

00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

“Actividad insecticida y antialimentaria de *Lantana camara* (Verbenaceae), *Vitex trifolia* var *Variegata* y *Vitex hemsleyi* (Labiatae).”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

Biol. CLAUDIA HERNÁNDEZ PALACIOS

MT 350787

DIRECTOR DE TESIS M. en C. Balduino Esquivel Rodríguez

MEXICO, D. F.

2005





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Biol. Claudia Hernández Palacios

FECHA: 29 - NOV - 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del(a) alumno(a) **HERNANDEZ PALACIOS CLAUDIA** con número de cuenta **89552409** con la tesis titulada: **Actividad insecticida y antialimentaria del Lantana camara (Verbenaceae), Vitex trifolia var. Variegata y Vitex hemsleyi (Labiatae)**, bajo la dirección del(a) M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.

Presidente:	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Vocal:	Dr. Oswaldo Téllez Valdés
Secretario:	M. en C. Baldomero Esquivel Rodriguez
Suplente:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Suplente:	Dra. Patricia Guevara Fefer

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 14 de octubre del 2005

[Firma]  
Dr. Juan Núñez Farián  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

# AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, recinto del conocimiento que me enriqueció y liberó del miedo a crecer.

A la Dirección de Administración del Programa de becas-crédito CONACYT, otorgada durante la realización de los estudios de Maestría y desarrollo del trabajo de tesis, correspondiente al periodo de septiembre de 1998 a agosto de 2000; con No. de registro de becario 130068. Inscrita al Programa de Posgrado en el Plan de Estudios: MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la orientación Biología Ambiental con No. de cuenta 89552409, con No. de expediente 3991071, Entidad 3 y Programa 4015.

A la Facultad de Ciencias donde encontré mi vocación de servicio empapada de ética, para resolver los ideales de mi verdad.

Al Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, por permitirme la oportunidad de alcanzar un objetivo a través de sus recursos humanos e infraestructura.

Quiero agradecer especialmente a Baldomero Esquivel, quien de manera precisa y profesional dirigió el presente estudio, pero sobre todo por permitirme aprender dándome la libertad de ser yo, a quien reitero mi gratitud y respeto.

A cada uno de los miembros del Comité Tutorial:

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Dra. Patricia Guevara Fefer

Dr. Eduardo Aranda Escobar

De manera personal por su disposición, sugerencias y madurez durante la realización y revisión del trabajo.

Al Centro de Estudios en Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, específicamente el laboratorio de Control Biológico a cargo del Dr. Eduardo Aranda, donde se realizaron las pruebas biológicas y a quien reconozco su inagotable capacidad y calidad humana.

De éste mismo Centro de Investigación (CEIB), no estaría dicho todo sin mencionar a Sandra, Mariana, Solcamiry, Yeny, Marco y muchos más que hicieron posible siempre una cálida sonrisa; para Laura y su familia no hay palabras que aquilaten su recompensa y mi aprecio.

De la Facultad de Ciencias UNAM, agradezco sinceramente a la Dra. Patricia Guevara por su franca motivación y firme apoyo incondicional, así como a su virtuoso equipo de trabajo en el Lab. de Química, donde siempre encontré las puertas abiertas.

A mis loables amigos del Laboratorio 2-9 en el Inst. de Química por hacerme cómplice de su inagotable arte del amor por la Química y compartir conmigo entrañables momentos de expansión en muchos aspectos de mi vida . . . Dr. Eugenio, Dr. Rodolfo Alvarez, M.en C. Rodolfo Tello, M.en C. Paola M., M. en C. Luisa S., M. en C. Claudia V.,

Q. Carlos, Q. María de la Luz, Q. Margarita R., M. en C. Ana Adela, M. en C. Clarisa y por supuesto de S.S. a César, Trinidad, Jesús, Adriana y Katy porque de alguna forma dejaron huellas indelebles y fecundas en mí y en mi trabajo.

Colegas...los perpetuaré al retomar sus enseñanzas útiles y revertirlas, cuando quiera alimentar otros caminos en la búsqueda de mi propia creatividad.

¡ A los que colaboraron durante la marcha y éxito de éste estudio, y que razonablemente no plasmé, tengo la confianza de encontrarlos en mi archivo sentimental que con entusiasmo sabré utilizar para expresarles mi más profundas!.

*iiii GRACIAS!!!!*

## Dedicatorias:

Aprovecho la oportunidad, para encomiar a quienes significan todo en mi vida, según mi naturaleza. Aún cuando quizá muchos no leerán este libro, es un placer hacerlos presentes en algo que requirió el trabajo de ser parte de nosotros.



**C**on amor ...

Al Dios de mi entendimiento por darme el libre albedrío.

A Guadalupe y nuestro gran hijo Jeshua, por su valiente apoyo, destacada capacidad de superación y espíritu noble de servicio, su fortaleza es mi orgullo, su salud mi fuerza y nuestra unión la fe; los amo.

A mis padres José Adolfo y Leonor, por no limitarme a creer que puedo, sino que soy responsable de hacerlo. Les otorgo mi respeto y gratitud infinitas, gracias por creer en mí y formarme en la vida.

A mis hermanos Guillermo, Adolfo, Rodrigo y esposas, que representan para mi un símbolo de fraternidad navegando siempre hacia arriba a puerto seguro, estable y placentero ante la vida.

A mis estimados suegros Rebeca y Rogelio, queridos cuñados y cuñadas por brindarme su confianza y calidad humana.

A mis sobrinos Guillermo, Andres Edaí, Andrea Estefanía, Sarahida, Adolfo Rodrigo, Sheyla, Mélani y Braulio, por hacerme muy feliz y mostrarme que la niñez es superación.

A mis Abuelos y en especial a mi abuelita M<sup>a</sup>. Ida Ernestina ejemplo de Mujer, Madre y Amiga, quien todavía existe con energía por la vida y comparte mi felicidad.

A los actuales compañeros del SAPAHUA, por sus atinadas sugerencias y comprensión, Q.B.P. Lupita, Leticia, M. Ángel y todos los operadores, continúen con su vital servicio de trabajo.

A todos mis familiares y amigos, por existir en armonía conmigo, amparados en el respeto y la aceptación.

## ÍNDICE GENERAL

Pag.

### Resumen

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>5</b>
<b>4. Marco Histórico .....</b>	<b>6</b>
4.1 Plagas agrícolas	
4.1.1 Principales plagas del maíz y el frijol	
a) Daño por <i>Spodoptera frugiperda</i>	
b) Daño por <i>Epilachna varivestis</i>	
4.2 Control químico de plagas	
4.2.1 Control biológico de plagas	
4.3 Interacción planta-insecto	
a) Herbivoría	
b) Co-evolución	
4.3.1 Insecticidas de origen vegetal	
4.3.2 Metabolitos secundarios	
4.4 Familia Labiatae y Verbenaceae	
4.4.1 <i>Lantana camara</i>	
4.4.2 Generalidades del género <i>Vitex</i>	
4.4.3 <i>Vitex trifolia</i> var. <i>variegata</i>	
4.4.4 <i>Vitex hemsleyi</i>	
4.5 Organismos de prueba	
4.5.1 <i>Artemia salina</i>	
a) Caracterización	
4.5.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	
a) Caracterización	
4.5.3 <i>Epilachna varivestis</i>	
a) Caracterización	



<b>5. Materiales y Métodos .....</b>	<b>23</b>
5.1 Reactivos y aparatos utilizados	
5.2 Análisis fitoquímico	
5.2.1 <i>Lantana camara</i> (hojas)	
a) Diagrama de trabajo	
5.2.2 <i>Vitex trifolia var. variegata</i> (fruto)	
a) Diagrama de trabajo	
5.2.3 <i>Vitex hemsleyi</i> (hojas)	
a) Diagrama de trabajo	
5.3 Pruebas de actividad biológica	
5.3.1 <i>Artemia salina</i>	
a) Preparación de las muestras	
b) Bioensayo	
5.3.2 <i>Spodóptera frugiperda</i>	
a) Preparación de las muestras	
b) Bioensayo	
5.3.3 <i>Epilachna varivestis</i>	
a) Preparación de las muestras	
b) Bioensayo	
5.3.4 Actividad antialimentaria en <i>S. frugiperda</i>	
a) Preparación de las muestras	
b) Bioensayo	
5.4 Análisis estadístico	
<b>6. Resultados y Discusiones .....</b>	<b>37</b>
6.1 <i>Lantana camara</i>	
6.1.1 Actividad insecticida	
6.2 <i>Vitex trifolia var. Variegata</i>	
6.2.1 Actividad insecticida	
6.3 <i>Vitex hemsleyi</i>	
6.3.1 Actividad insecticida	
6.4 Actividad antialimentaria	
6.5 Caracterización estructural	
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>62</b>
<b>9. Anexos</b>	



## FIGURAS Y TABLAS

Figura No.	Pag.
1. Diagrama de trabajo para <i>lantana camara</i>	25
2. Diagrama de trabajo para <i>Vitex trifolia var. variegata</i>	27
3. Diagrama de trabajo para <i>Vitex hemsleyi</i>	29
4. Ciclo de vida de los Lepidópteros	35
5. Registro del peso a diferentes tiempos con <i>L. camara</i> (Lc F20)	41
6. Registro de la talla a diferentes tiempos con <i>L.camara</i> (Lc F20)	42
7. Registro del peso a diferentes tiempos con <i>V.t.v.variegata</i> (Vtvv F16)	44
8. Registro de la talla a diferentes tiempos con <i>V.t.v.variegata</i> (Vtvv F16)	44
9. Registro del peso a diferentes tiempos con 12 fracciones de <i>V. hemsleyi</i>	63
10. Registro de la talla a diferentes tiempos con 12 fracciones de <i>V. hemsleyi</i>	64
11. Peso comparativo del promedio con 3 concentraciones en 4 tiempos	54

### Tabla No.

1. Mortalidad(%) en <i>A. salina</i> con las especies de Labiatae y Verbenaceae	38
2. Mortalidad(%) en <i>A. salina</i> con la fase F-002 de <i>Lantana camara</i>	39
3. Mortalidad (%) de la fracción L.c. F20 de <i>Lantana camara</i> en <i>A.salina</i>	39
4. Resultados del análisis ANOVA factorial y simple para peso	40
5. Resultados del análisis ANOVA factorial y simple para talla	41
6. Población de <i>S. frugiperda</i> expuesta al tratamiento (Lc F20) de <i>Lantana camara</i>	43
7. Mortalidad (%) en <i>S. frugiperda</i> con las fracciones activas del extracto acetónico	43
8. Población de <i>S. frugiperda</i> aplicando la F16 del extracto <i>Vitex t. var. variegata</i>	45



	Pag.
9. Mortalidad (%) en <i>A. salina</i> con la fracción activa del extracto acetónico	46
10. Mortalidad (%) en <i>S. frugiperda</i> con las fracciones activas del extracto acetónico	47
11. Población de <i>S. frugiperda</i> aplicando las fracciones activas de <i>Vitex hemsleyi</i>	50
12. Mortalidad (%) presentada en <i>S. frugiperda</i> por las fracciones seleccionadas	53
13. Resultados de los tratamientos seleccionados en el bioensayo con <i>S. frugiperda</i>	55

## ANEXO No.

1. Ingredientes de la dieta
2. Registro del peso (mg) de larvas *Spodoptera frugiperda* con la fracción 20 del extracto acetónico de *Lantana camara*
3. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con la fracción 20 del extracto acetónico de *Lantana camara*
4. Registro del peso (gr.) del larvas *Spodoptera frugiperda* con la fracción 16 del extracto acetónico de *Vitex trifolia var. variegata*
5. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con la fracción 16 del extracto acetónico de *Vitex trifolia var. variegata*
6. Registro del peso (gr.) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11,13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 1
7. Registro del peso (gr.) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11,13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 2
8. Registro del peso (gr.) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7,10, 11,13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 3
9. Registro del peso (gr.) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7,10, 11,13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 4
10. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11, 13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 1
11. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11, 13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 2
12. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11, 13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 3
13. Registro de la talla (mm) de larvas *Spodoptera frugiperda* con las fracciones 1,2,3,4,5,6,7, 10,11,13 y 15 del extracto acetónico de *Vitex hemsleyi* en el tiempo 4



**ESPECTRO No.**

1. Espectro de Infrarrojo del compuesto 1
2. Espectro de Masas por impacto electrónico del compuesto 1
3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del compuesto 1
4. Espectro de Infrarrojo del compuesto 2
5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del compuesto 2
6. Espectro de Infrarrojo del compuesto 3
7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del compuesto 3
8. Espectro de Masas por Impacto Electrónico del compuesto 3
9. Espectro de Infrarrojo del compuesto 4
10. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del compuesto 4
11. Espectro de Masas por impacto electrónico del compuesto 4
12. Espectro de Infrarrojo del compuesto 5
13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del compuesto 5
14. Espectro de Masas por impacto electrónico del compuesto 5



## ABREVIATURAS EMPLEADAS

Acetato de etilo	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Et
Acetona	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO
Agua	H <sub>2</sub> O
Benceno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
Concentración Letal Media (µg/mL)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
Dimetilsulfóxido	DMSO
EM (I.E.)	Espectrometría de Masas por impacto Electrónico
GF <sub>254</sub>	indicador
Hexano	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>
IR	Espectroscopia de Infra-rojo
Metanol	CH <sub>3</sub> -OH
MHz	Megahertz
No convergen	N.C.
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
UV	Ultravioleta
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
TMS	Tetrametilsilano
PM	Peso molecular
pf	punto de fusión
Ø	diámetro
Å	Angstrom
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>t</i>	tiempo
<i>α</i>	alfa
<i>β</i>	beta
<i>s</i>	singulete
<i>d</i>	doblete
<i>t</i>	triplete
<i>c</i>	cuadruplete
<i>dd</i>	doble de dobles
<i>m</i>	multiplete
s.a.	singulete ancho
s.d.	singulete deformado
m/z	Masa/carga
ppm	partes por millón
µg/mL	micro gramos por mililitro
%	por ciento
F	fracción
<	menor
>	mayor
P	probabilidad
T	tratamiento
♀	hembras
♂	machos
Sp.	especie

## RESUMEN

El presente estudio está orientado al conocimiento de metabolitos secundarios con propiedades antialimentarias de tres plantas medicinales; *Lantana camara* de la familia Verbenaceae, *Vitex hemsleyi* y *Vitex trifolia* var. *variegata* de la familia Labiatae, seleccionadas como "prototipos" para el posible desarrollo de productos destinados para el control de plagas de insectos, que resulten eficaces y con menos impacto sobre el medio ambiente. En este estudio se utilizaron métodos químicos y biológicos convencionales basados en fraccionamientos biodirigidos, con el fin de buscar la actividad tóxica sobre el crustáceo *Artemia salina* y dos insectos plaga, *Epilachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda*, mientras que la actividad antialimentaria se evaluó durante el ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda*. En el presente estudio el criterio de actividad de los tratamientos se estableció mediante la respuesta cualitativa del "todo o nada" con porcentajes de mortalidad acumulada mayor al 60% y con  $CL_{50}$  (concentración letal media) menor a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; la actividad fagocítica antialimentaria o promotora del gusto por comer se determinó cuantitativamente con el registro de peso y talla (variables dependientes), así como los porcentajes de pupación y proporción de sexos; las larvas se seleccionaron completamente al azar para su medición y los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza ANOVA factorial y simple, seguido de una prueba de Tukey con 95% de confianza. Esta última prueba mostró que los factores con diferencia significativa fueron el tiempo y la fracción cromatográfica usada, no así la concentración. Por otra parte a través de procedimientos físicos (p.f., P.M.), espectroscópicos (IR, RMN- $H^+$ ) y espectrometría de masas (E.M.), se identificaron 5 fracciones activas aisladas de la especie *V. hemsleyi*: VHF1 de naturaleza esencialmente hidrocarbonada, VHF2 el cual fue un diterpeno del tipo del labdano y su estructura asignada correspondió al ácido copálico, el producto VHF3 resultó ser una mezcla de ácido copálico y ácido dehidro abiético, la fracción VHF4 correspondió al ácido dehidro abiético y la muestra VHF5 se aisló como Gardenia B. A manera de conclusiones podemos decir que la fracción más activa fue la VHF1 y que del género *Vitex* no han sido descritos compuestos de este tipo anteriormente. Antes de finalizar cabe mencionar que es imprescindible el conocimiento de la composición química y actividad biológica de numerosas especies vegetales ya que ello nos permite, además de reforzar la clasificación taxonómica de las especies, hacer prototipos para el desarrollo de bioinsecticidas que beneficiarían a la agricultura en su búsqueda constante para satisfacer las necesidades de la siempre creciente población humana sin alterar tan drásticamente el equilibrio ecológico.

# 1. INTRODUCCIÓN

La lucha de la humanidad por proteger sus cultivos y cosechas tiene su inicio cuando se establece el monocultivo; lo cual modificó la diversidad natural rompiendo el equilibrio ecológico y propiciando el crecimiento poblacional de los herbívoros que llegaron a convertirse en plagas al causar daños económicos (Metcalf y Flint, 1975).

Según la FAO ha estimado que mundialmente el 15% de las pérdidas en la agricultura se deben únicamente al ataque de insectos con un fuerte impacto social y económico, particularmente en los países subdesarrollados.

Los métodos para el control de insectos han sido variados desde mecánicos, físicos, químicos y/o biológicos; siendo los compuestos químicos orgánicos y sintéticos los más demandados. Según Brock y Madigan en la historia de la humanidad se han comercializado más de un millar de plaguicidas (Brock y Madigan, 1991).

Los plaguicidas sintéticos marcaron una nueva época en la Agricultura al término de la II Guerra Mundial (1940) cuando Muller descubre las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano mejor conocido como DDT - panacea de los plaguicidas; sin embargo su uso intensivo ha sido causa de enormes problemas de contaminación ambiental y daños a la salud (cancerígenos, tóxicos o estimulantes del sistema nervioso central), ya que por su misma permanencia han hecho especies resistentes y los residuos llegan hasta niveles tóxicos en la red trófica estando prohibida su aplicación en cultivos para consumo (Gill y Pietrantonio, 1991; Huff y Haseman, 1991; Becher, *et al.* 1996; y Mc. Curdy, *et al.* 1996).

No obstante los productos para el control de plagas resultan imprescindibles en la agricultura de todo el mundo, por lo que no resulta una tarea sencilla el prohibir su uso, sino crear alternativas que permitan controlar el ataque de insectos y remediar la grave contaminación producida por los plaguicidas sintéticos.

Actualmente se han buscado diversas opciones que contribuyan al saneamiento ambiental dentro de las cuáles están, la biorremediación (degradación de desechos tóxicos), el uso de plaguicidas biológicos a partir de virus, bacterias (*Bacillus thuringensis*), hongos y microorganismos; así como productos derivados de vegetales y finalmente reforzar con la educación sobre el uso adecuado de plaguicidas.

Como parte de estas propuestas el presente estudio pretende contribuir con la búsqueda de agentes protectores de cultivos al ataque de insectos, a partir de especies vegetales, dada la amplia biodiversidad de plantas existentes en México como campo permanente para el continuo descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios.

La presencia de metabolitos secundarios, ha sido fundamental en el éxito coevolutivo planta-insecto, como defensa para la planta; ya que afectan indirectamente la longevidad, fisiología sensorial, endocrinología y metabolismo del insecto, e incluso a través de sus simbioses (Fowden y Peter, 1984; Hättenschwiler and Vitousek, 2000).

La búsqueda de dichos compuestos como posibles prototipos de agentes insecticidas requiere que sean indirectos (repelentes, atrayentes, feromonas, reguladores de crecimiento: ecdisonas, hormonas juveniles y hormonas anti-juveniles; inhibidores de la oviposición y antialimentarios) específicos y biodegradables (Maxwell y Jennings, 1984; Lagunes y Rodríguez, 1988).

Una alternativa son los compuestos llamados "semioquímicos" (sustancias químicas que modifican la conducta de modo indirecto), tales como feromonas, antialimentarios, entre otros; que pueden ser del tipo esteroides, fenoles, saponinas, taninos, resinas y diversos terpenoides. La acción antialimentaria consiste en que la presencia de cierto tipo de producto, presente o aplicado a una planta, evite que un insecto se la coma y pueda morir por inanición. Los terpenoides que presentan ésta actividad, son principalmente de tipo diterpénico del grupo del clerodano, los cuales se han aislado en forma abundante de la familia Labiatae y en menor proporción de la familia Verbenaceae (Esquivel, *et al.* 1992).

Las familias Labiatae y Verbenaceae cuentan con una gran riqueza de especies de importancia económica (uso como alimentos, condimentos, en perfumes, cosméticos, tintes etc.), medicinal y ornamental (Escalante, 1941; Rivera y Obón, 1992; Granados y López, 1996).

Desde la antigüedad, por sus propiedades medicinales numerosas especies han sido reconocidas como bactericidas, bacteriostáticas, coleréticas, carminativas y espasmódicas; así como, alucinantes, psicotrópicas e insecticidas (Rivera y Obón, 1992; Heinrich, 1992).

Los primeros reportes de la actividad insecticida en Verbenáceas corresponden a Kato *et al* (1971) citado por Hosozawa *et al* (1979), donde a partir de *Clerodendron tricotomum*, aislaron dos diterpenos antialimentarios; mientras que *C. fragrans* (hoja), *C. calamitosum* (hoja y tallo), y *C. cryptophyllum* (hoja) resultaron activos contra *Spodoptera litura*. Por su parte Hosozawa *et al* (1979) mostraron que *Caryopteris divaricata* y *Callicarpa*

*japónica* estuvieron arriba del 80% de actividad antialimentaria a 1% de concentración en *Spodoptera litura*, así mismo de *Clerodendron infortunatum* y *Caryopteris divaricata* aislaron clerodanos como la clerodina. Por otra parte del tipo neo-clerodano, se han aislado varios metabolitos secundarios de la familia Labiatae a partir de los géneros *Ajuga*, *Teucrium*, *Scutellaria*, *Leonurus*, *Stachys* y *Salvia*; de *Scutellaria woronowii* por ejemplo se aisló la Jodrelina B, considerado el más potente clerodano antialimentario contra *Spodoptera littoralis* (Esquivel, et al. 1992).

Por ello en el presente estudio se trabajó con especies de ambas familias: *Lantana camara* (Verbenaceae), *V. trifolia* var. *variegata* y *Vitex hemsleyi* (Labiatae) de modo biodirigido. Es decir se realizó la extracción y separación cromatografica a la par con las pruebas de actividad biológica, esta última primero en fase preliminar con *Artemia salina*, *Ephilachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda* seleccionando las fracciones que provocaron una toxicidad mayor al 60% de mortalidad, las cuáles se aplicaron en la siguiente fase que correspondió a la búsqueda de actividad antialimentaria en el ciclo biológico de *S. frugiperda*, donde la más representativa fue la fracción VHF1 aislada de *Vitex hemsleyi* cuya estructura fue de naturaleza hidrocarbonada.

Esto reviste importancia considerando que México tiene una gran riqueza de especies vegetales que significan una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad antialimentaria, así como una larga historia de brotes devastadores de insectos plaga que han causado cuantiosas pérdidas económicas en cultivos para autoconsumo y exportación. Por ello corresponde pues, a la ecología química la tarea de buscar dichos compuestos que cumplan con las exigencias del consumidor y las condiciones ambientales para sustituir a los actuales insecticidas sintéticos.

## 2. OBJETIVOS

### General

- Conocer la actividad insecticida y antialimentaria, así como la estructura química de los metabolitos responsables de dicha actividad, aislados a partir de los extractos vegetales de algunas especies de la familia Verbenaceae y Labiatae.

### Específicos

- Realizar el fraccionamiento cromatográfico biodirigido de los extractos de *Vitex mollis* (hojas y tallos), *V. trifolia* var. *sub-tricepta* (hojas, tallos y fruto), *V. trifolia* var. *variegata* (tallos y fruto) y *V. hemsleyi* (hojas y tallos) de la familia Labiatae y *Lantana camara* (hojas) de la familia Verbenaceae para purificar los metabolitos secundarios activos.

- Evaluar la actividad biológica mediante el bioensayo con *Artemia salina*, *Ephialachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda*, con respuesta de todo o nada sobre la mortalidad acumulada (mayor al 60%) y su respectivo cálculo de  $CL_{50}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- Determinar el efecto antialimentario, el porcentaje de pupación y la proporción de sexos en el ciclo biológico de *S. frugiperda*.

### 3. HIPÓTESIS

Las especies estudiadas contienen metabolitos secundarios que pueden actuar como insecticidas directos o bien de forma indirecta como antialimentarios y alterar el desarrollo de insectos plaga, por lo que sirven como prototipos para el desarrollo de bioinsecticidas.



## 4. MARCO HISTÓRICO:

### 4.1 Plagas agrícolas

La humanidad al modificar esencialmente la estructura del ambiente para satisfacer sus necesidades (monocultivo), ha favorecido la proliferación de herbívoros y patógenos hasta el punto en que se establecen las llamadas plagas agrícolas. En términos generales una plaga puede ser cualquier población vegetal o animal, que altera el proceso de desarrollo de un cultivo agrícola y perjudica el plan de trabajo de una o más personas, su propiedad o su medio provocando pérdidas económicas (Granados y López, *et al.* 1996).

Las plagas más importantes son los insectos, ya que se ha estimado a nivel mundial que el 15% de los cultivos se pierden debido a su ataque. El éxito se debe a la eficiencia y gran variedad de piezas bucales que poseen para cortar, chupar o masticar hojas, troncos, raíces, flores, frutos y semillas; también causan un gran impacto como vectores de patógenos (virus, bacterias y hongos) y consumidores de productos agrícolas almacenados (Esquivel, *et al.* 1992; Granados y López, *et al.* 1996).

#### 4.1.1 Principales plagas del maíz y el frijol

En México el maíz y el frijol son los principales productos alimenticios de la canasta básica, lo que implica la necesidad de controlar las plagas que merman su rendimiento.

##### Generalidades del maíz

El maíz (*Zea mays* L. -familia Poaceae) representa el 43% del área cultivada en México con un elevado volumen y valor de la producción<sup>1</sup> (Contreras, 2001).

---

<sup>1</sup> El agricultor está sometido a exigencias del mercado por obtener rendimientos altos, sin embargo las plagas de insectos tienen una rápida multiplicación y ocasiona enormes pérdidas lo cual representa una limitante en su cultivo anual (Contreras, 2001).



a) **Daño por *Spodóptera frugiperda* J. E. Smith.**

Es un lepidóptero (Familia: Noctuidae) de extensa distribución geográfica, polífago que ataca cerca de 87 especies de importancia económica tanto ornamentales como gramíneas, principalmente: alfalfa, frijol, maíz, papa, sorgo, soya, algodón, trébol, tomate de cáscara, entre otras plantas silvestres (Brown y Dewhurst, 1975; Morón y Terrón, 1988).

Plaga mejor conocida como "gusano cogollero o gusano soldado", por el hábito de comer el meristemo en desarrollo (cogollo) del maíz y porque en densidades muy altas las larvas adquieren un comportamiento gregario, marchando de cultivo en cultivo, desfoliándolos completamente; incluso pueden minar los tallos a nivel del suelo, cortar hojas tiernas y espigas inmaduras causándoles perforaciones características (Hill, 1987; Hernández, 1988).

**Generalidades del frijol**

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L. Familia Leguminosae) es una planta anual herbácea también originaria de América e intensamente cultivada desde zonas tropicales a templadas, donde se conoce como: poroto, haricot, caraota, judía, alubia, habichuela, entre otros; frecuentemente constituye la principal fuente de proteína por lo que su demanda es sumamente necesaria año con año (Bautista, *et al.* 1994).

b) **Daño por *Epilachna varivestis* Mulsant.**

Es un coleóptero (Familia: Coccinellidae) considerado en México como la principal plaga del frijol a nivel nacional; llega a dañar un millón de hectáreas en promedio por cada ciclo productivo. Este insecto comúnmente se conoce como: tortuguilla, pachón, catarinita etc. y ataca a los cultivos de la mayor parte de las leguminosas, alfalfa, trébol, veza, lima, caupí, así como algunos zacates y hierbas. Los adultos y larvas comen el envés de las hojas donde raspan los tejidos entre las venas dejando una apariencia característica esqueletonizada o reticulada (Valdez y Álvarez, 1991; King y Saunders, 1984 *citado por* Bautista, *et al.* 1994).



## 4.2 Control Químico de plagas

El uso de los productos químicos para el control de las plagas ha sido utilizado por numerosas culturas desde hace mucho tiempo. En escritos de 100 a 200 años a.C. los griegos y los chinos ya habían reconocido las propiedades insecticidas de los metales, en China se menciona la fumigación con mercurio y arsénico junto con la quema de plantas tóxicas. Así mismo, la aplicación de azufre, cal, sales de cobre, aluminio, sulfato y aceite de oliva fue muy aceptada. En Inglaterra y Francia el llamado caldo "Bordeles" ( $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ) se utilizó como funguicida para controlar la plaga de la uva.

Así mismo la aplicación de sustancias de origen vegetal (piretrinas, rotenona y nicotina) y posteriormente de origen sintético (desopricrina y bromuro de metilo) fueron ampliamente utilizadas, pero fue hasta 1939 en la segunda guerra mundial, cuando el uso de los plaguicidas sintéticos aumentó tras el descubrimiento del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) aplicado para controlar los insectos vectores del tifus exantemático y la malaria<sup>2</sup>. Hacia 1967, el DDT era efectivo para controlar el gusano de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), pero años después se generalizó su uso junto con otros insecticidas de acción similar (Primo, 1991; Granados y López, *et al.* 1996).

El común denominador en el uso de dichas sustancias fue su acción residual (permanecen activas durante un largo periodo de tiempo) y falta de especificidad (dañan a cualquier especie), por lo que se aplicaron sin control. Sin embargo, con el tiempo, la permanencia resultó ser uno de los mayores obstáculos al tratar de elevar la producción agrícola, ya que no se degradan ni aún después del procesamiento industrial de la materia prima y, al no ser específicas, alteran el equilibrio ecológico al dañar también la entomofauna benéfica y llegar a niveles superiores de la cadena alimenticia. Así mismo han favorecido la selección de especies de insectos plaga resistentes<sup>3</sup> a dichos productos (Coronado, 1972; Lindbland y Druben, 1979; Pickett, 1988; Romeo y Simmonds, 1988).

