromatográfico implementado permitió identificar 81 compuestos en los extractos de EtOH y 105 en los extractos de hexano. Del total de 186 compuestos identificados, 20 fueron identificados en ambos extractos como se muestran en las Tablas 12 y 13. Los compuestos extraídos se clasificaron dentro de los grupos de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, fenilpropanoides, alcoholes, alcanos, alquenos, aldehídos, ésteres y ácidos grasos. La clasificación de los grupos de compuestos aquí obtenido es similar a la reportado por Pineda y col. 2012, así como también el porcentaje de fenilpropanoides (60.2%) en el extracto de hexano de *P. auritum* (Anexo 1). Los compuestos clasificados como alquenos se extrajeron únicamente con EtOH y los ésteres sólo con hexano. Es importante mencionar que el número de ácidos grasos extraídos fue mayor cuando se utilizó hexano que al usar EtOH. Así mismo, González-Jiménez y col. 2010, observaron que extractos de hexano son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y los extractos de MeOH, por ser un disolvente polar, son ricos en compuestos fenólicos. En las Tablas 12 y 13 se observa que, algunos compuestos de las plantas Piperaceae fueron mejor extraídos con hexano que con etanol. Por ejemplo: el  $\beta$ -cubebeno fue extraído en un 22.4% de *P. umbellatum*

al usar hexano, y en un 2.5% cuando se utilizó EtOH. De igual manera, el ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico aumentó del 4.9% al 8.2% cuando se utilizó hexano como solvente extractor. Otro ejemplo, es el del safrol extraído de las hojas deshidratadas de *P. auritum*, el cual fue extraído en un 32% al usar EtOH y en un 53% al usar hexano. En resumen, el número de metabolitos extraídos con EtOH fue inferior al número de metabolitos extraídos con hexano, lo cual es congruente con lo reportado con [Hossain y col. \(2013\)](#), quienes observaron que conforme se aumenta la polaridad de los solventes es menor el número de metabolitos volátiles extraídos. La concentración en porcentaje reportada en las [Tablas 12 y 13](#) se determinó con respecto al área total bajo la curva como muestran los cromatogramas en las [Figuras 19 al 22](#).

Tabla 12. Compuestos identificados en extractos crudos de EtOH de las cuatro especies vegetales.

Compuestos fitoquímicos	<i>C. odorata</i>	<i>M. azedarach</i>	<i>P. auritum</i>	<i>P. umbellatum</i>
	Área (%)	Área (%)	Área (%)	Área (%)
<b>Monoterpenos</b>				
2,6-Dimetil-2-cis-6-octadieno	-	-	-	1.293
Mentol	0.999	1.965	-	-
<b>Sesquiterpenos</b>				
$\beta$ -Cariofileno	0.470		1.064	
$\beta$ -cis-Cariofileno	4.697	-	-	1.304
$\beta$ -Cubebeno	-	-	-	2.485
$\delta$ -Cadineno	0.464	-	-	1.194
$\beta$ -Sesquifelandreno	<b>14.189</b>	-	-	-
$\gamma$ -Muuroleno	<b>13.825</b>	-	-	-
$\beta$ -Bisaboleno	<b>6.810</b>	-	-	-
Farneseno	3.396	-	-	-
$\delta$ -Elemeno	3.174	-	0.785	-
Farnesol	-	-	1.099	-
Espatulenol	-	-	1.062	1.027
Acetato de farnesilo	1.562	-	-	-
Ledol	1.159	-	-	-
Himachaleno	0.385			
Nerolidol	0.661			0.576
Óxido de Cariofileno	0.602			0.828
Aromadendreno	0.408			0.510
$\alpha$ -cadinol	0.621			
Germacreno			0.840	
7-epi- $\alpha$ -Cadineno				0.987
(+)- $\gamma$ -Gurjuneno				0.500
$\alpha$ -cadineno				0.582
<b>Diterpeno</b>				
Fitol	-	<b>5.861</b>	2.344	<b>5.932</b>
Ácido retinoico				0.652
<b>Triterpeno</b>				
Escualeno	-	-	1.856	-
<b>Tetraterpeno</b>				
$\alpha$ -caroteno				0.750
<b>Fenilpropanoide</b>				
Safrol	1.798	1.576	<b>32.099</b>	0.753

Continuación de la **Tabla 12**.

<b>Alcohol</b>				
1-Heptadecanol	-	-	<b>4.205</b>	-
1-Hexadecanol	-	1.103	2.104	-
1-Tetradecanol	-	-	-	1.737
β-naftol	-	-	-	2.023
Z-2-Dodecenol	3.854	<b>7.920</b>	-	0.448
Naftalenol	0.379			
2-nonen-1-ol				0.750
<b>Aldehído</b>				
Tetradecanal	-	-	-	<b>5.388</b>
(Z)-7-Hexadecanal	0.531			
<b>Alcano y alqueno</b>				
1-Octadeceno	-	-	3.475	-
9-Eicosano			0.900	
1-Ciclopentil-4-n-octildodecano				1.066
<b>Ácidos grasos</b>				
ácido Dihomo-γ-linolénico	0.372	0.526	-	4.920
Ácido cis-linoleico	0.955	0.450	0.892	0.478
ácido hexadecanoico	5.042	<b>4.972</b>	-	4.745
Ácido tras-traumático	0.414	0.557	-	0.750
ácido octadecanoico	0.428	-	0.955	1.711
Linoleato de metilo	2.667	4.244	-	-
Ácido pentadecanoico	1.326	1.390	-	-
Ácido docosaheptaenoico	0.869	1.290		
Número de picos (porcentaje del número total de picos)	30 metabolitos (77.0%)	13 metabolitos (32.7%)	14 metabolitos (53.6%)	27 metabolitos (44.2%)

(-) Significa que no se ha observado el compuesto fitoquímico.

**Tabla 13.** Compuestos identificados en los extractos de hexano de las cuatro especies.

<b>Compuestos fitoquímicos</b>	<i>C. odorata</i>	<i>M. azedarach</i>	<i>P. auritum</i>	<i>P. umbellatum</i>
	Área (%)	Área (%)	Área (%)	Área (%)
<b>Monoterpenos</b>				
Terpinoleno	0.665	-	1.243	-
Acetato de geraniol	-	1.332	-	-
<b>Sesquiterpenos</b>				
$\beta$ -cis-Cariofileno	5.736	-	2.548	2.960
Oxido de cariofileno	1.068	-	0.853	3.068
$\beta$ -Cubebeno	<b>13.250</b>	-	1.536	<b>22.429</b>
$\delta$ -Elemeno	-	-	<b>3.400</b>	-
(-)- $\beta$ -Elemeno	3.711	-	-	-
$\gamma$ -Elemeno	1.110	-	-	-
Farnesol	-	-	1.283	-
Espatuleno	0.800	0.496	2.384	0.973
Acetato de farnesilo	-	-	1.148	-
Ledol	1.141	-	-	-
Nerolidol		-	0.584	5.015
Copaeno	0.627		0.892	0.618
$\alpha$ -Selineno	0.497			
$\alpha$ -Cariofileno	0.790			
Azuleno	0.776			
$\delta$ -Cadineno	0.475			
Viridiflorol	0.593			0.902
Eudesm-11-en-1-ol	0.468	0.416		
Acetona hexahidrofarnesilo	0.798			
Metropreno			0.617	
$\gamma$ -cadineno				0.618
$\beta$ -Farneseno				0.616
$\alpha$ -amorfeno				0.675
Trans nerolidol				0.894
$\alpha$ -Muurolol				0.655
<b>Diterpenoides</b>				
Fitol	10.106	15.94	1.446	3.313
Geranilgeraniol			0.658	
<b>Triterpeno</b>				
Escualeno	-	-	1.125	-
Colestano			0.960	
<b>Fenilpropanoide</b>				
Safrol	1.246	12.515	<b>53.002</b>	2.162

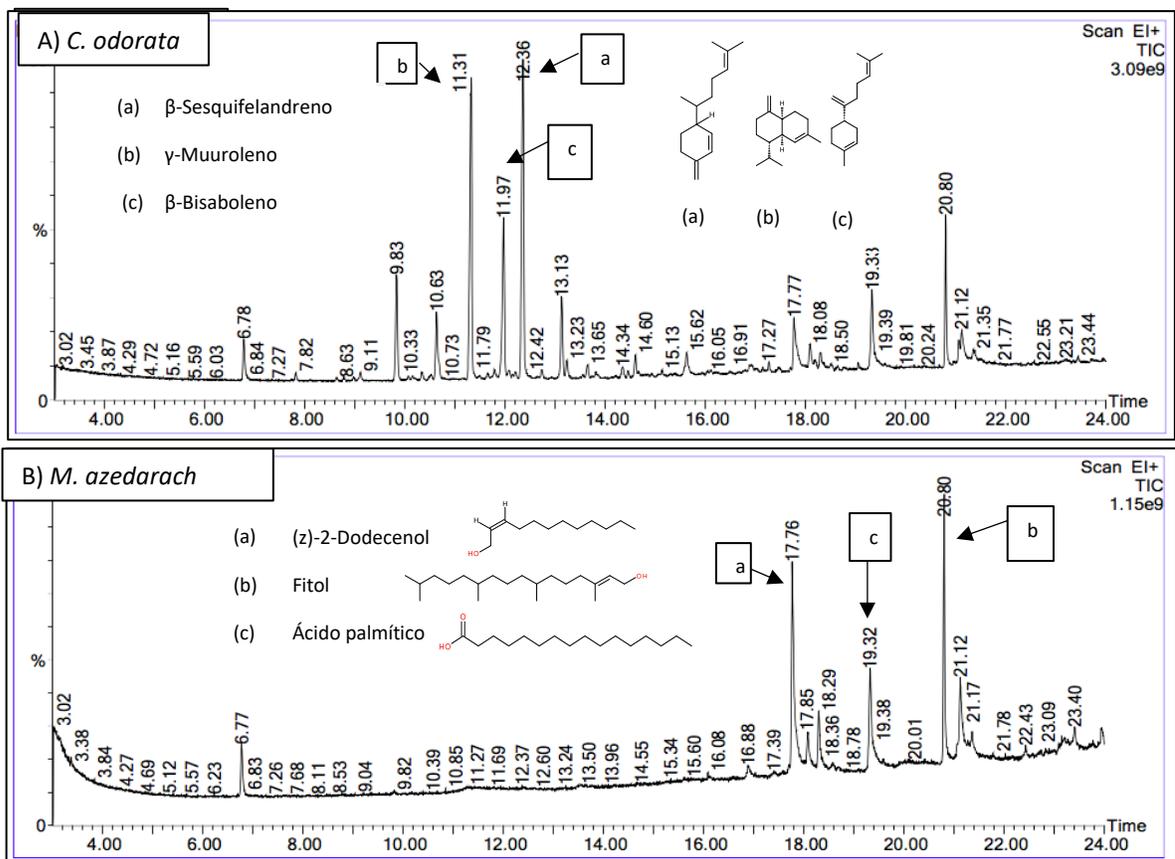
Continuación de la **Tabla 13**.

<b>Alcohol</b>				
1-Heptacosanol	-	1.116		-
1-Tetradecanol	-		3.381	-
3,7,11-Trimetil-1-dodecanol	-	1.313		-
Docosanol			0.919	
<b>Aldehído</b>				
(z)-11-hexadecanal			0.860	
<b>Éster</b>				
(Z,E)-Tetradeca-9,12-dienilacetato	-	1.208		-
Anhídrido-2-dodecen-1-il succínico	0.658	0.808	1.265	0.644
Estearato de etilo	-	-	-	2.964
El di-n-octilftalato	0.766			
<b>Alcanos</b>				
Tetratetracontano	9.253	-	2.358	3.81
3-etil-5-(2-etilbutil) octadecano	3.049	1.400	-	-
4-Metiltridecano	2.486	-	-	-
1-Ciclopentil-4-n-octil dodecano	0.872	-		-
Cloro hexadecano	-	-	0.988	-
<b>Ácidos grasos</b>				
Ácido $\alpha$ -linolénico	<b>18.108</b>	<b>29.735</b>	-	-
Ácido oleico	0.798	1.832	-	-
Ácido esteárico	-	1.392	-	4.912
Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico	0.497	-	-	<b>8.221</b>
Dipalmitina	-	-	-	2.369
Araquidato de metilo	-	-	-	1.690
Linoleato de metilo	-	-	1.034	-
Ácido pentadecanoico	0.530	1.085	0.966	0.792
Ácido palmítico	7.160	<b>17.748</b>	-	-
Palmitato de etilo	-	-	1.637	2.330
Ácido linoleico	0.808	0.436	-	-
Ácido hexadecanoico	-	0.579	-	-
Ácido octadecanoico	-	0.519	-	-
Número de picos (porcentaje del número total de picos)	30 metabolitos (88.8%)	18 metabolitos (89.9%)	25 metabolitos (87.1%)	32 metabolitos (87.2%)

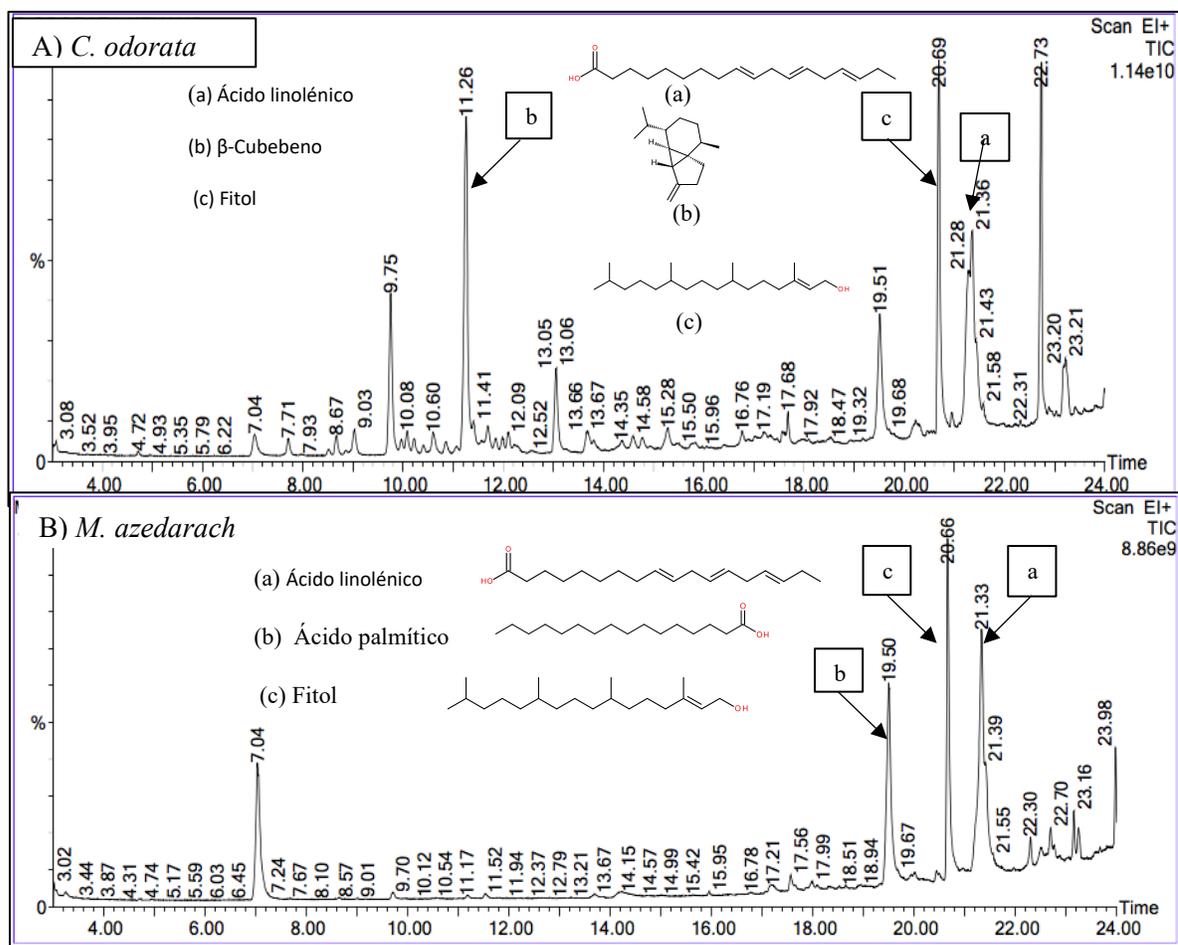
(-) Significa que no se ha observado el compuesto fitoquímico.

Las **Figuras 19** y **20**, muestran los compuestos identificados en los extractos etanólico y hexánico de las hojas deshidratadas de las plantas *M. azedarach* y *C. odorata*. Estas incluyen la estructura de los compuestos mayoritarios extraídos con los diferentes solventes, de las diferentes plantas. En los extractos etanólicos y hexánicos de *C. odorata*, el  $\beta$ -sesquifelandreno (14.189%; EtOH) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (18.108%; hexano) fueron identificados como los compuestos

mayoritarios. Investigadores como [Liang y col. \(2016\)](#), observaron que el  $\beta$ -sesquifelandreno presenta una toxicidad de contacto del 50%, en *Liposcelis bostrychophila* (piojos de los libros) en una concentración de 58.75  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . [Ramos-López y col. \(2012\)](#) observaron que el ácido linolénico a una concentración de 849 ppm mata el 50% de las larvas de *S. frugiperda*. Con respecto a los extractos de *M. azedarach*, el Z-2-Dodecenol (7.9 %; EtOH) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (29.7 %; hexano) fueron los metabolitos mayoritarios. Investigadores como [Sen y Brata \(2012\)](#) observaron del extracto metanólico de hojas de *M. azedarach* a la quercetina (16.5 %), ácido palmítico (15.5 %) y fitol (11.4 %) como compuestos mayoritarios. Los compuestos principales identificados en este trabajo coinciden con lo reportado por [Sen y Brata](#), excepto en lo que respecta a la quercetina, no identificada en el presente trabajo. Así mismo, [Costa-Leonardo y Haifig \(2010\)](#), reportaron que el dodecenol es una feromona del rastro que usan algunas termitas y la actividad del ácido  $\alpha$ -linolénico ya descrita anteriormente.



**Figura 19.** Cromatogramas de los extractos etanólicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) *C. odorata*; B) *M. azedarach*.

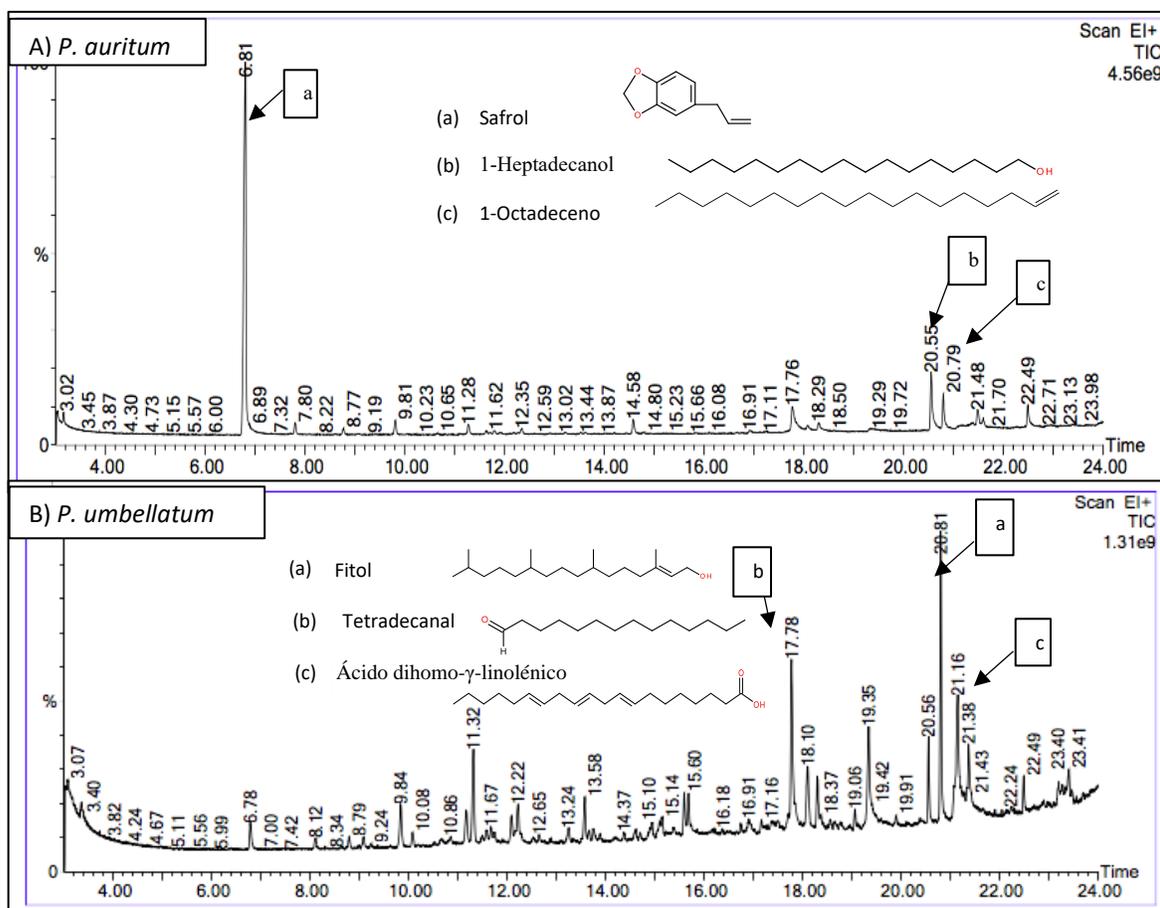


**Figura 20.** Cromatogramas de los extractos hexánicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) *C. odorata*; B) *M. azedarach*.

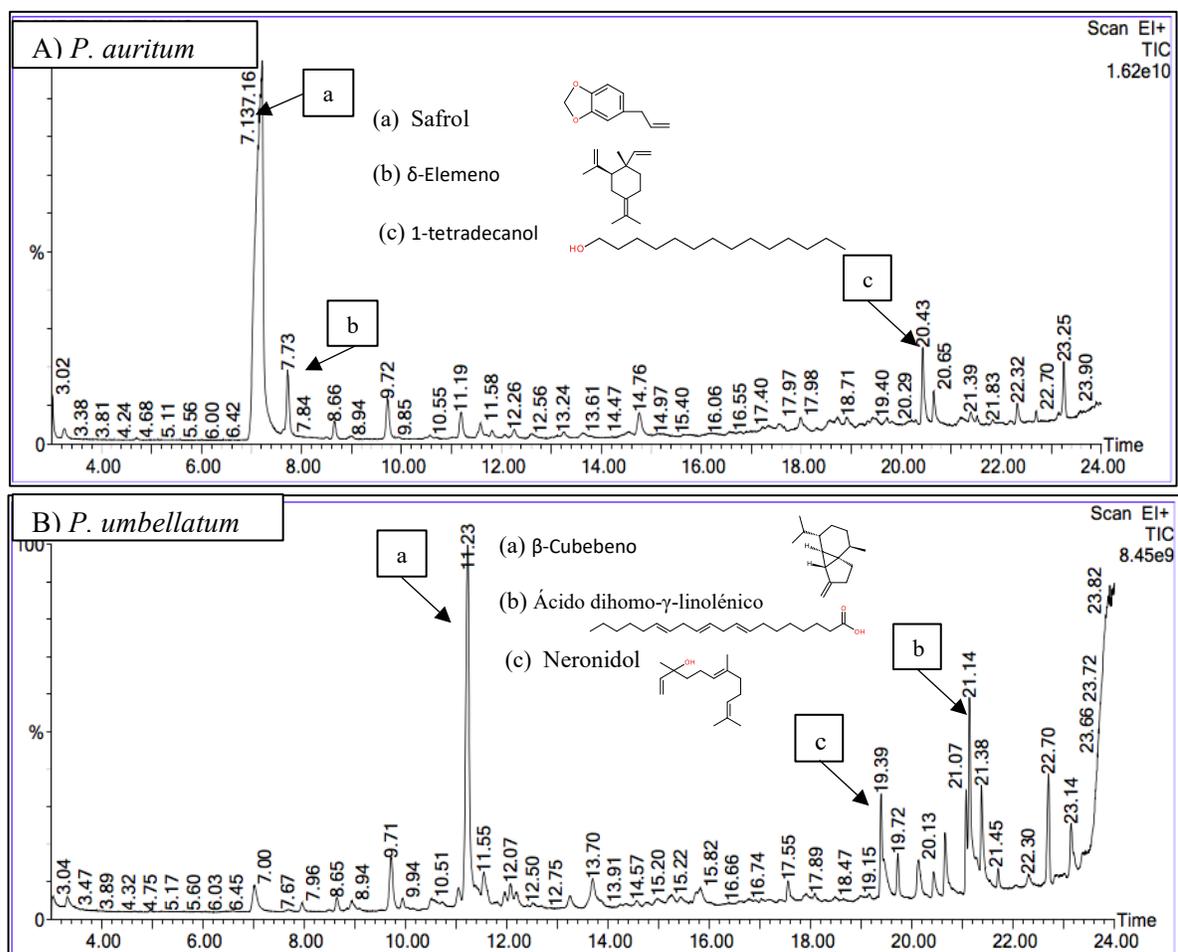
En las Figuras 21 y 22, se observa que en los extractos de *P. auritum*, el safrol (32 %; EtOH y 53 %; hexano) fue el compuesto mayoritario. Algunos autores han reportado que el safrol, miristicina y fitol son los compuestos mayoritarios tanto en el extracto como en el aceite esencial de *P. auritum* (Ríos et al. 2007; Conde-Hernández y Guerrero-Beltrán 2014), lo cual corrobora nuestros resultados. En un estudio previo realizado por Bhardwaj y col. 2010, estos autores mencionan que en una concentración de 5000 mg/ml, el safrol presentó una mortalidad del 100% en contra de larvas de *Spodoptera litura*.

En los extractos de *P. umbellatum*, el fitol (5.9 %; EtOH) y el  $\beta$ -cubebeno (22.4 %; hexano) fueron los compuestos mayoritarios. En lo que respecta a los extractos de esta planta,

[Arunachalam y col. \(2020\)](#) reportaron la extracción del fitol en una concentración del 32%, aunque usando una solución etanólica al 70%; otro compuesto mayoritario reportado por los mismo autores y dentro del mismo extracto es el 3,4-metilendioxiopropiofenona (27%). En lo concerniente a la actividad insecticida del fitol, [Mahesh y col. \(2016\)](#) encontraron que a una concentración de 2.5 ppm genera el 100% de actividad antialimentaria en larvas de *S. litura* y al aumentar la concentración a 42.40 ppm provoca su mortandad en un porcentaje del 90% . Respecto al  $\beta$ -cubebeno, [Mathew y Thoppil \(2011\)](#) lo identificaron como compuesto mayoritario (22.9%), junto con el cariofileno (12.99%) en el aceite esencial de *Salvia splendens* 'Blue Ribbon'. De este aceite se requirieron 133 ppm para matar el 90% de larvas de *A. albopictus*. La diferencia de metabolitos en la misma especie de planta se debe a las condiciones de cultivo, suelo, clima, técnica de extracción, disolvente, etc ([Soberón-Risco et al. 2012](#)).



**Figura 21.** Cromatogramas de los extractos etanólicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) *P. auritum* and B) *P. umbellatum*.



**Figura 22.** Cromatogramas de los extractos hexánicos crudos obtenidos de hojas deshidratadas de las plantas A) *P. auritum* and B) *P. umbellatum*.

### 6.5. Estudio fitoquímico de los extractos de EtOH y hexano de *Piper auritum*

Factores de retardo (Rf) de los metabolitos extraídos con los disolventes de EtOH y hexano, se presentan en la [Tabla 14](#), así como en el Anexo 2. Los diferentes valores de Rf en la [Tabla 14](#), muestra la variedad de fitoquímicos presentes en *P. auritum* y da información sobre el tipo de solventes más adecuados para realizar el fraccionamiento de éste. En el caso de los extractos de hexano, bajo luz UV a  $\lambda = 365$  nm, el número de manchas es mayor en comparación con las observadas bajo la luz del sol. En el caso del extracto de EtOH se observa un número similar de manchas a la luz del día que bajo luz UV a  $\lambda = 254$  y 365 nm. En el Anexo 2, se presentan las

fotos de las placas cromatográficas reveladas, correspondientes a cada estudio. Estos resultados están relacionados con la afinidad que tiene los disolventes, como ya se mencionó anteriormente el EtOH, tiene más afinidad con un mayor número de metabolitos (Tabla 4 de la Sección 1.3).

**Tabla 14.** Valores de Rf de los metabolitos contenidos en los extractos de hexano y EtOH de *Piper auritum*

Valor de Rf	Mancha	Placa (a) Luz del día	Placa (b) UV 254 nm	Placa (c) UV 365 nm
	<b>Extracto hexánico</b>			
	1	0.85	0.85	0.85
	2	0.225	0.475	0.7
	3	-	0.225	0.575
	4	-	-	0.475
	5	-	-	0.0125
<b>Extracto etanólico</b>				
	1	0.8	0.9	0.9125
	2	0.75	0.85	0.8
	3	0.6625	0.8	0.65
	4	0.6	0.7	0.575
	5	0.55	0.6	0.5
	6	0.45	0.45	0.475
	7	0.325	0.35	0.15
	8	0.275	0.11	-

### 6.5.1. Tamizaje fitoquímico

Los grupos de metabolitos identificados en los extractos hexánicos y etanólicos por TLC, así como su abundancia, se presentan en la Tabla 15. Alcoholes, iones fosfato e hidrocarburos aromáticos fueron extraídos mayoritariamente con el hexano, en tanto que compuestos clasificados como alcaloides, aminoácidos e hidroxilos, con el etanol. Compuestos identificados como aldehídos y cetonas, no se expresaron en el análisis por TLC con ninguno de los dos tipos de extractos. Este tipo de análisis permitió complementar el análisis de extractos realizado por CG-MS (Tablas 12 y 13).

El tamizaje por TLC del extracto hexánico de *P. auritum*, (Tabla 15 y el Anexo 3) mostró la presencia de 6 metabolitos, siendo 3 los más abundantes. La presencia de 7 metabolitos fue identificada en el extracto etanólico de *P. auritum* y 4 fueron los más abundantes en comparación con los identificados con hexano. Estos resultados fueron corroborados con lo reportado por Valdivia y col. (2018) y Carmona-Hernández y col. (2014) quienes realizaron el tamizaje fitoquímico de un extracto de *P. auritum* obtenido con EtOH al 90%. Los grupos de compuestos mayoritarios reportados por estos autores son los siguientes: terpenos, cumarinas y flavonoides. Cabe mencionar que propiedades medicinales, insecticidas y antimicrobianas de metabolitos extraídos de *P. auritum* han sido reportadas por Valdivia et al. 2018 y Salleh 2020. .

**Tabla 15.** Análisis fitoquímico de los extractos de hexano y EtOH de las hojas de *P. auritum*.

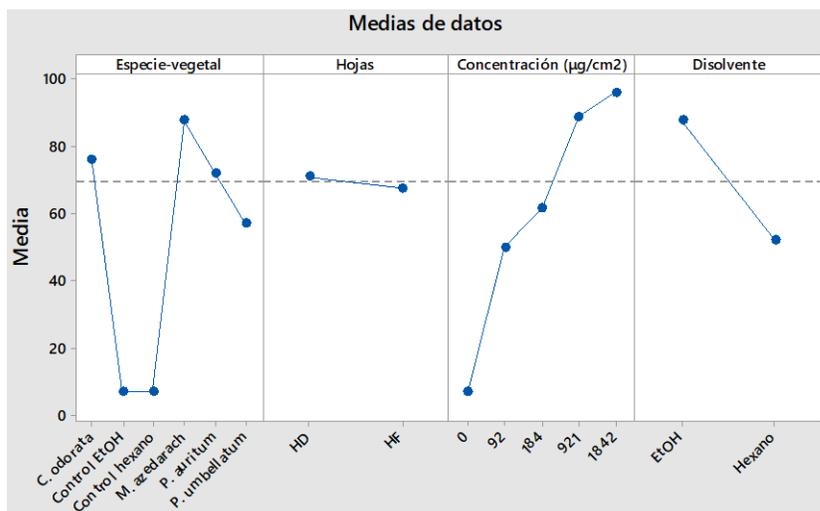
Metabolitos	Hexánico (A)	Etanólico (B)
Alcaloides	(+)	(++)
Alcoholes	(+++)	(++)
Aminoácidos	(+)	(++)
General: ion fosfato	(+++)	(++)
Grupo carbonilo: Aldehídos y cetonas	(-)	(-)
Grupo hidroxilo: Fenoles y taninos	(+)	(++)
Hidrocarburos aromáticos	(++)	(+)
Terpenos	(-)	(+)

Presencia del metabolito secundario con un diámetro de 2.5 mm; (++) Presencia del metabolito secundario con un diámetro de 5 mm; (+++) Presencia del metabolito secundario con un diámetro de 10 mm; (-) Ausencia del metabolito secundario.

## 6.6. Actividad larvicida

El ANOVA mixto de la mortalidad de *S. frugiperda* por efecto del tipo de hoja ( $F = 66.128$ ;  $df = 1, 15$ ;  $P < 0.001$ ), el disolvente ( $F = 1415.061$ ;  $df = 313, 1, 15$ ;  $P < 0,001$ ), y la especie vegetal ( $F = 349.028$ ;  $df = 312, 3, 13$ ;  $P < 0.001$ ) de los extractos ensayados mostraron un efecto significativo según la corrección de trazos de Pillai para  $\alpha < 0.05$  y el ANOVA mixto de la triple interacción entre la especie vegetal, el disolvente y la concentración de extracto fue significativo con los

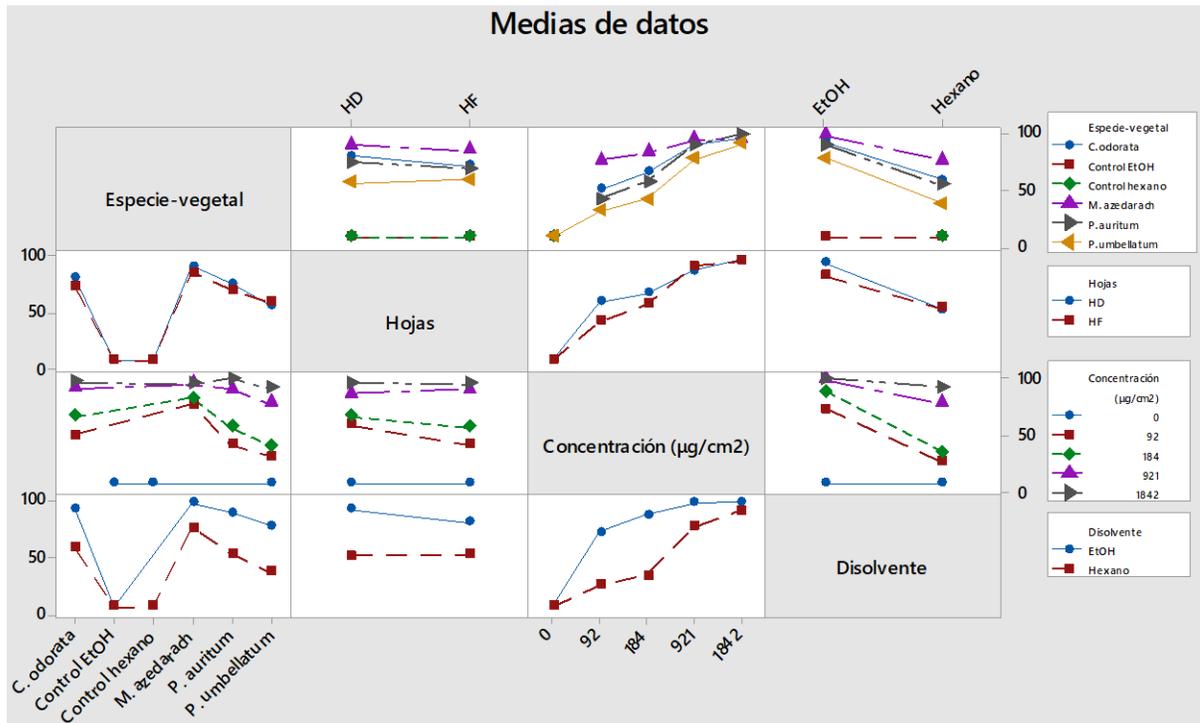
siguientes parámetros estadísticos  $F=5.322$ ;  $df=12, 45$ ;  $P < 0.001$ . De manera general, la [Figura 23](#) muestra que la concentración ejerce el mayor efecto en relación con la mortalidad larval seguida de la especie vegetal y del tipo del disolvente. El tipo de hoja tuvo poco efecto en el porcentaje de mortalidad.



**Figura 23.** Gráfica de efectos principales para la mortalidad (%).

De manera particular, en la [Figura 24](#), se presenta cada uno de los factores con las interacciones de todas las variables trabajadas. Por ejemplo, el tipo de solvente, los extractos etanólicos obtenidos de las hojas frescas y deshidratadas de las plantas estudiadas mostraron una mayor actividad (mortalidad media de  $76.2 \pm 32.6\%$ ,  $n = 160$ ) sobre las larvas de *S. frugiperda* que los extractos de hexano (mortalidad media de  $48.6 \pm 35.9\%$ ,  $n = 160$ ) obtenidos de las mismas plantas. Por otro lado, conforme aumenta la concentración mayor es el porcentaje de mortalidad, es decir a concentraciones 1842 y 920  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  los extractos de las tres plantas ensayadas controlan *S. frugiperda* aproximadamente al 100%. También, se observa que en las dos concentraciones más bajas de 92 y 184.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , la actividad larvicida disminuye al 20% para ambas plantas Piperaceae, y también para el extracto de hexano obtenido de las hojas frescas de *C. odorata*. De igual manera, se observa que el tipo de especie vegetal influye en el porcentaje de mortalidad y

que *C. odorata* y *P. auritum* a la concentración más baja estudiada ( $92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), presentan porcentajes de mortalidad de 97.9 y 91.7 respectivamente, valores similares al porcentaje de mortalidad del control positivo (*M. azedarach*). Se conoce que estas plantas pertenecen a familias con actividad insecticida (Nogueira et al. 2020; Salleh et al. 2020).