La mayoría de los insecticidas sintéticos utilizados hoy día se han clasificado como insecticidas de acción directa por su efecto en el sistema nervioso, como los organoclorados, organofosforados, dinitrofenoles, foramidinas, carbamatos y piretroides; y algunos productos de origen natural como la nicotina, rotenona (*Derris*), sabadilla y cuasina. Por otro lado, el grupo de acción indirecta lo constituyen principalmente productos de origen natural, como los repelentes, atrayentes, feromonas, reguladores del

<sup>2</sup> Por su acción potente y amplio espectro se extiende el uso del DDT y el de otros productos con propiedades semejantes tales como 2,4-D (herbicida), TMTD (fungicida) y el WARFARIN (raticida)..

<sup>3</sup> En 1938 se conocían 7 especies de insectos resistentes, para 1990 ya eran más de 500 especies resistentes a partir de varios mecanismos como: una descomposición bioquímica, una acción degradadora de enzimas, por detoxificación o por acumulación en el organismo del insecto.



crecimiento (ecdisonas, hormonas juveniles, hormonas anti-juveniles), inhibidores de la oviposición y los antialimentarios (Pickett, 1988).

Este último grupo de control biológico ha sido de especial importancia al ser fácilmente degradables y de mayor especificidad<sup>4</sup>. Los antialimentarios por ejemplo han sido definidos como sustancias químicas producidas por la planta, que inhiben la alimentación del herbívoro sin causar la muerte inmediata, sino que el insecto muere por inanición; este efecto también es referido como sinónimo de disuasivo de la alimentación o repelente al gusto por comer (Maxwell y Jennings, 1984; van Beek, and de Groot, 1986).

#### **4.2.1 Control Biológico de plagas**

El control de plagas desde el punto de vista ecológico se refiere a la acción de parasitoides, depredadores, entomopatógenos y productos tóxicos de origen orgánico vegetal o animal, que sirven para regular la densidad poblacional de una plaga hasta niveles menos dañinos. Desde el punto de vista aplicado y económico el control biológico actúa junto con los factores físicos del medio ambiente permitiendo la conservación de organismos benéficos y el mantenimiento del equilibrio ambiental.

Las plantas constituyen una fuente valiosísima para el desarrollo de nuevos agentes insecticidas, ya que durante 400 millones de años han desarrollado mecanismos de protección físicos y químicos contra el ataque de insectos. A partir de su composición química se han obtenido numerosas sustancias tóxicas, repelentes, antialimentarias o inhibidoras del crecimiento mediante algunos métodos tradicionales como, calentamiento o pulverización de las plantas secas entre otros, que ha marcado otras alternativas de control<sup>5</sup> (Lindbland y Druben, 1979; Lagunes, 1984; González y Lagunes, 1986; Granados y López, 1996).

#### **4.3 Interacción planta-insecto**

Las características mediadoras entre plantas e insectos no siempre resultan tan evidentes para el investigador en el campo debido, a que son respuestas muy finas que

---

<sup>4</sup> Muchos de estos compuestos juegan un rol muy específico en las relaciones insecto-planta, insecto-insecto, o en ciertos procesos de los insectos.

<sup>5</sup> No fue sino hasta 1984 cuando el estudio químico de las plantas en busca de insecticidas avanzó rápidamente, al dilucidarse varios mecanismos sobre la resistencia química específica, lo cual ha estimulado a continuar las investigaciones (Maxwell y Jennings, 1984).

pueden estar ocultas en la fenología, la fitoquímica y en complejos procesos metabólicos de ambos (García, 1990).

### a) Herbivoría

La herbivoría desde el punto de vista ecológico se ha definido como un tipo especial de depredación, en vista de que los herbívoros son capaces de consumir conjuntos de especies. Su efecto depende de la edad, el estado fisiológico de la planta, el nivel de daño causado y la preferencia por ciertos órganos vegetales; así como las relaciones de la planta atacada con otras (Dirzo, 1984; Dirzo & Harper, 1980 citado por García, 1990).

Otros tipos de interacción se dan cuando los insectos obtienen de las plantas sitios de alimentación, apareamiento, oviposición y/o refugio; al tiempo que afectan la dinámica poblacional de sus plantas huésped, modificando la riqueza, abundancia relativa y distribución espacial. Hipotéticamente, los insectos son y han sido la presión selectiva que ha fomentado la evolución de las defensas químicas<sup>6</sup> y físicas de las plantas contra ellos (Dirzo, 1984; Crawley, 1983 citado por García, 1990).

### b) Co-evolución

Las plantas han tenido que desarrollar mediante una constante co-evolución con los herbívoros, numerosos mecanismos para contrarrestar la competencia vegetal intra e inter específica, los factores abióticos (agua, nutrientes, luz) y el ataque de microorganismos patógenos o depredadores, ya que dichos factores representan las mayores presiones selectivas para desarrollar estrategias. Los insectos herbívoros a pesar de representar una pequeña parte dentro de los depredadores han moldeado el tipo de defensas físicas (dureza de los tejidos, vellosidades, tricomas, espinas agudas, hojas con bordes agudos etc.) y químicas (p.e. las toxinas del zumaque venenoso *Rhus toxicodendron*, los olores y sabores desagradables) que protegen a la planta de su ataque, haciéndola repelente, tóxica o inadecuada (van Beek and de Groot, 1986).

La composición química de la planta, es la que principalmente envía los estímulos indicativos que le permiten a un insecto fitófago identificar a sus hospederas. Los infoquímicos son compuestos que acarrean dicha información entre dos individuos, despertando en el receptor una respuesta fisiológica o conductual con carácter adaptativo para uno de los organismos interactuantes o para ambos. Los estímulos de los factores aromáticos que atraen al insecto hacia la planta actúan como "incitadores", mientras los que le permiten identificarla como huésped aceptable para alimentarse u

<sup>6</sup> La localización, densidad y calidad de los recursos (la planta por su química determina la palatabilidad) influyen en la actividad del insecto y viceversa (Barbour, *et al.* 1987; Miller and Miller, 1990).



ovipositar son “estimulantes”; si por el contrario el estímulo encontrado indica que la planta es inaceptable se considera “disuasivo” (Maxwell and Jennings, 1984; Berenbaum, 1995; Anaya, 2003).

#### 4.3.1 Insecticidas de origen vegetal

Desde los tiempos del imperio Romano hasta mediados del siglo XX sobre todo en el hemisferio oeste, ya se utilizaban los insecticidas vegetales de acción indirecta tales como la nicotina (alcaloide aislado del extracto acuoso de las hojas del tabaco: *Nicotiana tabacum*), la rotenona (derivada de los tallos de *Derris elliptica* y de *Lonchocarpus spp*) los piretroides (de la flor en cabezuela de *Chrysanthemum cinerariaefolium*), la sabadilla (alcaloides), la rianina (de los tallos de *Ryana speciosa*) y la cuasina, como repelentes y sustancias tóxicas contra insectos. En un estudio, los extractos de éstas plantas fueron aplicados contra *Periplaneta americana* (Blattidae), *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y *Sitophilus aryzae* (Curculionidae) donde observaron que pueden matar por ingestión, contacto o inhalación; algunos producen esterilidad o bien son atrayentes (sexuales, alimenticios o inductores de la oviposición) que sirven como cebos en trampas (Lagunes, et al. 1984; Norman, 1989; Dev and Jalandhar, 1997).

Con respecto a los antialimentarios el más efectivo y versátil proviene del árbol del Neem (*Azadirachta indica* Juss.) de origen hindú, el cual produce semillas oleaginosas en cuyo aceite se concentra un nor-triterpéno llamado Azadiractina, eficaz contra un amplio espectro de especies a concentraciones de 0.1 ppm. También del árbol frutal *Aleurites fordii* se han aislado antialimentarios contra el gorgojo del algodón. El meliantriol y la salamina también son compuestos que se usan como inhibidores en la alimentación de insectos (Granados y López, 1996).

En general la actividad antialimentaria se ha descrito para varios grupos de compuestos tales como terpenos, alcaloides, cumarinas, flavonoides, antraquinonas y fenoles entre otros. Por ejemplo la aglucona 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2 H-1,4-benzoxaxin-3-ona (DIMBOA) en *Zea mays* es un eficaz repelente e inhibidor de la alimentación para las larvas de primer estadio del barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*. Un inconveniente de este tipo de sustancias es que debido a su origen natural, frecuentemente están presentes a bajas concentraciones y su uso sería costoso a menos que se realizara la síntesis orgánica y se tomaran como prototipos que permitieran su combinación con otros métodos de control (Esquivel, et al. 1992; Coronado, 1972).

---

<sup>7</sup> Mientras que los atrayentes, repelentes y muchos incitadores son sustancias aromáticas, los estimulantes y disuasivos son en general factores gustativos (azúcares y amino ácidos)..



### 4.3.2 Metabolitos secundarios

Los primeros metabolitos secundarios estudiados en el siglo pasado, se encontraron asociados a glándulas y tricomas motivo por el cual se supuso, eran sustancias de desecho o vestigios de rutas metabólicas ancestrales sin conferir alguna ventaja selectiva. Dichos compuestos resultan tóxicos al herbívoro y/o patógeno, o bien crean condiciones que inhiben su crecimiento dentro de la planta (Coley, 1983 citado por García, 1990; Cavalier-Smith, 1992 citado por Contreras 2001; Gottlieb, *et al.* 2002).

Algunos afectan directamente la longevidad, fisiología sensorial (conducta), endocrinología (desarrollo) y metabolismo del insecto, e indirectamente afectan al insecto a través de sus simbioses. Pueden actuar como venenos para animales, bacterias u hongos, reductores de la digestibilidad en proteínas o carbohidratos; o bien inducir el consumo por su asociación con azúcares<sup>8</sup> (Hattenschwiler and Vitousek, 2000; Langenheim, 1994 citado por Contreras, 2001).

Por su biogénesis se pueden clasificar dentro de por lo menos dos grupos, p.e.- los isoprenoides (terpenos), acetogeninas (generadoras de acetato), protoalcaloides y verdaderos alcaloides que se pueden sintetizar a través de una sola vía, otros como los glicósidos, flavonoides, benzofenonas, ciertas cumarinas, taninos condensados y estilbenos son producto de vías mixtas (Ley and Toogood, 1990; Bernays, 1994; Hattenschwiler and Vitousek, 2000; Cates, 1996 citado por Contreras, 2001).

La concentración y diversidad de dichos compuestos varía con base en la genética, el clima y la fenología de la planta entre otros factores es decir, durante la germinación y el desarrollo probablemente produzca más energía en crecer que en la producción de altos niveles de metabolitos secundarios, en cambio una vez ya establecida las hojas jóvenes con un valor nutricional alto necesitan protegerse para asegurar la capacidad fotosintética que declina en el estado adulto, al igual que las semillas; por lo que ya se destina mayor energía en la producción de metabolitos secundarios sobre todo como agentes antialimentarios. Por lo cual aún quedan numerosos compuestos por ser aislados y reconocidos como compuestos bioactivos (Inderjit and Frank, 1995; Verpoorte, 1998).

---

<sup>8</sup> Se asocian también con fenómenos alelopáticos (inhibidores o reguladores), interacciones mutualistas (polinización), interacciones de herbívoros del tercer nivel trófico (dispersión), resistencia contra radiaciones UV y como factores metabólicos (mediadores nutricionales); siendo muy importantes para la existencia de las plantas.



#### 4.4 Familia Labiatae y Verbenaceae

El Orden Lamiales incluye cerca de 350 géneros agrupados en 8 familias, dentro de estas las familias Labiatae y Verbenaceae están más evolutivamente emparentadas morfológica y químicamente, en especial dentro de diferentes tipos de iridoides y derivados del ácido caféico. Recientemente el género *Vitex spp.* taxonómicamente fue reubicado de la familia Verbenaceae a la familia Labiatae, respetando dicho cambio en el presente estudio (Jacobson, 1989; Cantino, *et al.* 1992; Hedge, 1992; Richardson, 1992; Verpoorte, 1998).

La familia Labiatae presenta cerca de 220 géneros y quizá más de 4, 000 especies con una amplia diversidad morfológica y distribución cosmopolita, es una familia herbácea-arbustiva bien representada en regiones templadas. La familia Verbenaceae por su parte, está representada por 91 géneros y cerca de 3, 000 especies tropicales y subtropicales, básicamente árboles y arbustos con pocas flores zigomórficas y menos contenido en aceites aromáticos (Cantino, 1992; Zheng-yi and Raven, 1994).

En general las Verbenáceas y Labiadas son ricas en terpenos incluyendo monoterpenos (2 unidades de isopreno), sesquiterpenos (3 u. de i.), diterpenos (4 u. de i.), glicósidos iridoides (1 u. de i.) y flavonoides<sup>9</sup>, muchos de los cuáles presentan actividad insecticida. En especial para la familia Verbenaceae algunos trabajos científicos lo demuestran como por ejemplo: Hosozawa *et al* (1974) investigaron 23 especies de plantas pertenecientes a 17 familias diferentes contra *Spodoptera litura* (el gusano trozador del tabaco), de éstas, *Caryopteris divaricata*, *Callicarpa japonica* (Verbenaceae) y *Ficus carica* (Moraceae) mostraron de 80 a 100% de actividad antialimentaria a concentraciones de 1% y fueron aislados clerodanos en baja proporción, donde la clerodina fue la más representativa aislada de *Clerodendron infortunatum* y *Caryopteris divaricata* (Verbenaceae).

Previamente Kato, *et al.* (1971) (citado por Hosozawa, *et al.* 1974), aisló dos diterpenos antialimentarios a partir de *Clerodendron tricotomum*, mientras que otras verbenáceas fueron activas contra *Spodoptera litura* tales como *Clerodendron fragrans* (hoja), *C. calamitosum* (hoja y tallo), *C. crytophyllum* (hoja) y *Vitex trifolia* (semilla), esta última incluida recientemente dentro de las Labiatae. Por su actividad insecticida son conocidas *Vitex trifolia* y *V. negundo* contra las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi*, así como disuasivas para el mosquito *Aedes aegypti*.

---

<sup>9</sup> El efecto de algunos terpenoides puede ser insecticida, antibacteriano o antifúngico (Hegnauer, 1989 citado por Simmonds y Blaney, 1992)..



Con respecto a la familia Labiatae las especies mexicanas del género *Salvia* son una fuente importante de diterpenos del tipo clerodano, lo que las diferencia de las especies Europeas y Asiáticas que producen diterpenos con esqueleto de abietano. Los clerodanos constituyen casi el 80% de los diterpenos aislados hasta la fecha de las especies estudiadas y el resto son diterpenos abietánicos y pimaránicos (Cole, 1992; Cantino, 1992).

Algunos diterpenos han mostrado actividad biológica antitumoral o antialimentaria contra insectos, atribuyéndose la primera propiedad a compuestos de tipo abietánico y la segunda a compuestos de tipo clerodánico, así mismo de los géneros *Ajuga*, *Teucrium*, *Scutellaria*, *Leonurus*, *Stachys* y *Salvia*, se han aislado diterpenoides de tipo neo-clerodano. La Jodrelina B se aisló de *Scutellaria woronowii* y es considerada el más potente clerodano antialimentario contra *S. littoralis* (Esquivel, et al. 1992).

Existen reportes de que los terpenoides "antialimentarios" fueron activos contra *Spodóptera spp.*, *Heliothis spp.*, *Bombyx mori* y *Pectinophera gossypella*, mientras que otros afectaron el desarrollo de los insectos al interferir en el proceso hormonal durante la pupación y la ecdisis, llamados por tal motivo "fitoecdisteroides" que también pueden alterar el número de generaciones y la proporción de sexos.

#### 4.4.1 *Lantana camara*

##### a) Ubicación Taxonómica

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Lantana</i>
Especie	<i>Lantana camara</i> Linnaeus, 1753 (Cronquist, 1981).

##### b) Nombres comunes

Cinco negritos, alfombrilla, ojo de pescado, pionía del cerro, quelite de arroyo, flor de nauchi, flor de San Cayetano, hierba de San Pedro, hierba negra, hierba amarga, lampana, llantana, mocototol, mozoquite, orozus, palabra de mujer, palabra de caballero, poteo (Veracruz), hierba de cristo, corona del sol, (Tamaulipas), tres colores (Michoacán),



sapotillo (Oaxaca), uña de gato (Morelos), hierba mora, siete colores (Jalisco), confitura, confite (Sinaloa y Sonora), entre numerosos sinónimos (Martínez, 1979; Nash, *et al.* 1984; Argueta, *et al.* 1994).

#### c) Origen y Distribución

Planta de origen americano distribuida desde México, Panamá, Antillas hasta América del Sur, crece a una altitud desde el nivel del mar hasta los 1,800m con floración todo el año (Argueta, *et al.* 1994; Nash, *et al.* 1984).

#### d) Usos

Planta ornamental y medicinal, tradicionalmente se utiliza el cocimiento de las hojas en padecimientos de tipo gástrico como debilidad, dolor e inflamación estomacal, dolor de intestinos y hepático; derrame de bilis, amibas y vómito. En Chiapas, Puebla y Veracruz principalmente, es utilizada para la diarrea, disentería, afecciones respiratorias, desórdenes ginecológicos, después del parto para limpiar y cicatrizar la matriz y bañar al recién nacido. No existen reportes de su actividad insecticida, sin embargo las hojas no son atacadas por los insectos, por ello se incluyó en el presente estudio para la búsqueda de dicha actividad (Argueta, *et al.* 1994).

#### e) Composición química

Todos los órganos de la planta contienen un aceite esencial mas concentrado en las flores. El aceite esencial contiene los monoterpenos cineol, dipenteno, geraniol, linalool,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -felandreno, felandrona y el componente fenólico eugenol, los triterpenos lantadenos A y B, ácido lantanólico, ácido láctico, el éster metílico del ácido 3-oxo-ursólico y el ácido 3 ceto-ursólico. Lancamarona y ácido lantoico han sido detectados sólo en las hojas e igualmente se han identificado el triterpeno  $\alpha$ -amirina y el esteroil  $\beta$ -sitosterol; en la raíz se ha detectado el ácido triterpenoide llamado oleanólico (Argueta, *et al.* 1994).

### 4.4.2 Generalidades del género *Vitex spp*

Este género incluye aproximadamente 270 especies descritas tanto arbóreas como matorrales creciendo en zonas tropicales y subtropicales. Su origen es desconocido pero



numerosas variedades han sido descritas en diversos lugares de la India, México y sureste de África (McMillan, 1976; Cronquist, 1981; Jones, 1988; y Segura, 1996).

#### a) Usos

En la medicina tradicional las hojas son usadas extensamente en inflamaciones y padecimientos como leucoderma, bronquitis, dolor de cabeza, enfermedades de la piel y reumatismo, la corteza como astringente y las raíces como afrodisíaco y anti-inflamatorias, los frutos en dolores de cabeza y como vermífugos, las semillas para enfermedades de la piel, aborti-facientes y diuréticas; en México la especie *Vitex leucoxylon* se usa en el folklore de muchas regiones como alimento, *V. mollis* para aliviar la disentería como analgésico y anti-inflamatorio, para tratar las picaduras de escorpión, diarrea y afecciones gastrointestinales al igual que *V. pyramidata*, *V. pubescens*, *V. agnus-castus* y *V. gaumeri* (Krishna and Jena, 1990; Argueta, et al. 1994; Ahmad and Holdsworth, 1995; Bajpai, et al. 1995).

Tanto *V. gaumeri*, *V. agnus-castus* y *V. negundo* son usadas respectivamente como malárico, antimicrobiano y antifúngico, *V. negundo* también es usado como agente anti-inflamatorio y *V. gaumeri* para el resfriado y la tos; *Vitex rotundifolia* se usa para el dolor de cabeza y de esta se aisló un diterpeno de tipo abietano que mostró una fuerte actividad antioxidante y se ha reportado su toxicidad para ciertas líneas celulares cancerígenas y contra ciertas bacterias patógenas.<sup>10</sup> En Japón de ésta misma especie se aislaron flavonoides (de los frutos), glucósidos iridoides y diterpenos (de las hojas) (Tada and Yasuda, 1984; Ekundayo, et al. 1990; Chawla, et al. 1992; Singh, et al. 1993; Argueta, et al. 1994; Damayanti, et al. 1996; Ono, et al. 1998).

Por su actividad insecticida son conocidas *Vitex trifolia* y *V. negundo*, éste último eficaz contra las larvas del mosquito *Chulees quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi*, así como disuasivo para el mosquito *Aedes aegypty*; en campo *V. trifolia* es poco atacada por insectos herbívoros por ello se consideró para su estudio en el presente trabajo.

---

<sup>10</sup> Cabe mencionar que en cuanto a la composición química de diferentes especies sobresalen los aceites esenciales, alcaloides, esteróles, triterpenoides, flavonoides, tridoides, iridoides y ecdisonas (Rimpler, 1972; Krishna and Jena 1990; Hebbalkar, et al. 1992; Pushpalatha y Muthukrishnan, 1995).



### 4.4.3 *Vitex trifolia* var. *variegata*

#### a) Ubicación Taxonómica

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Labiatae
Género	<i>Vitex</i>
Especie	<i>Vitex trifolia</i> var. <i>variegata</i> Moldenke, 1941 (Publicado en Phytologia, 1941).

#### b) Origen y distribución

Su origen es desconocido, está bien representada en todo el Oeste de Sudáfrica y Asia.<sup>11</sup> En regiones tropicales y subtropicales está ampliamente distribuida en países como: China, India y Sudamérica; en México se encuentran numerosas variedades distribuidas desde Sinaloa hasta Yucatán y Guerrero (Hansel, 1964).

#### c) Usos

*Vitex trifolia* se considera útil en aplicaciones externas para dolores reumáticos y torceduras, las hojas se usan para fiebres intermitentes acompañadas con vómitos y sed severas, ha sido reportada por tener propiedades insecticidas. En la India<sup>12</sup> las hojas y tallos son aplicados como tónicos y febrífugos, la decocción de las hojas y su jugo es aplicada en la composición de drogas para combatir el dolor de cabeza y catarro. En las islas Filipinas se utiliza en fomentos para el reumatismo, contusiones, beri-beri etc. Steinmetz (1957), señaló que en Ceilán, India, Burma, Indonesia, Australia y Norte de China eran de uso común el aceite esencial y resina extraído de las hojas, ácidos del fruto y colorantes (Moldenke, 1981; Ramesh, *et al.* 1986; Thein, *et al.* 1995).

<sup>11</sup> Seemann (1866) señala que *V. trifolia* es muy común en Nueva Guinea, China, Ceilán, Japón, al este de la India, Filipinas, Norte de Australia, e islas del oeste de África. Bean (1956) señala que esta planta ha sido cultivada en Inglaterra desde el año 1739 (Moldenke, 1982).

<sup>12</sup> Cooke (1905) remarca que *V. trifolia* está muy emparentada a *V. negundo* con base en criterios morfológicos y propiedades curativas, de hecho entre los Tamils (India), consideran a una especie la hembra y a la otra el macho, combinándolas con fines curativos.



Con fines curativos actualmente se utilizan las hojas como tónico, aromático, sedativo, analgésico, expectorante, febrífugo y antiparasitario,<sup>13</sup> los tallos como tónico, expectorante, febrífugo y diurético, los frutos frescos en tratamiento para los nervios y como cefálico, secos como vermífugo y para el insomnio, además facilita la transpiración.

Bolan (1935) reportó que los frutos de *V. trifolia* eran usados como cataplasma en el tratamiento de tumores en Malaya e India. Quisumbing (1951) señaló que eran cultivados y utilizados para el tratamiento del cáncer de seno en China. Se ha reportado que la especie de *V. trifolia* var. *variegata* que crece como maleza en el Sur de Florida, causa irritación al respirar, a veces dolores de cabeza y náuseas.

Worthington (1959) reportó que en Sri Lanka son reconocidas sus semillas por su actividad antialimentaria contra insectos, siendo también efectivas sus hojas ya que son altamente aromáticas. En Asia las hojas son mezcladas con el agua para irrigar cultivos de arroz para protegerlas de plagas y en establecimientos de granos y ropa para repeler insectos (Hosozawa, *et al.* 1974, Moldenke, 1981; Moldenke, 1982).

#### d) Composición química

Se han aislado varias estructuras químicas de hojas y frutos, tales como flavonoides: Casticina, 3,6,7-trimetil quercetagina, 5-metil artemetina, 7-desmetil artemetina, luteolina, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucurónido e isoorientina, además la presencia de dimetiltereftalato es única y reportada por primera vez en especies del género *Vitex*, así como flavonoides identificados como vitexin, isovitexin y casticin; también glycoflavonas típicas de este género (Ramesh, *et al.* 1986; Krishna and Jena, 1990).

Han sido descritos y analizados los aceites esenciales de las hojas conteniendo, el triterpenoide friedelin, stigmasterol,  $\beta$ -Sitosterol y  $\beta$ -Sitosterol- $\beta$ -D-glucósido. En relación a su actividad Hernández *et al* en 1999 reportaron fuerte actividad fúngica, bactericida, citotóxica e insecticida del extracto crudo de diferentes partes de *V. trifolia* (Vedantham y Subramanian, 1976; Pan, *et al.* 1989 y Zeng, *et al.* 1996).

Las hojas contienen cineol, 1-d-pineno, canfeno, acetato de terpinilo y un alcohol diterpénico. Willaman & Li (1970) describió un nuevo alcaloide, vitricina, del fruto de

---

<sup>13</sup> Puri (1960) reportó que las hojas de esta planta fueron probadas por sus propiedades antibióticas y arrojaron resultados negativos contra *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli communis*, *Elerthella typhosae*, *Vibrio cholerae* y *Klebsiella pneumoniae* y solo inhibieron parcialmente el crecimiento de *Shigella dysenteriae* (Moldenke, 1981)..



esta especie y Ramachandran *et al* (1975) reportó del extracto clorofórmico de las hojas de *V. trifolia* dos flavonas metiladas; el rendimiento mayor fue caracterizado como 5, 7-dihydroxyl-3, 3', 4', 6-tetra metoxil flavona (3, 3', 4', 6'-tetra metil quercetagenin) y el menor como artemetina (3-hidroxi-3, 3', 4', 6, 7-penta metoxil flavona).

#### 4.4.4 *Vitex hemsleyi*

##### a) Ubicación Taxonómica

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Labiatae
Género	<i>Vitex</i>
Especie	<i>Vitex hemsleyi</i> Briq. (Bulletin del' Herbiar, 1896).

##### b) Nombres comunes "Capulín y Capulín blanco"

##### c) Origen y distribución

En México se encuentra distribuida en Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca básicamente, es frecuente en bosque tropical sub-caducifolio a bajas altitudes, florece en Junio y está muy emparentada con las especies asiáticas.

##### d) Usos

La medicina tradicional lo prescribe para problemas gastrointestinales y como repelente contra mosquitos, por ende fue propuesto para su estudio fitoquímico e insecticida en el presente estudio ya que no se encontraron antecedentes bibliográficos reportados (Samy, *et al.* 1998).



## 4.5 Organismos de prueba

### 4.5.1 *Artemia salina*

Es un crustáceo de la subclase Brachiopoda, Orden Anostraca. Presenta tolerancia a un rango muy amplio de salinidad (de 10-20 a 180-220 g/L.) siendo relativamente fácil de cultivar y estudiar. Produce numerosos huevecillos en estado de diapausa, altamente resistentes a condiciones extremas y muy viables.

El primer reporte del uso de larvas de *A. salina* en las ciencias biológicas toxicología apareció en 1956 y desde entonces se emplea en estudios medio-ambientales como una prueba simple, estándar, rápida, reproducible, efectiva y cuantificable por Vanhaecke and Persoone, útil en la búsqueda de sustancias bioactivas de extractos vegetales; en el presente estudio se reporta el bioensayo y la preparación de las muestras en el apartado de metodología (McLaughlin, *et al.* 1988; Wah, 1993).

#### a) Ciclo de vida

Su cultivo es fácil en solución salina donde los huevos en inmersión absorben agua y la embriogénesis se completa entre 16 a 18h. Los embriones emergen cubiertos con una membrana, su crecimiento es rápido y las antenas, así como sus mandíbulas les ayudan a liberarse; presentan dos estadios larvarios.

La concentración letal del 50% de mortalidad (CL<sub>50</sub>) causada por los extractos fue determinada después de 24h de exposición (crónica), debido a que los extractos fueron solubles en agua<sup>14</sup>.

### 4.5.2 *Spodóptera frugiperda*

#### a) Ubicación Taxonómica

Phylum: Artropoda  
Clase: Insecta  
Orden: Lepidoptera  
Familia: Noctuidae  
Género: *Spodoptera*  
Especie: *Spodoptera frugiperda* Smith. (Morón y Terrón, 1988).

---

<sup>14</sup> Para sustancias altamente solubles en agua las exposiciones son cortas, mientras los extractos insolubles en agua requieren mayor tiempo de exposición (Wah, 1993).



- b) **Nombre común** "Gusano cogollero del maíz", pelón, palomilla del maíz, gusano vainero.

c) **Distribución**

Es una plaga ampliamente distribuida en México sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales, en general abarca desde el norte de EE.UU. hasta América del sur y es posible encontrar especies muy afines en África y Asia.

d) **Ciclo de vida**

**Huevo:** de 3-5mm en grupos de hasta 300 en la superficie de la hoja, cubierto con escamas gris-rosadas del abdomen de la hembra en oviposición. **Larva:** (14-15 días) pasa por 5 a 6 estadios según la temperatura y alimento, mide de 35-40mm cuando está madura. Los primeros estadios son verdes con manchas y líneas negras dorsales, después se vuelve verde con líneas espiraculares y dorsales negras, café-beige o casi negra (cuando están muy hacinadas) con una Y invertida en la cabeza, pináculos dorsales negros y cuatro puntos negros en cuadro sobre el último segmento abdominal. **Adulto:** mide 3cm de punta a punta de las alas, de color oscuro con las alas anteriores moteadas de gris y con una mancha pálida o blanca en el ángulo apical de las alas anteriores, el segundo par de alas es blanco con venas oscuras (Aviles, 1987; Lagunes y Rodríguez, 1988).

#### 4.5.3 *Epilachna varivestis*

a) **Ubicación taxonómica**

División	Artropoda
Clase	Insecta
Orden	Coleoptera
Familia	Coccinelidae
Género	<i>Epilachna</i>
Especie	<i>Epilachna varivestis</i> Mulsant. (Morón y Terrón, 1988).