**Figura 24.** Mortalidad (media (%)  $\pm$  SE) de larvas de primer estadio de *S. frugiperda* por efecto de la concentración ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de extractos fitoquímicos obtenidos con EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes. La corrección de Pillaie indica las diferencias en la mortalidad de las larvas debidas a los factores principales (concentración del extracto, disolvente, tipo de hoja y especie de planta). Las interacciones dobles, triples y cuádruples fueron significativamente diferentes, siendo las únicas excepciones las interacciones dobles especie vegetal-hojas y hojas-disolvente. La diferencia entre medias se determinó mediante la prueba de Bonferroni para una  $p < 0.05$ .

El presente estudio, muestra que los extractos etanólicos de las hojas deshidratadas de *P. auritum* y *C. odorata* fueron los que presentaron mayor actividad tóxica en contra de *S. frugiperda*. La concentración letal de 5000 g/mL ( $92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) es alta, pero nos permitió seleccionar la planta con potencial bioinsecticida, además de que las concentraciones letales de los extractos crudos suelen ser altas. Por ejemplo; Bullangpoti y col. 2012 reportaron que 12000 g/mL de un extracto etanólico de las hojas deshidratadas de *M. azedarach* fueron necesarios para alcanzar el 100% de

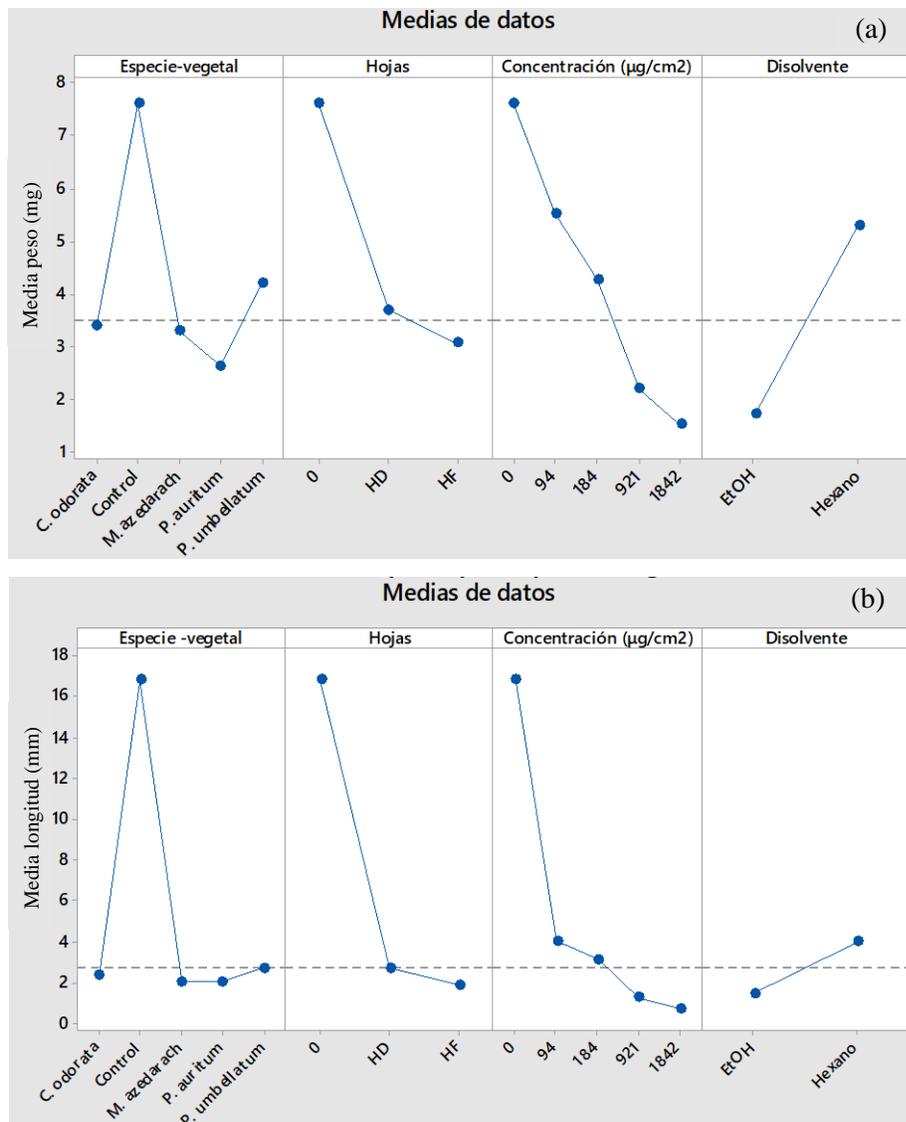
mortalidad en las larvas de tercer instar de *S. frugiperda*. El efecto tóxico, lo atribuyen a los triterpenoides como bakayanina, meliacarpininas y azadiractina que causan actividad antialimentaria, regulan el crecimiento, afectan la actividad del NADPH-citocromo c reductasa y de la colinesterasa en *S. frugiperda*. En este estudio, *C. odorata* fue una de las plantas que presentó mayor actividad larvicida, esto se debe quizá a la presencia de sesquiterpenos, limonoides y triterpenos que se han identificado de esta planta como mayoritarios (Sección 1.2.4.1.1). Además, los resultados de GC (Tabla 12 y Figura 19) muestran al  $\beta$ -sesquifelandreno (14%) y el  $\gamma$ -muuroleno (13.8%) como los metabolitos mayoritarios y pertenecen al grupo de los sesquiterpenos. Por lo tanto, la congruencia de lo reportado por Bullangpoti y col. 2012 y los resultados obtenidos en este trabajo son la toxicidad de las plantas y la presencia de terpenos. En cuanto a la actividad insecticida de plantas del género *Piper*, Lucena y col. 2017 reportaron porcentajes de mortalidad del 31% en larvas de *S. frugiperda* expuestas a 15000 g/mL de un extracto etanólico de hojas deshidratadas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae), los autores mencionan que el efecto tóxico podría deberse a la presencia de apiol, compuesto mayoritario del extracto de *Piper aduncum*. La congruencia de lo reportado por Lucena y col. 2017 y lo reportado en este trabajo para *P. auritum*, es que en ambos estudios los extractos presentan como compuestos mayoritarios a los fenilpropanoides. También, Celis y col. 2014 informaron porcentajes de mortalidad del 80.3% en larvas de segundo instar de *S. frugiperda* expuestas a extractos etanólicos de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae), *Piper el-bancoanum* Trel. y Yunck (Piperaceae) en concentraciones de 50 y 200 g/mL. Las toxicidades se atribuyen a las amidas del tipo isobutil, pirrolidina, dihidropiridina y piperidina. De las dos especies Piperaceae analizadas en este trabajo, *P. auritum* mostró mayor actividad larvicida contra *S. frugiperda*. Esta actividad se debe quizá a la presencia de safrol (Tabla 12), aunque también se sabe que el safrol no representa el 100% de mortalidad, ya que el extracto hexánico de *P. auritum* contiene una

concentración mayor de safrol (Tabla 13) y no presentó un porcentaje de mortalidad superior. Sin embargo, se sabe que el safrol actúa como sinergizante de alcaloides y terpenos (Bakkali et al. 2008), metabolitos presentes en el extracto etanólico de *P. auritum* identificados por TLC (Tabla 15). Además, Scott y col. (2005) mencionan que especies de la familia Piperaceae presentan toxicidad contra insectos debido a la presencia de isobutil amidas.

### 6.6.1. Disminución del peso y longitud larval

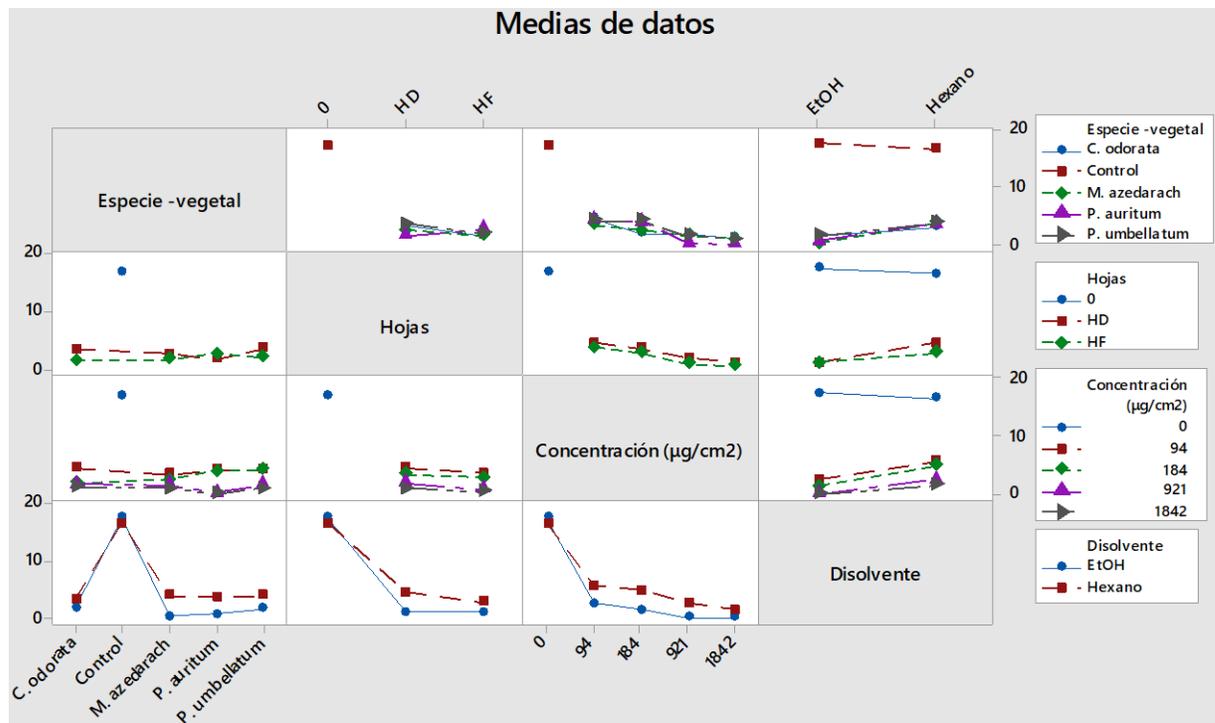
Las larvas supervivientes expuestas a los extractos de EtOH y hexano mostraron un acortamiento en su tamaño y pérdida de peso (Figuras 26 y 27). El ANOVA mixto indicó diferencias en el tamaño de las larvas por efecto de los siguientes factores principales: especie vegetal (F=57.348; df=3,13; P<0.001), tipo de hoja (F=66.933; df=1,15; P<0.001), disolvente (F=399.599; df=1,15; P<0.001) y concentración (F=548.915; df 356 =4,15; P<0.001); las interacciones dobles, triples y cuádruples entre los factores también mostraron diferencias significativas, excepto la interacción doble entre la especie vegetal y el disolvente (F=0.987; df =3,13; P=0.429).

En la Figura 25a y b, se muestra que el factor concentración ejerce el mayor efecto sobre la longitud larval y el peso. 1842 µg/cm<sup>2</sup> provoca un acortamiento de la longitud y peso. El tipo de disolventes es la segunda variable en mostrar efecto sobre la longitud y el peso. El EtOH muestra un acortamiento y disminución del peso mayor con respecto al hexano. El tipo de especie también ejerce efecto sobre la longitud y peso. El extracto de *P. auritum* y *M. azedarach* fueron los que presenta mayor acortamiento y menor peso larval. Ambas gráficas se observan muy similares.



**Figura 25.** Efectos principales para (a): el peso (mg) y (b):la longitud (mm) en larvas.

En la [Figura 26](#), se observan los efectos que tienen las interacciones de los factores con respecto a la longitud. Las interacciones especie vegetal, concentración y el solvente, son los factores que más afectan a la longitud. El EtOH provoca un mayor acortamiento larval del 47.4%, y las concentraciones de 921 y 1842 µg/cm<sup>2</sup> presentaron mayor efecto sobre la longitud de las larvas con ambos disolventes (hexano y EtOH), siendo más notorio con EtOH. También de las tres plantas analizadas *C. odorata* y *P. auritum* presentan una reducción larval similar al extracto control (*M. azerach*) y, por último, el tipo de hoja hace que el acortamiento larval sea más notorio.

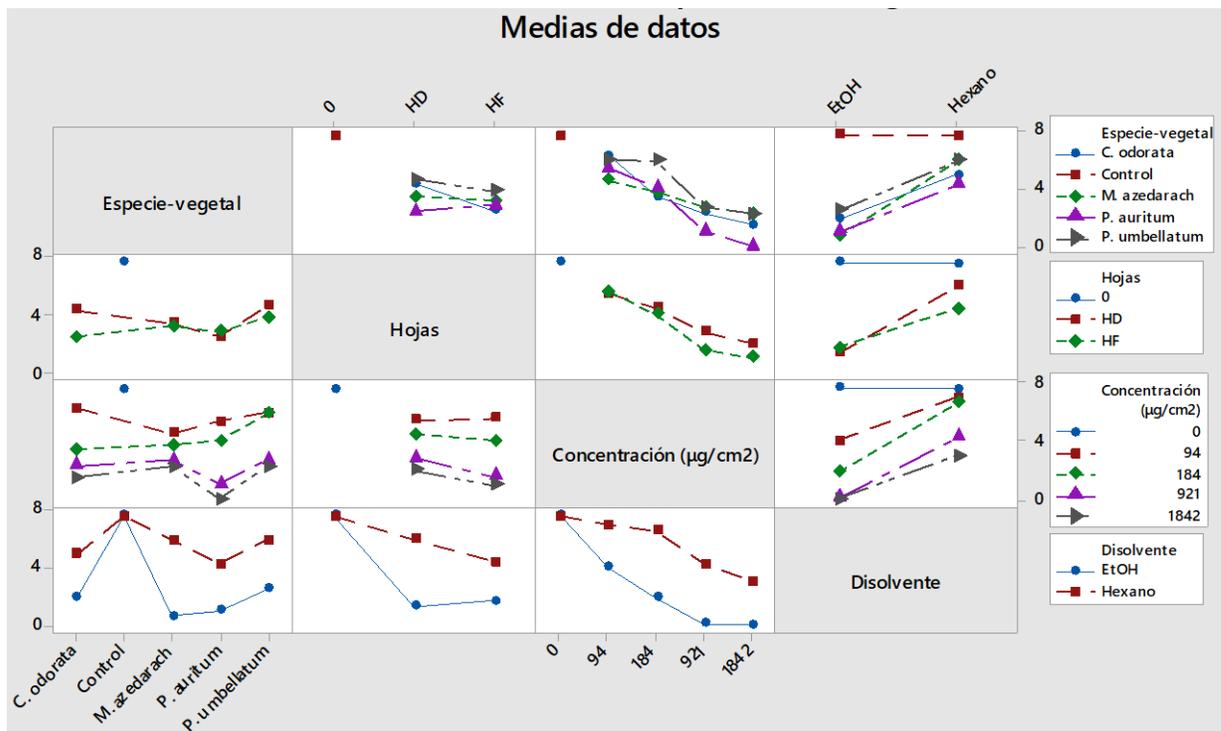


**Figura 26.** Longitud (media (mm)  $\pm$  SE) de larvas de *S. frugiperda* expuestas durante siete días a extractos fitoquímicos obtenidos con disolventes de EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes. El ANOVA mixto indicó diferencias en el tamaño de las larvas por efecto de los factores principales (concentración de extracto ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), disolvente, tipo de hoja y especie de planta) y sus interacciones dobles, triples y cuádruples, siendo la interacción doble entre los factores especie de planta y disolvente la excepción. La diferencia entre medias se determinó mediante la prueba de Bonferroni para una  $p < 0.05$ .

La variación de peso en las larvas expuestas a los diferentes extractos fue congruente con sus respectivas variaciones de tamaño antes mencionado. Los factores concentración del extracto ( $F=275.148$ ;  $df=4,15$ ;  $P<0.0001$ ) y disolvente ( $F=69.302$ ;  $df=1, 15$ ;  $P<0.001$ ) produjeron el mayor impacto en el desarrollo de las larvas. Sin embargo, aunque el ANOVA mixto del peso de las larvas mostró diferencias significativas, éstas fueron escasas para los efectos intrasujeto probados, con valores de  $F$  en el rango de 2.514 y 23.869, para una  $P<0.039$ .

Por lo tanto, en la Figura [Figura 27](#) las interacciones entre el material vegetal, solvente y concentraciones son los que presentan mayor efecto sobre el peso larval. Con los extractos de EtOH a la concentración más alta ( $1842 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), el peso de las larvas de *S. frugiperda* fue

cercano a cero para el control (*M. azedarach*); sin embargo, a 92 y 184.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , el peso de las larvas fue de alrededor del 50% en comparación con el peso del control negativo.



**Figura 27.** Peso (media (mg)  $\pm$  SE) de larvas de *Spodoptera frugiperda* expuestas durante siete días a extractos fitoquímicos obtenidos con disolventes de EtOH y hexano de hojas deshidratadas (HD) y frescas (HF) de cuatro plantas diferentes. El ANOVA mixto indicó diferencias en el tamaño de las larvas por efecto de los factores principales (concentración de extracto ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), disolvente, tipo de hoja y especie de planta) y sus interacciones dobles, triples y cuádruples, siendo la interacción doble entre los factores especie de planta y disolvente la excepción. La diferencia entre medias se determinó mediante la prueba de Bonferroni para una  $p < 0.05$ .