- b) **Nombres comunes** Conchuela del frijol, escarabajo mexicano del frijol, tortuguilla del frijol, pachón, catarinita.



### c) Distribución

Del Sur de Estados Unidos hacia América Central, en México está presente en Veracruz, Puebla, Morelos, Tamaulipas, San Luis Potosí, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Durango, Sonora, Colima, Zacatecas, Guanajuato, D.F., Jalisco, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Querétaro, Tlaxcala, Coahuila, y Chihuahua (King y Saunders, 1984).

### d) Ciclo de vida

**Huevo:** elongado amarillo, puesto en grupos de 25 a 60 por el envés de las hojas. **Larva:** Cifosomática que pasa por cuatro estadios, primero blanca verdosa luego amarilla, oval, cubierta con cuatro a seis espinas ramificadas en cada uno de los segmentos del cuerpo excepto el caudal, con una protuberancia eversible con áreas oscuras cerca de los tres ocelos; longitud corporal: 10-11mm. **Pupa:** amarilla, ovoide, pegada a su planta huésped. **Adulto:** Presentan un cuerpo muy convexo de 6-8mm de largo, superficie dorsal pubescente de color amarillo, bronce o cobrizo que se hace más oscuro con la edad, cada élitro presenta ocho puntos negros formando tres hileras que cruzan el cuerpo; sus bordes delanteros laterales del pronoto cubren una parte considerable de los ojos, el extremo de sus mandíbulas es bífido y con muchos dientes en su cara interna, pliegue epipleural es ancho y acanalado; presenta mesocoxas ampliamente separadas, patas proporcionalmente cortas ya que los fémures no sobrepasan los lados del cuerpo y su longitud total es de 6 a 8mm. La incubación dura 12 días y completan su desarrollo de 30 a 38 días, pupan de 9-14 días, el ciclo total es de 61 días con 2 generaciones por año (Coronado, 1972; Morón y Terron, 1988).



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y Aparatos utilizados

- Rotavapor (Büchi CH-9230 Flawil/Schweiz).
- Equipo para determinar puntos de fusión (Melt-Temp II, Devices-USA) que no están corregidos.
- Balanza granataria 2Kg./5 Lb de capacidad (OHAUS Dial-O-Gram).
- Balanza analítica (Sartorius BP 1105).
- Campana de extracción (ALDER, S.A. de C.V.)
- Campana de flujo laminar
- Lámpara de luz ultravioleta (Spectronics Co., Mod. ENF-260C).
- Estufa (Cole-Parmer Mod. 05015-58).
- Parrilla eléctrica (Barnsted/Termolyne 2300, Mod. HP2305b).
- Incubadora de ambiente controlado (REVCO 27 °C ± 1.5 °C y 60% ± 5%HR) con foto periodo luz-oscuridad de 16 - 8 hrs.
- Cromatografías en columna con fase estacionaria (Gel de sílice 60: mallas 230-400 y sílice para placas -Merck).
- Cromatografías en capa delgada con cromatofolios (Alugram Sil G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel Dören).
- Revelador de sulfato cérico ( Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 1%) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2N.
- Liofilizadora (LABCONCO Freeze-Dry System LYPH-LOCK 45).
- Varios (Cristalería, papel, algodón, tapones, mangueras, pinzas, pizetas, soporte universal, anillos metálicos, canastas de ebullición, piedras, desecador, etc.)
- Bomba de vacío (WELCH, duo-Seal, Mod. 1402).
- Equipo de infrarrojo (Spectrometer, Nicolet Magna 750, Perkin-Elmer, Mod. 337; en pastilla de KBr o en película).
- Equipo para resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H, Varian Gemini Unity 300, corridos a 300 MHz) mediante CDCl<sub>3</sub> como disolvente y de referencia interna TMS con desplazamientos químicos en ppm y en unidades. Los valores de J están dados en Hz.
- Espectrómetro de masas (Jeol JMS-AX505HA ó Jeol JMS-SX102A), mediante la técnica de ionización por impacto electrónico a 70 eV.



## 5.2 Análisis Fitoquímico

En el presente estudio se trabajó inicialmente con cinco especies vegetales, cuatro de la familia Labiatae: *Vitex mollis* (hojas y tallos), *V. trifolia var. sub-tricepta* (hojas, tallos y fruto), *V. trifolia var. variegata* (tallos y fruto) y *V. hemsleyi* (hojas y tallos); y una de la familia Verbenaceae: *Lantana camara* (hojas).

Mediante un enfoque biodirigido hacia la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad insecticida y antialimentaria, se maceraron las especies y los extractos obtenidos se probaron biológicamente de manera preliminar, con base en lo cual fueron seleccionadas para un análisis fitoquímico, biológico y estadístico completo; las especies que a continuación se indican.

### 5.2.1 *Lantana camara* (hojas)

#### a) Material vegetal

Arbusto de ornato de 3m de alto aproximadamente, en estado de floración con cabezuelas color amarillo, naranja y rojo muy abundantes; hojas opuestas, rugosas de ápices agudos y base redondeada. La recolecta de tallos y hojas de esta especie estuvo a cargo del M. en C. Baldomero Esquivel, realizada dentro de las instalaciones del conjunto E de la Facultad de Química (C. U.) de la UNAM, durante Julio de 1998. Las hojas se secaron a temperatura ambiente hasta sequedad, a partir de las cuales se realizó el análisis químico reportado en la Figura 1 (Nash, *et al.* 1984).

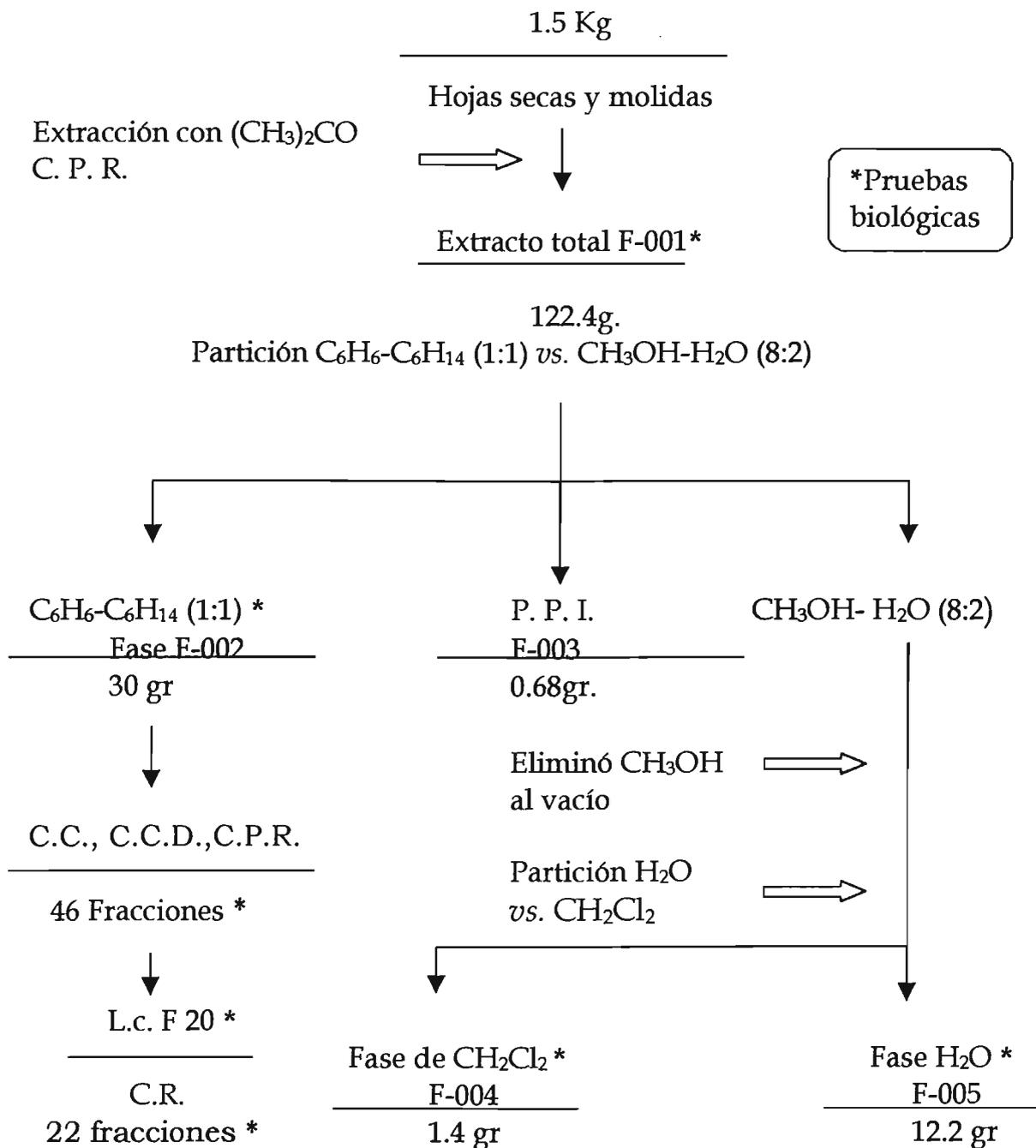
#### b) Extracción

Se realizó con 1.5kg de hojas secas en un frasco con 10L de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  durante tres días, el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor obteniendo 147.37gr (F-001) de extracto total. A dicho extracto se le realizó una partición con 2 mezclas de disolventes ( $\text{C}_6\text{H}_6$ - $\text{C}_6\text{H}_{14}$  1:1 y  $\text{CH}_3\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  8:2, 2 L. de c/u) hasta obtener dos fases, una no polar F-002 ( $\text{C}_6\text{H}_6$ - $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) y otra polar ( $\text{CH}_3\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$ ), los disolventes se eliminaron con ayuda de un rotavapor. Esta última fracción se extrajo nuevamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obteniendo dos fases, por un lado la fase F-004 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  secada en un rotavapor y por otro la fase acuosa F-005 (Azúcares, Glicósidos y Sales) secada en una liofilizadora.

De los extractos antes mencionados se cuenta con producto suficiente almacenado en condiciones estables. La fase F-003 corresponde a los precipitados insolubles obtenidos por filtración antes de la segunda partición con un bajo rendimiento, por lo cual no se probó en los bioensayos.



**Figura 1. Diagrama de trabajo para *Lantana camara***



CLAVES: C.C.= Cromatografía en columna, C.C.D.= Cromatografía en capa delgada, C.P.R.= Concent. a presión reducida, L.c. F20 = Fracción No.20 (activa), C.R.=Cromat.Relámpago, P.P.I.=Precipitados-insolubles.



### c) Análisis cromatográfico

La fracción F-002 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) fue activa hacia *A. salina* y su fraccionamiento cromatográfico se realizó en una columna de 10cm de Ø empacada con gel de sílice para placas. El punto de aplicación (30gr) fue adsorbido en gel de sílice 60Å, adicionando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro una vez empacada. Los disolventes se adicionaron del menos (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) al más polar (CH<sub>3</sub>OH) a través de un embudo de adición.

Las fracciones eluidas se recolectaron cada 150mL conectadas al vacío y evaporadas simultáneamente en un rotavapor, la sílice se lavó con CH<sub>3</sub>OH al final. Las fracciones obtenidas fueron agrupadas por afinidad química en 46 diferentes según las cromatografías en capa delgada realizadas. Donde cada una fue probada biológicamente.

### d) Tratamientos activos

De las fracciones antes mencionadas fue activa la No. 20 (L.c. F20). Dicha fracción fue separada más finamente a través de una cromatografía relámpago empacada a partir de 325mg de extracto con gel de sílice (230-400 Å) en C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO al 12.5% (Still, *et al.* 1978).

El sistema de disolventes se adicionó de menor a mayor polaridad recolectando cada 20mL. Una vez separadas se corrieron cromatografías en capa delgada donde se obtuvieron 22 fracciones, de las cuales ninguna dió actividad en los tres bioensayos citados. Por tal motivo se llevó la fracción (L.c. F20) sin separar al último nivel de prueba referente al efecto antialimentario sobre el ciclo de *S. frugiperda*.

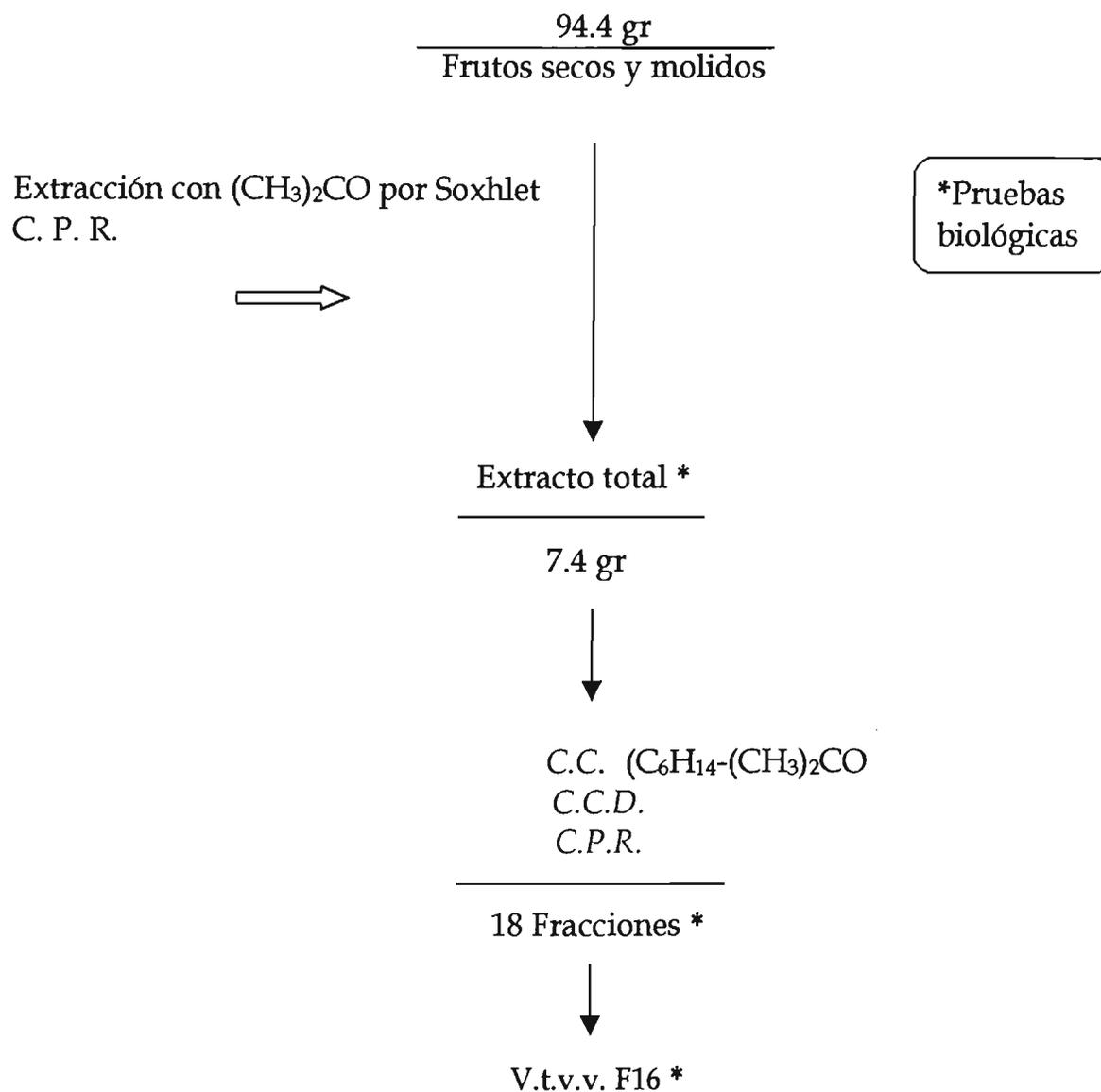
## 5.2.2 *Vitex trifolia var. variegata* (fruto)

### a) Material vegetal

Arbusto que mide 6m de alto aproximadamente con hojas pecioladas, pubescentes con envés grisáceo, margen liso, ápice agudo y base cuneada; tallos y frutos cilíndricos de color pardo. Se recolectaron tallos, hojas y frutos en el poblado llamado el "5" en Valle del Carrizo (Mpio. Ahome, Sinaloa) durante diciembre de 1997, la recolecta estuvo a cargo del Dr. Eduardo Aranda (UAEM).



**Figura 2. Diagrama de trabajo para *Vitex trifolia* var. *variegata***



CLAVES: C.C.= Cromatografía en columna, C.C.D.= Cromatografía en capa delgada, C.P.R.= Concentración a presión reducida, V.t.v.v. F16= Fracción No. 16 (activa).



## b) Extracción

Los frutos ya secos a temperatura ambiente fueron molidos en un mortero de porcelana pesando 94.4gr. y extraídos como se muestra en la Figura 2. Debido a la cantidad y dureza del fruto la extracción se realizó en un Soxhlet con  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , eliminando el disolvente a presión reducida en un rotavapor y obteniendo de este proceso 7.4gr. de extracto total.

## c) Análisis cromatográfico

La separación se realizó de forma directa por cromatografía en una columna de 8cm. de  $\varnothing$  empacada con gel de sílice para placas y conectada al vacío, el punto de aplicación fue adsorbido en gel de sílice 60: 70-230 Å. Los disolventes se adicionaron de menor a mayor polaridad iniciando con  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  hasta  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  al 100%. Las fracciones fueron obtenidas cada 150mL, separando por afinidad química 18, mediante cromatografías en capa delgada. La evaluación biológica se realizó en los tres bioensayos estándar.

## d) Tratamientos activos

Únicamente la fracción No.16 (V.t.v.v. F16) fue activa como se muestra en la Tabla No. 7 del apartado de resultados, la cual fue considerada para la prueba de actividad antialimentaria.

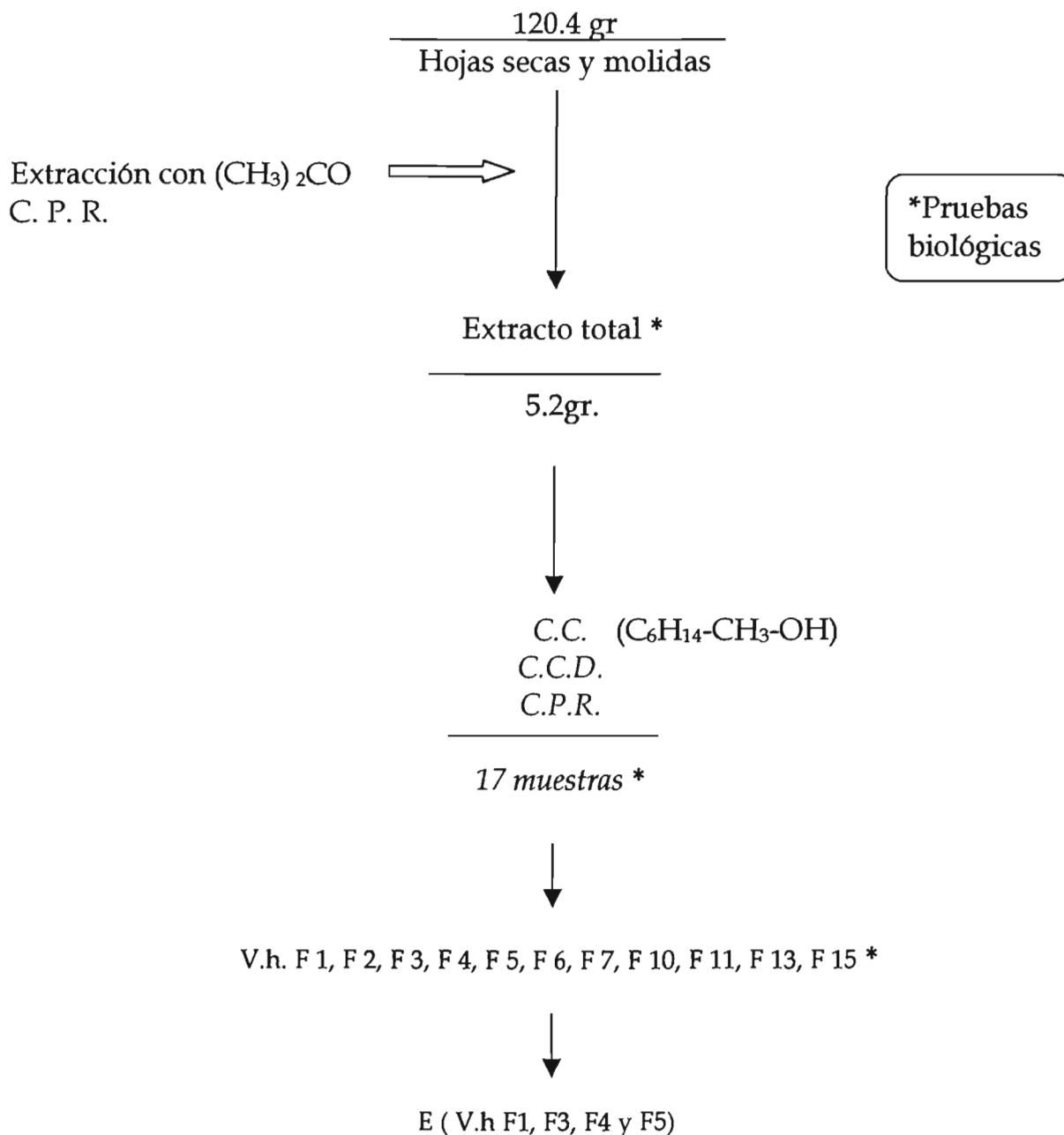
### 5.2.3 *Vitex hemsleyi* (hojas)

#### a) Material Vegetal

Árbol de aproximadamente 6m de alto con hojas pecioladas, envés convexo y puberulento, ápice agudo, margen entero y base aguda. Se recolectaron tallos y hojas representativos de la población en Huautla, Morelos (Mpio. de Tlaquiltenango) el 17 de Octubre de 1998 a cargo del Dr. Eduardo Aranda. Las hojas fueron extendidas al ambiente hasta sequedad, molidas, pesadas y extraídas como se indica a continuación.



**Figura 3. Diagrama de trabajo para *Vitex hemsleyi***



CLAVES: C.C.= Cromatografía en columna, C.C.D.= Cromatografía en capa delgada, C.P.R.= Concent. a presión reducida, V.h. F 1 - F 15 = Fracciones de la No.1 a la 15 (activas), E.= Espectroscopias



### b) Extracción

La extracción se realizó con 120.4gr. de material vegetal macerado en un matr az de vidrio con 3L de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  durante tres días, posteriormente se filtró y concentró a presión reducida en un rotavapor obteniendo de este proceso 5.2gr de producto con actividad biológica. En una segunda extracción con  $\text{CH}_3\text{-OH} + 5\%$  de  $\text{H}_2\text{O}$  se obtuvieron 10.09gr. de extracto el cual no present  actividad biológica.

### c) Análisis cromatográfico

Por su actividad el extracto acetónico fue separado directamente por cromatografía en una columna de 5cm. de  $\varnothing$  empacada con gel de sílice para placas. Los eluyentes fueron mezclas de menor a mayor polaridad desde  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  hasta  $\text{CH}_3\text{COOEt}$  al 100%, llegando a  $\text{CH}_3\text{-OH}$  pura y  $\text{CH}_3\text{-OH} + 5\%$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; el lavado final se realizó con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Las fracciones fueron recolectadas cada 150mL con vacío y evaporadas a sequedad mientras que las acuosas se evaporaron con una bomba de alto vacío. Finalmente por cromatografía en capa delgada se aislaron 17 fracciones que fueron probadas biológicamente.

### d) Tratamientos activos

Esta especie vegetal present  varios tratamientos activos que se señalan en los resultados (Tablas 9 y 10).

## 5.3 Pruebas de actividad biológica

En el presente estudio los bioensayos preliminares se realizaron con tres pruebas, una para determinar la toxicidad de los extractos vegetales con larvas de primer estadio de *Artemia salina* (crustáceo) y dos para evaluar la acción insecticida con larvas de primer estadio de *Epilachna varivestis* (coleóptero) y *Spodoptera frugiperda* (lepidóptero).

El criterio para determinar la presencia de actividad fue: presentar un porcentaje de mortalidad acumulada mayor al 60% y por ende una  $\text{CL}_{50}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  baja. Con base en lo anterior fueron seleccionados aquellos tratamientos activos en la fase preliminar, para continuar con su evaluación enfocada hacia la búsqueda del efecto antialimentario, porcentaje de pupación y proporción de sexos en el ciclo biológico de *S. frugiperda*.

Para dicha prueba, cabe señalar que en los insectos el término "larva" se refiere a diversas formas inmaduras. En la especie *S. frugiperda* se presentan 6 estadios larvarios,



donde solo los dos primeros estadios estuvieron alimentados con los extractos aplicados en la superficie de la dieta y los cuatro restantes con la dieta libre de compuestos.

Sin embargo en cada estadio se cuantificó el peso y la talla de las larvas, se evaluó el porcentaje de mortalidad y las alteraciones en su desarrollo, principalmente en el estadio de pupa. El término "pupa" se refiere al estado entre larva y adulto caracterizado por que la larva está recubierta por una capa engrosada de color oscuro y no se alimenta (Fig. 4), en este estadio también se calculó el porcentaje de pupación y la proporción de sexos; el sexo se leyó en el tercer segmento abdominal con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Stehr, 1987).

Cabe destacar que en cada prueba se establecieron siembras testigo, las cuales no rebasaron el 20% de mortalidad, lo que asegura que en los resultados el porcentaje de mortalidad correspondió únicamente al efecto causado por los extractos. Así mismo la metodología utilizada en esta prueba fue la establecida por el laboratorio de control biológico del CIB (Centro de Investigación Biotecnológica) de la UAEM-Cuernavaca<sup>15</sup> (Busvine, 1971 citado por Lagunes y Vázquez, 1994).

Por otra parte, el vehículo que se estableció para diluir los extractos fue la  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , debido a su alta volatilidad, facilidad de adquisición y capacidad para disolver a la mayoría de los compuestos. La Sociedad Americana de Entomología (ESA, por sus siglas en inglés) recomienda precisamente su uso como disolvente universal para las pruebas biológicas (Lagunes y Vázquez, 1994).

Con referencia a la solubilidad de los extractos en agua para la prueba biológica con *A. salina*, la mayoría de las fracciones separadas requirieron el uso de DMSO (dimetilsulfóxido) como codisolvente o surfactante, para lo cual se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  por vial aún en el control, con base en que las larvas de crustáceos pueden tolerar arriba del 11% de DMSO (Steven and Russell, 1993).

Las larvas de *E. varivestis* y *S. frugiperda* utilizadas en los bioensayos fueron procedentes del insectario del CIB, mantenidas bajo condiciones ambientales controladas (Temperatura, Humedad, Foto periodo y Ventilación), lugar donde fueron realizadas las pruebas biológicas bajo la dirección del Dr. Eduardo Aranda (Aranda, *et al.* 1996).

---

<sup>15</sup> McLaughlin en 1988, reportó que la prueba con *Artemia salina* podía ser extendida como estándar para descubrir sustancias nuevas, útiles, o prototipos de compuestos bioactivos naturales por ser rápida y confiable. Así mismo el Dr. Eduardo Aranda en 1996, estableció entre otros el cultivo de *E. varivestis* y *S. frugiperda* como pruebas de actividad insecticida y antialimentaria debidamente estandarizadas (Aranda, *et al.* 1996)..



### 5.3.1 *Artemia salina* Leach (crustáceo)

#### a) Preparación de las muestras

En las fracciones con extractos completos se trabajò con 20mg y en el caso de compuestos puros con 10mg, en ambos casos fueron aforados a 2mL con  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  o mezclas  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  según la disolución del producto; solo en el caso de las fracciones muy polares se aplicó  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  + 5% de  $\text{CH}_3\text{-OH}$  debido a su alta toxicidad (Meyer, *et al.* 1982).

#### b) Bioensayo

Una vez diluídos los extractos se tomaron alícuotas de 500, 50 y 5 $\mu\text{L}$  por triplicado respectivamente. A cada concentración así como al control se le colocaron 10 larvas de *A. salina* cosechadas con una pipeta Pasteur (1mm. , de  $\emptyset$ ). Finalmente se aforaron a 5mL con medio salino para obtener una concentración final de 1000, 100 y 10 ppm (Meyer, *et al.* 1982).

Las larvas fueron eclosionadas en un recipiente con dos divisiones, pero conectados en el fondo; el cual se lleno de agua de mar sintética. En una división se colocaron los huevecillos y se cubrió con papel aluminio, el recipiente fue colocado bajo un foco de 20 wats (cerca de 25°C) por 48h; así los nauplios eclosionados por su fototropismo positivo, se trasladaron al compartimento destapado, donde se recolectaron.

Durante los bioensayos el porcentaje de mortalidad se cuantificó después de permanecer expuestos a los extractos por 24h, mediante un microscópio estereoscópico. La mortalidad se consideró como la ausencia total de movimiento en los apéndices u otro signo vital mostrado. Los organismos vivos fueron cuantificados, luego se adicionó  $\text{CH}_3\text{-OH}$  durante 5min. para facilitar el conteo del total de organismos y así obtener el porcentaje de los que respondieron al tratamiento.

### 5.3.2 *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (lepidoptero)

#### a) Preparación de las muestras

Se utilizaron 10mg de cada extracto, colocados en viales donde se adicionó 1mL de  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , como solución stock. De estas se tomaron alícuotas correspondientes a 100, 200 y 400ppm, dejando evaporar. Posteriormente, a cada vial se le agregaron 20 $\mu\text{l}$  de



DMSO y agua destilada, hasta su disolución con ultrasonido y/o calor; aforando a 1mL de volumen final.

#### b) Bioensayo

El alimento de las larvas fue una dieta artificial de tipo oligídica (merídica según algunos autores), es decir está compuesta por elementos de diferente naturaleza, modificada por Minh (1984)<sup>16</sup>. Para la preparación, se mezclaron todos los componentes y fueron disueltos bajo calor moderado, vaciado inmediatamente en placas de poliestireno (con 24 pozos de 2.4cm de diámetro marca Corning Cell Wells, No.25820), aproximadamente 3mL en cada pozo, dejando gelificar.