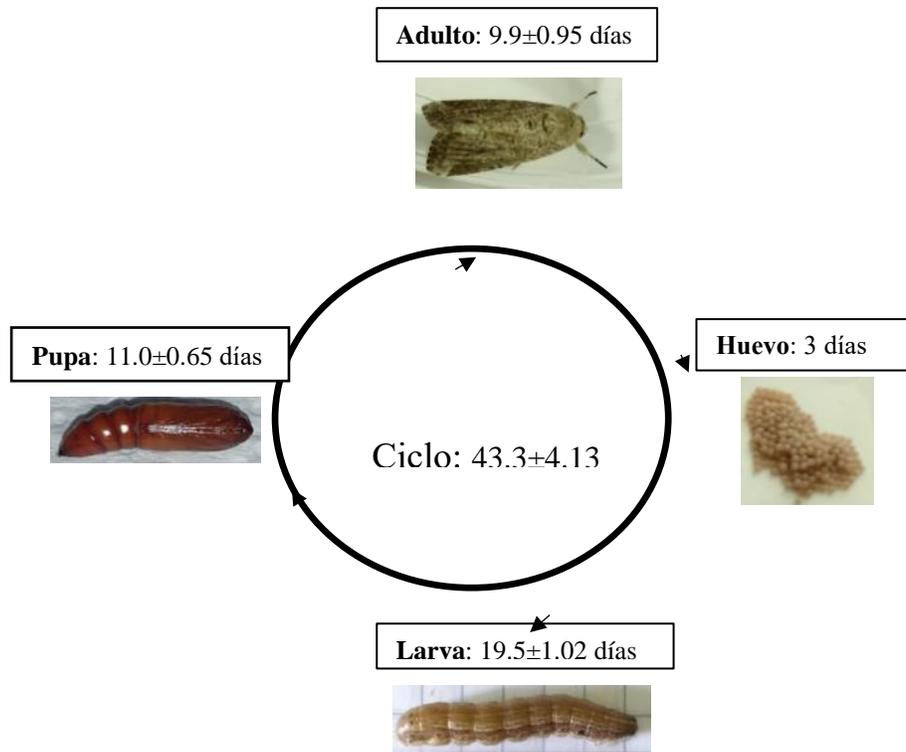
La reducción de tamaño y la pérdida de peso son algunos de los efectos reportados en larvas de *S. frugiperda* expuestas a fitoquímicos. En la literatura, se encontró que 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de saponinas de *Gypsophila*, *Glycine max* y *Quillaja saponaria*, a pesar de no presentar mortalidad en larvas de *S. frugiperda* primer instar, si inhibieron el crecimiento en aproximadamente 20-50% (Dowd et al. 2011). De la misma manera, Macleod y col. (1990), mencionan que la meliatoxina A<sub>2</sub> a 400-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  redujo la ingesta en un 80% aproximadamente y que el peso se redujo de 144 mg (control) a 39 mg en larvas de *S. litura*. Los autores atribuyen la disminución del peso (73%), a

la baja tasa de consumo. También [Scapinello y col. \(2014\)](#) informaron de un acortamiento en el tamaño del 58 % y una disminución del peso en un 92% en larvas de *S. frugiperda*, expuestas a 5000 µg/ml de un extracto de frutos de *M. azedarach*. La reducción del peso y longitud se asocia a la actividad antialimentaria que generó el extracto y también a que promueve la activación del citocromo P-450, un mecanismo de degradación de compuestos tóxicos y por lo tanto se desvían los recursos energéticos que generalmente se utilizan para el aumento de la biomasa de las larvas. Así mismo, [Céspedes y col. \(2000\)](#) informaron de un acortamiento del 47 % y pérdida de peso en un 92%, generado por gedunina, un triterpenoide extraído de *Cedrela dugessi* S. Watson y *Cedrela salvadorensis* Stadl. Por último, [Cárdenas y col. \(2012\)](#), alimentaron larvas neonatas de *S. frugiperda* con 1000 µg/ml de extracto de hojas de *Bursera copallifera* y mostró una reducción de peso y tamaño del 73% y 35% respectivamente. También reportaron que la acetilcolinesterasa de *S. frugiperda* fué inhibida por extractos de *B. copallifera* de MeOH (IC<sub>50</sub>=367 µg/ml) y de EtOAc (IC<sub>50</sub>=397 µg/ml). El acortamiento y la pérdida de peso de las larvas tratadas con 921µg/cm<sup>2</sup> de extracto de *P. auritum* y *M. azedarach* en este trabajo mostraron valores similares a lo reportado por [Céspedes y col. \(2000\)](#), [Cárdenas y col. \(2012\)](#) y [Scapinello y col. \(2014\)](#). También los autores concuerdan en que estos efectos se deben principalmente a la actividad antialimentaria, así como también a la activación del citocromo P-450.

### **6.7. Actividad biológica de *P. auritum* sobre el ciclo de vida de *S. frugiperda***

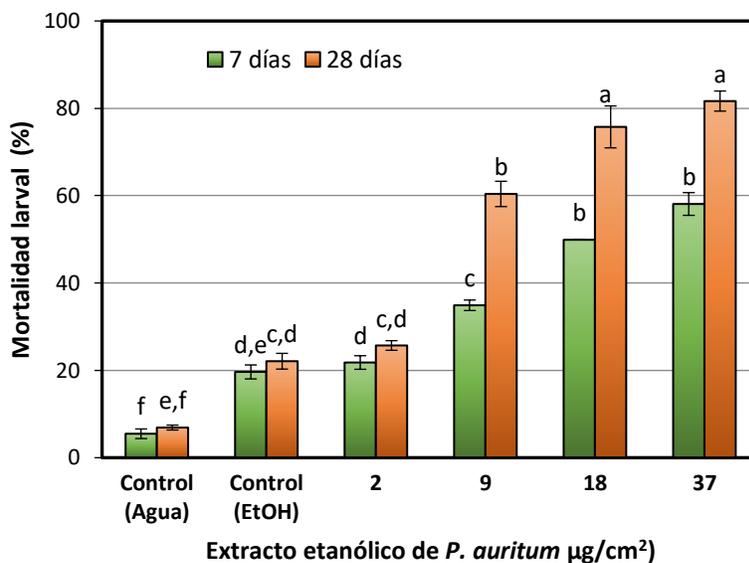
La fisiología normal de *S. frugiperda* se presenta en la [Figura 28](#), en esta se observan larvas de 25-28 días de edad con longitud de 2 a 3 cm, con colores de tonalidades beige-gris con puntos color café y de cutícula bien formada. Las pupas presentan un tamaño de 1.5 a 2 cm, de colores de rojo a café acaramelado de un tono brillante y textura suave. Las mariposas o palomillas

presentan colores y tonalidades de café claro a gris, cubierta de vellos en todo el cuerpo. Los huevecillos son esféricos de color blanco cristalino.



**Figura 28.** Ciclo de vida de *S. frugiperda* control.

Las concentraciones de 2-37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de extracto de *P. auritum* etanólico aplicadas a larvas de *S. frugiperda* por ingesta, después de los 7 y 28 días mostraron una mortalidad entre el 21 y el 81%, como se muestra en la [Figura 29](#). A 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  no presentó diferencia significativa con respecto al control (EtOH) y presentó una mortalidad baja de 21 y 27 % respectivamente a los 7 y 28 días de exposición. Los porcentajes de mortalidades mayores se observan a los 28 días y a una concentración de 18 y 37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



**Figura 29.** Actividad larvaria a los 7 y 28 días de exposición del extracto etanólico de *P. auritum* en el rango de concentración de 0-37 µg/cm<sup>2</sup>. Los valores medios que no comparten letra son significativamente diferentes según el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).  $n = 2 \times 24$  insectos por tratamiento.

El extracto etanólico de *P. auritum* presenta una mayor toxicidad conforme se incrementa el tiempo de exposición y conforme aumenta la concentración del extracto. Este incremento de la mortalidad con respecto al tiempo ha sido observado por otros autores, donde le atribuyen este efecto a la concentración y presencia de metabolitos como: cedrelona, azadirachtina, meliacarpina, melianona, pellitorina y 4,5-dihidropiperlonguminina que dañan la respiración, el apetito, la síntesis de enzimas de importancia para el desarrollo y supervivencia de los insectos (Bullangpoti et al. 2012; Soberón-Risco et al. 2012; Scapinello et al. 2014; Giongo et al. 2016). Anteriormente en la Sección 6.6, se mencionó que el safrol representa cierto porcentaje de mortalidad y que el resto lo pueden estar generando los alcaloides y los terpenos. Por otro lado, la LC<sub>50</sub> obtenida del extracto de *P. auritum* a concentraciones de 2-37 µg/cm<sup>2</sup> fue de 22.1 µg/cm<sup>2</sup> (1200 µg/mL) calculado por el método Probit a los 7 días de exposición del extracto (Tabla 16). Si observamos este valor obtenido LC<sub>50</sub>=376 µg/mL, se posiciona como un valor promedio

LC<sub>50</sub>=376-2000 µg/mL), de acuerdo con lo reportado por Bullangpoti y col. 2012; Scapinello y col. 2014; Giongo y col. (2016); Alves y col. (2018).

**Tabla 16.** Concentración letal del extracto etanólico de las hojas deshidratadas de *P. auritum* en larvas de *S. frugiperda* de primer instar.

	Concentración (µg/mL)	Límites de confianza del 95% para µg/mL		Concentración (µg/cm <sup>2</sup> )	Límites de confianza del 95% para µg/cm <sup>2</sup>	
		Límite inferior	Límite superior		Límite inferior	Límite superior
<i>S. frugiperda</i> expuesta a 7 días (Análisis Probit. $X^2=3.409$ ; gl=14; Sig.=0.998)						
LC <sub>50</sub>	1200	700	3250	22.1	13.0	60.0
LC <sub>56</sub>	1750	970	6330	31.8	17.9	116.6
<i>S. frugiperda</i> expuesta a 28 días (Análisis Probit. $X^2=3.251$ ; gl=14; Sig.=1.000)						
LC <sub>50</sub>	270	180	380	4.90	3.29	7.03
LC <sub>83</sub>	1980	1200	4490	36.46	22.12	82.78

### 6.7.1. Alteración de los tiempos de desarrollo.

Otra de las afectaciones que se observa por efecto del extracto etanólico de *P. auritum*, es la alteración en los tiempos de desarrollo de *S. frugiperda* (Tabla 17). Durante los estadios, larval y pupal, se observa una prolongación, dependiente de las concentraciones de *P. auritum*. A 37 µg/cm<sup>2</sup> de extracto de *P. auritum*, la etapa larvaria fue mayor (28.5±0.79 días), 9 días más con respecto al control (H<sub>2</sub>O) y la etapa pupal de igual manera se alargó 5.8 días más con respecto al control (H<sub>2</sub>O). En la etapa adulto de *S. frugiperda*, los tiempos se vieron reducidos 4 y 5 días en las concentraciones de 18 y 37 µg/cm<sup>2</sup> respectivamente, debido a la mortalidad temprana de los adultos, por la afectación causada del extracto. Por otro lado, se observa que los tiempos de eclosión no se vieron afectados por el extracto de *P. auritum* a diferentes concentraciones.

**Tabla 17.** Duración de los estadios de larva, pupa, adulto, huevo, ciclo completo de *S. frugiperda* en diferentes tratamientos.

Tratamientos		Estado de desarrollo promedio (días) $\pm$ DS				
		Larva	Pupa	Adulto	Huevo	Ciclo
<i>P. auritum</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	2	25.6 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	12.5 $\pm$ 1.22 <sup>a,b</sup>	7.8 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	48.7 $\pm$ 2.91 <sup>a,b</sup>
	9	26.8 $\pm$ 0.89 <sup>a,b</sup>	14.0 $\pm$ 1.40 <sup>a,b</sup>	6.7 $\pm$ 0.63 <sup>a,b</sup>	3.0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	49.0 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>
	18	27.0 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	15.4 $\pm$ 1.70 <sup>a,b</sup>	4 $\pm$ 0.71 <sup>b,c</sup>	-	43.7 $\pm$ 1.53 <sup>a,b</sup>
	37	28.5 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	16.8 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	3 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>	-	44.8 $\pm$ 2.98 <sup>a,b</sup>
Control (H <sub>2</sub> O)		19.5 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>	11.0 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	9.9 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	43.3 $\pm$ 4.13 <sup>b</sup>
Control (EtOH)		24.5 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	10.9 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	47.0 $\pm$ 3.88 <sup>a,b</sup>

DS = desviación estándar. Los promedios con las mismas letras no presentan diferencia significativa, según la prueba de tukey.

La prolongación de los estadios larvario y pupal observadas en *S. frugiperda*, ya han sido reportados por Bullangpoti y col. 2012, cuando larvas de *S. frugiperda* fueron expuestas a azadirachtina a 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las larvas puparon 5 días después de las larvas control. También se observó que el extracto crudo de *Jatropha gossypifolia* L. a 12000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las larvas puparon 7 días después que las larvas control. Una explicación del porque se observa una prolongación del estado larvario lo presenta Dorn y col. (1986) quienes observaron un aumento de la concentración de la hormona ecdisona. Así mismo, se reportó que el retraso genera malformaciones en los ejemplares adultos (Rizzo y La Rossa 1992).

### 6.7.2 Actividad pupicida y fertilidad.

El extracto de *P. auritum*, generó muerte de pupas que va de 19 a 81% como se presenta en la Tabla 18. También se observa que la fertilidad de los adultos se ve afectada conforme aumenta la concentración del extracto, concentraciones de 18 y 37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mostraron una nula oviposición.

**Tabla 18.** Actividad pupicida, fertilidad total e índice de actividad de oviposición.

Tratamientos		Actividad pupicida±SE	Fertilidad total ±SE	Índice de actividad de oviposición ±SE
<i>P. auritum</i> (µg/cm <sup>2</sup> )	2	19.86±2.35 <sup>c</sup>	457.33±181.03 <sup>a,b,c</sup>	-0.28±0.29 <sup>a</sup>
	9	31.5±2.60 <sup>b</sup>	140.5±82.73 <sup>b,c</sup>	-0.69±0.28 <sup>b</sup>
	18	71.77±3.46 <sup>a</sup>		-1.0±0.0 <sup>b,c</sup>
	37	81.39±2.76 <sup>a</sup>		-1.0±0.0 <sup>c</sup>
<b>Control (H<sub>2</sub>O)</b>		0.0±0.0 <sup>d</sup>	862.37±161.57 <sup>a</sup>	
<b>Control (EtOH)</b>		7.75±1.91 <sup>d</sup>	560.33±56.04 <sup>a,b</sup>	-0.18±0.04 <sup>a</sup>

SE=desviación estándar. Los valores medios que no comparten letra son significativamente diferentes según el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

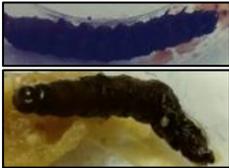
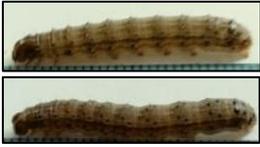
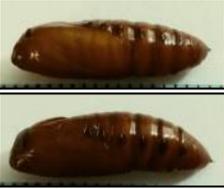
La mortalidad pupal e infertilidad de *S. frugiperda*, causada por extractos también fue observada por [Sosa y col. \(2019\)](#), quienes alimentaron larvas de *S. frugiperda* de segundo instar con 300 µg/g de dieta de extracto metanólico de *Vernonanthura nebularum* y observaron una mortalidad pupal del 30%. También, una disminución de fertilidad (control=743 ± 74, tratados=185 ± 18) fue observada, cuando larvas de *S. frugiperda* fueron alimentadas con 300 µg/g de una fracción rica en lactona de *V. Nebularum*.

La disminución del número de huevos ovipositados y del número de huevos eclosionados se puede deber a cambios morfofisiológicos en el sistema reproductivo debido a la falta de nutrientes y a los compuestos fenólicos ([Alves et al. 2018](#)). Así mismo, el efecto antialimentario causado por el safrol ya fue comprobado por [Andrés y col. 2017](#), en larvas de *Spodoptera littoralis*.

### 6.7.3 Daño en la fisiología de *S. frugiperda*.

Se observaron alteraciones durante los estadios larvario, pupal y adulto ([Figura 30](#)) de *S. frugiperda* tratadas con 2, 9, 18 y 37 µg/cm<sup>2</sup> de extracto de *P. auritum*. Las larvas presentaron áreas arrugadas y segmentos dorsales hinchadas, así como oscurecimiento del color y partes de la vieja cutícula quedaron en la nueva. En el estadio pupal, se observa una metamorfosis

imperfecta de cuerpos arrugados y deformes. Los cuerpos son más pequeños, con zonas en la cutícula delgadas y negras. En el estadio adulto, se presentan alas deformes y arrugadas, así como ausencia de alas y antenas defectuosas. Estas afectaciones van en incremento conforme aumenta la concentración del extracto de *P. auritum*.

Tretamientos		Larvas	Pupas	Adultos
<i>P. auritum</i> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	2			
	9			
	18			
	37			
Control (EtOH)				
Control (H <sub>2</sub> O)				

**Figura 30.** Anomalías fisiológicas en larvas, pupas y adultos de *Spodoptera frugiperda* causados por el extracto de EtOH de *P. auritum* dentro del rango de concentración de 0 - 37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Alteraciones en la fisiología de *S. frugiperda* han sido reportadas por diferentes investigadores. [Sosa y col. \(2019\)](#) observaron en larvas y pupas de *S. frugiperda* alimentadas con 300 µg/g de *V. nebularum* un extracto rico en lactona, que causó deformidades en el tórax y abdomen de las pupas, así como mudas incompletas de larvas a pupas y deformidad en las alas de los adultos en un 25%. Asimismo, [Aldana y col. \(2010\)](#) reportaron un 35 % de pupas deformes cuando larvas de *S. frugiperda* fueron alimentadas con 500 µg/mL de extracto metanólico de hojas de *Bursera grandifolia*.

Se conoce que las principales hormonas que están involucradas en la metamorfosis de *S. frugiperda* son la ecdisona y hormonas juveniles como se presenta en la Sección de Introducción en la [Figura 10](#). También se ha informado, que las malformaciones en los insectos pueden ser inducidas por una amplia variedad de metabolitos clasificados dentro de los grupos de diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, ácidos grasos y otros compuestos que atacan a compuestos objetivo vulnerable como las monooxigenasas del citocromo P-450 y las carboxilesterasas ([Bhardwaj et al. 2010](#), [Bullangpoti et al. 2012](#), [Scapinello et al. 2014](#)) ocasionando afectación y alteraciones en los insectos. El extracto etanólico de *P. auritum* contiene a los grupos de metabolitos mencionados anteriormente que se sabe que generan malformaciones ([Tabla 12](#) y [15](#)). De manera particular, en la literatura se ha reportado que la azadiractina, el brasinólido y la digitonina son disruptores endocrinos regulando el crecimiento, la regeneración de tejidos, la reproducción, la muda y la metamorfosis debido a la inhibición de las hormonas ecdisona y juvenil (Neotenina) ([Álvarez-Colom et al. 2009](#)). También se sabe que el safrol, activa el citocromo P-450, provocando que el insecto gaste energía en este proceso y limita su nutrición ([Andrés et al. 2017](#)).

## 6.8. Extracción y purificación de safrol

### 6.8.1. Rendimiento del extracto de hoja deshidratada de *P. auritum*

El rendimiento del extracto etanólico de la hoja deshidratada de *P. auritum* obtenido por maceración, se presenta en la [Tabla 19](#). Este valor fue 1 % más con respecto al rendimiento del extracto con el uso del ustrasonido. El incremento del rendimiento se puede deber al tiempo y técnica de extracción.

**Tabla 19.** Rendimiento de extracción de hoja deshidratada de *P. auritum*.

Material (g)	Extracto crudo (g)	Rendimiento %
325±35.35	23.3± 1.84	7.15±0.21

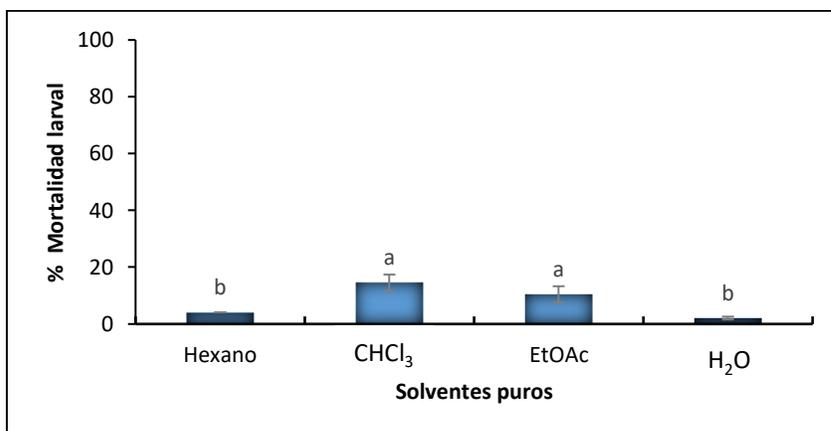
### 6.8.2. Estudio fitoquímico bioguiado del extracto etanólico de hoja de *Piper auritum*

De 24 g de extracto etanólico, se obtuvieron 4 extractos de la extracción por polaridad. En la [Tabla 20](#), se presentan los rendimientos (p/p) de los extractos con los diferentes disolventes. La partición de mayor rendimiento es la de hexano con un porcentaje de 82.5%. Quizá debido a que el mayor porcentaje de los compuestos son afines al hexano y se encuentra en mayor cantidad.

**Tabla 20.** Porcentajes de rendimiento de extracción con base en 24 g de extracto etanólico de *P. auritum*.

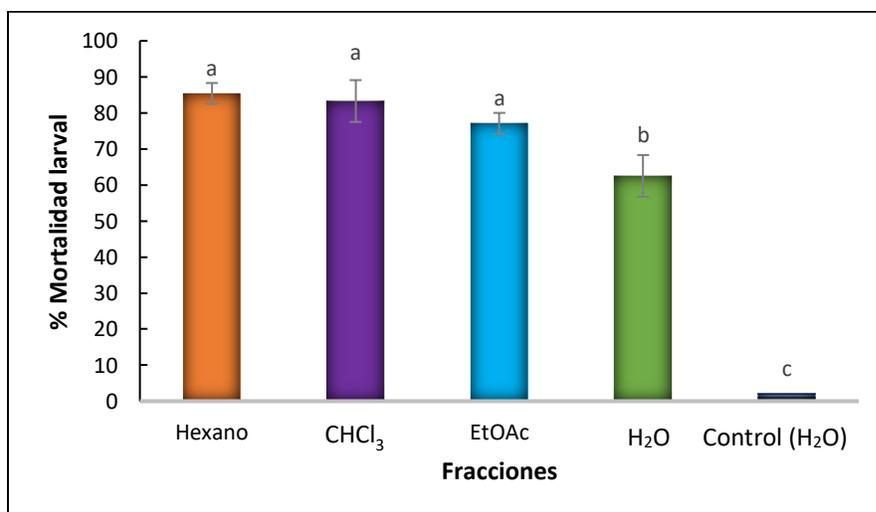
Disolventes	Extracto crudo (g)	Rendimiento % para 24 g
Hexano	19.8	82.5
CHCl <sub>3</sub>	1.3	5.5
EtOAc	0.09	0.37
H <sub>2</sub> O	2.1	8.8

Una vez que se obtuvieron los extractos antes presentados ([Tabla 20](#)), se continuó primero con el bioensayo larval de los disolventes de CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, hexano y H<sub>2</sub>O. Donde se encontró que el CHCl<sub>3</sub> y EtOAc fueron los que presentaron mayor porcentaje de mortalidad ([Figura 31](#)).



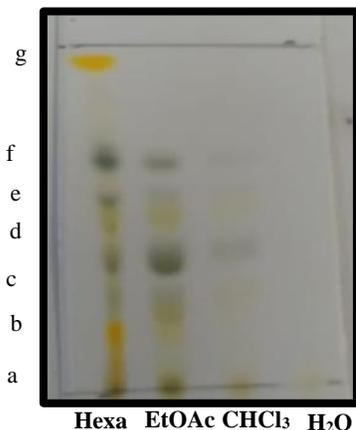
**Figura 31.** Mortalidad larval de *S. frugiperda* por efecto de los disolventes de CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, hexano y agua, después del séptimo día de aplicación. Valores de mortalidad que no comparten la misma letra son significativamente diferente de acuerdo con el método de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). n = 2 x 24 insectos por tratamiento.

Por otro lado, los porcentajes de mortalidad que causaron los extractos de hexano, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc y H<sub>2</sub>O obtenidos de la extracción por polaridad, se presentan en la [Figura 32](#), donde se observa que el extracto de hexano, CHCl<sub>3</sub> y EtOAc presentaron un porcentaje de mortalidad mayor y que la fracción acuosa fue la que presentó la mortalidad larval más baja después del séptimo día de aplicación.



**Figura 32.** Mortalidad larval de *S. frugiperda* por efecto de los extractos de *P. auritum* con los diferentes disolventes, después del séptimo día de aplicación. Valores de mortalidad que no comparten la misma letra son significativamente diferente de acuerdo con el método de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). n = 2 x 24 insectos

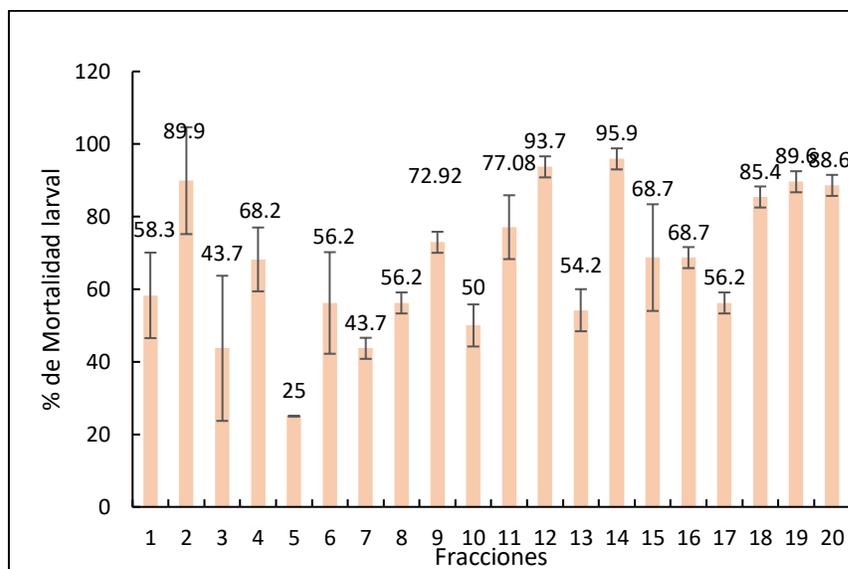
El cromatograma de TLC de las extracciones con diferentes polaridades presentó un mayor número de manchas para los extractos de hexano y  $\text{CHCl}_3$  (Figura 33) indicando un mayor número de compuestos o grupos de compuestos que pudieran tener efecto tóxico con las larvas.



**Figura 33.** Cromatograma de las extracciones. Fase móvil: hexano/ EtOAc (7:3).

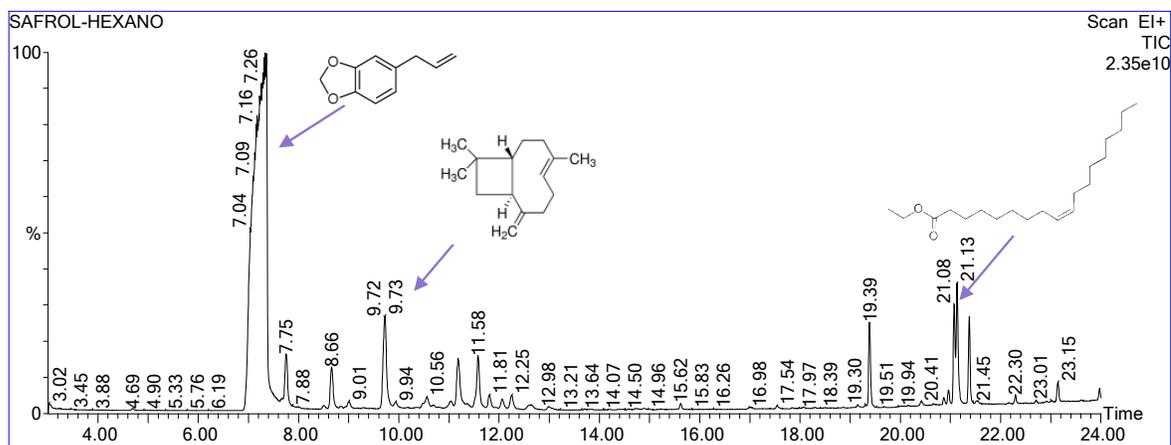
Debido a que el rendimiento de extracción con hexano fue mayor (Tabla 22), así como su porcentaje de mortalidad (Figura 32). Se decidió continuar con el fraccionamiento del extracto hexánico. 2.045 g fue sujeto a cromatografía en columna sobre silica gel de malla 60-200 y eluido con hexano/EtOAc/acetona/ $\text{CHCl}_3$ /EtOH. Un total de 135 tubos fueron colectados con 7 mL cada uno y patrones similares de cromatografía de capa fina (TLC) se agruparon en 17 fracciones

Las fracciones obtenidas de la columna del extracto hexánico se presentan en la Figura 34, y se observa que la fracción 2 de 100% hexano, fracción 12 y 14 de hexano/EtOAc 80:20% y fracción 18,19 y 20 de acetona/ $\text{CHCl}_3$  (50:50, 100%)- EtOH (100%), fueron los que presentaron mayor toxicidad contra larvas de *S. frugiperda*. El anova de un solo factor indica que existe diferencia entre las fracciones ( $F=10.01$ ;  $gl= 19$ ;  $P< 0.0001$ ).



**Figura 34.** Actividad larvicida de las fracciones de la columna del extracto hexánico.

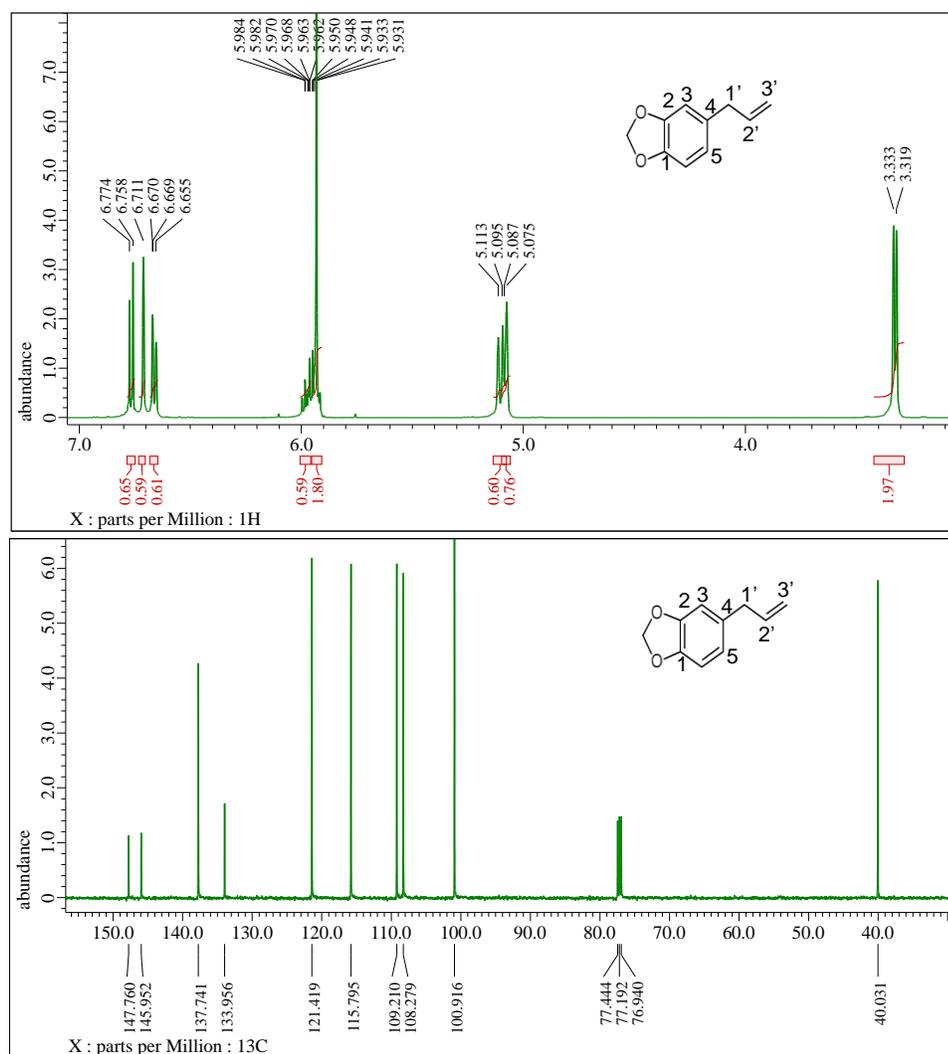
Por lo anterior, se decidió continuar con el análisis de la fracción 2. En la [Figura 35](#), se presenta un cromatograma de la fracción 2, obtenida por cromatografía de gases, donde se observa al safrol (66.2%),  $\beta$ -cariofileno (4.6%) y oleato de etilo (3.2%) como compuestos mayoritarios de un total de 20 metabolitos. También, [Rodríguez y col. \(2013\)](#), encontraron que del aceite esencial de *P. auritum*, los compuestos mayoritarios son el safrol (71.8%), canfeno (5.5%) y  $\alpha$ -pineno (3.8%) fueron los compuestos mayoritarios. También [Salleh y col. 2020](#) mencionan que el porcentaje de safrol varía de 64.5 a 93.2% dependiendo del origen y de la parte de la planta.



**Figura 35.** Cromatograma de la fracción 2. Safrol (66.2%),  $\beta$ -cariofileno (4.6%) y oleato de etilo (3.2%). Total, de 20 metabolitos (91.9%).

Posteriormente 0.914 g de la fracción 2, se sometió a una separación por cromatografía en columna y se obtuvo 0.3414g de safrol puro representando un 37.3% de rendimiento. El safrol obtenido es incoloro y de consistencia aceitoso (Anexo 4).

Para corroborar la pureza del safrol se analizaron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 36) donde se observan las señales características del safrol.



**Figura 36.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (arriba) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (abajo); y sus respectivas asignaciones para el safrol aislado de *P. auritum*.

En la [Tabla 21](#), se presentan los desplazamientos químicos en (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertz. Estos resultados también fueron reportados por [Gupta y col. \(1985\)](#) y [Vizcaíno y col. \(2016\)](#).

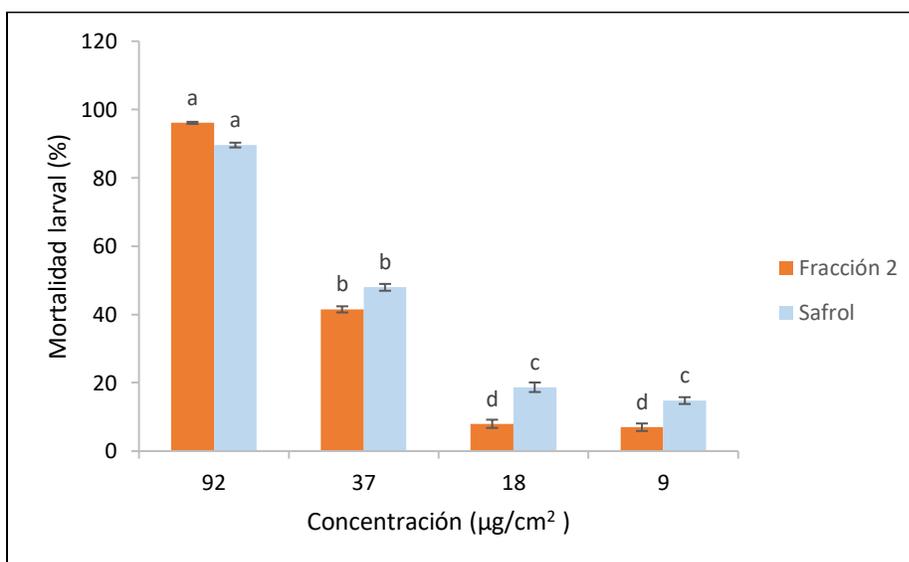
**Tabla 21.** Desplazamientos químicos ( $\delta$  en ppm) y constantes de acoplamiento ( $J$  en Hz) para el safrol. Datos obtenidos a 300 MHz, en  $\text{CDCl}_3$ .

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	145.95
2	-	147.76
3	6.71 (dd, $J=1.1, 0.4$ )	108.28
4	-	133.96
5	6.76 (dd; $J=8, 1.5$ )	121.42
6	6.66 (dd; $J=8,0$ )	109.21
1'	3.32 (d; $J=6.7$ )	40.03
2'	5.96 (ddt; $J=16.6; 10.9; 6.7$ )	137.74
3'a	5.10 (dd; $J=3.3, 1.6$ )	115.79
3'b	5.16 (dd; $J=3.3, 1.9$ )	
-O-CH <sub>2</sub> -O-	5.95 (s)	100.92

Los resultados de cromatografía de gases para la fracción 2 nos indicó que el compuesto mayoritario es el safrol y el estudio de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN nos indica que se trata del safrol puro.

### 6.9. Actividad larvica de la fracción 2 y safrol sobre *S. frugiperda*.

Los resultados de los bioensayos sobre la actividad tóxica para la fracción 2 y safrol se presentan en la [Figura 37](#), donde, se observa que a  $92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  se obtiene una mortalidad cercana al 100% para la fracción 2 y safrol.



**Figura 37.** Mortalidad larval de la fracción 2 y de safrol en larvas de primer instar de *S. frugiperda*.

Por otra parte, los resultados calculados por el método Probit mostraron un  $LC_{50}=33.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $LC_{90}=159.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para el safrol y  $LC_{50}=36.82\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $LC_{90}=104.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para la fracción 2, como se presenta en la [Tabla 22](#). Los resultados muestran que los valores de  $LC_{50}$  de safrol y la fracción 2, no presentan diferencia significativa de acuerdo con el análisis de varianza ( $F=5.870$ ;  $gl=1$ ;  $Sig.=0.136$ ). Por otro lado, si se comparan estos datos con el  $LC_{50}$  del extracto de *P. auritum* ( $LC_{50}=22.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) presentados en la Sección 6.7 en la [Figura 29](#), observamos que el extracto crudo de *P. auritum* presenta mayor toxicidad contra *S. frugiperda*. El porcentaje de mortalidad que representa el safrol es del 71% con respecto al extracto crudo de *P. auritum*. Según los resultados de mortalidad de extracto de *P. auritum* y la mortalidad de safrol, ambos a  $28\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ([Figuras 29 y 37](#)). El 29 % de la mortalidad restante puede deberse a otros metabolitos presentes en el extracto de *P. auritum* o al poder sinergizante que presenta el safrol, capaz de potenciar la actividad de otros metabolitos ([Bakkali et al. 2008](#)).

**Tabla 22.** Concentración letal de safrol y de la fracción 2 en larvas de *S. frugiperda* primer instar expuestas a 7 días.