Durante el bioensayo cada muestra preparada a 100, 200 y 400 ppm de concentración, fue adicionada cada 35µL por pozo de una placa con dieta. Es decir se trabajó con una placa por concentración, cada dosis fue distribuída homogéneamente por toda la superficie de la dieta; dejando evaporar bajo una campana de flujo laminar. Se establecieron también dos controles (con disolvente sin muestra) y un blanco (sin nada).

Las larvas con 24h de eclosión fueron colocadas de 2 en 2 por cada pozo con la ayuda de un pincel fino (#00), al final la placa se cubrió con una película auto adherente (Kleen Pack) para evitar el escape de las larvas, perforando finamente como respiraderos. Las placas fueron apiladas y sujetas para su incubación por 7 días a 24°C, al cabo de los cuáles se cuantificó el porcentaje de mortalidad.

### 5.3.3 *Epilachna varivestis* Mulsant (coleóptero)

#### a) Preparación de las muestras

Se trabajó con 10mg de cada extracto en viales, donde se agregó 1mL de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO como solución stock, de ahí fueron tomadas alícuotas correspondientes para concentraciones de 20 y 200ppm. Se dejaron evaporar para adicionar 5µL de Tween 80 (adherente o dispersante) y 20µL de DMSO, aforando a 20mL con agua destilada.

Los controles se establecieron dos como positivos y 2 como negativos por cada bioensayo, dentro de los controles positivos uno fue químico a partir de un

---

<sup>16</sup> Este tipo de dieta consiste principalmente en el uso de materiales naturales crudos y otros elementos de origen vegetal o animal con características nutricionales y no nutricionales, fácilmente asequibles y baratos que ayudan a producir insectos de calidad aceptable; relativamente es de fácil elaboración y conservación (Singh, 1977; Mihm, 1987; y Bautista, et al. 1994)..



organofosforado a 1ppm (Fosdrim comercial al 90%), preparado con 3 $\mu$ L por cada 10mL y el otro fue orgánico a partir del extracto hexánico de semillas de *Anona muricata*. Los dos controles negativos, se prepararon con los disolventes sin muestra; así mismo se incluyeron 2 testigos a los que se agregó únicamente agua destilada.

#### b) Bioensayo

En cajas petri se agregaron 10mL de agar (15gr/L) hasta solidificar, colocando encima 2 discos de papel secante del mismo diámetro para absorber el exceso de humedad. Las hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) recién cortadas, se sumergieron en las soluciones preparadas con los extractos a cada concentración (20 y 200 ppm) señalada durante 20s agitando constantemente, realizando dicho procedimiento por duplicado.

Sobre una charola con papel se extendieron las hojas bañadas con los extractos bajo una campana de flujo laminar, ya secas se colocaron de 2 en 2 por caja petri previamente etiquetadas, posteriormente se pusieron 10 larvas de 2hrs de eclosión y se incubaron a 26°C durante 7 días reportando la toxicidad con base en el porcentaje de mortalidad presentado.

### 5.3.4 Actividad Antialimentaria en *S. frugiperda*

#### a) Preparación de las muestras

La metodología realizada fue la reportada para los bioensayos de actividad insecticida, pero a las siguientes concentraciones: 100, 300 y 600ppm a fin de ampliar el rango del efecto registrado en la fase preliminar.

#### b) Bioensayo

Así mismo para la realización del presente bioensayo se mantuvo el mismo criterio descrito en la fase de actividad insecticida, salvo que luego de los primeros 7 días de tratamiento, se cuantificó el porcentaje de mortalidad acumulada de las larvas. También se dejó una larva por pozo, substituyendo las muertas. De tal forma que se evaluó todo el ciclo cada 7 días, registrando los datos de peso y talla, específicamente a 6 de las 24 por concentración previamente seleccionadas completamente al azar.

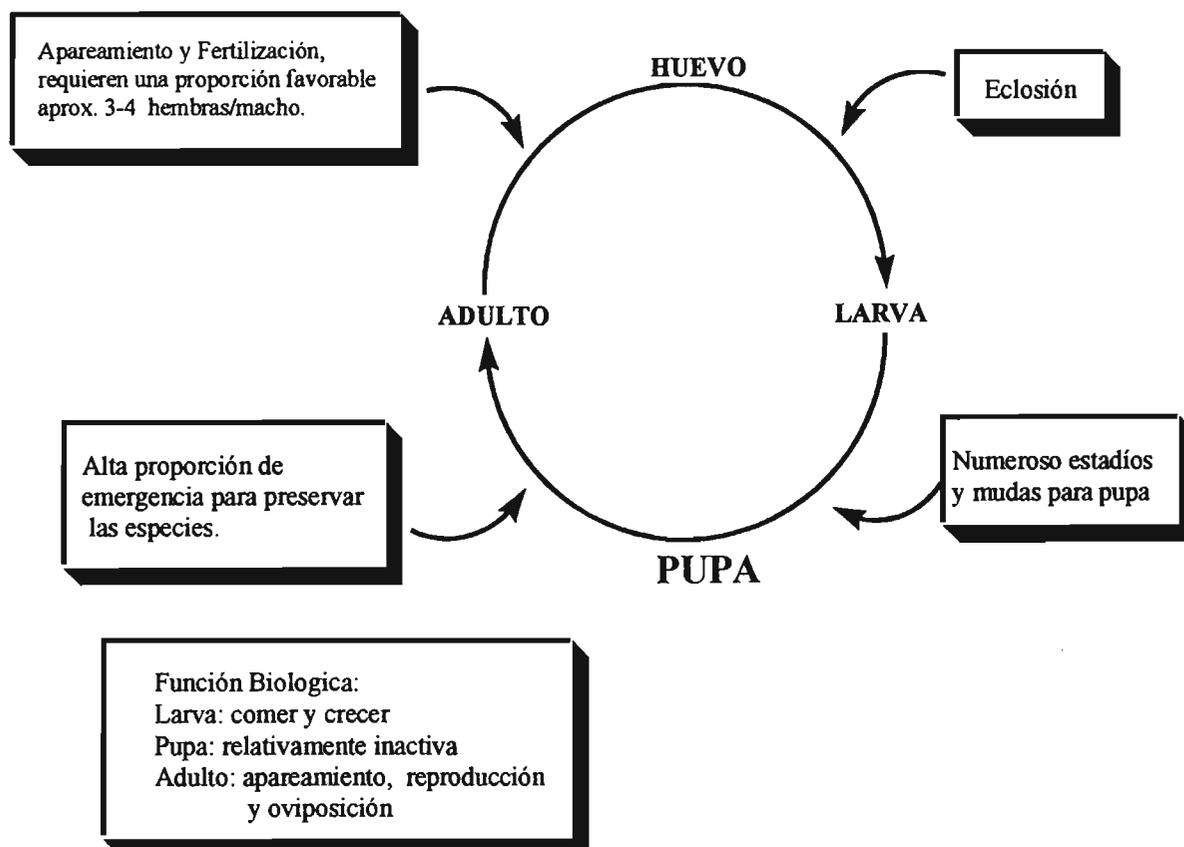
A partir de lo anterior se generaron 4 registros por concentración de peso y talla a diferentes tiempos, así como el porcentaje de pupación y la proporción de sexos de larvas



vivas y sanas (Fig. 4). El peso(mg) se registró en una balanza analítica y la talla(mm) se midió con papel milimétrico.

Así mismo cabe mencionar, que a partir de la segunda semana de crecimiento, se colocaron cada 3 larvas en recipientes de plástico desechable mas grandes, previamente etiquetados con dieta libre de tratamiento para su crecimiento y pupación. A dicho nivel de prueba se observó en algunos casos canibalismo, lo que redujo el porcentaje de pupación; se observaron también pupas con malformaciones. Todos los organismos al final del estudio se sacrificaron para prevenir riesgos. Es importante mencionar que para cada bioensayo se estableció un control y un testigo.

Figura 4. *Ciclo de vida de los lepidópteros*



Esquivel, et al. 1992



## 5.4 Análisis estadístico

Los bioensayos toxicológicos preliminares con *A. salina*, y de actividad insecticida con *S. frugiperda* y *E. varivestis* fueron de respuesta rápida, reproducible y cualitativa del “todo o nada”, en los que se estimó el porcentaje de mortalidad, reportado en tablas de frecuencia acumulada; donde se midió la relación estímulo-respuesta para determinar la concentración letal media  $CL_{50}$ . La probabilidad fue del 95%, con base en el método de “Análisis Probit” estandarizado por Finney (Finney, 1971; Infante y Calderón, 1980).

A partir de lo cual los tratamientos que presentaron actividad positiva se probaron en el bioensayo de actividad antialimentaria, la cual es de tipo cuantitativo a partir del registro del peso y la talla a diferentes estadios, los registros fueron cada 7 días, finalizando el ciclo con cuatro tomas.

El diseño estadístico se planteó con base en variables independientes: tiempo (T1, T2, T3 y T4) tratamiento (13 extractos activos) y concentración (100, 300 y 600ppm); el tiempo se consideró desde la perspectiva de la acumulación del efecto.

Es importante decir que la selección de 6 larvas fue completamente al azar a partir de un total de 24 en cada concentración las cuales se midieron y pesaron (Reyes, 1984).

La interacción entre las variables independientes se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA factorial involucrando a todas las variables y sus niveles de prueba, posteriormente un ANOVA simple para cada variable de forma independiente; en las interacciones con significancia se aplicó una prueba POST HOC conocida como prueba de Tukey MCMM (Método de Comparación Múltiple de Medias) para ubicar el nivel al que el tratamiento fue activo.

En este caso los tratamientos activos se reportan ampliamente en el apartado de resultados, junto con su caracterización estructural por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente estudio se trabajó con cinco especies vegetales mediante un enfoque biodirigido, hacia la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad insecticida y antialimentaria.

De la familia Labiatae se maceraron: *Vitex mollis* (hojas y tallos), *V. trifolia* var. *subtriceps* (hojas, tallos y fruto), *V. trifolia* var. *variegata* (tallos y fruto) y *V. hemsleyi* (hojas y tallos) con  $\text{CH}_2\text{COOEt}$ ; los frutos con  $\text{CH}_3\text{-OH}$ . De la familia Verbenaceae: *Lantana camara* (hojas) con  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ .

Los extractos obtenidos de estas especies se probaron biológicamente de manera preliminar en *Artemia salina*, *Epilachana varivestis* y *Spodoptera frugiperda*<sup>17</sup>, como se reporta en la metodología. La forma fue indirecta, es decir se manejaron concentraciones y no dosis, ya que no existió la certidumbre de la cantidad exacta disuelta en el medio o alimento, así como la consumida por el organismo.

La respuesta fue de tipo cualitativa del todo o nada, durante el tiempo de exposición; evaluando así la ausencia total de movimiento para calcular el porcentaje de mortalidad. Dicho porcentaje es la expresión cuantitativa de la "dosis letal media" (DL50), la cual indica la tolerancia de un organismo en particular a un insecticida, bajo ciertas condiciones experimentales y representa la dosis necesaria para matar el 50% de los individuos, expresado así con fines estadísticos (Hubert, 1980; citado por Lagunes y Vázquez, 1994).

El porcentaje de mortalidad se reportó de forma acumulada con relación a los individuos tratados y los que respondieron al tratamiento, considerando como activas a aquellas fracciones con una mortalidad acumulada mayor al 60% y una concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) baja<sup>18</sup>, menor a  $1000\mu\text{g}/\text{mL}$  (Finney, 1971; Hubert, 1980, Lagunes y Vázquez, 1994).

---

<sup>17</sup> Los dos últimos son insectos plaga de importancia económica.

<sup>18</sup> Ver tabla 1 de resultados

Con base en lo anterior fueron seleccionadas para un análisis fitoquímico, biológico y estadístico mas amplio, las especies que a continuación se indican en la Tabla 1 resaltadas con letras oscuras, correspondientes a la suma de tres repeticiones (90 artemias) por concentración para cada tratamiento.

Tabla 1. Mortalidad (%) en *A. salina* con las especies de Labiatae y Verbenaceae

Tratamiento	Concentrac. (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>V. mollis</i>	1000	15	15	31	15	31/46	67.40	
(tallos)	100	13	17	16	32	16/48	33.30	325.98
	10	3	27	3	59	3/62	4.80	
<i>V. trifolia var.</i>	1000	16	14	34	14	34/48	70.80	
<i>variegata</i>	100	14	16	18	34	18/52	34.60	273.79
(tallos)	10	4	26	4	60	4/64	6.25	
<i>V. trifolia var.</i>	1000	21	9	35	9	35/44	79.50	
<i>variegata</i>	100	10	20	14	29	14/43	32.60	212.14
(fruto)	10	4	26	4	55	4/59	6.80	
<i>V. hemsleyi</i>	1000	25	5	36	5	36/41	87.80	
(hojas)	100	8	22	11	27	11/38	28.90	183.08
	10	3	27	3	54	3/57	5.26	
<i>Lantana</i>	1000	11	19	36	19	36/55	65.45	
<i>camara</i>	100	15	15	25	34	25/59	42.37	237.50
(hojas)	10	10	20	10	54	10/64	15.62	

A partir de dichos resultados se realizó el fraccionamiento químico biodirigido de *Lantana camara* (hojas), *V. trifolia var. variegata* (frutos) y *V. hemsleyi* (hojas).

### 6.1 *Lantana camara*

Esta especie fue la única que a la menor concentración (10 ppm) presentó 15.62% de mortalidad, lo que le dió hasta el momento mayor ventaja comparativa.



### 6.1.1 Actividad insecticida

El extracto acetónico de las hojas, registrado como F-001, fue separado como se indica en la Fig.1 de metodología, a partir del cual las fracciones resultantes (F-002, F-004 y F-005) se probaron en *A. salina*, donde la F-002(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) resultó activa (Tabla 2).

Tabla 2. Mortalidad (%) en *A.salina* con la fase F-002 de *Lantana camara*

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL <sub>50</sub> µg/mL
<i>Fase</i> C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> (1:1)	1000	14	16	41	16	41/57	71.93	
(F-002)	100	13	17	27	33	27/60	45.00	142.99
	10	14	16	14	49	14/63	22.22	

Dicha fracción fue separada más finamente a través de una cromatografía relámpago, probando las muestras resultantes tanto en *A. salina* como en *E. varivestis* y *S. frugiperda* de modo indirecto. Donde únicamente la fracción (L.c. F20) fue activa para *Artemia salina*, con un 65.11% de mortalidad acumulada a 100ppm y una CL<sub>50</sub> de 428.21 µg/mL, mientras que en *Epilachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda* no fue significativa (Tabla 3).

Tabla 3. Mortalidad (%) de la fracción Lc F 20 de *Lantana camara* en *A. salina*

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL <sub>50</sub> µg/mL
<i>Lantana camara</i>	1000	15	15	28	15	28/43	65.11	
F 20	100	6	24	13	39	13/52	25.00	428.21
	10	7	23	7	62	7/69	10.14	

El resultado anterior demostró que quizá por sus características fisiológicas, dicho organismo fue más sensible a la presencia de uno o varios compuestos químicos presentes en esta fracción; de ahí que compuestos que son disuasivos para un insecto u organismo pueden actuar como estimulantes para otros y viceversa (Fowden and Peter, 1984).



Por ello y con base en los resultados anteriores, se sugiere hacer correlaciones estadísticas previas: organismo-compuesto-concentración, con el fin de comprender mejor la acción química que ejercen los metabolitos y su concentración sobre los diferentes sistemas biológicos de prueba a evaluar.

Posteriormente, se continuó con la separación de la fracción LcF20 mediante una cromatografía relámpago, de la cual se obtuvieron 22 compuestos puros. Dichos compuestos fueron probados biológicamente, sin presentar actividad positiva en ningún sistema. Quizá porque son compuestos sinérgicos y separados perdieron su actividad o bien fueron lábiles al ambiente (Still, *et al.* 1978).

Por ello, para evaluar el efecto antialimentario en *S. frugiperda* se trabajó con la muestra LcF20 completa sin fraccionar. Las variables dependientes fueron peso y talla, mientras que las independientes fueron tiempo, tratamiento y concentración, como se detalla en la metodología.

Cabe señalar que los datos de peso y talla fueron medidos cada 7 días en cuatro tomas, a partir de 6 larvas seleccionadas completamente al azar de un total de 24 por cada concentración (100, 300 y 600ppm), es decir fueron 72 datos experimentales (ver anexo # 2 y 3).

El análisis estadístico de dichos datos permitió contrastar la Ht (hipótesis de trabajo) planteada contra la Ho (hipótesis nula) ya que, el análisis de varianza y la prueba de Tukey señalaron diferencias significativas causadas por efecto de las variables independientes y no debidas al azar, por lo que la Ho se rechazó.

El análisis de varianza ANOVA se realizó factorial y simple, el primero permitió apreciar la significancia del tiempo, tratamiento y concentración con relación al peso y la talla (ver tabla 4 y 5).

Tabla 4. Resultados del análisis ANOVA factorial y simple para peso

Variables	A	B	C
Factores			
A	0.000*	0.000*	0.257
B		0.000*	0.000*
C			0.000*
factorial			ABC*



Tabla 5. Resultados del análisis ANOVA factorial y simple para talla

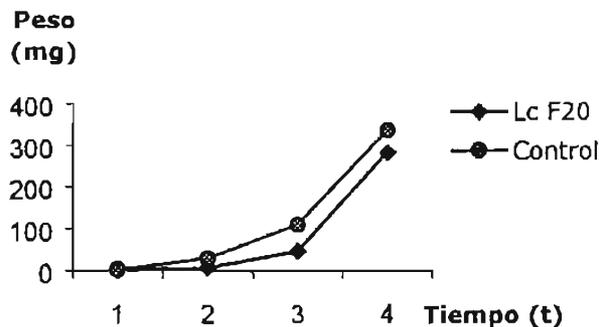
Variables		A	B	C
Factores				
A		0.000*	0.000*	0.000*
B			0.000*	0.810
C				0.350
factorial		ABC*		

Donde: A=Tiempo, B=Tratamiento, C=Concentración, ABC=Interacción de las tres variables independientes; (\*) representa la significancia al 0.050 de probabilidad.

El ANOVA simple por su parte mostró que para el peso, fueron significativos tiempo contra tiempo y tratamiento; el tratamiento fue significativo contra tratamiento y concentración, esta última solo resultó significativa contra sí misma. En la talla, el tiempo fue significativo contra todas las variables, el tratamiento solo contra tratamiento y la concentración no fue significativa en ningún caso.

Por otra parte se aplicó una prueba POST HOC conocida como prueba de Tukey MCMM (Método de Comparación Múltiple de Medias) que determinó el nivel al que cada una de las variables independientes fueron significativas.

Para el peso (mg) la variable tiempo(t) presentó una  $P < 0.050$ , ya que los pesos promedio variaron en cada toma con una diferencia significativa entre ellos, en parte debido al propio crecimiento de las larvas como sigue:  $t_1=0.35\text{mg}$ ,  $t_2=6.12\text{mg}$ ,  $t_3=45.23\text{mg}$  y  $t_4=281.6\text{mg}$  (Fig.4).

Fig.5 Registro del peso a diferentes tiempos con *L. camara* (Lc F20)

Con respecto al tratamiento podría pensarse en un efecto positivo ya que los pesos fueron menores que el control, sin embargo estadísticamente la diferencia no fue significativa. La variable concentración presentó una  $P > 0.050$  la cual indica que su efecto fue negativo, por ende las diferencias entre los pesos registrados no fueron significativas.

Para la talla (mm) el tiempo fue significativo con una  $P < 0.050$  donde los promedios fueron en el  $t_1=3\text{mm}$ ,  $t_2=7.4\text{mm}$ ,  $t_3=14.9\text{mm}$  y  $t_4=27.6\text{mm}$  (Fig 5). La variable tratamiento no presentó diferencias significativas, de hecho se mantuvo cerca del control. La concentración por su parte tampoco fue significativa en ningún caso  $P > 0.050$ .

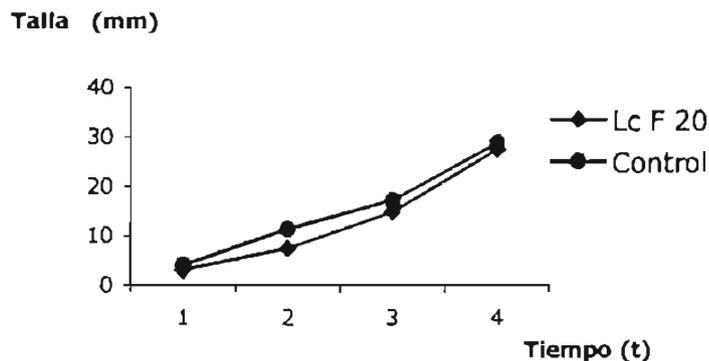


Fig. 6 Registro de la talla a diferentes tiempos con *L. camara* (Lc F20)

Los aspectos correspondientes al porcentaje de pupación y proporción de sexos se evaluaron con individuos sin alteraciones de un total de 24 como el 100% (Tabla 6). El primero en general fue bajo, ya que hubo una alta mortalidad en larvas, prepupas y pupas deformes (tecas incompletas, torax prominente) en especial a 600 ppm de concentración (Tabla 6).

Con respecto a la proporción de sexos varió según la concentración, pero en total fueron 9 machos por 8 hembras. En el campo siempre se guarda una relación mayor de hembras que de machos con una diferencia de al menos 5 individuos. Por lo que en este caso se puede decir que a bajas concentraciones se inhibió la diferenciación hacia hembras.

Tabla 6. Población de *S. frugiperda* expuesta al tratamiento (Lc F20) de *Lantana camara*

Tratamiento	Concentración ppm	No. Individuos	Pupación		Proporción sexos	
			♀	♂	♀ /	♂
<i>Lantana camara</i>	600	24	8.33	4.17	2	: 1
F20	300	24	20.83	20.83	1	: 1
	100	24	20.83	29.17	5	: 7

## 6.2 *Vitex trifolia* var. *variegata*:

### 6.2.1 Actividad insecticida

Con el extracto acetónico del fruto de esta especie se obtuvieron de modo directo 18 fracciones químicas (ver metodología Fig. 2), las cuáles fueron probadas biológicamente en *A. salina* y los insectos *E. varivestis* y *S. frugiperda*. Considerando como activa a la fracción V.t.v.v.F16 (*Vitex trifolia* var. *variegata* F16) hacia *S. frugiperda* (Tabla7), ya que presentó un 61.11% de mortalidad a 400ppm con una CL<sub>50</sub> de 322µg/mL y las fracciones F11, F15 y F18 estuvieron cercanas al 60%.

Tabla 7. Mortalidad (%) en *S. frugiperda* con algunas fracciones del extracto acetónico

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL <sub>50</sub> µg/mL	
<i>Vitex trifolia</i> var. <i>variegata</i>	F11	400	7	17	20	17	20/37	54.05	362.38
		200	7	17	13	34	13/47	27.70	
		100	6	18	6	52	6/58	10.34	
	F15	400	8	16	18	16	18/34	52.94	372.51
		200	7	17	10	33	10/43	23.26	
		100	3	21	3	54	3/57	5.26	
	F16	400	10	14	22	14	22/36	61.11	322.21
		200	6	18	12	32	12/44	27.30	
		100	6	18	6	50	6/56	10.71	
F18	400	5	19	20	19	20/39	51.38	350.37	
	200	13	11	15	30	15/45	33.30		
	100	2	22	2	52	2/54	3.70		



Con la fracción activa antes señalada se realizó la prueba de actividad antialimentaria a 600, 300 y 100ppm durante el ciclo biológico de *S. frugiperda*. Donde las variables dependientes fueron peso y talla, las cuáles se midieron a partir de 6 de 24 larvas tomadas al azar, cada 7 días por 4 veces (ver Anexo 4 y 5). Con dichos datos se realizó el análisis estadístico ANOVA factorial y simple. Resultando una interacción significativa entre las variables independientes (tiempo, tratamiento y concentración) sobre las dependientes (Tablas 4 y 5).

La prueba de Tukey reportó para el peso(mg) promedio una  $P < 0.05$  de significancia con las variables tiempo y tratamiento, la concentración no fue significativa (Fig. 6). Así, todos los pesos promedio  $t_1=0.42\text{mg}$ ,  $t_2=5.8\text{mg}$ ,  $t_3=34\text{mg}$  y  $t_4=249.9\text{mg}$  fueron menores al control.

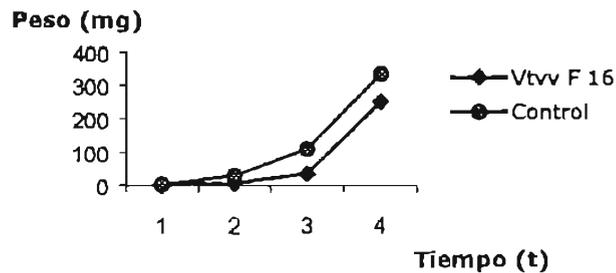


Fig. 7 Registro del peso a diferentes tiempos con *V.t.v.variegata* (Vtvv F16)

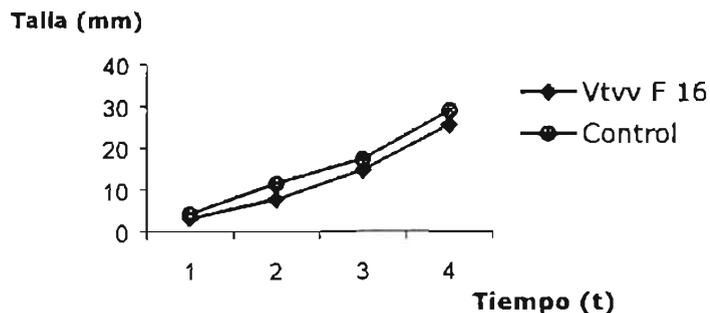


Fig. 8 Registro de la talla a diferentes tiempos con *V.t.v.variegata* (Vtvv F16)



La prueba de Tukey para la talla señaló una  $P < 0.05$  solo con la variable tiempo, ya que los valores promedio de cada tiempo fueron significativamente diferentes entre sí como sigue:  $t_1=3\text{mm}$ ,  $t_2=7.6$ ,  $t_3=14.6$  y  $t_4=25.4\text{mm}$ . Con respecto al control no hubo diferencias significativas de ninguna de las variables tiempo, concentración ni tratamiento.

Por otro lado, cabe mencionar que Hosozawa, *et al.* en 1974 reportaron que las semillas de *Vitex trifolia var. variegata* fueron activas contra larvas de *Spodoptera litura*. Heraso por su parte en 1988 realizó bioensayos a partir del extracto de las hojas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y encontró que a  $0.1\text{mg}/\text{cm}^2$  no fue letal para las larvas de *S. frugiperda* solo redujo el peso y la talla de las mismas. En otro caso, Hernández, *et al.* en 1998 reportaron que los extractos de las hojas hexánico y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de esta misma especie vegetal, mostraron actividad relevante como antialimentarios contra *S. frugiperda*.

Sin embargo, del fruto de esta especie que es considerado un órgano que necesita protección química contra sus consumidores no se encontraron reportes de algún tipo de actividad, por ello el presente estudio se considera una aportación al respecto. Encontrando que del extracto acetónico la fracción F16 presentó actividad insecticida contra *A. salina* y antialimentaria contra *S. frugiperda*.

Con respecto a los porcentajes de pupación y proporción de sexos fueron bajos debido a una alta mortalidad y deformaciones (tecas incompletas) presentadas en larvas de tercer estadio y pupas, quizá porque en esos estadios fueron mas vulnerables a los compuestos presentes en la fracción o bien por el tiempo de exposición (Tabla 8), la concentración etc. ya que a 600ppm se observaron gran número de deformaciones.

Tabla 8. Población de *S. frugiperda* aplicando la F16 del extracto *Vitex t. var. variegata*

Tratamiento	Concentración ppm	No. Individuos	%		Pupación		Proporción sexos	
			♀	♂	♀	♂	♀ / ♂	
<i>Vitex trifolia</i> <i>var. variegata</i>	600	24	8.33	12.5	2	:	3	
F16	300	24	16.67	33.34	4	:	8	
	100	24	16.67	25	4	:	6	
TOTAL		72	41.67	70.84	10 : 17			



La proporción de sexos en la población sobreviviente fue de 17 machos por 10 hembras, contrario a lo que sucede en campo, ya sea por una diferenciación preferencial hacia los machos o bien porque las hembras fueron más susceptibles.

### 6.3 *Vitex hemsleyi*:

#### 6.3.1 Actividad insecticida:

A partir del extracto de las hojas secas obtenido con  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  y con  $\text{CH}_3\text{-OH} + 5\% \text{H}_2\text{O}$  en una segunda extracción, como se refiere en la metodología (Fig. 3), se reportan los siguientes resultados.

En el bioensayo preliminar con *A. salina* el extracto acetónico fue activo, por lo que se procedió a su separación cromatográfica, de la cual se obtuvieron 17 fracciones que fueron probadas en los tres sistemas biológicos establecidos.

En *A. salina* la fracción (V.h. F1) se consideró activa (Tabla 9) con una mortalidad acumulada de 70% a 1000ppm. La CL<sub>50</sub> no pudo calcularla el análisis probit debido que a 100 y 10 ppm la mortalidad fue de cero y las concentraciones no convergieron.

Tabla 9. Mortalidad (%) en *A. salina* con la fracción F1 del extracto acetónico

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL <sub>50</sub> µg/mL
F1	1000	21	9	21	9	21/30	70.00	
	100	0	30	0	39	0/39	0	N.C.
	10	0	30	0	69	0/69	0	

N.C. = No convergen

En el bioensayo con *E. varivestis* no hubo fracciones activas, mientras que para *S. frugiperda* los resultados fueron mas representativos (Tabla 10), las fracciones Vh F2, F3, F4, F5, F6 y F13 resultaron activas, mientras que las fracciones Vh F7, F10, F11 y F15 aún cuando no alcanzaron el 60% de mortalidad en *S. frugiperda*, fueron consideradas al realizar la prueba de actividad antialimentaria; con el fin de tener un sondeo completo de los compuestos aislados a partir de esta especie.

Cabe destacar que únicamente se reportó el porcentaje de mortalidad sin llegar a investigar el sitio de acción en el sistema biológico y su relación con la estructura química y concentración de los metabolitos secundarios (1000, 100 y 10 en *A. salina*, 20 y



200ppm con *E. varivestis*, y finalmente 100, 200 y 400 ppm para *S. frugiperda*), ya que las pruebas están debidamente estandarizadas para los fines del presente estudio.