	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}^2$ )	Límites de confianza del 95% para $\mu\text{g}/\text{mL}^2$		Concentración ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Límites de confianza del 95% para $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	
		Límite inferior	Límite superior		Límite inferior	Límite superior
<i>S. frugiperda</i> expuesta a <b>safrol</b> (Probit analisis. $X^2=22.303$ ; $df;3$ Sig.:0.0001)						
<b>LC<sub>50</sub></b>	1788.59	848.806	8799.960	33.08	15.703	162.799
<b>LC<sub>90</sub></b>	8633.28	3220.973	1962351.292	159.7	59.588	36303.499
<i>S. frugiperda</i> expuesta a <b>fracción 2</b> (Probit analisis. $X^2=40.975$ ; $df;3$ Sig.: .0001)						
<b>LC<sub>50</sub></b>	1990.59	763.710	40656.000	36.82	14.128	752.136
<b>LC<sub>90</sub></b>	5648.5	2446.192	406492590.000	104.5	45.254	7520112.915

En la literatura [Bhardwaj y col. \(2010\)](#), observaron una mortalidad de 100% de larvas de segundo instar de *S. litura* a una concentración de 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de safrol y presentó una mortalidad del 100% de las larvas. En este trabajo se necesitó 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de safrol para matar el 89% de larvas de primer instar de *S. frugiperda*. A pesar de no tratarse de la misma especie, las concentraciones

usadas para controlar ambos insectos son similares. Por otra parte, [Lima y col. \(2009\)](#) analizaron aceite esencial de *Piper hispidinervum* con un contenido de safrol del 82%, y encontraron que se necesita 16200 µg/ml de aceite para matar el 50% de larvas de *S. frugiperda* de primer instar. La toxicidad observada por el safrol se debe a la capacidad que tienen algunos fenilpropanoides para afectar la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares gracias a su carácter lipofílico ([Devi et al. 2010](#)), además investigadores como [Andrés y col. 2017](#) han reportado que el safrol, activa el citocromo P-450, provocando que el insecto gaste energía en este proceso, limitando su nutrición.

## 7. CONCLUSIONES

---

Se determinó la actividad larvaria en contra de larvas primer instar de *Spodoptera frugiperda*, de los extractos etanólico y hexánico de las hojas frescas y deshidratadas de las plantas *C. odorata*, *P. auritum* y *P. umbellatum*, todas ellas cultivados en el Estado de Oaxaca, México. De las tres plantas, los extractos etanólicos de las dos primeras presentaron actividad larvicida tan alta como la obtenida con el extracto etanólico de *Melia azadarach*, planta seleccionada como control positivo. *Melia azedarach* es una de las plantas actualmente utilizadas en el combate de insectos plaga, por tanto, los extractos de las hojas de *C. odorata* y *P. auritum*, y particularmente de ésta última, podrían ser de gran interés para la producción de insecticidas. La alta toxicidad y complejidad de los extractos vegetales ha sido una de las limitantes para la regulación de los insecticidas botánicos, sin embargo, en el caso de *P. auritum*, planta utilizada en algunos países como condimento, la aprobación para su comercialización como insecticida no debería ser un problema.

El estudio de la actividad biológica del extracto etanólico de *P. auritum* en las larvas primer instar de *S. frugiperda* permitió observar que en una concentración desde  $18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , el extracto etanólico de esta planta alargó el estadio larval y el proceso de muda. La alteración del proceso de muda, favoreció la deformación de larvas, pupas y la emergencia de adultos sanos; los adultos emergidos con deformaciones fisiológicas perdieron su capacidad de oviposición. La observación de la actividad biológica de *P. auritum* en las larvas de *S. frugiperda* permite asumir que el uso del extracto etanólico de *P. auritum* como insecticida podría ser útil para detener el proceso de propagación de *S. frugiperda* en los cultivos agrícolas.

El fraccionamiento en columna cromatográfica del extracto etanólico de *P. auritum* permitió identificar al safrol como el principal componente en la fracción identificada como la más tóxica en contra de las larvas primer instar de *S. frugiperda*. El safrol ya ha sido reportado como altamente tóxico en contra de larvas del mismo género, sin embargo, en el presente estudio la evaluación de su toxicidad en forma pura, no generó los resultados esperados, lo que permite asumir que requiere de la presencia de los demás componentes del extracto para su aplicación en el combate de *S. frugiperda*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se asume que se cumplieron los objetivos planteados al inicio de la presente tesis de investigación.

## 8. RECOMENDACIONES

---

1. Aislar el alcaloide o el flavonoide mayoritario presente en el extracto de *P. auritum*, para hacer una comparación con el safrol.
2. Realizar el estudio del ciclo biológico de *S. frugiperda* con el safrol.
3. Realizar pruebas de actividad ovicida con los extractos de *P. auritum*, *C. odorata* y safrol.
4. Realizar una combinación de extractos de *P. auritum* con *M. azedarach* para mejorar la toxicidad.
5. Realizar pruebas de actividades enzimáticas con el uso de los extractos y el safrol.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

- Abang** A.F., Nanga S.N., Fotso Kuate A., Kouebou C., Suh C., Masso C., Saethre M.G., Fiaboe K.K.M. (2021) Natural enemies of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in different agro-ecologies. *Insects*. 12:509-520.
- All** J.N. (1988) Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestations in no-tillage cropping systems. *Fla. Entomol.* 71:268–272.
- Andrés** M.F., Rossa G.E., Cassel E., Vargas R., Santana O., Díaz C.E., González-Coloma A. (2017) Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. *Food Chem. Toxicol.* 109:1086-1092.
- AOAC** (1999) Official Methods of Analysis. Loss on Drying (Moisture) for Feeds (at 135°C for 2 Hours)/Dry Matter on Oven Drying for Feeds (at 135°C for 2 Hours). Method: AOAC 930.15-1930 (1999).
- Aldana** L.L., Salinas S.D.O., Valdés E.M.E., Gutiérrez O.M., Valladares C. (2010) Evaluación bioinsecticida de extractos de *Bursera copallifera* (D.C.) bullock y *Bursera grandifolia* (SCHLTDL) ENGL en gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Polibotánica*. 29:149-158.
- Álvarez-Colom** O., Neske A., Chahaboune N., Zafra-Polo M.C, Bardón A. (2009) Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. *Chem. Biodivers.* 6(3):335-340.
- Alves** D. S., Carvalho G.A., Oliveira D.F., Corrêa A.D. (2018) Screening of Brazilian plant extracts as candidates for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 44(1): 32-38.
- Aribia** N., Oulhacia M.C., Kilani-Morakchia S., Sandozb J.C., Kaiserb L., Denisb B., Jolyb D. (2017) Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity, and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 143:95-101.
- Assefa** F., Ayalew D. (2019) Status and control measures of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) infestations in maize fields in Ethiopia: A review. *Cogent. Food agric.* 5(1):1-16.
- Azmir** J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117:426-436.
- Bakkali** F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-475.
- Badui** D.S. (2006) Química de los alimentos. Ed. Pearson México, 4<sup>ta</sup> ed. México, pp 13-21.

- Belay** D.K., Huckaba R.M., Foster J.E. (2012) Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), at Santa Isabel, Puerto Rico, to different insecticides. Fla. Entomol. 95:476-478.
- Bezzar-Bendjazia** R., Kilani-Morakchi S., Maroua F., Aribi N. (2015) Azadirachtin induced larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Int J Biochem Cell Biol. 64:126-135.
- Bhardwaj** A., Tewary K. D., Kumar R., Kumar R., Sinha K. A., Shanker A. (2010) Larvicidal and structure activity studies of natural phenylpropanoids and their semisynthetic derivatives against the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (FAB.) (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biodivers. 7(1):168-177.
- Bullangpoti** V., Wajnberg E., Audant P., Feyereisen R. (2012) Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) and their potential use as synergists. Pest Manag. Sci. 68 (9):1255-1264.
- Bruneton** J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: Technique et Documentation Lavoisier. 5<sup>ta</sup> ed. Paris. pp. 418-419.
- Bruneton** J. (2001) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: Technique et Documentation Lavoisier Ed. Tec & Doc. 5<sup>ta</sup>, ed. Paris, pp 418-419.
- Campos** E.V.R., Proença P.L.F., Oliveira J.L., Bakshi M., Abhilash P.C., Fraceto L.F. (2018) Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. Ecol. Indic. 105:483-495.
- Cárdenas** R., de Jesús J., Serrano R., Llanos-Romero E., Aguirre- Hernández E., Herrera-Santoyo J., Zúñiga B., Rodarte B., Alba-Lois L., Guevara-Fefer P. (2012) Effects of organic extracts of *Bursera copallifera* and *B. lancifolia* leaves in the development of *Spodoptera frugiperda*. J Entomol. 9(2): 115-122.
- Carpinella** M.C., Defago M.T., Valladares G., Palacios S.M. (2003) Antifeedant and insecticide properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. J Agric Food Chem. 51:369-374.
- Carmona-Hernández** O., Fernández del S. M., Palmeros-Sánchez B., Lozada-García A.J. (2014) Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve Piperaceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. 30:67-73.
- Casmuz** A., Juárez L.M., Socías G.M., Murúa G.M., Prieto S., Medina S., Willink E., Gastaminza G. (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). Rev. Soc. Entomol. Arg. 69: 209-231.
- Castellanos** L., De Correa R. S., Martínez E., Calderon J. S. (2002) Oleanane Triterpenoids from *Cedrela montana* (Meliaceae). Z. Naturforsch. 57:575-578.

- Céspedes** C.L., Calderón S.J., Lina L., Aranda E. (2000) Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela spp.* (Meliaceae). J Agric Food Chem. 48(5):1903-1908.
- Celis** F.A., Mendoza F.C., Roa-B A., Delgado A.W. (2014) Effect of Piper Extracts in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith), under Semi-Controlled Conditions. Acta Hort. 1030:49-54
- Chanda** S.V., Parekh J. and Karathia, N. (2006) Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegates* L. bark. Afr. J. Biomed. Res. 9: 53-56.
- Chebet O.N., Omosa L.K., Subramanian S., Nchiozem-Ngnitedem V.A., Mmari J.O., Akutse K.S. (2021) Mechanism of action of endophytic fungi *Hypocrea lixii* and *Beauveria bassiana* in *Phaseolus vulgaris* as biopesticides against pea leaf miner and fall armyworm. Molecules. 26:5694.
- Conde-Hernández** L.A and Guerrero-Beltrán J.A. (2014) Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. Food Chem. 142: 455-460.
- Coronado** P.R. (1994) Introducción a la entomología, morfología y taxonomía de los insectos. Limusa (Eds), 1<sup>ra</sup> ed. Uteha, México, pp. 282-286.
- Chiffelle** G. I., Huerta F. A., Lizana R. D. (2009) Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. Chil. J. Agric. Res. 69:38-45.
- Chini** M.G., Malafronte N., Vaccaro M.C., Gualtieri M.J., Vassallo A., Vasaturo M., Castellano S., Milite C., Leone A., Bifulco G. (2016) Identification of Limonol derivatives as heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors through a multidisciplinary approach. Chem. A Eur. J. 22:13236-13250.
- Corzo** F.L., Gilabert M., Alcaide M.F., Bardón A. (2012) Toxicity of *Porella chilensis* sesqui- and diterpenoids against larvae of the corn pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Neotrop. Entomol. 41(5):414-419.
- Costa-Leonardo** A.M and Haifig I. (2010) Chapter twenty-one-pheromones and exocrine glands in Isoptera. Vitam. Horm. 83:521-549.
- Day** R., Abrahams P., Bateman M., Beale T., Clotey V., Cock M., Colmenarez Y., Corniani N., Early R., Godwin J., Gomez J., Gonzalez M.P., Murphy S.T., Oppong-Mensah B., Phiri N., Pratt C., Silvestri S., Witt A. (2017) Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. Outlooks Pest Manag. 28:196-201.
- da Silva** Jr I.F., de Oliveira G. R., Soares M.I., Alvim da C.T., Ascêncio D.S., Mantins de O.T.D. (2014) Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. J Ethnopharmacol. 151:137-143.
- da Silva** D.M., Bueno A.F., Andrade K., Stecca C.S., Neves P.M.O.J., Oliveira M.C.N. (2017) Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. Sci. Agric. 74 (1):18-31.
- Devi** K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. (2010) Eugenol (an essential oil of clove) acts as an

antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol.* 130(1):107-115.

**Difabachew** K. B., Randy M. H., John E. F. (2012) Susceptibility of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), at Santa Isabel, Puerto Rico, to Different Insecticides. *Fla. Entomol.* 95:476-478.

**Dorn** A., Rademacher J.M., Sehn E. (1986) Effects of azadiractin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last instar larvae of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *J Insect Physiol.* 32(3):231-238.

**Dowd** F.P., Berhow A.M., Johnson T.E. (2011) Differential activity of multiple saponins against omnivorous insects with varying feeding preferences. *J Chem Ecol.* 37(5):443-449.

**Dyer** L.A., Dodson C.D., Stireman III J.O., Tobler M.A., Smilanich A.M., Fincher R.M., Letourneau D.K. (2003) Synergistic effects of three Piper amidas on generalist and specialist herbivores. *J. Chem. Ecol.* 29(11):2499-2514.

**Elbrense** H., Elmasry A.M.A., Seleiman M.F., AL-Harbi M.S., Abd El-Raheem A.M. (2021) Can symbiotic bacteria (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*) be more efficient than their entomopathogenic nematodes against *Pieris rapae* and *Pentodon algerinus* larvae. *Biology.* 10:999.

**FAO**, estadísticas consultadas en abril de 2022 en: <http://faostat3.fao.org/download/R/RP/E>.

**Fazolin** M., Vidal-Estrada J.L., Mendeiros-Monteiro A.F., da Silvia I.M., Paiva-Gomes L., de Farias-Silva M.S. (2016) Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with commercial insecticides. *Semin Cienc Agrar.* 37:3903-3914.

**Fontes** E.M.G., Laumann R. (2019) Special section on biological control. *Neotrop. Entomol.* 48:873–874.

**García-Gutiérrez** K., Poggi-Varaldo H.M., Esperanza-García F., Ibarra-Rendón J., Barrera-Cortés J. (2011) Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. *Bioproc. Biosys. Eng.* 34(6):701-708.

**García-Mendoza** A. J., Díaz-Ordóñez M. S., Briones-Salas M. (2004) Biodiversidad de Oaxaca. In: México: Universidad Nacional Autónoma de México World Wildlife Fund (Eds). Redacta, SA de CV, 1<sup>er</sup> Ed. México, pp. 605.

**García-Lara** S and Bergvinson J. D. (2007) Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. *Agric. Téc. Méx.* 33:181-189.

**García** D. (2004) Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes.* 27 (1):1-12.

**Garrett** H.R., Grisham M.C. (2008) Biochemistry. Capítulo 21. Electrón transportador y fosforilación oxidativa. Cengage Learning (Eds), 4<sup>ta</sup> ed, pp 673-704.

**Giongo** A.M.M., Vendramin J.D., Freitas S.D.L., Silva M.F.G.F. (2016) Toxicity of Secondary Metabolites from Meliaceae against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 45(6):725-733.

- Giordani** M.A., Collicchio T.C., Ascêncio S.D., Martins D.T., Balogun S.O., Bieski I.G., da Silva L.A., Colodel E.M., de Souza R.L., de Souza D.L., de França S.A., Andrade S.M., Kawashita N.H. (2015) Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. *J. Ethnopharmacol.* 162:352-61
- González-Jiménez** F. E., Beltrán-Orozco M. C., and Vargas M. G. (2010) The antioxidant capacity and phenolic content of chía's (*Salvia hispánica* L.). Integral seed and oil. *J Biotechnol.* 150: 315.
- Gupta M.P., Arias T.D., Williams N.H., Bos R., Tattje D. H. E. (1985) Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. *J. Nat. Prod.* 48(2):330-343.
- Greatti** V. R., Oda F., Sorrechia R., Kapp B. R., Seraphim C. M., Weckwerth A., Chorilli M., Silva P., Eloy J. O., Kogan M. J., Morales J. O., and Pietro R. (2020) Poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles loaded with 4-Nerolidylcatechol (4-NC) for growth inhibition of *Microsporum canis*. *Antibiotics.* 9(12):894.
- Herbert** G.C., Johnstone W.A.R. (2002) Mass spectrometry basics. Washington, D.C. CRC PRESS (Eds), 1<sup>ra</sup> ed, pp 453.
- Hernández-Carlos** B., Gamboa-Angulo M. (2019) Insecticidal and nematicidal contributions of Mexican flora in the search for safer biopesticides. Review. *Molecules.* 24:897.
- Hossain** A.M., ALSabari M.K., Weli M.A., Al-Riyami Q. (2013) Gas chromatography-mass spectrometry analysis and total phenolic contents of various crude extracts from the fruits of *Datura metel* L. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* 7(4): 209-215.
- Hoffman** Robert V. (2004) Organic chemistry: an intermediate text. *Organic Chemistry: An Intermediate Text.* In. Robert V. Hoffman, 2<sup>da</sup> ed, John Wiley & Sons, pp. 332–394.
- Hussain** A.G., Wennmann J.T., Goergen G., Bryon A., Ros V.I.D. (2021) Viruses of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: A Review with Prospects for Biological Control. *Viruses*,13:1-12.
- Huot** L., George S., Girard P.A., Severac D., Nègre N., Duvic B. (2019) *Spodoptera frugiperda* transcriptional response to infestation by *Steinernema carpocapsae*. *Sci. Rep.* 9:12879.
- Isman** M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51:45–66.
- Jacobson M. (1989) Botanical pesticides. Past, present, and future. Symposium series. Am Chem Soc. 387:1-10.
- Joseph** N. P. (1982) Resonancia magnética nuclear de hidrogeno-1 y de carbono-13. (eds) Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, vol 1, 2<sup>nd</sup> ed. Universidad de Texas, pp 3-14.
- Jork** I.H.H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. (1990) Thin-layer chromatography reagents and detection methods: Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents, Vol. 1, 1<sup>ra</sup> ed, VHC, Weinheim, pp 610.
- Kimbaris** C.A., Siatis G.N., Daferer J.D., Tarantilis A.P., Pappas S.C., Polissiou G.M. (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma

compounds from garlic. *Ultrason. Sonochem.* 13(1):54-60.

Kumela T., Simiyu J., Sisay B., Likhayo P., Mendesil E., Gohole L., and Tefera T. (2018) Farmers' knowledge, perceptions, and management practices of the new invasive pest, fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Ethiopia and Kenya. *Int J Pest Manag.* 65:1-9.

**Kumar** G.S., Jayaveera K.N., Kumar C.K.A., Sanjay U.P., Swamy B.M.V. and Kumar D.V.K. (2007) Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Trop. J. Pharm. Res.* 6:717-723.

**Kvitko** K., Bandinelli E., Henriques J.A., Heuser V.D., Rohr P., da Silva R.R., Schneider N.B., Fernandes S., Ancines C., da Silva J. (2012) Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. *Genet Mol Biol.* 35 (4):1060-1068.

**Lalramnghaki** H.C., Lalramliana., Lalremsanga H.T., Vanlalhlimpua., Lalramchuan M., Vanramliana. (2021) Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), to four species of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Mizoram, North-Eastern India. *Egypt J Biol Pest Control.* 31:110.

**Laurella** L.S. (2016) Resonancia magnética nuclear. Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares. (eds) Universidad de La Plata, vol 1, 1ra ed. Universidad Nacional de La Plata, pp 8-16.

**Lima** R.K., Cardoso M.G., Moraes J.C., Melo B.A., Rodrigues V.G., Guimarães P.L. (2009) Insecticidal activity of long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz.* 39(2):377-382.

**Liang** J.Y., You C.X., Gou S.S., Zhang W.J., Li Y., Geng Z.F., Wang., Du S.S., Deng Z.W., Zhang J. (2016) Chemical constituents of the essential oil extracted from *Rhododendron thymifolium* and their insecticidal activities against *Liposcelis bostrychophila* or *Tribolium castaneum*. *Ind Crops Prod.* 79:267-273.

**Lopes-Souto** A., Sylvestre, M., Dantas-Tölke, E., Fachine-Tavares J., Barbosa-Filho J.M., Cebrián-Torrejón, G. (2021) Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules.* 26(16): 4835.

**Lucena** D.C., Bertholdo-Vargas L.R., Silva W.C., Machado A.F., Lopes T.S., Moura S., Barros N.M. (2017) Biological Activity of *Piper aduncum* extracts on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebididae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An Acad Bras Cienc.* 89(3):1869-1879.

**Mordue** A.J., Nisbet A.J. (2000) Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An Soc Entomol Bras.* 19:1-8.

**Ofori** J., and Brentuo B. (2005) Green moisture content, basic density, shrinkage, and drying characteristics of the wood of *Cedrela odorata* grown in Ghana. *J Trop for Sci.* 17(2): 211-223.

- Machado** E.P., Rodrigues J.D., Führ F.M., Zago S.L., Marques L.H., Santos A.C., Nowatzki T., Dahmer M.L., Omoto C., Bernardi O. (2020) Cross-crop resistance of *Spodoptera frugiperda* selected on Bt maize to genetically modified soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins in Brazil. *Sci Rep.* 10:10080.
- Macleod** J. K., Moeller P. D. R., Molinski F.T., Koul O. (1990) Antifeedant activity against *Spodoptera litura* larvae and [13C] MNR spectral assignments of the meliotoxins. *J. Chem. Ecol.* 16(8):2511-2518.
- Maia** J.G.S., Andrade E.H.A. (2009) Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. *Quim Nova.* 32:595-622.
- Mata** R., Morales L., Perz O., Rivero-Cruz L., Acevedo L., Enrique-Mendoza I., Bye R., Franzblau S., Timmermann B. (2004) Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *J Nat Prod.*67(12):1961-1968.
- Mariscal-Lucero** S. R., Rosales-Castro M., Sánchez-Monsalvo V., Honorato-Salazar J. A. (2015) Evaluation of phenols and limonoids in leaves of *Cedrela odorata* (Meliaceae) from an experimental plantation established in Tezonapa Veracruz, Mexico. *J Trop Biol Conserv.* 63(2):545- 558.
- Mahesh** B.S., Baranitharan M., Dhanasekaran S., Thushimenan S., Kovendan K., Jeyasankar A. (2016) Chemical Compositions, antifeedant and Larvicidal activity of *Pongamia pinnata* (L.) against polyphagous field pest, *Spodoptera litura*. *Int. J. Zool. Investig.* 2(1):48-57.
- Mathew** J and Thoppil E.J. (2011) Chemical composition and mosquito larvicidal activities of *Salvia* essential oils. *Pharm Biol.* 49(5): 456-463.
- Mgbeahuruike** E., Yrjönen T., Vuorela H., and Holm Y. (2017) Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *S Afr J Bot.* 112: 54-69.
- Mpumi** N., Mtei K., Machunda R., Ndakidemi A.P. (2016) The Toxicity, persistence, and model of actions of selected botanical pesticides in Africa against insect pests in common beans, *P. vulgaris*: A Review. *Am J Plant Sci.* 7:138-151.
- Murúa** M.G., Vera M.T., Abraham S., Juaréz M.L., Prieto S., Head G.P., and Willink E. (2008) Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101:639–649.
- Navickiene** H.M.D., Alécio A.C., Kato M. J., Bolzani V. da S., Young M.C.M., Cavalheiro A.J., Furlan M. (2000) Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry.* 55:621-626.
- Niassy** S., Agbodzavu M.K., Kimathi E., Mutune B., Abdel-Rahman E.F.M., Salifu D., Hailu G., Belayneh T.Y., Felege E., Tonnang Z.Z.H., Ekesi S., Subramanian S. (2021) Bioecology of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), its management and potential patterns of seasonal spread in Africa. *PLoS One.* 16: 621-626.
- Nogueira** T.S.R., Passos M.S., Nascimento L.P.S., Arantes M.B.S., Monteiro N.O., Boeno S.I.D.S., de Carvalho Junior A., Azevedo O.A., Terra W.D.S., Vieira M.G.C.; Braz-Filho R., Curcino Vieira I.J.

(2020) Chemical Compounds and Biologic Activities: A Review of Cedrela Genus. *Molecules*. 25(22): 5401.

**Estrada-Reyes R.**, Martínez-Laurrabaquio A., Suárez U.D., Araujo-Escalona G.A. (2013) Neuropharmacological studies of *Piper auritum* Kunth (Piperaceae). Antinociceptive and anxiolytic-like effects. *J Med Plant Res*. 7(23):1718-1729.

**Palermo T.B.**, Cappellari L.D.R., Chiappero J., Giordano W., Banchio E. (2021) Beneficial rhizobacteria inoculation on *Ocimum basilicum* reduces the growth performance and nutritional value of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci*. 78:778–784.

**Paredes-Sánchez F.A.**, Rivera G., Bocanegra-García V., Martínez-Padrón H.Y., Berrones-Morales M., Niño-García N., Herrera-Mayorga V. (2021) Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. *Molecules*. 26: 55-87.

**Parmar V.S.**, Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E. (1997) Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 46(4):597-673.

**Parekh J.** and Chanda S.V. (2007) In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk J Biol*. 31:53-58.

**Perigo C.V.**, Torres R.B., Bernacu L.C., Guimarães E.F., Haber L.C., Facanali R., Vieira M.A.R., Quecini V., Marques M.O.M. (2016) The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. *Ind Crops Prod*. 94:528-539.

**Prasanna B.M.**, Huesing J.E., Eddy R., Peschke V.M. (2018) Fall Armyworm in Africa: A Guide for Integrated Pest Management, 1<sup>st</sup> ed.; CIMMYT: Mexico City, Mexico, pp. 63-88.

**Peteira B.**, González I., Arias Y., Fernández Turro A., Miranda I., Martínez B. (2011) Biochemical characterization of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Rev. prot. veg*. 26:16-22.

**Pereira B.D.**, Jaqueline M.D., Moreira R.R., Carvalho V.M., Romano S.A.C., Odorico M.M., Rocha S.E., Sousa L.M.A., Pegas H.J.A., Veras Costa-Lotufu L. y Saf J. (2008) Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutat Res*. 652:164-174.

**Pereira C.R.**, Barbosa F.W., Lima P.A.M., Jr Vieira L.O.J., Guedes C.N.R., da Silva R.K.B., Barbosa D.M.G., Fernandes L.F. (2020) Toxicity of botanical extracts and their main constituents on the bees *Partamona helleri* and *Apis mellifera*. *Ecotoxicology*. 29(3):246-257.

**Pineda M.R.**, Vizcaíno P.S., García P.C.M., Gil G.J.H., Durango R.D.L. (2012) Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C.D.C. against phytopathogenic fungi. *Chil. J. Agric. Res*. 72(4): 507-515.

**Pino J.A.**, Marbot R., Fuentes V., Payo A., Chao D., Herrera P. (2005) Aromatic plants from Western Cuba. II. Composition of leaf oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. And *Ageratina havanensis* (H.B.K.) R.M. Kinget. *J Essent Oil Res*. 17:572-574.

- Pino J.A.**, Rosado A., Rodríguez, M., García D. (1998) Composition of leaf oil of *Piper auritum* H.B.K. grown in Cuba. J Essent Oil Res. 10(3):333-334.
- Pullaguari O. M.J.**, Maura J (2014) Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Piper umbellatum* L. Tesis de licenciatura. Dpto. de Bioquímica. Loja, Ecuador.
- Quichimbo D. G. C.** (2012) Procesos morfogénicos in vitro de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) inducidos a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis de Licenciatura. Dpto. de Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Ramos-López M.A.**, Gonzáles-Chávez M.M., Cárdenas-Ortega N.C., Zavala-Sánchez M.A., Pérez S.G. (2012) Activity of the main fatty acid components of the hexane leaf extract of *Ricinus communis* against *Spodoptera frugiperda*. Afr J Biotechnol.11(18): 4274-4278.
- Carpinella M.C.**, Defagó M.T., Valladares G.R., Palacios S.M. (2006) Naturally occurring bioactive compounds. Rai and Carpinella (eds), Chapter 5 Role of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and prospects, Vol 3, pp: 81-123.
- Rioba N.B.**, Stevenson P.C. (2020) Opportunities and scope for botanical extracts and products for the management of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) for smallholders in Africa. Review. *Plants*. 9:207.
- Rizzo H.F.E.**, La Rossa F.R., (1992) Aspectos morfológicos y biológicos de la "oruga militar tardía"[*Spodoptera frugiperda* [JE Smith][Lep. Noctuidae]. Rev. Fac. Agron. 13(2-3):193-199.
- Ríos G. A.**, Leyva A. M., Martínez M. R.J., Stashenko E. E. (2007) Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la costa de Colombia. Scientia et Technica. 1(33):439-442.
- Rodríguez E.J.**, Saucedo-Hernández Y., Vander H.Y., Simo-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G., Lerma-García M.J., Monteagudo U., Bravo L., Medinilla M., De Armas Y. (2013) Chemical analysis and antioxidant activity of the essential oils of three Piperaceae species growing in the central region of Cuba. Nat. Prod. Commun. 8(9):1325-1328.
- Rowell R.M.**, Pettersen R. Han J.S., Rowell J. S., Tshabalala M.A. (2005) Cell wall chemistry. En R.M. Rowell (Ed.), Handbook of wood chemistry and wood composites, Boca Rton, Florida, EUA: CRC Press, pp 35-74.
- Saavedra-Charca W.**, Vásquez V.V., Rojas C. (2015) Analytical techniques used in food metabolomics. J Agro-ind sci. 191-210.
- Salleh W.M.N.H.W.** (2020) A systematic review of botany, phytochemicals, and pharmacological properties of "Hoja santa" (*Piper auritum* Kunth). Z Naturforsch C J Biosci, 76(3-4): 93-102.

- Sarkowi F.N., Mokhtar A.S.** (2021) The Fall Armyworm (faw) *Spodoptera frugiperda*: A review on biology, life history, invasion, dispersion, and control. *Outlooks Pest Manag.* 32:27-32.
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K.M, Yoga-Latha L.** (2011) Extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8(1):1-10.
- Saupi N., Lepun P., Alan R., Zakaria M. H., Saidin A. A., Yusli N. A.** (2021) Morphological characterization and nutrient assessment of wild pepper, *Piper umbellatum* L. (Piperaceae) grown in Sarawak, Malaysia. *J Phycol.* 13:055-063.
- Sen A y Brata A.** (2012) Chemical composition of metanol extract of the leaves of *Melia azedarach* L. *Asian J Pharm Clin Res.* 5(3):42-45.
- Soberón-Risco V. G., Idrogo C. R., Kato M. J., Díaz J. S., Armando-Jr J and Paredes-Delgado E. G.** (2012) Larvicidal activity of *Piper tuberculatum* on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Rev Colomb Entomol.* 38(1):35-41.
- Scapinello J., Oliveira V.J., Ribeiros L.M., Jr Tomazelli O., Chiaradia A.L., Magro D.J.** (2014) Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Melia azedarach* L. on the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J Supercrit Fluids.* 93: 20-26.
- Scott I.M., Jesen H.R., Philogène B.J.R., Arnason J.T.** (2008) A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity, and mode of action. *Phytochem. Rev.* 7:65-75.
- Scott I.M., Puniani E., Jensen H., Livesey J.F., Poveda L., Sánchez-Vindas P., Durst T., Arnason J.T.** (2005) Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. *J Agric Food Chem.* 53(6):1907–1913.
- Soares F.C., Nunes L.A.R., Sebastião I., Desidério J.A.** (2019) Synergism of the *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2, and Vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 188:798–809.
- Sosa A., Diaz M., Salvatore A., Bardon A., Borkosky S., Vera N.** (2019) Insecticidal effects of *Vernonanthura nebulorum* against two economically important pest insects. *Saudi J Biol Sci.* 26(5):881-889.
- Soonwera M., Phasomkusolsil S.** (2017) Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7 (11):967-978.
- Stashenko E.E., Caballero-Gallardo K., Olivero-Verbel J., Pino-Benítez N.** (2014) Chemical composition and bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* essential oil against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *B Latinoam Caribe Pl.* 13(1):10-19.
- Sun X., Hu C., Jia H., Wu Q., Shen X., Zhao S., Jiang Y., Wu K.** (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. *J. Integr. Agric.* 20: 664–672.

- Tang W.**, Eisenbrand G. (1992) Chinese drugs of plant origin. Chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. Cap.85, *Melia azedarach* L. and *Melia toosendan* Sieb. Et Zucc. 1<sup>er</sup> ed, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp 647-654.
- Tavares W.S.**, Cruz I., Petacci F., Sousa-Freiotas S. de; Serrão J.E., Cola-Zanuncio J. (2011) Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. J Med Plant Res. 5 (21): 5301-5306.
- Toto-Blessing L.D.**, Colom O.A., Popich S., Neske A., Bardón A. (2010) Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. J Pest Sci. 83:307-310.
- Valdivia Á.A.L.**, Rubio F. Y., Camacho C. C., Brea M. O., Matos T. M., S. del C. M., Pérez H., Y. (2018) Phytochemical and antibacterial properties of *Piper auritum* Kunth. Av Investig Agropecu. 22(1):77-89.
- Vázquez-Luna A.**, Pérez-Flores L and Díaz-Sobac R. (2007) Biomolecules with insecticidal activity: an alternative to improve the food safety. J Food. 5(4):306-313.
- Venson I.**, Guzmán J.A.S., Talavera F.J.F., Richter H.G. (2008) Biological, physical, and mechanical wood properties of Paraiso (*Melia azedarach*) from a roadside planting at Huaxtla, Jalisco, México. J Trop for Sci. 20(1):38-47.
- Vizcaino P.S.**, Pineda R., García C.M., Gil J., and Durango D. (2016) Metabolism and antifungal activity of safrole, dillapiole, and derivatives against *Botryodiplodia theobromae* and *Colletotrichum acutatum*. B Latinoam Caribe Pl. 15(1): 1-17.
- Viji M** and Murugesan S. (2010) Phytochemical analysis and antibacterial activity of medicinal plant *Cardiospermum halicabum* Linn. J. Phytol. 2:68-77.
- Wang C. F.**, Yang K., You C. X., Zhang W. J., Guo S. S., Geng Z. F., Du S. S., and Wang Y. Y. (2015) Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Zanthoxylum dissitum* leaves and roots against three species of storage pests. Molecules. 20(5):7990-7999.
- Wan J.**, Huang C., Li C.Y., Zhou H.X., Ren Y.L., Li Z.Y., Xin L.S., Zhang B., Qiao X., Liu B., Liu C.H., Liu W.X., Wang W.K., Qian W.Q., Mckirdy S and Wan F.H. (2021) Biology, invasion, and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Integr. Agric. 20:646-663.
- Wan B.**, Zhu J., Chang Q., Zhou H., Shi Z., Min L., Cai Y.J., Guan H. (2018) Alpha, 2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxydihydrochalcone inhibits cell proliferation, invasion, and migration in gastric cancer in part via autophagy. Biomed. Pharmacother.98:709-718.
- Wan S. W. M. N.H.**, Ahmad F., Yen K. H., Sirat H. M. (2011) Chemical compositions, antioxidante and antimicrobial activities of Essentials oils of *Piper caninum* Blume. Int. J. Mol. Sci. 12:7720-7731.
- Wu L.H.**, Zhou C., Long G.Y., Yang X.B., Wei Z.Y., Liao Y.J., Yang H., Hu C.X. (2021) Fitness of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* to three solanaceous vegetables. J. Integr. Agric. 20(3): 755–763.

- Xu Z.**, Lu M., Yang M., Xu W., Gao U.J., Zhang Y., Yang Y., Tao L. (2017) Pyrethrum-extract induced autophagy in insect cells: a new target?. *Pestic Biochem Physiol.* 137:21-26.
- Zakir-ur-Rahman** Ahmad S, Qureshi S, Atiq-ur- Rahman, Badar Y. 1991. Toxicological studies of *Melia azedarach* L. (owers and berries). *Pak. J. Pharm. Sci.* 4:153-158.
- Zhang C.**, Hicks G.R., Raikhel N.V. (2014) Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking. *Front. Plant Sci.* 5:476.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** Comparación de los metabolitos reportados por Pineda y col. (2012) y los encontrados en este trabajo.

Compuestos fitoquímicos	<i>P. auritum</i> (Obtenido)	<i>P. auritum</i> (Reportado)
	Area (%)	Area (%)
<b>Monoterpenos</b>		
Terpinoleno	1.243	1.46
<i>p</i> -Cimeno	-	1.58
$\gamma$ -Terpineno	-	<b>5.11</b>
citral	-	0.83
Mirceno	-	1.46
Linalool	-	0.98
$\alpha$ -Terpineno	-	2.61
Alcanfor	-	0.78
<i>p</i> -Cimen-8-ol	-	0.95
<b>Sesquiterpenos</b>		
$\beta$ -cis-Cariofileno	2.548	2.65
Oxido de cariofileno	0.853	-
$\beta$ -Cubebeno	1.536	0.79
$\delta$ -Elemeno	<b>3.400</b>	-
Farnesol	1.283	-
Espatuleno	2.384	0.23
Acetato de farnesil	1.148	-
Nerolidol	0.584	-
Copaeno	0.892	-
Metropreno	0.617	-
$\beta$ -Bisaboleno	-	0.33
$\beta$ -Amorfeno	-	0.37
Cubenol	-	1.14
3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	-	0.82
3-Oxo- $\alpha$ -ionol	-	0.52
3-Oxo- $\beta$ -ionol	-	0.73
<b>Diterpenoides</b>		
Fitol	1.446	2.31
Geranilgeranil	0.658	-
<b>Triterpeno</b>		
Escualeno	1.125	-
Colestano	0.960	-
<b>Fenilpropanoide</b>		
Safrol	<b>53.002</b>	<b>56.88</b>
Eugenol	-	0.73
Miristidina	-	2.01
Apiole	-	0.59
<b>Alcohol</b>		
1-Tetradecanol	<b>3.381</b>	-
Docosanol	0.919	-
<b>Aldehído</b>		
( <i>z</i> )-11-hexadecenal	0.860	-
<b>Ester</b>		
Anhídrido-2-dodecen-1-il succínico	1.265	-

Continuación de la Tabla.

Ester metílico del ácido 2,4-decadienoico	-	0.30
<b>Alcanos</b>		
Tetratetracontano	2.358	-
Cloro hexadecano	0.988	-
<b>Acidos grasos</b>		
Ester metílico del ácido palmítico	-	0.31
Linoleato de metilo	1.034	-
Acido pentadecanoico	0.966	-
Acido palmítico	-	<b>5.95</b>
Palmitato de etilo	1.637	-
número de picos (porcentaje del número total de picos)	25 metabolitos (87.1%)	26 metabolitos (92.35%)

### Anexo 2. Placas de TLC

En la [Figura 1](#), se presentan tres placas de TLC para el extracto hexánico de *P. auritum*. En la primera foto (a); se aprecian 2 manchas bajo la luz del día, en la segunda (b); se observan 3 manchas bajo  $\lambda = 254$  nm (b) y en la tercera placa (c); se aprecian 5 manchas bajo  $\lambda = 365$  nm. Todas las placas se corrieron bajo el sistema del disolvente hexano/ EtOAc (96/4).