Tabla 10. Mortalidad (%) en *S. frugiperda* con las fracciones activas del extracto acetónico

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL50 $\mu\text{g/mL}$	
<i>Vitex hemsleyi</i>	F2	400	8	16	24	16	24/40	60.00	309.40
		200	8	16	16	32	16/48	33.33	
		100	8	16	8	48	8/56	14.28	
	F3	400	23	25	78	25	76/101	75.24	192.16
		200	34	14	53	39	53/92	57.60	
		100	19	29	19	68	19/87	21.83	
	F4	400	16	32	70	32	70/102	68.62	210.32
		200	28	20	54	52	54/106	50.94	
		100	26	22	26	74	26/100	26.00	
	F5	400	21	27	72	27	72/99	72.72	200.00
		200	24	24	51	51	51/102	50.00	
		100	27	21	27	72	27/99	27.27	
	F6	400	24	24	85	24	85/109	77.98	156.48
		200	29	19	61	43	61/104	58.65	
		100	32	16	32	59	32/91	35.16	
F7	400	9	15	20	15	20/35	57.14	351.12	
	200	3	15	11	30	11/41	26.83		
	100	8	15	8	45	8/53	15.09		
F10	400	8	16	20	16	20/36	55.55	353.16	
	200	7	17	12	33	12/45	26.67		
	100	5	19	5	52	5/57	8.77		
F11	400	8	16	19	16	19/35	54.28	382.86	
	200	4	20	11	36	11/47	23.40		
	100	7	17	7	53	7/60	11.66		
F13	400	9	15	24	15	24/39	61.54	302.47	
	200	9	15	15	30	15/45	33.33		
	100	6	18	6	48	6/54	11.11		
F15	400	9	15	19	15	19/34	55.88	365.10	
	200	5	19	10	34	10/44	22.73		
	100	5	19	5	53	5/58	8.62		



En la prueba de actividad antialimentaria se evaluaron todas las fracciones de la tabla 10 mas la fracción Vh F1 por su efecto contra *A. salina* que correspondieron a los tratamientos, cada uno se probò a tres concentraciones (100, 300 y 600 ppm) en 24 larvas por concentración, tomando 6 de ellas completamente al azar para su registro de peso y talla y así cuantificar el efecto antialimentario. Se realizaron cuatro registros cada 7 días que correspondieron a la variable tiempo. Los datos se reportan en los anexos # 6 al 13.

La prueba de varianza ANOVA factorial, aplicada a dichos datos indicó que las tres variables independientes (tiempo, tratamiento y concentración) interaccionaron sin diferencia estadística significativa (ver Tablas 4 y 5 de *L. camara*). Por tal motivo se continuò con el análisis ANOVA simple donde tanto el peso como la talla mantuvieron un efecto significativo ejercido por las variables: tiempo de exposición y tratamiento únicamente.

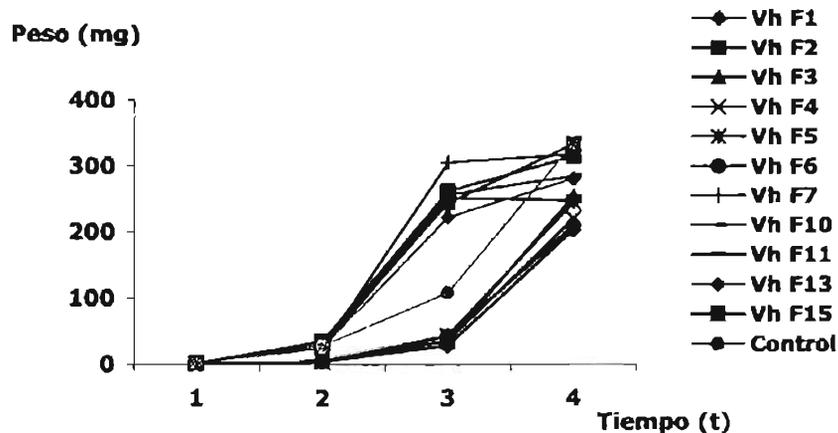


Fig. 9 Registro del peso a diferentes tiempos con 11 fracciones de *V. hemsleyi*

Ambas variables se procesaron mediante una prueba de Tukey que para la variable tiempo identificò diferencias significativas entre la toma ( $t_4$ ) con respecto a las anteriores. En este registro los valores de los pesos promedio fueron mas homogéneos, pero aún cuando se elevaron no rebasaron el valor promedio del control a diferencia del  $t_3$ , donde fueron mas heterogéneos ya que los tratamientos Vh F1, F3, F4, F5, y F6 estuvieron por debajo del control mientras que F2, F7, F10, F11, F13, y F15 por arriba, lo cual señala un efecto antialimentario para el primer caso y una fagoestimulación para el segundo.



Resultò claro que la concentración no fue significativa y cabe señalar que probablemente su efecto quedò enmascarado por el tiempo de exposición, donde el efecto se acumulò hasta causar la muerte de los insectos, lo cual estadísticamente fue mas significativo que la mortalidad provocada por concentraciones sub-letales a corto plazo.

Con referencia a la talla su respuesta fue similar al peso, habiendo un marcado incremento en el  $t_4$  el cual sin embargo fue menor al control; dicho incremento pudo deberse a que las larvas sobrevivientes fueron muy homogéneas. Por lo que sòlo el tiempo presentò una  $P < 0.05$  de significancia. Así mismo el  $t_3$  presentò una divergencia de tratamientos tal como se reportò para el peso y del  $t_1$  al  $t_2$  hubo poca variación (ver Fig. 9).

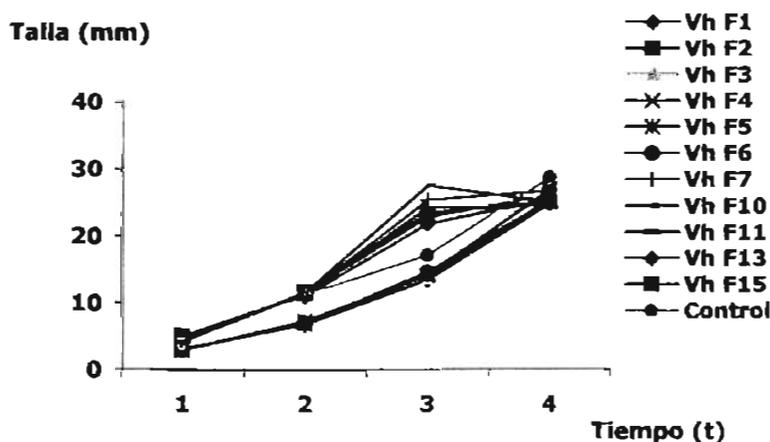


Fig. 10 Registro de la talla a diferentes tiempos con 11 fracciones de *V. hemsleyi*

Con relación al porcentaje de pupación para los tratamientos F1, F2, F5, F6, F7, y F15 fueron bajos principalmente a 600 ppm y con relación a la proporción de sexos hubo 6 hembras por cada 3 machos, excepto en el tratamiento F2. Para los tratamientos F3, F4, F10, F11 y F13 los porcentajes de pupación mas altos se dieron a 600ppm y los menores a 100ppm, con respecto a la proporción de sexos predominaron los machos a 600ppm.

Tabla 11. Resultados de *S. frugiperda* aplicando las fracciones activas de *Vitex hemsleyi*

Tratamiento	Concentración	Individuos No.	% Pupa		% Mortalidad		Proporción sexos ♀ / ♂
	ppm		♀	♂	♀	♂	
F1	600	24	12.5	12.5	0	8.33	1 : 1
	300	24	25	12.5	0	0	6 : 3
	100	24	20.84	20.84	4.17	0	1 : 1
F2	600	24	4.17	25	0	8.33	1 : 6
	300	24	8.33	16.67	4.17	4.17	2 : 4
	100	24	12.5	20.83	8.33	8.33	3 : 5
F3	600	24	12.5	16.67	0	4.17	3 : 4
	300	24	16.67	29.17	4.17	0	4 : 7
	100	24	4.17	4.17	0	0	1 : 1
F4	600	24	25	16.67	4.17	4.17	6 : 4
	300	24	12.5	12.5	0	4.17	1 : 1
	100	24	12.5	16.67	0	0	3 : 4
F5	600	24	4.17	0	0	0	1 : 0
	300	24	12.5	25	0	0	3 : 6
	100	24	20.84	8.33	0	0	5 : 2
F6	600	24	12.5	4.17	4.17	4.17	3 : 1
	300	24	20.83	20.83	0	0	1 : 1
	100	24	33.34	4.17	0	0	8 : 1
F7	600	24	0	4.17	0	4.17	0 : 1
	300	24	16.67	8.33	4.17	8.33	4 : 2
	100	24	12.5	8.33	12.5	4.17	3 : 2
F10	600	24	33.34	16.66	4.17	8.33	8 : 4
	300	24	16.66	20.83	8.33	4.17	4 : 5
	100	24	20.83	12.5	12.5	8.33	5 : 3
F11	600	24	25	4.17	4.17	0	6 : 1
	300	24	16.67	16.67	0	4.17	1 : 1
	100	24	8.33	16.67	0	0	2 : 4
F13	600	24	29.17	4.17	4.17	0	7 : 1
	300	24	12.5	8.33	0	0	3 : 2
	100	24	8.33	8.33	0	0	1 : 1
F15	600	24	0	0	0	0	0 : 0
	300	24	12.5	4.17	4.17	4.17	3 : 1
	100	24	12.5	4.17	4.17	0	3 : 1

En general la mortalidad fue alta en los estadios de larva y prepupa, además en este último se observaron alteraciones morfológicas como protuberancias, tecas incompletas, alas cortas, abdomen deforme, larvas albinas o cutícula hialina básicamente, lo que repercutió en el análisis estadístico ya que solo se consideraron individuos sanos y vivos; por lo que de alguna forma la fracción química fue responsable en algunos casos.

Por otro lado, se descartó que las malformaciones fuesen causadas por el deterioro de la población de insectos en condiciones de laboratorio ya que se mantuvieron bajo factores abióticos (luz, temperatura, viento, humedad) y bióticos (alimento, sin depredación o parasitismo) estables, en continua renovación con líneas silvestres y con cultivos control, eliminando así las pequeñas variaciones encontradas para asegurar una correcta interpretación de resultados (King y Leppla, 1984; Moore, 1984 citado por Bautista, 1994).

Los cuáles con respecto al porcentaje de sobrevivencia de las hembras señalan que fueron los más bajos. En condiciones de campo se reporta que las hembras aún a mayor edad siguen siendo fértiles y produciendo descendencia, pero producen menor número de huevecillos para compensar. Los machos por su parte fueron mas resistentes y así mismo en número mayor las pupas diferenciadas a machos; contrario a lo que ocurre en condiciones naturales.

#### 6.4 Actividad antialimentaria

Los tratamientos activos probados en este bioensayo fueron catorce: el T1 que corresponde a *Vitex hemsleyi* fracción F1(v.h. F1), el T2 (v.h. F5), T3 (v.h. F6), T4 (v.h. F4), T5 a *V. tifolia var. variegata* F16, el T6 (v.h. F3), T7 a *Lantana camara* F20, T8 (v.h. F11), T9 (v.h. F13), T10 (v.h. F10), T11 (v.h. F15), T12 (v.h. F2), T13 (v.h. F7) y el T14 que correspondió al control.

Dichos tratamientos fueron preparados a 600, 300 y 100ppm, tal como se describe en el apartado de material y métodos donde también se reporta la dieta artificial con la que se alimentó a las larvas de *Spodoptera*. Después de 7 días de exponerse al alimento contaminado con los compuestos de cada tratamiento, se leyó el porcentaje de mortalidad acumulada a partir de 6 larvas escogidas al azar de un total de 24 por concentración y se registró su peso y talla, dicho registro se continuó cada semana hasta la pupación con el fin de determinar si hubo efecto antialimentario o no(Tabla 12).



En general se pudo observar que el efecto tóxico reportado inicialmente por los tratamientos disminuyó y por ende los valores de las  $CL_{50}$  aumentaron, mientras que las concentraciones para este bioensayo se establecieron con base en los resultados preliminares. Por otro lado cabe hacer mención de que se trabajó con la primer generación de larvas de adultos recién establecidos en condiciones de laboratorio, ya que por una infestación de hormigas se perdió el cultivo anterior, por ello se infiere que presentaron mayor resistencia a los tratamientos, aunado a la baja de actividad de los productos por efecto del medio ambiente.

Es oportuno señalar que las larvas muertas en la primer semana se repusieron por otras que sobrevivieron durante su evaluación, asegurando con ello que la mortalidad reportada fue debida únicamente al efecto de los compuestos químicos.

Dichos compuestos fueron considerados activos al presentar una  $CL_{50}$  menor a  $1000\mu\text{g}/\text{mL}$  y en el caso de compuestos puros fue menor a  $200\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que dio pauta para considerar que el tratamiento T1 (*Vitex hemsleyi* F1) a los 7 días fue el tratamiento más activo con 61.29% de mortalidad y una  $CL_{50}$  de  $528.77\mu\text{g}/\text{mL}$ , seguido por los tratamientos T6, T4 y T2, que aunque no alcanzaron el 60% de mortalidad, la  $CL_{50}$  que presentaron fue menor a  $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ , los restantes simplemente no fueron activos (Finney, 1971; Russell, *et al.* 1977; Infante, 1980; Anderson, *et al.* 1991).

Tabla 12. Mortalidad (%) presentada en *S. frugiperda* por las fracciones seleccionadas<sup>1</sup>

Tratamiento	Concentración (ppm)	Muertas No.	Vivas No.	Muertas acum.	Vivas acum.	Muertas totales	Mortalidad %	CL50 µg/mL
1	600	12	12	19	12	19/31	61.29	528.77
	300	5	19	7	31	7/38	18.42	
	100	2	22	2	53	2/55	3.64	
2	600	5	19	13	19	13/32	40.63	955.92
	300	4	20	8	39	8/47	17.02	
	100	4	20	4	59	4/63	6.35	
3	600	2	22	9	22	9/31	29.03	1068.54
	300	8	18	7	40	7/47	14.89	
	100	1	23	1	63	1/64	1.56	
4	600	6	18	16	18	16/34	47.06	911.06
	300	2	22	10	40	10/50	20.00	
	100	8	16	8	66	8/64	12.50	
5	600	4	20	12	20	12/32	37.30	1583.16
	300	1	23	8	43	8/51	15.69	
	100	7	17	7	60	7/67	10.45	
6	600	4	20	21	20	21/41	51.22	537.68
	300	10	8	17	28	17/45	37.78	
	100	7	17	7	45	7/52	13.46	
7	600	2	22	5	22	5/27	18.52	N.C.
	300	2	22	3	44	3/47	6.38	
	100	1	23	1	67	1/68	1.47	
8	600	0	24	0	24	0/24	0	N.C.
	300	0	24	0	48	0/48	0	
	100	0	24	0	72	0/72	0	
9	600	0	24	1	24	1/25	4	N.C.
	300	1	23	1	47	1/48	2.01	
	100	0	24	0	71	0/71	0	
10	600	0	24	1	24	1/25	4.00	N.C.
	300	0	24	1	48	1/49	2.00	
	100	1	23	1	71	1/72	1.39	
11	600	1	23	1	23	1/24	4.17	N.C.
	300	0	24	0	47	0/47	0	
	100	0	24	0	71	0/71	0	
12	600	0	24	5	24	5/29	17.24	2188.31
	300	4	20	5	44	5/49	10.20	
	100	1	23	1	67	1/68	1.47	
13	600	0	24	0	24	0/24	0	0
	300	0	24	0	48	0/48	0	
	100	0	24	0	72	0/72	0	
14	600	0	24	0	24	0/24	0	0
	300	0	24	0	48	0/48	0	
	100	0	24	0	72	0/72	0	

<sup>1</sup> N.C. = Estos datos probablemente no convergen y no hay interacción.



A continuación se indican los resultados obtenidos de la comparación entre las variables independientes y los promedios de peso y talla en cuatro tiempos diferentes junto con los datos de pupación y proporción de sexos (Fig.10).

La prueba de Tukey marcó diferencias significativas para el peso, donde los promedios de los tratamientos T1(v.h. F1), T2(v.h. F5), T3(v.h. F6), T4(v.h. F4), T5(v.t.v.v. F16), T (v.h. F3) 6 y T7(l.c. F20) fueron similares y en función al control presentaron un efecto antialimentario. A partir de los tratamientos T8(v.h. F11) y T9(v.h. F13) hubo un aumento en el peso, sin embargo la diferencia fue poco significativa, haciendose altamente significativa con respecto a los tratamientos T10(v.h. F10), T11(v.h. F15), T12(v.h. F2) y T13(v.h. F7) los cuáles con respecto al control (T14) favorecieron el gusto por comer.

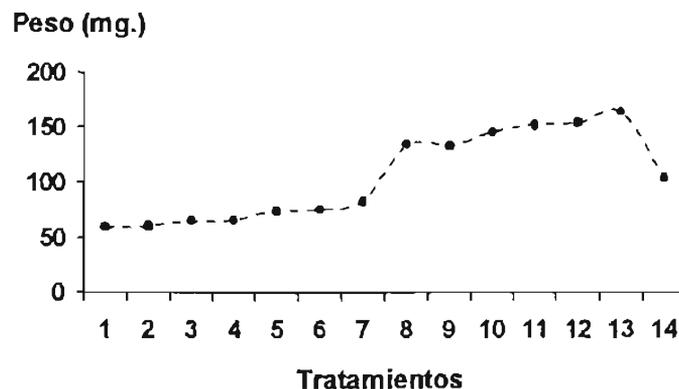


Fig. 11 Peso comparativo del promedio con 3 concentraciones en 4 tiempos.

En la figura anterior se indica el promedio del peso registrado por cada tratamiento en función del tiempo y no de la concentración, ya que esta no fue significativa (Fig. 10). Donde resulta claro observar que el tratamiento 13 (*Vitex hemsleyi* F7) presentó el promedio más alto con 162.7mg y 0% de mortalidad a 600ppm; por el contrario el peso mas bajo lo registró el tratamiento 1 (*V. h. F1*) con 59.39mg y 61.29% de mortalidad a 600ppm, por ello este último fue el más representativo como antialimentario e insecticida. El tratamiento 14 correspondió al control con un promedio de 103.7mg y un registro de 0% de mortalidad.

Tabla 13. Resultados de los tratamientos seleccionados en el bioensayo con *S. frugiperda*

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso promedio (gr.)	Talla promedio (cm)	Mortalidad %
1	600	59.39	12.10	61.29
2	600	59.89	12.80	40.63
3	600	64.50	12.50	29.03
4	600	65.79	12.40	47.06
5	600	73.62	12.70	37.30
6	600	74.36	14.40	51.22
7	600	83.31	13.20	18.52
8	600	131.99	16.00	0
9	600	133.10	16.18	4.00
10	600	145.06	16.90	4.00
11	600	147.31	16.52	4.17
12	600	152.29	16.30	17.24
13	600	162.70	17.50	0
14	600	103.70	15.30	0

Por otra parte en los resultados presentados en apartado de *V. hemsleyi* (Tabla, 10) los tratamientos T1 (v.h. F1), T6 (v.h. F3), T4 (v.h. F4) y T2 (v.h. F5) fueron los más activos, sin embargo en esta prueba por las razones antes mencionadas (efecto del ambiente, larvas mas resistentes) los porcentajes de mortalidad disminuyeron considerablemente excepto en la fracción v.h. F1, la cual en menor proporción mantuvo su efecto hacia los lepidópteros adaptados a succionar aún después de su separación cromatográfica y se considera el antialimentario más representativo aislado en el presente estudio.

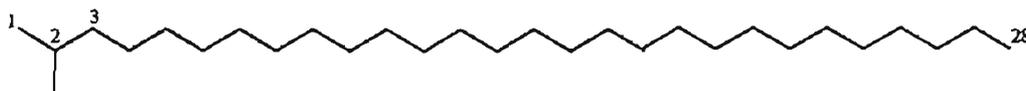
Con respecto a la pupación y proporción de sexos podemos decir que por comparación el tratamiento T2(v.h. F5) presentó el porcentaje de pupación más bajo ya que en los estadíos larvarios hubo una elevada mortalidad y el número de machos fue mayor al de hembras (Tabla 11) .

De acuerdo con los resultados anteriores y preliminares, se prosiguió a purificar los tratamientos v.h. F1(compuesto 1), v.h. F3(compuesto 2), v.h. F4(compuesto 3) y v.h. F5(compuesto 4), y a caracterizar las estructuras químicas resultantes mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, cotejando con la revisión bibliográfica a fin de determinar correctamente la estructura junto con sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

## 6.5 Caracterización Estructural:

Se identificó la estructura molecular de cinco metabolitos secundarios, los cuáles fueron todos activos y provenientes del extracto crudo de las hojas de *Vitex hemsleyi* (ver diagrama de trabajo Fig. 3); con base en métodos espectroscópicos (ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), resonancia magnética protónica de hidrógeno (RMN- $^1\text{H}$ )) y espectrométricos (espectrometría de masas (EM)), como se reporta a continuación, siendo el compuesto 1 el de mayor actividad.

### a) Compuesto 1



Hidrocarburo

El compuesto codificado VHF-1 se aisló como una sustancia cerosa blanca. En el espectro de IR<sup>19</sup> de esta sustancia se observan bandas en 1711 y 1731cm<sup>-1</sup> indicativas de grupos carbonilo muy probablemente de grupos ésteres.

El aspecto del espectro de masas<sup>20</sup> de este compuesto sugiere una naturaleza esencialmente hidrocarbonada. Se observan varias pérdidas consecutivas de 14 unidades de masa lo cual apoya la observación anterior.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$ <sup>21</sup> de esta sustancia es congruente con una sustancia de tipo hidrocarburo, el 2-metil-octacosano, aislado previamente de tabaco, aceite de naranja y de algunos insectos.

<sup>19</sup> Corresponde al Espectro No. 1

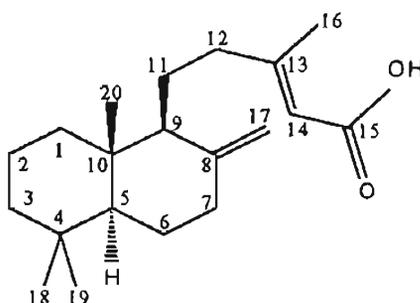
<sup>20</sup> Correspondiente al Espectro No. 2

<sup>21</sup> Espectro con No. 3



Del género *Vitex* este es el segundo reporte descrito de un compuesto de este tipo con actividad insecticida y antialimentaria (Villegas, 2004).

### b) Compuesto 2



El producto VHF-2 fue aislado como un aceite viscoso de color amarillo pálido. Su espectro de IR<sup>22</sup> muestra una banda ancha centrada en 2845 cm<sup>-1</sup> la cual junto con la observada en 1691.3 cm<sup>-1</sup> sugiere la presencia de un ácido carboxílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado. En 1638.8 cm<sup>-1</sup> se observa una banda intensa que se asigna a dobles ligaduras.

En el espectro RMN de <sup>1</sup>H<sup>23</sup> de esta sustancia se observan a tres señales singuletes en 0.684, 0.802, 0.872 que se asigna tres metilos presentes en la estructura de este producto. Una señal doblete con  $J=1.2$  centrada en 2.16 ppm se asigna a un metilo vinílico, lo cual es consistente con la presencia de dobles ligaduras indicada en el IR.

Dos señales que integran para un protón cada una en 4.49 (s.a.) y 4.84 (d.a.,  $J=1.2$ ) se asignan a los protones de un metileno exacíclico característico de un sistema de tipo labdano con un doble enlace 8(17).

En 5.67 se observa una señal de tipo vinílica (desplazamiento químico) cuya multiplicidad (cuarteto deformado) y constante de acoplamiento ( $J=1.2$ ) indican que está acoplado al metilo vinílico previamente mencionado. Estos datos sugieren la presencia de un sistema de ácido carboxílico  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado con un metilo unido en posición  $\beta$ , acoplado a un protón vinílico  $\alpha$  al carbonilo. El desplazamiento químico del precitado metilo sugiere que se encuentra en relación *cis* al grupo carboxilo.

<sup>22</sup> Espectro No. 4

<sup>23</sup> Espectro No. 5

Los datos anteriores, sumados a la espectrometría de masas indican que VHF-2 es un diterpeno con un arreglo del tipo labdano. La estructura asignada corresponde al ácido anticopálico. Esta sustancia se conoce con anterioridad y ha sido descrita como componente de plantas del género *Copaifera*, como *Pinus strobus*, *P. moticola* e *Hymenea coubaril* L. (Basile, A.C. et al. 1988)

Es importante señalar que este es el segundo reporte de diterpenos tipo labdano con este patrón de oxidación en plantas del género *Vitex*, con actividad básicamente fagoestimulante ya que básicamente se han descrito diterpenos del grupo de los clerodanos (Villegas, 2004).

### c) Compuesto 3

El compuesto codificado como VHF-3 se aisló como un producto aceitoso.

En el espectro de IR<sup>24</sup> de este producto se observa una banda ancha centrada en 2930 cm<sup>-1</sup> la cual sumada a la banda en 1695 cm<sup>-1</sup> indican la presencia de un grupo ácido carboxílico. La banda observada en 1641 en este mismo espectro sugiere la presencia de dobles ligaduras.

En el espectro de R.M.N. de <sup>1</sup>H<sup>25</sup> de este producto se observan señales que recuerdan a las del ácido anticopálico previamente descrito, sumadas a las de un producto de naturaleza aromática.

Restando las señales del ácido anticopálico se puede observar un sistema de tres protones aromáticos en 6.88(singulete deformado), 6.99(*dd*, 1H, *J*=8.1 y 1.92) y 7.16 ppm(*d*, 1H, *J*=8.1) los cuáles se asignan a un anillo aromático trisustituido con dos protones en relación orto y un protón adicional en relación meta y para en los anteriores.

Estas señales sumadas a las de un grupo isopropilo características de un abietano indican que el producto VHF-3 es una mezcla de ácido anticopálico y ácido dehidro abiético. El espectro de masas de VHF-3<sup>26</sup> apoya este resultado ya que se observan señales a *m/z* 304 y *m/z* 300 correspondientes al M<sup>+</sup> para el ácido anticopálico y dehidro abiético; cuya mezcla presentó actividad tanto insecticida como antialimentaria.

---

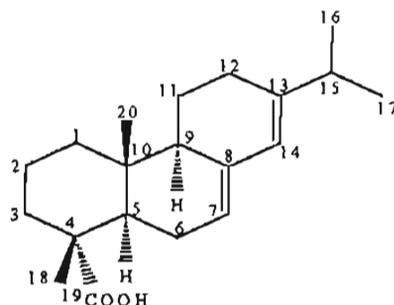
<sup>24</sup> Espectro No. 6

<sup>25</sup> Espectro No. 7

<sup>26</sup> Espectro No. 8



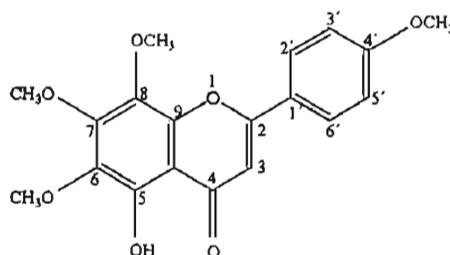
## c) Compuesto 4



Ácido dehidro-abiético

Los datos espectroscópicos obtenidos para este producto indican que se trata del diterpeno con un arreglo molecular del abietano conocido como **ácido dehidro abiético**, el cual se encuentra mezclado con el ácido anticopálico en forma minoritaria y necesita otro tipo de separación<sup>27</sup>, aislado anteriormente de *Pinus palustris*, *Pinus taeda* y *Larix kaempfen*, en el presente estudio presentó una marcada actividad antialimentaria.

## Compuesto 5



Gardenina B

El producto VHF-5 es un flavonoide típico de labiatae que por su espectroscopía presenta un arreglo molecular del tipo de las flavonas bien conocida como **Gardenia B**<sup>28</sup>, aisladas en *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* y *Sidertis mugronensis* entre otros, recientemente reportada para esta especie (Villegas, 2004), la cual en el presente estudio reportó una actividad antialimentaria importante.

<sup>27</sup> Espectros No. 9, 10 y 11

<sup>28</sup> Espectros No. 12, 13 y 14

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



## 7. CONCLUSIONES

El estudio químico biodirigido, hacia la búsqueda del potencial insecticida y antialimentario de las especies vegetales *Lantana camara*, *Vitex trifolia var. variegata* y *Vitex hemsleyi*, permitió discernir los compuestos activos con base en los objetivos planteados, de una manera clara y confiable. Por lo que es muy importante integrar pruebas de actividad biológica en los estudios sobre la composición química de las plantas aportando un mayor interés desde el punto de vista económico, ecológico, medicinal y cultural de las mismas.

Por otro lado, los extractos de las tres especies fueron acetónicos, sin embargo debido a la composición química de las estructuras trabajadas hubo diferencias en cuanto a su cromatografía y actividad biológica. Lo que sí resultó claro fue que en general los compuestos activos se extrajeron con disolventes de baja polaridad; así mismo en cuanto a la actividad biológica ninguna fracción resultó activa contra *E. varivestis*, mientras que las fracciones que fueron activas hacia *A. salina* y *Spodoptera* estuvieron preparadas a la más alta concentración. Por lo tanto, se concluye que las fracciones activas son de baja polaridad y que *E. varivestis* no es sensible a las mismas.

Con respecto a la actividad insecticida, las hojas de *Lantana camara* (Verbenaceae) no fueron activas, los frutos de *Vitex trifolia var. variegata* (fam. Labiatae) presentaron actividad hacia *Spodóptera frugiperda* a 400ppm y las hojas de *Vitex hemsleyi* presentaron varias fracciones activas hacia *A. salina* a 1000 ppm y hacia *S. frugiperda* a 400ppm, por lo que esta última especie estuvo mejor protegida contra el ataque de los herbívoros.

En cuanto a la actividad antialimentaria, únicamente *Vitex hemsleyi* presentó actividad, en este caso se aislaron cinco fracciones eluidas a baja polaridad (VhF1, F3, F4, F5 y F6), las cuáles presentaron una diferencia estadísticamente significativa en las variables tiempo y tratamiento con respecto al control; así mismo esta especie presentó seis fracciones (F2, F7, F10, F11, F13, y F15) con actividad fagoestimulante, lo cual demuestra que esta especie es rica en metabolitos secundarios indirectos.

En general para las tres especies vegetales se observó un porcentaje de pupación bajo causado por una alta mortalidad en los estadíos de larva y prepupa, aunado a las alteraciones causadas durante la pupación, lo cual disminuyó aún mas la emergencia de adultos. Por lo cual la diferencia en la proporción de sexos fue mínima con mayor



cantidad de machos que de hembras. La maduración reproductiva y efectos posteriores en la oogénesis no se valoraron ya que no fueron los objetivos del estudio.

Con referencia a las estructuras químicas de los metabolitos secundarios con actividad tanto insecticida como antialimentaria, fueron dilucidados cinco compuestos correspondientes a la especie *Vitex hemsleyi*. Se encontró que el compuesto más activo resultó ser el hidrocarburo 2-metil-octacosano, seguido por la mezcla de diterpenos, uno con esqueleto tipo labdano (ácido anticopálico) y otro de tipo abietano (ácido dehidroabiético), cabe mencionar que el ácido anticopálico puro presentó actividad fagoestimulante mientras que el ácido dehidro abiético conservó la actividad antialimentaria, finalmente siguió el flavonoide Gardenia B. Esto nos demuestra que el hidrocarburo de cadena larga fue estable porque mantuvo su actividad biológica.

Por otra parte, cabe mencionar que algunas fracciones perdieron o modificaron su actividad al momento de su separación cromatográfica señalando un efecto sinérgico, el cual es de importante consideración al momento de establecer los bioensayos.

En todos los casos los insectos estuvieron bien expuestos a la acción de los productos vegetales de acuerdo a su polaridad y al hábitat de los organismos. Por lo cual consideramos que la aplicación de los compuestos químicos fue adecuada. Sin embargo, las diferencias fisiológicas de cada organismo les confieren un tipo de respuesta particular en cuanto a tolerancia, resistencia, diferencia en el desarrollo, entre otras que causaron diferencias en los porcentajes de la mortalidad. Por lo tanto, es de suma importancia considerar dichas diferencias fisiológicas a fin de no dar un falso positivo o bien dejar de escudriñar compuestos potenciales. Se sugiere realizar un análisis de correlación entre los sistemas biológicos para estudios futuros.

No obstante, también es importante realizar otro tipo de pruebas multidisciplinarias con dichos compuestos para conocer sus alcances y limitaciones, así como para comprender mejor su naturaleza química y actividad biológica para utilizarlos lo más adecuadamente. Conocer su acción al ser aplicados solos o acompañados; ya sea usándolos como un tóxicos, cebos o bien como reguladores de la población al inhibir alguna etapa del desarrollo o para modificar simplemente la proporción de sexos.

De acuerdo con lo anterior, los objetivos planteados en el presente estudio se cumplieron satisfactoriamente aceptando la hipótesis de trabajo, ya que los metabolitos secundarios causaron una mortalidad significativa en los insectos de interés, alteraciones en su desarrollo y arreglo poblacional, lo que cuantitativamente provocó diferencias significativas.



---

Entre otras consideraciones, este trabajo representa una aportación con aplicaciones ecológicas en el manejo integrado de insectos plaga (MIP), que a través de subsiguientes líneas de investigación permitan ir despejando el camino para sentar las bases con respecto a las implicaciones y riesgos que surjan, útiles en el planteamiento de alternativas que permitan regular a las plagas sin dañar al ambiente.

Ciertamente, se han obtenido resultados satisfactorios en este campo, mediante trabajos y ensayos realizados por numerosos investigadores, sin embargo aún queda mucho por hacer y es prioritaria la aplicación de políticas que fomenten, practiquen o fortalezcan un sistema de agricultura sustentable y las medidas de control biológico de plagas.

Por último, debemos recordar que México cuenta con una amplia diversidad de especies vegetales que muchas son endémicas y son, por lo tanto, un potencial de metabolitos secundarios para el desarrollo de productos de control biológico que marquen un hito histórico dentro del campo científico que fortalezcan una cultura de la bioconservación, fomenten la aplicación de insecticidas biodegradables así como formar parte integral del desarrollo sustentable de las comunidades.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C.A. y Zolla, C. 1982. *Plantas tóxicas de México*. Intituto Mexicano del Seguro Social.
- Aguirre, B.G. 1963. *Medicina y Magia*, Instituto Nacional Indigenista.
- Ahmad, H.B. and Holdsworth, D.K. 1995. *Traditional medicinal plants of Sabah State Malaysia*, Part III, *Int. J. Pharmacognosy*, 33(3), 262-264.
- Apablaza, J. 1990. *Insectos, ácaros y otros*. En plagas de las hortalizas. Manual de manejo integrado. FAO. 376-379.
- Aranda, E.; Sánchez, J.; Peferoen, M.; Guereca, L. and Bravo, A. 1996. *Interactions of Bacillus thuringiensis cristal proteins with the midgut epithelial cells of Spodoptera frugiperda (Lepidopterae: Noctuidae)*. *J. Invertebr. Patnol.*, 68, 203-212.
- Argueta, V.A.; Cano, A.L.M. y Rodarte, M. 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I,II y III*. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., 450-452.
- E. Smith) en el cultivo del maiz. Valle de Culiacán, Sinaloa 1985-1986 En: Resumen XXII Congreso Nacional de Entomología, Folia Entomológica Mexicana. Cd. Juárez, Chih. México.
- Bajpai, A.; Ojha, J.K.; Sant, H.R. 1995. *Medicobotany of the Varanisi Distric Uttar Pradesh, India*. *Int. J. Pharmacognosy* 33(2), 172-176.
- Barbour, M.G.; Burk, J.H.; Pitts, W.D. 1987. *Terrestrial Plant Ecology*, Ed. Benjamin, 2da. Ed., California-E.U.
- Basile, A.C. et al. 1988. *Journal of Ethnopharmacology* 22, 101-109.
- Bautista, M.N.; Vejar, C.G. y Carrillo, S.J.L. 1994. *Técnicas para la cría de insectos*, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Instituto de Fitosanidad, Montesillo, Estado de México.
- Becher, H.; Flesch-Janys, D.; Kauppiner, T.; Kogevinas, M.; Steindorrf, K.; Manz, A. y Wahrendorf, J. 1996. *Cancer mortality in German male workers exponed to phenoxy herbicides and dioxins*. *Cancer Cause Control*. 7(3), 312-321.

- Berenbaum, M.R. 1988. *Allelochemicals in insect-microbe-plant-interactions: Agrtns provocateurs in coevolutionary arms race*, Ed.P&Lentourneau, D.K., New York, 97-124.
- Berenbaum, M.R. 1989. in Arnason, Philogene and Moran (editors), ACS Symposium Series 387, Washington D.C.
- Berenbaum, M.R. 1995. *Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction*, <http://www.nap.edu/openbook/0309052815/html/1.html>, copyright 1885, 2000 The National Academy of Sciences, all rights reserved, 1-16.
- Bernays, E. 1992. *Insect-Plant Interactions*, Vol. IV, CRC Press, USA.
- Borror, T.J.; Charles, A. T. and Norman, F. J. 1997. *Insects An Introduction to the Study of Insects*, Saunders College Publishing, Chapter 3, 6 Ed., EUA.
- Bouman, F. and Meeuse, A.D.J. 1992. *Dispersal in Labiatae*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 193-202.
- Bredenkamp, C.L and Botha, D.J. 1993. *A synopsis of the genus Vitex L. (Verbenaceae) in southern Africa*, South African, *Journal of Botany*, **59(6)**, 611-622.
- Briggs, G.G. 1994. *Advances in the Chemistry of Insect Control III*, Royal Society of Chemistry, Gran Bretaña.
- Brock, T. y Madigan, M. 1991. *Microbiología*, Prentice may Hispanoamérica S.A., México.
- Brooks, G.T. 1983. *Chlorinated Insecticides, Tecnology and Application*, Vol. I, Ed. Krieger, Malabar-Florida.
- Brown, E. y Dewhurst, C. 1975. *The genus Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) in Africa and the Near East*. Bull. Ent. Res. 65, 221-262.
- Bulletin del' Herbario Boissier. 1896. (*Vitex hemleyi* Briq.) 4: 347, (BPH 253.06)
- Bulletin del' Herbario Boissier. 1901. ( *Vitex trifolia* L., *Plantae Madagascarienses*), sér.2, 1(6), 549-587.
- Bulletin del' Herbario Boissier. 1901. *Plantae Madagascarienses*, Candolle (R.E.)A. de.
- Bye, R. y Linares, M.E. 1987. *Usos pasados y presentes de algunas plantas medicinales encontradas en los mercados mexicanos*. **América Indígena**, vol.47, No.2, 205-215.
- Cartino, P.D.; Harley, R.M. and Wagstaff, S.J. 1992. *Genera of Labiatae, Status and Classification*. In: R.M. Harley and T. Reynolds (editors), *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic

Gardens, Kew, pp.511-522 ver Lamiales Home Page: March 2000 (<http://www.rbgekew.org.uk/lamiales/lamhome1.htm>).

- Cole, M.D. 1992. *The Significance of the Terpenoids in the Labiatae*, In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors), *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 315-324.
- Colegate, M.S. and Molyneux, J.R. 1993. *Bioactive Natural Products*, U.S.A., Ed. CRC Press.
- Contreras, A.S. 2001. *Efecto de la herbivoría foliar del gusano Cogollero (Spodoptera frugiperda, J.E. Smith) y del gusano barrenador (Diatraea grandiosella, Dyar) sobre la producción de compuestos fenólicos en cuatro líneas de maíz*, Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias, UNAM.
- Coronado, P.R. 1972. *Apuntes del Curso de Entomología III (Entomología Agrícola)*, Ed. Enseñanza e Investigación en Parasitología, Esc. Nal. de Agricultura, Chapingo-México.
- Cremllyn, R. 1978. *Pesticides, Preparations and Mode of Action*, Ed. John Wiley & Sons, Gran Bretaña.
- Cremllyn, R. 1982. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Ed. Limusa, México, D.F. J. Chem. Ecol.
- Crombie, L. 1989. *Recent advances in the chemistry of insect control II*, Royal Society of Chemistry, Oxford-USA.
- Cronquist, A. 1981. *An integrate system of classification of flowering plants*, Columbia university, New York
- Cruz, D.P.M. 1991. *Estudio Fitoquímico Biodirigido de Salvia holwayii*, Tesis QFB, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver.
- Chapman, F.R.; Bernays, E.A. and Stoffolano, Jr. J.G. 1987. *Perspectives in Chemoreception and Behavior*, Ed. Springer-Verlag, New York.
- Chawala, A.S.; Sharma, A.K.; Handa, S.S.; Dhar, K.L. 1992. *Chemical Investigation and inflammatory activity of Vitex negundo seeds*, J., **Nat.Prod.** **55(2)**, 163-167.
- Damayanti, M.; Susheela, M. and Sharma, G.J. 1996. *Effect of plant extracts and sistemic fungicide on the pincapple fruti-rotting fungs. Ceratocystis paradoxa*, **Cytobios** **86 (346)**, 155-165.
- De Bach, P. 1992. *Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas*, Ed. Continental, México D.F.
- Dev, Sukh and Jalandhar, O.K. 1997. *Insecticides on Natural Origin*, Harwood academic publishers, India.



- Dirzo, R. 1984. *Herbivory: A Phytocentric Overview*. In Dirzo, R. & Sarukan J. (eds). Perspectives on population Ecology, Siaver Ass. Inc. Pub. Sunderland Mass, 141-165.
- Dressler, R.L. 1954. *Some floristic relationships between México and United States*, Rhodora, 56, 81-96.
- Edmondson, A. and Druce, D. 1996. *Advanced Biology Statistics*, Oxford, New York.
- Ekundayo, O.; Laskso, I.; Holopainen, M.; Hiltunen, R.; Oguntimein, B. and Kauppinen, V. 1990. *The chemical composition and antimicrobial activity of the leaf oil of Vitex agnus-castus L.* J. **Essent, Oil Res.** 2(3), 115-119.
- Escalante, S.E. 1941. *Botanica*, Publicaciones de la Universidad de Yucatan, México.
- Esquivel, R. B.; Rodríguez, H.L. and Simmonds M.S.J. 1992. *Actividad insecticida de diterpenos clerodánicos aislados de salvas mexicanas*, 1er. Simposium, Instituto de Química, UNAM, México D.F., 140-156.
- Esquivel, B.; Calderón, J.; Sánchez, A.; Ramamoorthy, T.P.; Flores, E. and Domínguez, R.M. 1996. *Recent advances in Phytochemistry and biological activity of Mexican Labiatae*. **Rev. Latinoamer. Quim.** 24, 44-64.
- FAO, 1993. *Importancia y potencial del Bacillus thuringiensis en el control de plagas*, REDBIO, Santiago, Chile.
- Fall Armyworm Symposium, 1979. *The Florida Entomologist* 62(2), 81-133.
- Finney, J. 1971. *Probit analysis*, 3<sup>rd</sup> Ed. University Press, Cambridge.
- García, G.M.G. 1990. *Estudio sobre ecología de patógenos en el follaje de plantas en la selva de los Tuxtlas*. Tesis Biólogo, Fac. Ciencias, UNAM.
- Geissman, T.A. and Crout, D.H.G. 1969. *Organic Chemistry of Secondary Plants Metabolism*, Ed. Freeman, Cooper & Company, U.S.A.
- Generum Plantarum. 1891. (*Vitex agnus-castus* var. *subtrisecta* Kuntae) Revisión 2, 510-511.
- Gill, S.; Cowles, y Pietrantonio, P. 1991. *The Mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins*. **Annu. Rev. Entomol.** 37, 615-636.
- González, G.O.J. y Lagunes, T.A. 1986. *Evaluación de métodos tecnificados y no tecnificados para el combate de Spodoptera frugiperda y Sitophilus zeamidis en la Chontalpa-Tabasco, México*.



- Gottlieb, O.R.; Borin, de M.B. and de Brito, N. R. S. 2002. *Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality?*, **Phytochemistry** 60, 145-152.
- Grainge, M. and Ahmeol, S. 1988. *Handbook of Plants with Pest-Control Properties*. Ed. Wiley Interscience.
- Granados, S. D. y López, R.G.F. 1996. *Agroecología*, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Gupta, M.; Mazumder, UK.; Bhawal, SR. 1999. *CNS activity of Vitex negundo Linn. in mice*, Dept. of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Jadavpur, Calcutta 700 032, India., **Indian Journal of Experimental Biology**, 37(2) 143-146.
- Hansell, R.; Leuckert, Ch.; Rimpler, H. and Schaaf K.D. 1964. *Chemotaxonomische untersuchungen in der Gattung Vitex L.* **Phytochemistry**, vol.4, 19-27.
- Hart, K.N.; Lamberton, A.J.; Sioumis, A.A.; Soares, H. and Seawright, A.A. 1976. *Triterpenes of Toxic and Non-Toxic Taxa of Lantana camara*, **Specialia**, 15(4), 412-413.
- Hart, K.N.; Lamberton, A.J.; Sioumis, A.A.; Soares, H. 1976. *New Triterpenes of Lantana camara. A Comparative Study of the Constituents of Several Taxa*, **Aust.J.Chem.**, 29, 655-71.
- Hättenschwiler, S. and Vitousek, P.M. 2000. *The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling*, **TREE** vol.15, No.6, 238-243.
- Hebbalkar, D.S.; Hebbalkar, G.D.; Sharma, R.N.; Joshi, V.S. and Bhat, V.S. 1992. *Mosquito repellent activity of oils from Vitex negundo Linn. Leaves*, **Indian J. Med. Res.** 95, 200-203.
- Hedge, I.C. 1992. *A global survey of the biogeography of the Labiatae*, In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors), *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 7-17.
- Heinrich, M. 1992. *Economic Botany of American Labiatae*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 475-488.
- Hemsley, W.B. 1888. *Botany*. In: Godwin, F.D. & O. Salvin. *Biología Centrali-Americana*. R. H. Porter, London, Vol.5.
- Heraso, C. C. 1998. *Evaluación de las actividades biológicas (insecticidas y citotóxicas) de extractos crudos de Vitex trifolia L. (Verbenaceae)* Tesis, biólogo, UAEM.
- Hernández, J. 1988. *Evaluation de la toxicité de Bacillus thuringiensis sur Spodoptera frugiperda*. **Entomophaga** 33.



- 
- Hernández, M.M.; Heraso, C.; Villareal, M.L.; Vargas-Arispuro, I. and Aranda, E. 1999. *Biological activities of crude plant extracts Vitex trifolia L. (Verbenaceae)*, **J. of Ethnopharmacology** **67**, 37-44.
- Hill, D. 1987. *Agricultural Insect pests of the tropics and their control*, 2o Ed. Cambridge University Press.
- Hosozawa, S.; Kato, N.; Munakata, K. and Chen, Y.L. 1974. *Antifeeding active substances for insects in plants.*, **Agric. biol. Chem.** **38(5)**, 1045-1048.
- Hostettman, K.; Wolfender, J.L. and Rodriguez, S. 1997. *Rapid Detection and Subsequent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plant Extracts*, **Planta Médica** **63**, 2-10.
- Huff, E. y Haseman. 1991. *Exposure to certain pesticides may pose real carcinogenic risk*. Chemical and Engineering News.
- Inderjit, K.M.M.; Dakshini, and Frank A.E. 1995. *Allelopathy Organisms, Processes and Applications*, American Chemical Society Washington, D.C., ACS Symposium Series 582.
- Infante, G.S.; Calderon, A.L. del C. 1980. *Manual de Analisis Probit*, Centro de estadística y cálculo, Col de Postgraduados, Chapingo-México.
- Instituto Nacional Indigenista (INI). 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, Argueta-Villamar, Cano-Asseleih, L.M., Rodarte, M.E., 3a Ed. México.
- Jacobson, M. 1989. Botanical Pesticides: Past, Present, and Future. En: *Insecticides of plants origin*. Edit. Arnason J.T., Philogene B.J.R. American Chemical Society, 01-10.
- Jerry, L.; McLaughlin; Ching-ger, Ch. and David, L.S. 1988. *Simple Bioassays for the Detection and Isolation of Bioactive Natural Products*, Proceedings Congres, France, June.
- Jones, S. 1988. *Sistemática vegetal*, 2a.Ed. Ed. McGraw-Hill. México, 424-425.
- Jones, C.G. and Lawton, J.H. 1991. *Plant chemistry and insect species richness of British umbellifers*. **Journal of Animal Ecology** **60**, 767-777.
- Kato, N.; Takahashi, M. and Munakata. 1972. **Agr. Biol. Chem.**, **36**.
- King, A.B.S. y Saunders, J.L. 1984. *Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en America Central*, Una guia para su reconocimiento y control, ODA, TDRI,CATIE, Inglaterra.
- Krishna, R.R.V. and Jena, R. 1990. *Comparative phytochemical studies on Vitex species*, **Indian J.Nat.Prod.**, **12(2)**, 26-28.



- Kubo, I. 1992. *Screening technique for plant-insect interaction*. En: Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6. Academic press, LTD, 179-193.
- Kubo, I. and Hanke, F.J. 1984. *Multifaceted Chemically Based Resistance in Plants*, see in: Chemical Mediated Interactions Between Plants and Other Organisms, Recent Advances in Phytochemistry, Ed. Plenum, vol.19, cap.7, 171-194.
- Lagunes, A.; Arena, C. y Rodríguez, C. 1982. *Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas*, Colegio de Postgraduados, Chapingo-México.
- Lagunes, T.A. 1984. *Empleo de sustancias vegetales contra plagas del maíz como una alternativa al uso de insecticidas en áreas de temporal*, Informe del proyecto PROAF-CONACYT: PCAFBNA-001299. CONACYT -CP-UACH-INIA-DGSU. México D.F.
- Lagunes, T.A. y Rodríguez, C. 1988. *Combate químico de plagas agrícolas en México*. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Lagunes, T.A. y Vázquez, N.M. 1994. *El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas*. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Ley, V.S. and Toogood, P.L. 1990. *Insect antifeedants*, **Chemistry in Britain**, No.26 ( 31), 31-35.
- Lindbland, C. y Druben, L. 1979. *Almacenamiento de granos, manejo, secado, silos, control de insectos y roedores*, Ed. Concepto, México D.F.
- Long, R.W. & Lakela, O. 1971. *A flora of Tropical Florida*, Xii+.
- Loyola, V.V.M. 1990. *El efecto del Estrés en la Síntesis de Productos Secundarios*.
- MacGregor, R. y Gutierrez, O. 1983. *Guía de insectos nocivos para la agricultura en México*. Alhambra, México.
- Man, Y.K.; Son, K.; Wook, Ch.H.; Sik, K.S. and Pyo, K.H. 1998. *Vitexicarpin, a Flavonoid from the Fruits of *Vitex rotundifolia*, Inhibits Mouse Lymphocyte Proliferation and Growth of Cell Lines In Vitro*, **Planta Medica** 64, 546-550.
- Mansel, D. 1963. *Infra-Red Spectroscopy and Molecular Structure*, Ed. Elsevier Publishing Company. New York.
- Margalef, R., 1974. *Ecología*, Ed.Omega, Barcelona, España.
- Martin, P.S.& Harrell, B.E. 1957. *The Pleistocene history of temperate biotas in México an eastern United States*, **Ecology** 38, 468-480.



- Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Maxwel, G.F. and Jennings R. P. 1984. *Mejoramiento de plantas resistentes a insectos*, Ed. Limusa, México D.F.
- McCurdy, S., Ferguson, T.; Goldsmith, D.; Parker, J. y Schenker, M. 1996. *Respiratory health of California rice farmers*. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **153(5)**, 1553-1559.
- McLaughlin, J. 1982. Brine Shrimp: *A conveniente general bioassay for active plant constituents*, **Planta Medica** **45**, 31-34.
- McLaughlin, J. L.; Chang Ch., and Smith, D.L. 1988. *Simple Bioassays for the Detection and Isolation of Bioactive Natural Products*, Procceding Congress France.
- McMillan, X. 1976. *A Concise Dictionary of Plants Cultivate in the United States and Canada*. In: Bayley, L.H. Ed, Hortorium. Cornell University, New York, 1161-1162.
- Metcalf, R.L. 1965. *Advances in pest control Research*, Vol VI, Ed. John Wiley & Sons, EUA.
- Metcalf, C.L. y Flint, W.P. 1974. *Insectos destructivos e insectos útiles*, Ed. Continental, México D.F.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, D.E.; Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*, **J. of Medic. Plant Reserch (Planta Médica)**, January Vol.45, 31-34.
- Mihn, J. A. 1984. *Técnicas eficientes para la crianza de infestación de insectos en la selección de plantas hospederas para resistencias al gusano cogollero de la mazorca o elotero *Heliothis zea**. Centro Internacional para el mejoramiento del maiz y trigo (CIMMYT). Folleto técnico.
- Mihn, J. A. 1987. *Mass rearing stem borers, fall armyworms and corn earworms at CIMMYT*. In Toward insect resistant maize for the third world. Proceedings of the International Symposium on methodologies for developing host plant resistance to maize insects, CIMMYT: México, 5-21.
- Miller, J.R. and Miller, T.A. 1990. *Insect-Plant Interactions*, Ed. Springer-Verlag, New York, Chap. 1, 1-22.
- Moldenke, H.N. 1941. (*Vitex trifolia var. variegata*). **Phytologia (BPH 710.12)** **2(1)**.
- Moldenke, H.N. 1956. *Verbenaceae*, Flore de Madagascar et des Comores 174, 1-264.
- Moldenke, H.N. 1961. (*Vitex trifolia var. subtrisecta*) **Phytologia** **8(2)**.



- Moldenke, H.N. 1981. (Genus Vitex. XIX) **Phytologia Vol.48, No.6.**
- Moldenke, H.N. 1982. (Notas Adicionales del género Vitex. XXXV) **Phytologia., Vol. 51, No. 3, 330-355.**
- Moldenke, H.N. 1982. (Notas Adicionales del género Vitex. XXXVI) **Phytologia Vol. 52, No.3, 185-211.**
- Morón, A. M. y Terron, A.R. 1988. *Entomología práctica*, Instituto de Ecología, Sociedad Mexicana de Entomología. México.
- Nash, L.; Dorothy, y Nee, M. 1984. *Flora de Veracruz, Verbenaceae*, Xalapa, Ver. Dic. Fascículo 41, Ed. Inireb.
- Nathan, P.J. y Diaz, E. 1970. *Introduccion a la Resonancia Magnetica Nuclear*. Limusa Wiley, México.
- Norman, A. 1989. *Introduction of the potenciality of plant extracts in insect pests control*. Company press Incorporation, Nebraska. Etnobiological Library, 123-168.
- Ono, M.; Yasuyuki, and Nohara, T. 1998. A Labdane diterpene glycoside from fruit of Vitex rotundifolia, **Phytochemistry Vol.48, No.1, 207-209.**
- Ortega, J.; Espinoza, F. y López, L. 1994. *El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio*. Salud Pública de México, 36 (6), 624-632.
- Pan, J.G.; Xu, Z.I. and Pan, J.F. 1989. GC-MS análisis of essential oils from tour Vitex species, **Cheng Kuo Cheng Yao Tsa Chih 14(6), 357, 359, 383.**
- Pennigton, T.D. y Sarukhán, K.J. 1968. *Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México* (INIF) Inst. Nal. de Inv. Forestales, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, (FAO) Org. de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Pickett, J.A. 1988. *Chemical pest control the new philosophy*, **Chemistry in Brintain 24, 137-142.**
- Primo, E. 1991. *Ecología Química. Nuevos aspectos de la lucha contra insectos*, Mundi-Prensa, España, 13-34.
- Pushpalatha, H. y Muthukrishnan, J. 1995. *Larvicidal activity of a new plant extracts against Culex quinquefasciatus and Anopheles stephensi*, Indian J. Malariol 32 (1), 14-23.



- 
- Ramesh, P., Ramachandran, N.A.G. and Subramanian. 1986. *Flavone Glycosides of Vitex trifolia*, **Fitoterapia**, Vol. LVII, No.4, 282-283.
- Reyes, C.P. 1984. *Diseño de experimentos aplicados*, Ed. Trillas, 3a Ed., México D.F.
- Richardson, P.M. 1992. *The chemistry of the Labiatae: An introduction and overview*, In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 291-297.
- Rimpler, H. 1972. *Iridoids and Ecdysones from Vitex species*, **Phytochemistry**, Vol. 11, 2653-2654.
- Rimpler, H., Winterhalter, C. and Falk, U. 1992. *Cladistic analysis of the subfamily Caryopteridoideae Briq. and related taxa of Verbenaceae and Lamiaceae using morphological and chemical characters*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 39-54.
- Rivera, N., D. and Obón, de C., C. 1992. *The ethnobotany of Labiatae of the Old World*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science* Royal Botanic Gardens Kew, 455-473.
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B. & Cárdenas, J. 1992. *The Distribution of Diterpenoids in Salvia*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens Kew, 335-347.
- Román, R.F. 1998. *Propiedades Insecticidas de Galphimia glauca Cav. (Malpighiaceae), planta utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana*. Tesis Biologo, CEIB, Cuernavaca, Mor. UAEM.
- Romeo, J. and Simmonds, M. 1988. *Nonprotein amino acid feeding deterrents from Calliandra*. *Insecticidas of plants origin*. 5. American Chemical Society, 59-68.
- Romo, de V.A. 1985. *Productos Naturales de la Flora Mexicana*, Ed. Limusa, México.
- Ronald, J.T. and Jacob, L.S. 1979. *The Dose-Response Relation in Pharmacology*, Ed. Springer-Verlag, New-york, USA.
- Russell, R.M., Robertson, J.L. and Savin, N.E. 1977. *A new computer program for probit analysis*. **Bull. Entomol. Soc. Am.** 23, 209-213.
- Rzedowsky, J. 1965. *Relaciones geográficas y posibles orígenes de la flora de México*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 29, 121-177.
- Rzedowsky, J. 1983. *Vegetacion de Mexico*, Ed. Limusa, México.

- Rzedowski, J. 1991. *Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México*, **Acta Botánica Mexicana** 14, 3-21.
- Rzedowsky, J. 1985. *Flora fanerogámica del valle de México*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN(II), 279-280.
- Sahayaraj, K. and Paulraj, M.G. 1998. *Screening the relative toxicity of some plant extracts to Spodoptera litura fab. (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) of groundnut*, Department of Botany, St. Joseph's College, Tamil Nadu, India. **Fresenius Environmental Bulletin**, 7 (9-10), 557-560.
- Said, I.G. y Calderón, A. L. del C. 1980. *Manual de Análisis Probit*, Centro de Estadística y Cálculo, Col. de Postgraduados, Chapingo-México.
- Samy, R.P.; Ignacimuthu, S. and Sen, A. 1998. *Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties*, Entomology Research Institute, Loyola College, Chennai 600 034, India., **Journal of Ethnopharmacology** 62 (2), 173-181.
- Sánchez, M.P.N. 1996. *Compuestos Bioactivos de las Raíces de Stauranthus perforatus*, LIEMB. (Rutaceae), Tesis de Maestría, UNAM, Fac. Química, México D.F.
- Segura, H. M. G. 1996. *La familia Verbenaceae en el Estado de Nayarit*, Tesis de Biología, Fac. de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Sharp, A.J. 1953. *Notes on the flora of México; world distribution of the woody dicotyledonous families and the origin of the modern vegetation*. **Journ. Ecol.** 41, 374-380.
- Simmonds, M.S.J. and Blaney, W.M. 1992. *Labiata-insect interactions: Effects of Labiate-derived compounds on insect behaviour*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens, Kew. 375-392.
- Singh, P. 1977. *Artificial diets for insects, mites and spiders*. Plenum Publishing co. New York.
- Singh, H.N.P.; Prasad, M.M. and Sinha, K.K. 1993. *Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana*, **Letters in Applied Microbiology**, 17 (6), 269-271.
- Sinhg, M.; Khokhar, S.; Malik, S. and Singh, R. 1997. *Evaluation of Neem (Azadirachta indica A. Juss) Extracts against American Bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner)*. **J. Agric. Food Chem.** 45, 3262-3268.
- Sousa, S.M. and Cabrera, C.E.F. 1983. *Listados florísticos de México II. Flora de Quintana Roo*, Inst. de Biol. UNAM, 1-100.
- Species plantarum. 1753. (Vitex trifolia L.) 2:638(as "938").