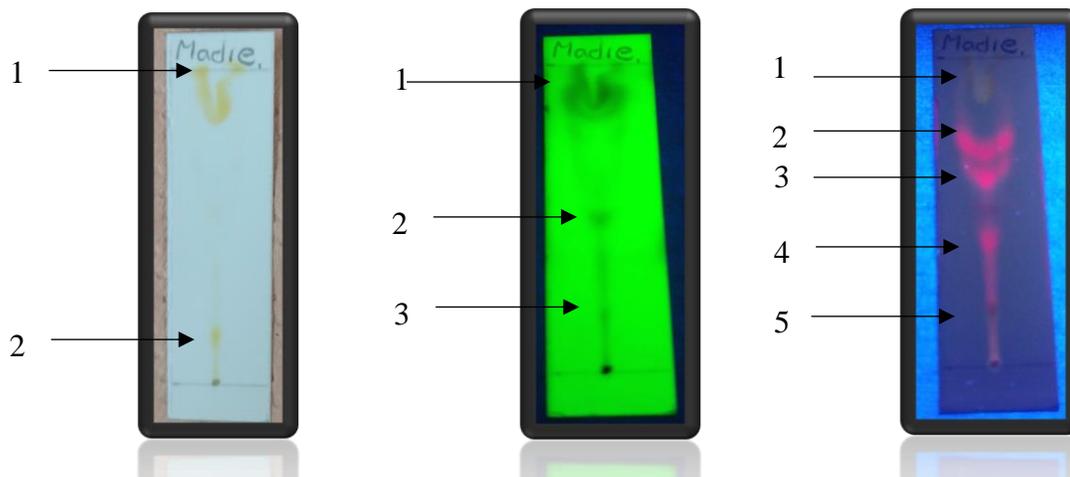


Figura 1: Placas de TLC del extracto hexánico de *P. auritum*. Fase móvil: hexano/ EtOAc (96:4)

Las placas de TLC para el extracto de EtOH de *P. auritum*, se presentan en la [Figura 2](#). En la placa (a), se observan 8 manchas, en las placas (b) y (c) se presentan 7 manchas. Todas las placas se corrieron bajo el sistema del disolvente hexano/ EtOAc (96/4).

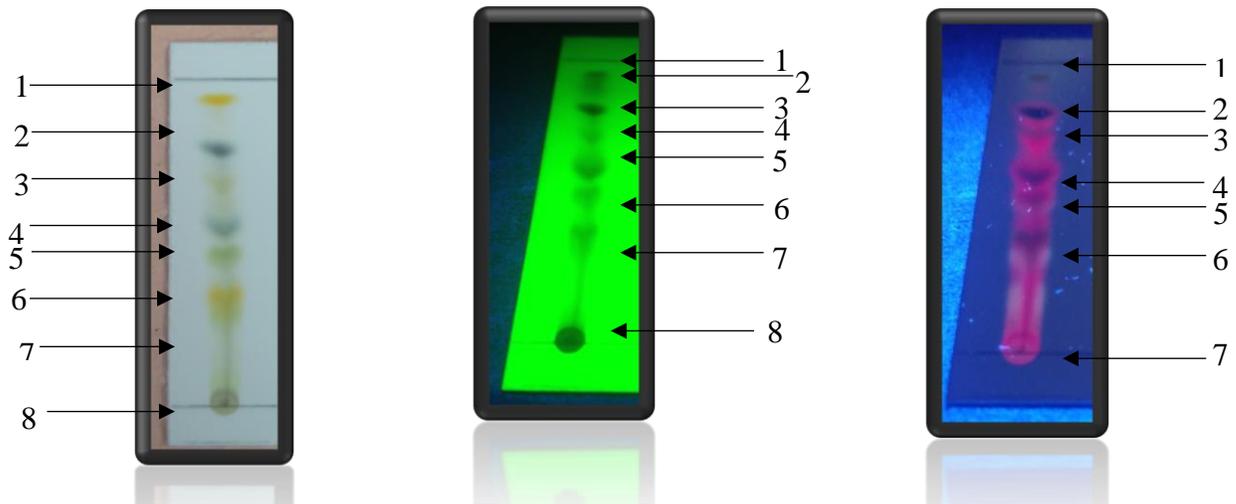


Figura 2. Placas de TLC del extracto etanólico de *P. auritum*. Fase móvil: hexano/ EtOAc (96:4).

### Anexo 3. Placas de tamizaje químico.

#### Alcaloides

La figura 3, muestra dos cromatoplasmas reveladas con el reactivo de Dragendorff. La [Figura 3\(a\)](#), presenta la placa del extracto de hexano y se observa sólo una mancha de 2.5 mm de diámetro poco visible. Y la [Figura 3\(b\)](#), presenta la cromatoplasma del extracto de EtOH y se observan dos manchas de 5 mm de diámetro aproximadamente. La reacción del reactivo de Dragendorff indica la presencia de alcaloides en ambos extractos de *Piper auritum* debido a la coloración naranja-rojizo en las manchas.

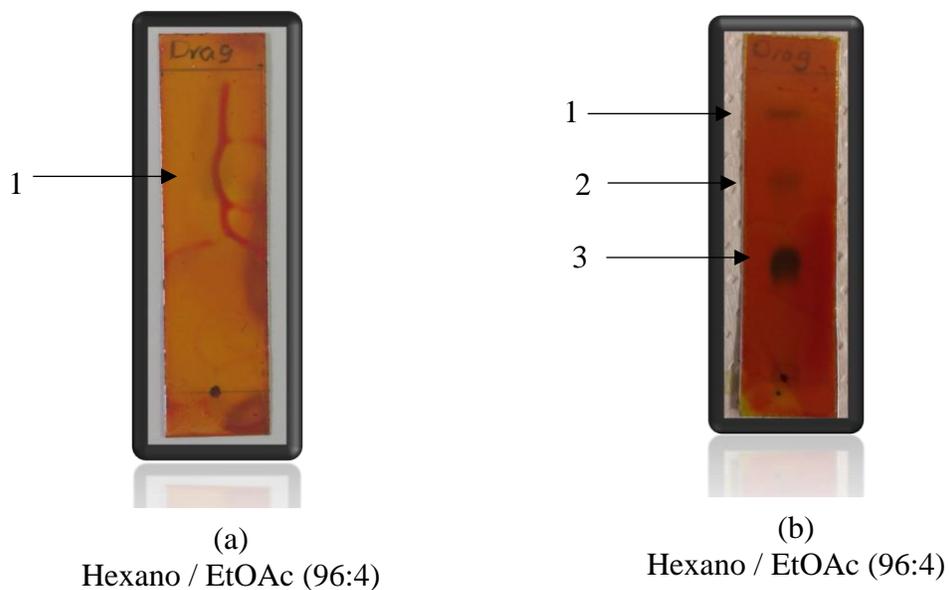


Figura 3. Cromatoplasmas reveladas con el reactivo de Dragendorff para el extracto hexánico (a) y etanólico (b) de *P. auritum*.

### Alcoholes

En la [Figura 4](#), se muestran dos placas reveladas con vainillina del extracto de *P. auritum*. En la placa (a) se ven tres manchas de coloración azul-verdoso de 10 mm de diámetro característico de la presencia de alcoholes y en la placa (b) se ven 7 manchas de 5 mm de diámetro aproximadamente. Ambos extractos dieron positivo a esta prueba.

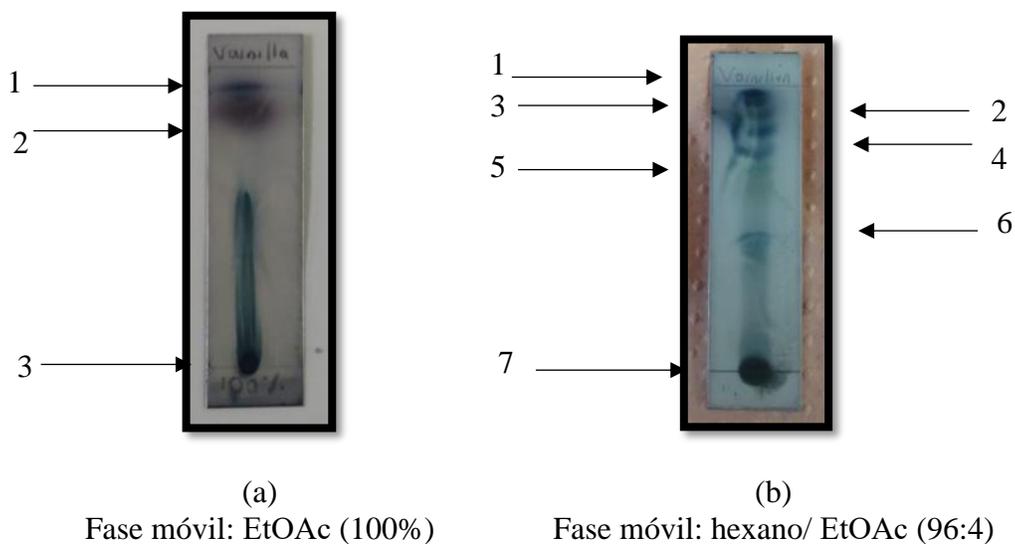


Figura 4. Cromatoplasmas reveladas con vainillina para el extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

### Aminoácidos

Los extractos de *P. auritum* con hexano y EtOH dieron positivo a la prueba con Ninhidrina, en la [Figura 5\(a\)](#), se observa una placa con una mancha color rosa característico de la presencia de aminoácidos de diámetro de 2.5 mm y la [Figura 5\(b\)](#) se ve una placa con tres manchas rosas de diámetro 5 mm.

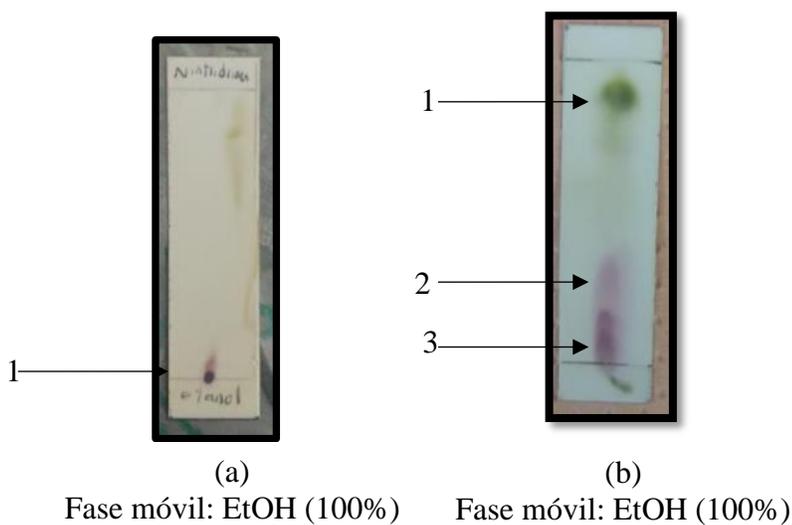


Figura 5. Cromatoplasmas reveladas con Ninhidrina para el extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

### General (ion de fosfato)

Los extractos de *P. auritum* de hexano y EtOH, dieron positivos al revelador de molibdato cerico de amonio (Figura 6). En la placa (a) se observan tres manchas de color azul de 10 mm de diámetro y en la placa (b) se ven 6 manchas de color azul de 5 mm de diámetro.

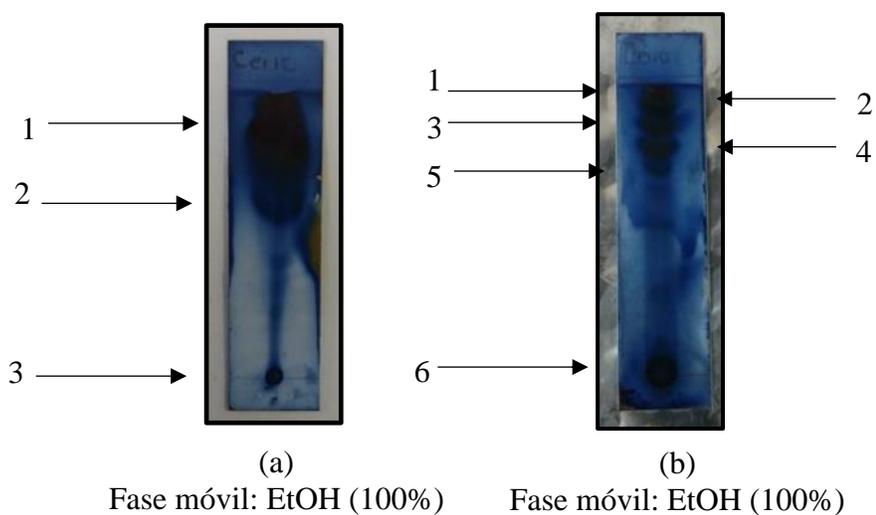


Figura 6. Cromatoplasmas reveladas con molibdato cerico de amonio de extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

### Grupo carbonilo: aldehídos y cetonas

Los extractos de hexano y EtOH de *P. auritum* dieron negativo a la prueba del reactivo de Fehling como se observa en Figura 7 (a y b), debido a que no se ve un precipitado rojo característico que indica la presencia de aldehídos y cetonas.



(a)



(b)

Figura 7. Reacción con la sal cúprica de cobre (II) con el extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

### Grupo hidroxilo: Fenoles y taninos.

En la [Figura 8\(a\)](#), se presenta la placa del extracto hexánico revelada con  $\text{FeCl}_3$ , donde se observa una mancha color azul característico para fenol o enol. En la misma [Figura 8\(b\)](#) se presenta la placa del extracto etanólico revelada con  $\text{FeCl}_3$  y se ven cinco manchas color azul indicando positivo para esta prueba.

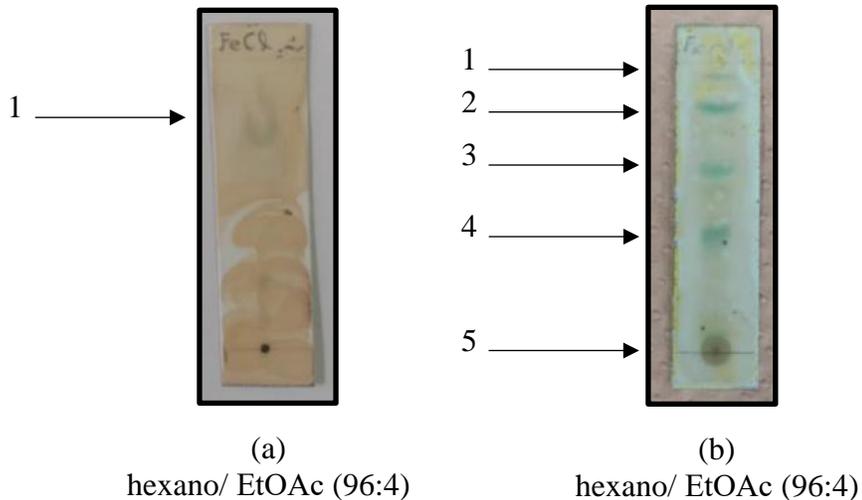


Figura 8. Placas reveladas con  $\text{FeCl}_3$  de extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum* reveladas con  $\text{FeCl}_3$ .

## Hidrocarburos aromáticos

En la [Figura 9](#), se presentan las cromatoplasmas reveladas con yodo ( $I_2$ ) del extracto hexánico (a) y el extracto etanólico (b). En la primera placa se observan dos manchas color marrón indicador de la presencia de hidrocarburos aromáticos. En la misma [Figura 9](#), pero inciso (b) se observan de igual manera 4 manchas color marrón.

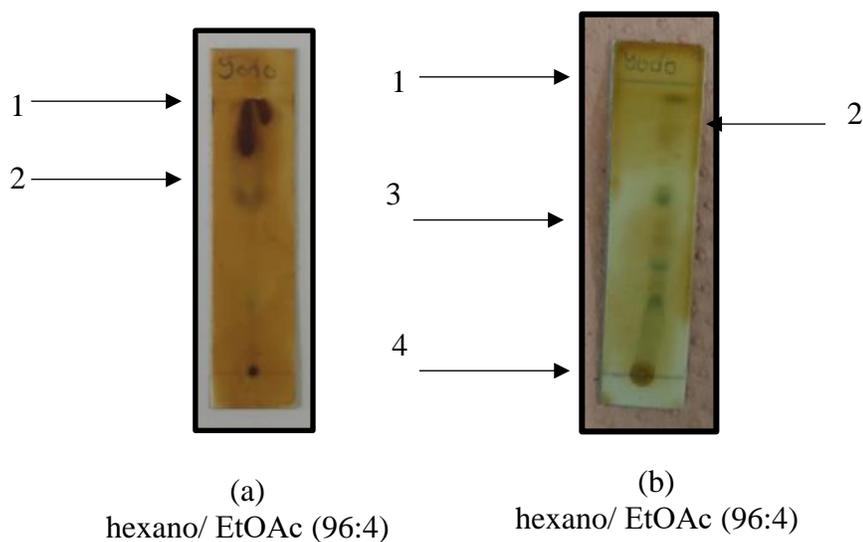


Figura 9. Cromatoplasmas reveladas con  $I_2$  de extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

## Terpenos

En la [Figura 10](#), se presentan las placas con extracto de *P. auritum* de hexano y EtOH que fueron reveladas con el revelador de Lieberman-Buchar. La placa (a) resultó negativo a la prueba de Lieberman-Buchar ya que no se observa ninguna mancha color azul verdoso como las que se ven en la [Figura 10](#) inciso (b) donde se observan 3 manchas color azul verdoso, dando positivo a la prueba de terpenos.

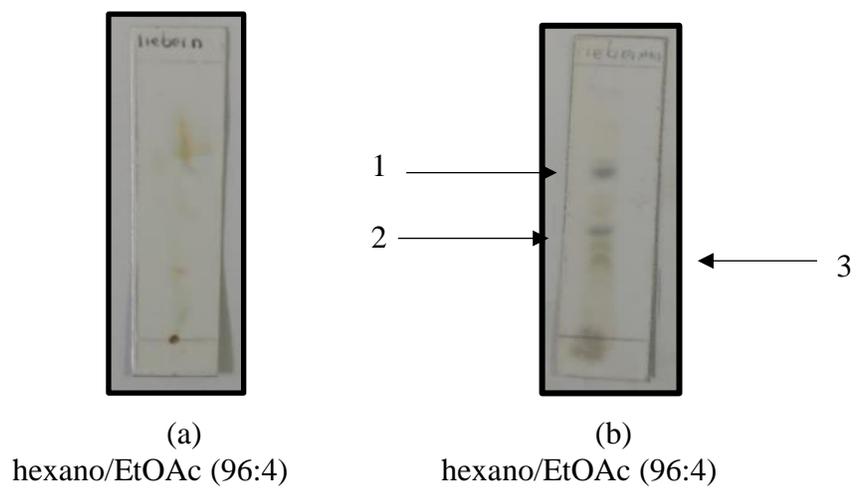


Figura 10. Cromatoplasmas reveladas con el reactivo de Liebermann-Buchar del extracto de hexano (a) y de EtOH (b) ambas de hojas deshidratadas de *P. auritum*.

**Anexo 4.** Fotografía de safrol puro y fracción 2.



Safrol



Fracción 2