- Stehr, F.W. 1987. *Immature Insects*, Department of Entomology, Ed. Kendall/Hunt, E.U.
- Steven, M.C. and Russell J.M. 1993. *Bioactive Natural Products*. Detection, Isolation, and Structural Determination, Ed. CRC Press, Florida-E.U.A., Chap.3, 9-57.
- Still, W.C.; Kahn, M. and Mitra, A. J. 1978. *Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution*, **J.Org. Chem.**, **Vol.43**, **No. 14**, 2923-2925.
- Strauss, S.Y. and Agrawal, A.A. 1990. *The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory*,
- Tada, H. and Yasuda, F. 1984. (-)-Viteralone from *Vitex rotundifolia* L. **Heterocycles**, **Vol.22**, **No.10**, 1-5.
- Tallarida, R.J. and Jacob, L.S. 1979. *The Dose-Response Relation in Pharmacology*, Ed. Springer-Verlagv, New York, U.S.A.,
- Téllez, V.O. y Cabrera, C.E.F. 1987. *Listados florísticos de México VI. Flora de la Isla de Cozumel, Quintana Roo*. Inst. de Biología, UNAM.
- Thein, K.; Myint, W.; Myint, M.M.; Aung, S.P.; Khin, M.; Than, A. and Bwin, M. 1995. *Preliminary screening of medicinal plants for biological activity based on inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase*. **Int. J. Pharmacognosy** **33 (4)**, 330-333.
- Van Beek, T.A. and de Groot, A. 1986. *Terpenoid antifeedants, part I*. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 105/12, 513-527.
- Varley, G.C.; Gradwell, G.R. and Hassell, M.P. 1984. *Insect Population Ecology and Analytical Approach*, Blackwell Scientific Publications, Great Britain.
- Vedantham, T.N.C. and Subramanian, S.S. 1976. *Non-flavonoid components of Vitex trifolia*. **Indian J. Pharmacol.** **38 (1)**, 1-13.
- Verpoorte, R. 1998. *Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development*, **Reviews DDT Vol.3**, **No. 5**, 232-238.
- Villar, M.; Ayala, O.; Rodríguez, H. y Lagunas, T. 1990. *Utilización de infusiones y extractos acuosos vegetales en el combate del gusano cogollero del maíz*. **Revista Chapingo**, **No. 67-68**, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Villegas, G.C. 2004. *Estudio fitoquímico y de la actividad insecticida de los metabolitos secundarios de Vitex hemsleyi*, Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, Instituto de Química, UNAM, México.



- 
- Wade, Jr. L.G. 1995. *Organic Chemistry*. 3a Ed., Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, N.Y. USA.
- Wah, S.T. 1993. *Bioactive Natural Products*, Chapter 18: Toxicity testing using the Brine shrimp: *Artemia salina*, Ed. by Press, Inc. USA, 441-456.
- Watanabe, K.; Yoji, T.; Noritada, M. and Hiroyuki, N. 1995. *A new natural mosquito repellent from the leaves of Vitex rotundifolia*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **59(10)**, 1979-1980.
- Whitaker, T.W. and Cutler, H.C. 1966. *Food Plants in a Mexican Market*, **Economic Botany** **20(1)**, 6-16.
- Wilkinson, C. 1976. *Insecticide Biochemistry and Physiology*, Plenum Press, New York, 305-316.
- Wunderlin, R.P. 1998. *Guide to the Vascular Plants of Florida*, Xt.
- Zarucchi, J.L. and Funston, A.M. 2001. *Checklist of the Flora of China Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*.
- Zeng, X.; Fang, Z.; Wu, Y. and Zhang, H. 1996. *Chemical constituents of the fruits of Vitex trifolia L.* **Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih** **21 (3)**, 167-168.
- Zheng-gi, W. and Raven, P. H. 1994. *Flora of China, Verbenaceae through Solanaceae*, Ed. Science Press, **Missouri Botanical Garden, Vol.17**, China and Nort America.

ANEXOS



## # 1

### 14. INGREDIENTES DE LA DIETA:

Harina de soya 71.1gr.  
Germen de trigo 31.7gr.  
Sales Wesson 10.6gr.  
Sacarosa 13.0gr.  
Acido sórbico 1.0gr.  
Methylparaben 1.6gr.  
Formalina (10%) 4.4 mL.  
Cloruro de colina (15%) 7.3 mL.  
Solución vitamínica 3.5 mL.  
Acido ascórbico 4.3 gr.  
Agar 14.0gr.  
Acido acético (25%) 12 mL.

### PREPARACIÓN DE LA DIETA:

En un recipiente de 1L. se disolvió el agar con 500mL. de agua destilada caliente y se agitó para evitar la formación de grumos. La solución de agar se hirvió a fuego lento durante 10 min más. Esta solución de agar se juntó con los demás ingredientes excepto las vitaminas y se licuaron, al mismo tiempo se agregaron 600mL más de agua destilada fría. Por último se agregó la solución vitamínica e inmediatamente la dieta se colocó en un vaso de precipitado para vaciarla en las placas Cell Wells Corning.

## # 2

15. REGISTRO DEL PESO (mg) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LA FRACCION 20 DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Lantana camara*.

	T 1			T 2			T 3			T 4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.5	0.2	0.6	2.4	8.5	4.2	37.5	12.7	40.5	159.0	251.3	249.4	
0.3	0.2	0.3	2.4	9.1	6.3	45.3	42.2	34.0	267.8	370.1	226.6	
0.3	0.4	0.5	9.7	6.6	2.5	50.4	55.9	50.7	324.5	259.1	225.0	
0.4	0.4	0.2	4.2	3.4	6.2	47.4	28.0	62.8	412.4	246.4	362.6	
0.4	0.4	0.3	8.4	3.1	7.1	127.9	31.6	20.9	277.1	143.3	360.6	
0.3	0.2	0.2	8.0	8.1	9.9	57.5	27.3	41.5	432.5	145.9	355.6	
X=0.4	0.3	0.35	5.85	6.5	6.0	61.0	33.0	41.7	312.2	236.0	296.6	

T1, T2, T3, y T4 = Tiempos de registro (cada siete días)

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas ( 100, 300 y 600 ppm)

### # 3

#### 16. REGISTRO DE LA TALLA(mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LA FRACCION 20 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Lantana camara*.

	T 1			T 2			T 3			T 4		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
3	3	3.5	6	8	6	15	10	15	22	28	29	
3	3	2.5	5	9	8	15	16	13	27	31	28	
3	3	3	9	8	6	15	17	15	32	30	27	
3	3.5	3	6	6	7	16	13	17	30	25	26	
3	3	2.5	9	6	8	20	14	12	27	22	25	
3	2	3	9.0	8	10	18	13	15	35	26	27	
X = 3	3	3	7.3	7.5	7.5	16.5	13.8	14.5	28.8	27	27	

T1, T2, T3, y T4 = Tiempos de registro (cada siete días)

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas ( 100, 300 y 600 ppm)

## # 4

17. REGISTRO DEL PESO (gr) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LA FRACCION 16 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex trifolia* var. *variegata*.

	T 1			T 2			T 3			T 4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.5	0.5	0.2	8.9	2.8	5.0	38.7	23.4	36.7	108.7	393.5	313.7	
0.6	0.3	0.5	8.3	3.4	2.1	46.7	36.5	31	169.5	306.1	281.1	
0.3	0.3	0.4	7.6	4.9	6.9	52.6	5.9	41.3	241.5	160.8	211.0	
0.6	0.5	0.3	6.2	5.9	5.4	47.3	22.9	76.8	293.6	376.1	147.5	
0.4	0.4	0.3	4.2	6.7	7.5	32.2	21.1	24.9	366.4	52.4	188.3	
0.5	0.4	0.4	8.6	2.3	8.4	34.7	-	39.8	248.2	256.9	383.8	
X=0.5	0.4	0.35	7.3	4.3	5.9	42.0	18.3	41.7	237.9	257.6	254.3	

T1, T2, T3, y T4 = Tiempos de registro (cada siete días)

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas ( 100, 300 y 600 ppm)

## # 5

### 18. REGISTRO DE LA TALLA (mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LA FRACCION 16 DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Vitex trifolia* var. *variegata*.

	T 1			T 2			T 3			T 4		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
3	3	3	9	7	7	17	12	14	20	35	27	
3	3	3.5	9	7	6	16	15	14	25	32	30	
3	3	3	8	8	8	17	8	17	27	23	25	
4	3	3	8	8	7	18	15	18	30	30	20	
3	3	3	7	8	8	15	12	12	30	20	24	
3.5	3	3	9	5	8	16	-	115	28	30	30	
X = 3	3	3	8.3	7.2	7.3	16.5	12.4	15	26.7	28.3	21.2	

T1, T2, T3, y T4 = Tiempos de registro (cada siete días)

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas ( 100, 300 y 600 ppm)

## # 6

### 19. REGISTRO DEL PESO (gr) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 1.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.5	0.9	0.7	1.1	2.2	2.9	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.8	0.5	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4
0.3	0.4	0.7	0.7	0.6	4.3	0.3	0.5	0.3	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.6	0.3	0.2	0.4
0.5	0.3	0.3	0.1	0.1	3.6	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.3
0.2	0.2	0.3	1.8	1.0	2.6	0.3	0.2	0.2	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.9	0.2	0.4	0.4
0.2	0.4	0.7	1.3	0.5	1.7	0.4	0.2	0.3	0.2	0.4	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4
0.3	0.4	0.3	1.4	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.1	0.2	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0.2	0.4
X=0.3	0.4	0.5	1.1	0.8	2.55	0.35	0.35	0.3	0.4	0.4	0.45	0.4	0.40	0.5	0.3	0.3	0.4

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
0.6	1.0	3.1	1.8	2.1	1.8	1.7	2.5	1.6	1.9	2.2	2.3	2.1	0.4	2.7	2.3
2.5	1.6	0.3	3.3	0.5	1.1	0.1	1.5	4.5	1.9	0.8	0.9	2.3	1.7	2.1	0.7
3.4	1.8	2.4	0.1	2.3	2.0	2.4	0.5	1.6	2.6	1.6	3.1	0.4	2.6	1.0	2.3
3.4	2.5	2.2	1.1	2.5	0.3	5.5	1.8	2.8	1.4	3.0	1.6	1.8	2.1	2.7	1.3
0.9	2.2	2.2	1.4	2.9	1.9	0.9	2.0	0.9	2.3	2.8	2.2	3.6	0.6	4.0	2.6
2.0	1.8	1.6	2.3	2.1	1.0	4.4	2.1	1.2	1.9	1.4	2.2	2.3	2.5	1.8	0.7
X=2.1	1.8	1.9	1.7	2.1	1.35	2.5	1.7	2.1	1.95	1.97	2.05	2.1	1.65	2.8	1.65

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 7

20. REGISTRO DEL PESO (gr) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 2.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
6.3	8.7	5.4	50.5	7.3	59.4	7.3	10.6	9.9	4.0	10.4	5.8	9.1	9.9	0.9	1.3	6.3	7.5
2.7	3.4	6.5	30.0	41.3	26.4	11.1	8.2	0.6	10.2	5.2	5.5	6.3	0.9	3.9	2.0	5.9	5.7
6.9	8.1	5.9	8.6	48.7	57.3	3.4	9.5	3.1	2.1	4.6	3.9	6.6	1.3	10.8	2.8	7.9	2.7
3.5	1.8	3.9	26.7	8.3	49.8	3.1	5.6	11.8	11.9	13.4	2.5	3.6	3.2	1.8	2.9	3.7	5.8
7.6	2.1	3.0	39.6	6.6	44.5	7.8	0.9	2.7	4.3	3.3	7.8	4.2	10.7	6.3	7.6	2.7	8.5
2.6	3.8	2.6	9.0	2.8	19.0	2.3	10.0	12.8	2.5	1.5	2.7	0.7	6.4	1.3	5.4	5.7	8.7
X=4.9	4.65	4.55	27.4	19.2	42.7	5.8	8.9	6.8	5.8	6.40	4.7	5.1	5.4	4.2	3.75	5.4	6.5

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
55.6	28.9	21.5	4.6	62.1	26.9	26.5	45.8	14.4	49.8	35	4.1	19.7	25.8	48.2	40.3
26.1	10.9	27.5	1.9	96.7	56.4	8.9	26.4	42.7	50.2	7.4	11.3	22.1	16.4	41.2	1.4
42.0	55.0	36.6	29.5	45.0	46.6	34.4	37.4	20.3	69.3	48.7	10.0	40.9	11.1	30.5	55.8
11.8	4.6	11.1	84.5	41.1	6.2	3.2	11.6	47.4	12.5	26.8	27.7	28.9	16.9	65.1	4.4
6.4	21.7	18.3	6.1	15.6	4.7	51.6	4.3	37.1	17.2	35.4	22.9	34.6	37.0	21.6	28.9
45.6	28.8	7.8	22.6	30.0	64.3	15.2	40.5	2.6	2.8	9.1	18.2	-	7.7	34.7	44.6
X=31.25	24.9	20.5	24.8	48.4	34.18	23.3	27.7	27.4	348.5	27.1	15.7	24.4	19.15	40.2	29.2

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 8

21.REGISTRO DEL PESO (gr) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 3.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
27.5	35.5	21.9	397.7	330.4	268.8	17.0	27.0	33.5	13.8	87.8	37.5	18.1	34.7	68.7	49.2	67.9	53.7
24.2	24.1	34.7	242.2	52.1	235.3	45.0	50.5	38.0	37.3	29.5	27.6	33.0	26.3	73.8	38.2	51.4	27.9
46.0	60.6	27.3	154.0	346.1	151.3	43.8	38.8	41.6	24.4	45.7	42.4	50.4	30.8	37.7	50.4	64.8	29.4
29.5	26.5	44.5	166.5	328.4	312.8	35.8	42.9	16.3	45.2	28.8	34.8	31.5	86.8	39.3	49.3	44.8	36.4
16.4	19.6	21.5	308.5	363.7	83.5	25.9	41.2	75.2	59.0	43.1	20.8	30.1	40.6	5.6	43.5	25.8	40.2
13.2	16.2	29.3	319.3	166.2	170.2	17.8	5.7	42.6	20.4	16.2	40.9	55.5	54.5	80.6	8.0	80.0	15.2

X = 26.1      30.4      29.9      264.7      264.5      203.7      30.9      34.4      41.2      33.35      41.85      34.0      36.4      45.6      50.95      39.8      55.8      33.8

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
320.5	274.6	347.5	335.5	387.3	164.8	62.6	378.3	428.5	431.1	286.6	214.9	286.9	148.3	362.9	132.2
284.6	403.2	332.0	14.2	373.0	28.7	279.6	408.4	362.1	292.8	397.3	136.1	404.8	35.2	355.0	117.8
286.8	271.8	323.1	268.0	479.6	289.4	291.2	311.1	202.5	397.9	116.1	245.8	352.4	160.4	262.0	82.3
134.8	378.0	377.1	120.0	257.0	292.2	373.5	239.4	324.9	257.6	110.9	51.9	539.8	100.8	429.0	120.9
369.2	72.1	462.4	435.8	232.1	431.1	212.8	132.9	208.9	306.1	64.9	42.5	375.4	36.3	129.5	137.6
373.2	148.8	347.6	73.8	362.5	84.7	72.3	62.5	176.0	405.4	133.8	130.2	338.3	28.6	410.4	61.7

X=294.85      258.1      365.0      207.9      348.6      215.2      215.3      255.4      283.8      348.5      184.9      136.9      382.9      84.93      324.8      108.75

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 9

### 22. REGISTRO DEL PESO (gr) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 4.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
270.3	117.1	400	334.4	420	380.2	316.0	237.5	439.7	225.9	445.5	171.2	158.6	110.0	341.8	178.2	227.7	172.9
121.3	111.3	114.1	342.2	274.7	447.3	246.6	232.3	459.0	147.8	106.8	222.3	164.4	166.5	230.4	145.9	73.1	233.6
371.2	427.3	78.9	390.4	374.1	468.7	162.6	378.8	315.8	247.6	279.1	119.4	110.1	222.4	296.6	406.9	397.6	116.7
103.3	154.5	185.9	281.2	173.3	431.6	103.1	323.9	199.1	177.3	221.2	314.2	244.7	162.4	350.9	223.3	217.9	103.3
250	81.4	65.5	367.2	325.9	251.4	216.2	324.0	259.6	146.2	180.0	322.5	371.1	339.0	360.3	328.3	73.3	176.3
335.5	315.3	159.8	314.1	111.6	317.2	132.2	91.5	147.6	200.0	92.0	353.1	126.5	375.7	282.6	345.7	254.8	96.2
X=241.9	201.15	167.4	338.3	279.9	382.7	196.1	264.7	303.5	190.8	220.80	250.45	195.9	229.3	310.4	271.4	207.4	149.8

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
259.5	277.5	331.4	401.7	386.2	236.9	296.9	137.2	391.2	272.3	391.7	390.3	266.5	80.0	298.6	411.7
362.8	397.2	276.6	321.5	415.7	195.0	306.8	345.8	436.4	230.1	588.1	369.8	259.1	90.5	386.0	447.0
288.6	392.8	332.9	271.5	494.5	96.7	435.4	230.7	374.1	160.7	304.0	153.7	243.6	123.9	297.7	423.7
421.6	413.5	314.5	233.3	85.8	215.5	118.1	138.0	111.0	510.0	177.9	131.5	364.8	359.1	429.3	280.3
408.4	260.6	281.3	74.6	513.5	285.8	109.1	391.8	95.5	151.1	307.2	103.6	413.1	251.9	422.5	337.8
364.1	56.8	279.7	406.3	245.3	253.2	170.9	258.7	115.1	215.8	265.8	341.1	304.1	300.1	268.9	107.3
X=350.8	299.7	302.7	284.8	356.8	213.80	239.5	250.4	253.9	256.7	339.1	248.3	308.5	200.9	350.5	334.6

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 10

## # 10

### 23. REGISTRO DE LA TALLA (mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO1.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3.5	4.0	4.0	4.0	5.0	6.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.5	3.5	3.0	2.5	3.0	3.0
3.5	2.5	4.0	4.0	3.0	7.0	3.0	3.5	3.0	3.5	3.5	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	3.0	3.0
3.5	3.0	3.0	3.0	2.0	6.0	3.0	3.0	3.5	3.0	3.0	2.5	2.5	3.0	3.0	2.5	2.0	3.0
3.0	3.0	3.0	5.0	4.0	5.0	2.5	3.0	3.0	2.5	3.5	3.0	3.5	3.5	4.0	3.0	3.0	3.0
2.5	3.0	4.0	5.0	4.0	5.0	3.0	2.5	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.0	3.0
3.0	3.5	3.0	5.0	3.0	3.0	3.0	2.5	3.0	2.0	2.5	3.5	3.5	3.5	3.0	2.1	3.0	3.0

X=3.0    3.0    3.5    4.3    3.5    5.3    3.0    3.0    3.0    3.0    3.0    3.0    3.0    3.3    3.3    3.0    3.0    3.0

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
3.0	5.0	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	6.0	5.0	5.0	5.0	6.0	5.0	4.0	6.0	5
5.0	5.0	3.0	7.0	3.0	4.0	3.0	5.0	6.0	5.0	4.0	4.0	5.0	5.0	5.0	4
6.0	6.0	6.0	3.0	5.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	6.0	3.0	6.0	4.0	5
6.0	6.0	5.0	4.0	6.0	2.0	7.0	5.0	5.0	5.0	6.0	5.0	5.0	6.0	6.0	5
4.0	6.0	5.0	5.0	6.0	5.0	4.0	5.0	4.0	6.0	6.0	5.0	6.0	4.0	7.0	6
5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	6.0	5.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4

X=4.8    5.5    5.0    4.8    5.0    4.20    5.0    5.0    5.0    5.2    5.0    5.2    4.8    5.0    5.5    4

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 11

### 24. REGISTRO DE LA TALLA (mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 2.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
7.0	9.0	7.0	15.0	7.0	15.0	7.0	8.0	8.0	7.0	9.0	8.0	9.0	10.0	4.0	5.0	9.0	9.0
6.0	6.0	8.0	12.0	15.0	12.0	9.0	8.0	3.0	10.0	7.0	8.0	8.0	5.0	7.0	6.0	9.0	7.0
8.0	8.0	9.0	8.0	15.0	15.0	6.0	9.0	7.0	5.0	8.0	7.0	8.0	5.0	10.0	0.6	8.0	6.0
6.0	5.0	6.0	13.0	8.0	16.0	6.0	7.0	10.0	10.0	10	6.0	7.0	7.0	5.0	6.0	7.0	7.0
7.0	6.0	6.0	15.0	7.0	14.0	8.0	5.0	6.0	6.0	6.0	9.0	7.0	10.0	8.0	9.0	6.0	9.0
6.0	7.0	6.0	8.0	6.0	10.0	6.0	9.0	9.0	6.0	5.0	6.0	3.0	8.0	5.0	7.0	8.0	9.0
X=6.7	6.8	7.0	11.8	9.7	13.7	7.0	7.7	7.2	7.3	7.5	7.3	6.9	7.5	6.5	5.6	7.8	7.8

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
15.0	13.0	12.0	8.0	17.0	2.0	11.0	15.0	12.0	14.0	14.0	6.0	11.0	13.0	14.0	14
12.0	9.0	10.0	5.0	17.0	15.0	8.0	13.0	13.0	15.0	8.0	8.0	11.0	11.0	15.0	5
15.0	15.0	14.0	13.0	15.0	14.0	14.0	13.0	11.0	17.0	13.0	10.0	13.0	10.0	13.0	15
10.0	6.0	9.0	18.0	14.0	7.0	6.0	8.0	14.0	10.0	11.0	12.0	10.0	12.0	15.0	6
8.0	11.0	11.0	7.0	10.0	7.0	15.0	6.0	13.0	11.0	13.0	12.0	12.0	13.0	11.0	13
15.0	13.0	8.0	11.0	13.0	17.0	10.0	14.0	5.0	6.0	8.0	11.0	-	8.0	13.0	15
X=12.5	11.2	10.7	10.3	14.3	10.30	10.7	11.5	11.3	12.2	11.2	9.8	9.5	11.2	13.5	11.3

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

## # 12

### 25. REGISTRO DE LA TALLA (mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 3.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12.0	14.0	13.0	25.0	27.0	20.0	13.0	14.0	15.0	11.0	18.0	13.0	12.0	13.0	17.0	18.0	18.0	17.0
13.0	13.0	14.0	23.0	15.0	25.0	15.0	17.0	14.0	14.0	13.0	12.0	14.0	13.0	18.0	15.0	15.0	13.0
15.0	17.0	14.0	18.0	30.0	20.0	15.0	15.0	15.0	13.0	14.0	16.0	14.0	13.0	13.0	16.0	17.0	14.0
15.0	13.0	15.0	20.0	25.0	28.0	14.0	14.0	11.0	15.0	14.0	14.0	13.0	18.0	15.0	15.0	16.0	15.0
12.0	11.0	16.0	28.0	28.0	17.0	12.0	12.0	16.0	16.0	17.0	12.0	13.0	15.0	8.0	14.0	13.0	16.0
10.0	13.0	14.0	23.0	20.0	20.0	13.0	7.0	17.0	12.0	11.0	15.0	15.0	16.0	18.0	8.0	15.0	11.0
X=12.8	13.5	14.3	22.8	24.2	21.7	13.7	13.2	14.7	13.5	14.5	13.7	13.5	14.7	14.8	14.3	15.7	14.3

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
25.0	28.0	25.0	30.0	30.0	20.0	15.0	30.0	30.0	30.0	30.0	25.0	28.0	20.0	25.0	15
28.0	30.0	30.0	12.0	30.0	14.0	25.0	28.0	25.0	25.0	29.0	20.0	29.0	15.0	28.0	17
29.0	25.0	25.0	20.0	31.0	28.0	26.0	27.0	25.0	25.0	20.0	26.0	25.0	20.0	26.0	18
20.0	28.0	25.0	20.0	28.0	25.0	25.0	25.0	28.0	28.0	18.0	16.0	28.0	22.0	30.0	18
25.0	15.0	30.0	25.0	25.0	30.0	30.0	20.0	20.0	27.0	17.0	15.0	25.0	13.0	20.0	20
24.0	20.0	26.0	17.0	30.0	16.0	18.0	18.0	22.0	30.0	22.0	20.0	24.0	14.0	30.0	15
X=25.2	24.3	26.8	20.7	29.0	22.2	23.2	24.7	25.0	22.7	22.7	20.3	26.5	17.3	26.5	17.2

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)

### # 13

#### 26. REGISTRO DE LA TALLA (mm) DE LARVAS *Spodoptera frugiperda* CON LAS FRACCIONES 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 y 15 DEL EXTRACTO ACETONICO DE *Vitex hemsleyi* EN EL TIEMPO 4.

Vh F1			Vh F2			Vh F3			Vh F4			Vh F5			Vh F6		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
28.0	20.0	30.0	28.0	28.0	29.0	27.0	28.0	35.0	27.0	32.0	25.0	25.0	22.0	27.0	25.0	25.0	25.0
20.0	22.0	20.0	26.0	25.0	28.0	30.0	27.0	34.0	20.0	20.0	23.0	25.0	23.0	28.0	25.0	15.0	27.0
30.0	30.0	18.0	28.0	28.0	29.0	25.0	33.0	28.0	27.0	25.0	20.0	19.0	25.0	30.0	37.0	30.0	20.0
20.0	24.0	27.0	26.0	20.0	28.0	20.0	30.0	25.0	25.0	25.0	30.0	26.0	25.0	30.0	30.0	25.0	20.0
28.0	20.0	15.0	28.0	26.0	24.0	25.0	32.0	28.0	21.0	27.0	30.0	30.0	30.0	30.0	28.0	20.0	23.0
31.0	33.0	32.0	25.0	18.0	27.0	25.0	22.0	20.0	26.0	21.0	30.0	20.0	39.0	30.0	33.0	28.0	20.0
X=26.2	24.8	23.7	26.8	24.2	27.5	25.3	28.7	28.3	24.3	25.0	26.3	24.2	27.3	29.2	29.7	23.8	22.5

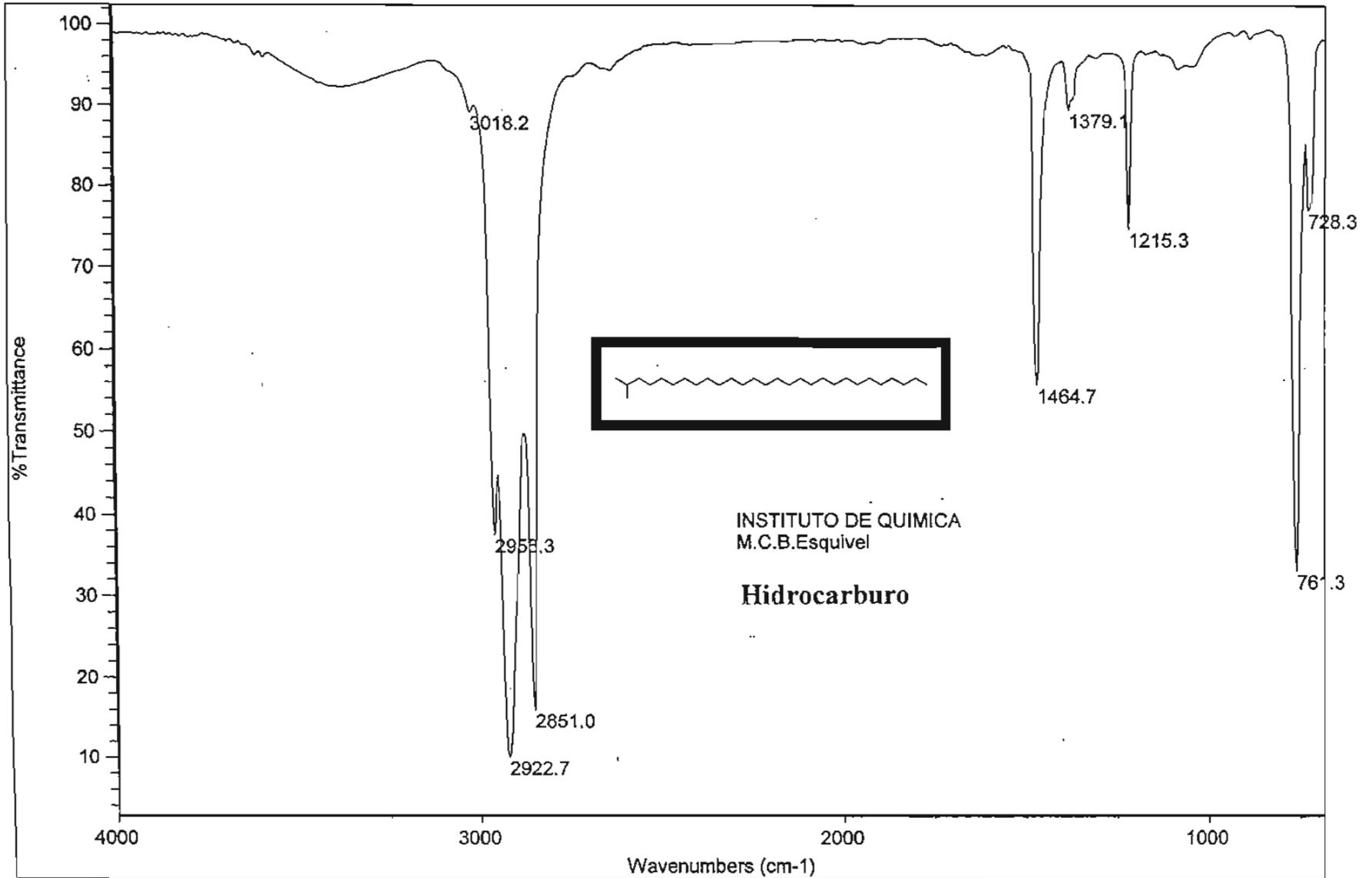
  

Vh F7			Vh F10			Vh F11			Vh F13			Vh F15			Control
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
30.0	20.0	26.0	26.0	29.0	24.0	25.0	22.0	30.0	28.0	28.0	28.0	27.0	17.0	28.0	30
38.0	30.0	25.0	25.0	30.0	23.0	27.0	30.0	27.0	17.0	30.0	29.0	23.0	18.0	30.0	33
27.0	29.0	20.0	29.0	31.0	18.0	28.0	25.0	28.0	21.0	26.0	25.0	25.0	20.0	25.0	32
30.0	29.0	28.0	25.0	18.0	20.0	23.0	23.0	20.0	30.0	24.0	22.0	28.0	27.0	33.0	28
30.0	24.0	25.0	20.0	32.0	24.0	20.0	25.0	20.0	23.0	27.0	18.0	31.0	22.0	31.0	30
30.0	15.0	27.0	30.0	27.0	23.0	23.0	25.0	22.0	25.0	28.0	30.0	20.0	28.0	20.0	20
X=30.8	24.5	25.2	25.8	27.8	22.0	24.3	25.0	24.5	24.0	27.2	25.3	25.7	22.0	27.8	28.8

1, 2, 3 = Concentraciones aplicadas (100, 300 y 600 ppm)



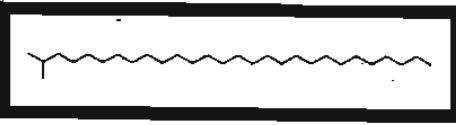
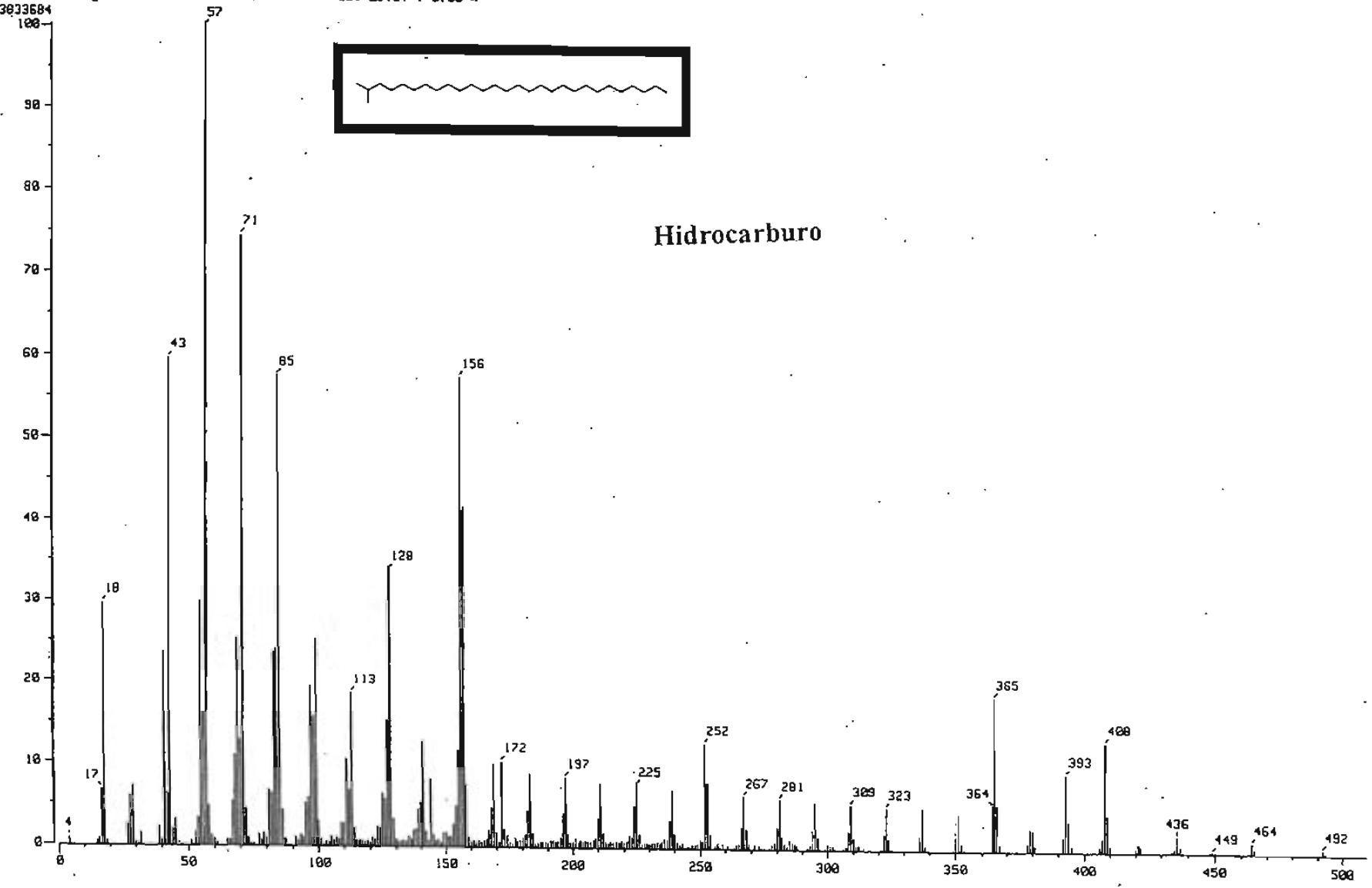
Instituto de Química, UNAM



**Espectro No. 1**

**Espectro de Infra rojo**

[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr-Exquivel-Baldomero-061 Date : 18-Apr 11:50  
Sample:  
Note : Javier-Perez  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
RT : 1.15 min Scan# : (20,59)-(16,29) Temp : 91.2 deg.C  
BP : m/z 57.0000 Int. : 364.56  
Output m/z range : 0.0000 to 509.1988 Cut Level : 0.00 %



Hidrocarburo

Espectro de Masas

Espectro No. 2

Mass Spectrum

Data : Dr-Esquivel-Baldomero-709 Date : 10-Dec-103 13:21

Sample: 101203-02 Hidro-2

Note : Javier-Perez

Inlet : GC

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 20.42 min Scan# : (1670,1671)

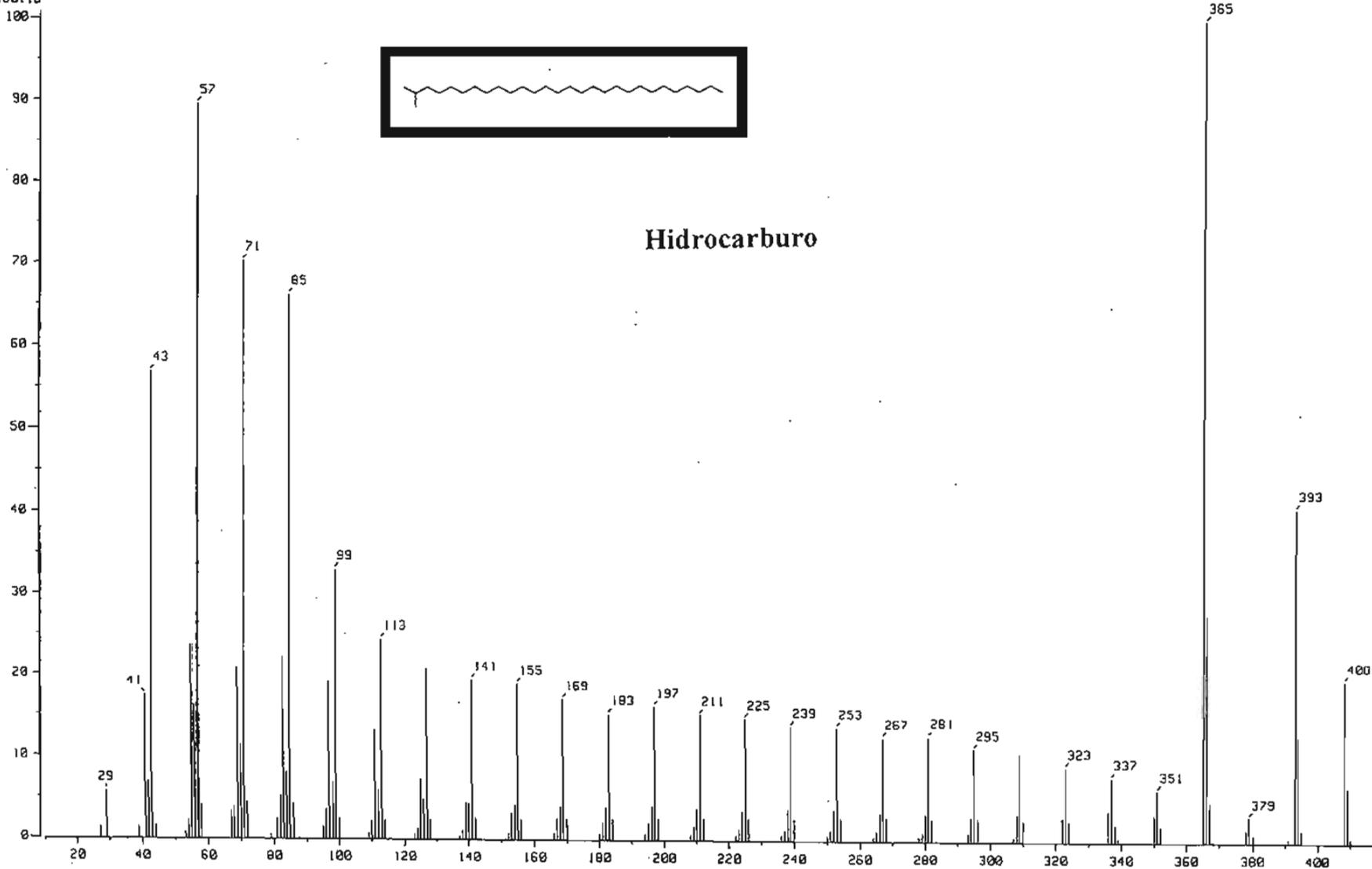
Temp : 0.0 deg.C

BP : m/z 365.0000 Int. : 234.00

Output m/z range : 10.0000 to 418.5757

Cut Level : 0.00 %

2480110



Hidrocarburo

Espectro de Masas

Espectro No. 2<sup>a</sup>

[ Mass Library Spectrum ]

Library Database : Public/NIST

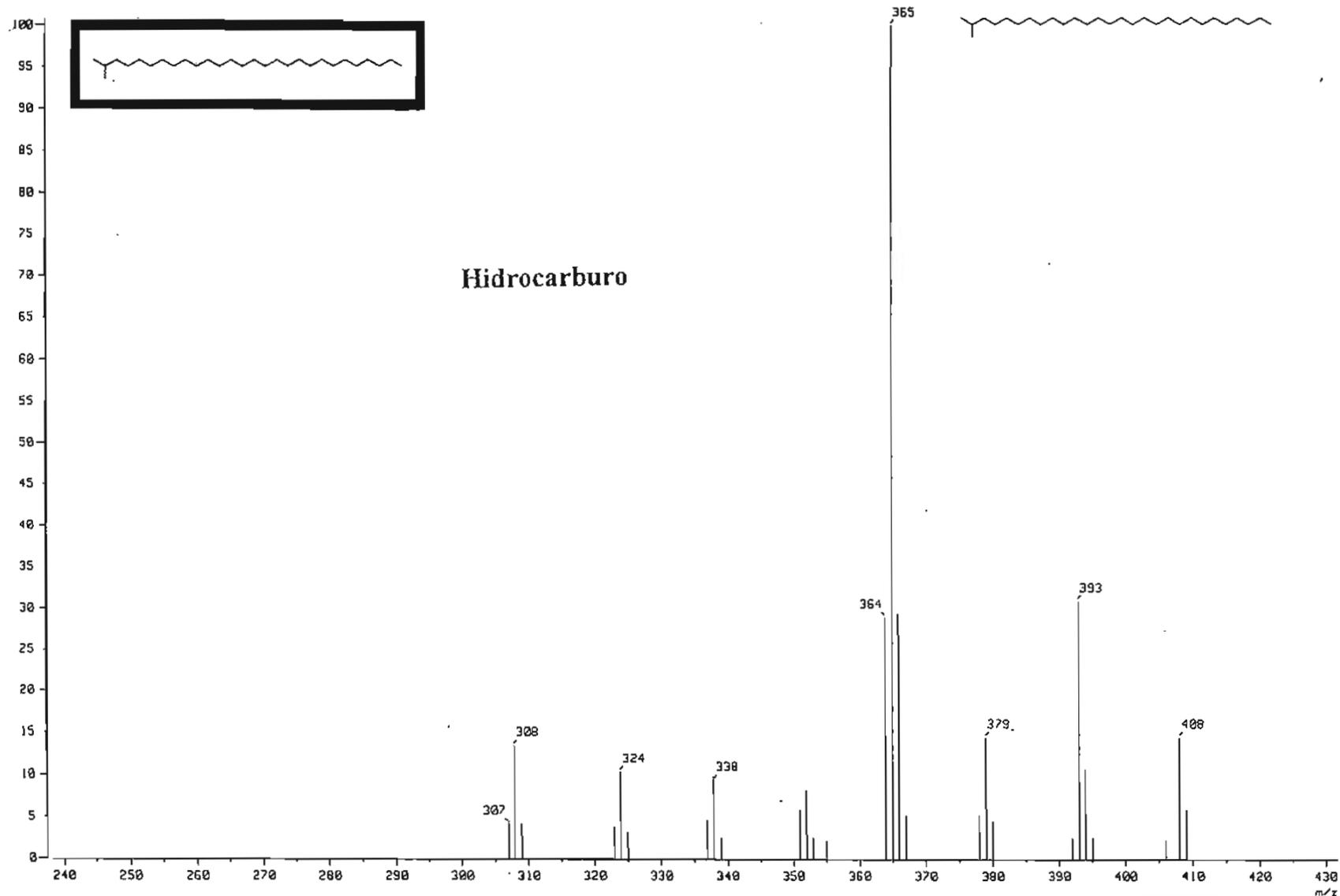
Entry No. : 43835

Name : Octacosane, 2-methyl-

MW : 408 BP : m/z 365.0 Formula : C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>

CAS No. : 1568-98-1 EPA No. : 17122 R. Index :

Inlet Type : Note : T67 4876



Hidrocarburo

Espectro de Masas

Espectro No. 2b

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, spg

M. C. Baldomero Esquivel

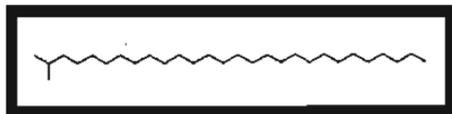
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>

Hidrogeno-1

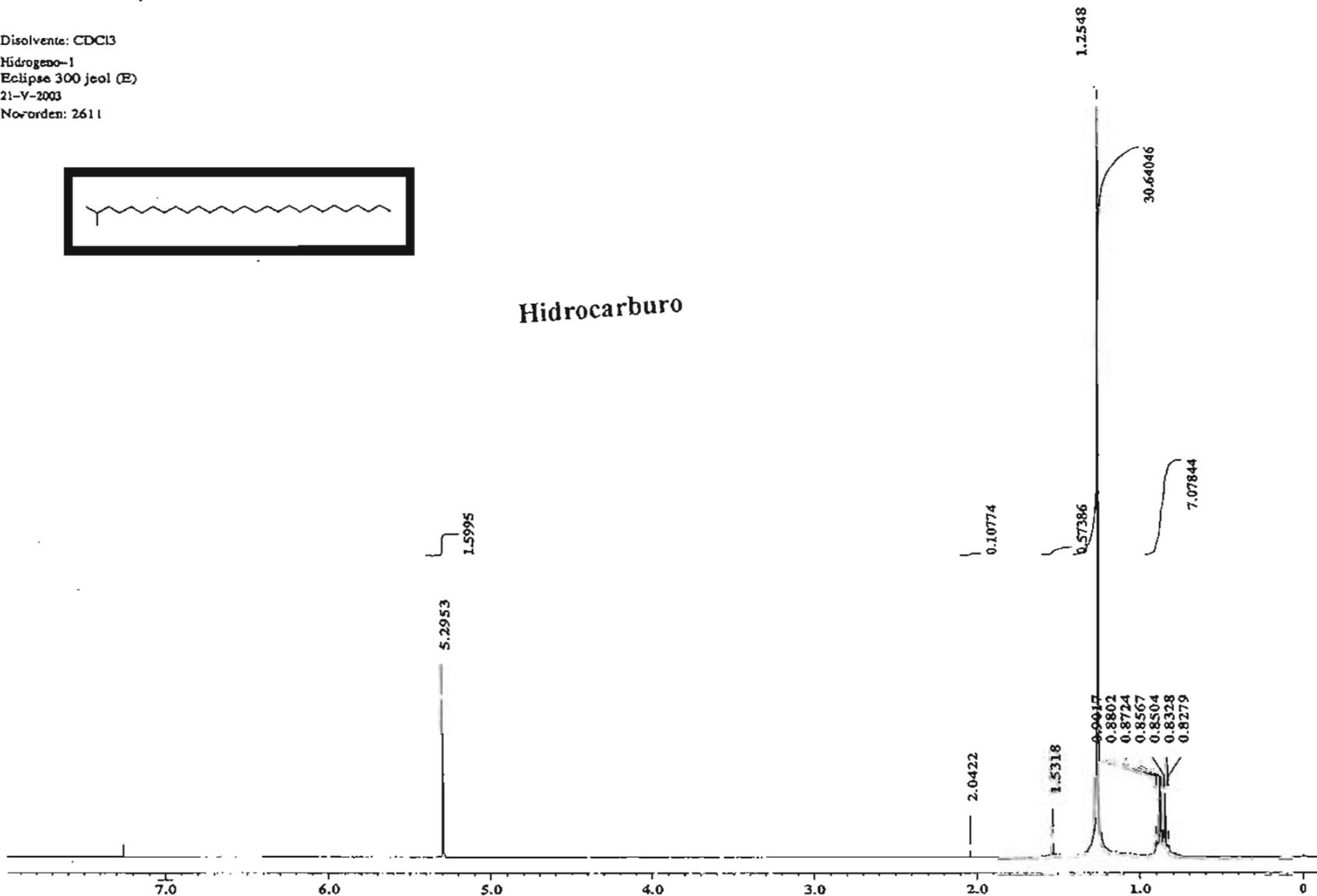
Eclipse 300 jeol (E)

21-V-2003

Noorden: 2611

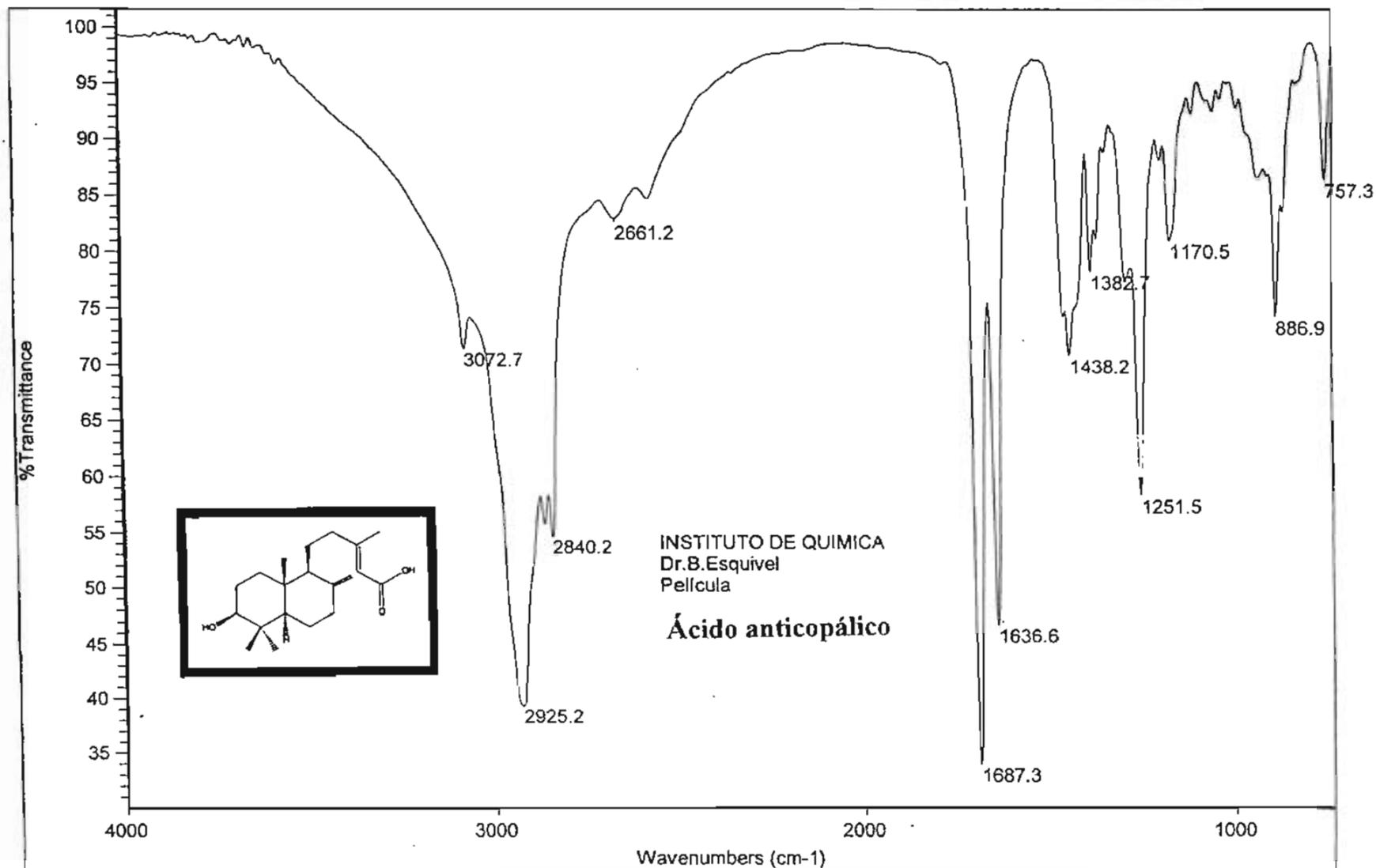


Hidrocarburo



**Espectro No. 3**

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

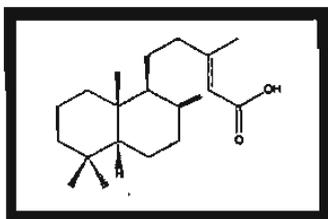


Espectro de Infra-rojo

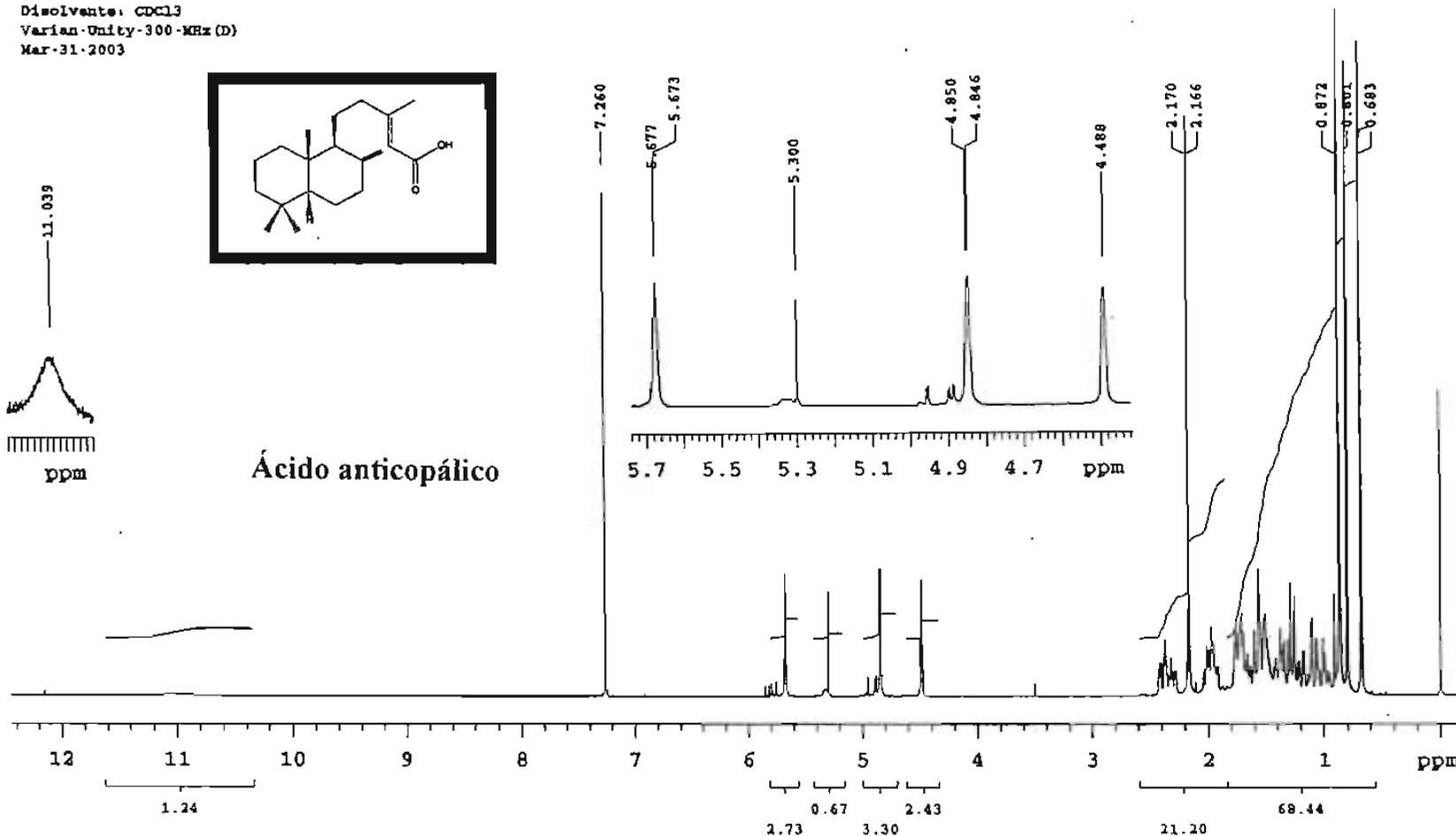
Espectro No. 4

Instituto de Química, UNAM HR  
Dr. B. Esquivel/

Experimento: Hidrogeno  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Varian Unity-300-MHz (D)  
Mar-31-2003



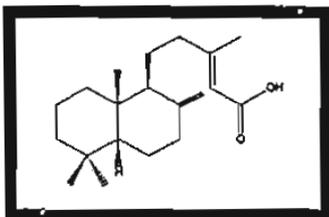
Ácido anticopálico



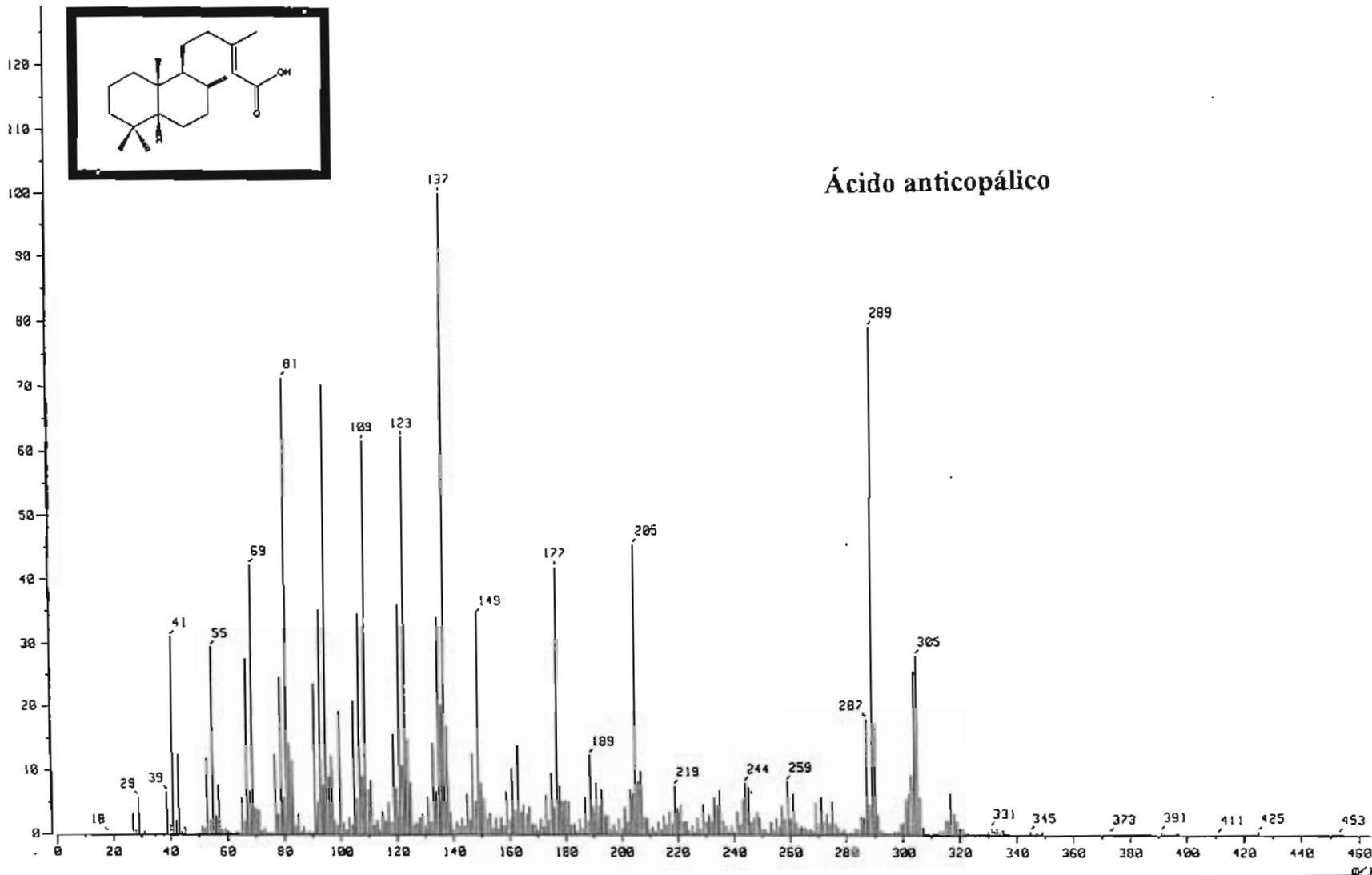
Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

Espectro No. 5

Mass Spectrum  
Data : Dr-Baldomero-Esquivel1804 Date : 05-Dec-10 11:49  
Sample: 841203-05 Ac-copa  
Note : Luis-Velasco  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
RT : 0.84 min Scan# : (17,24) Temp : 233.6 deg.C  
BP : m/z 137.0000 Int. : 1207.00  
Output m/z range : 0.0000 to 465.2819 Cut Level : 0.00 %  
16350841

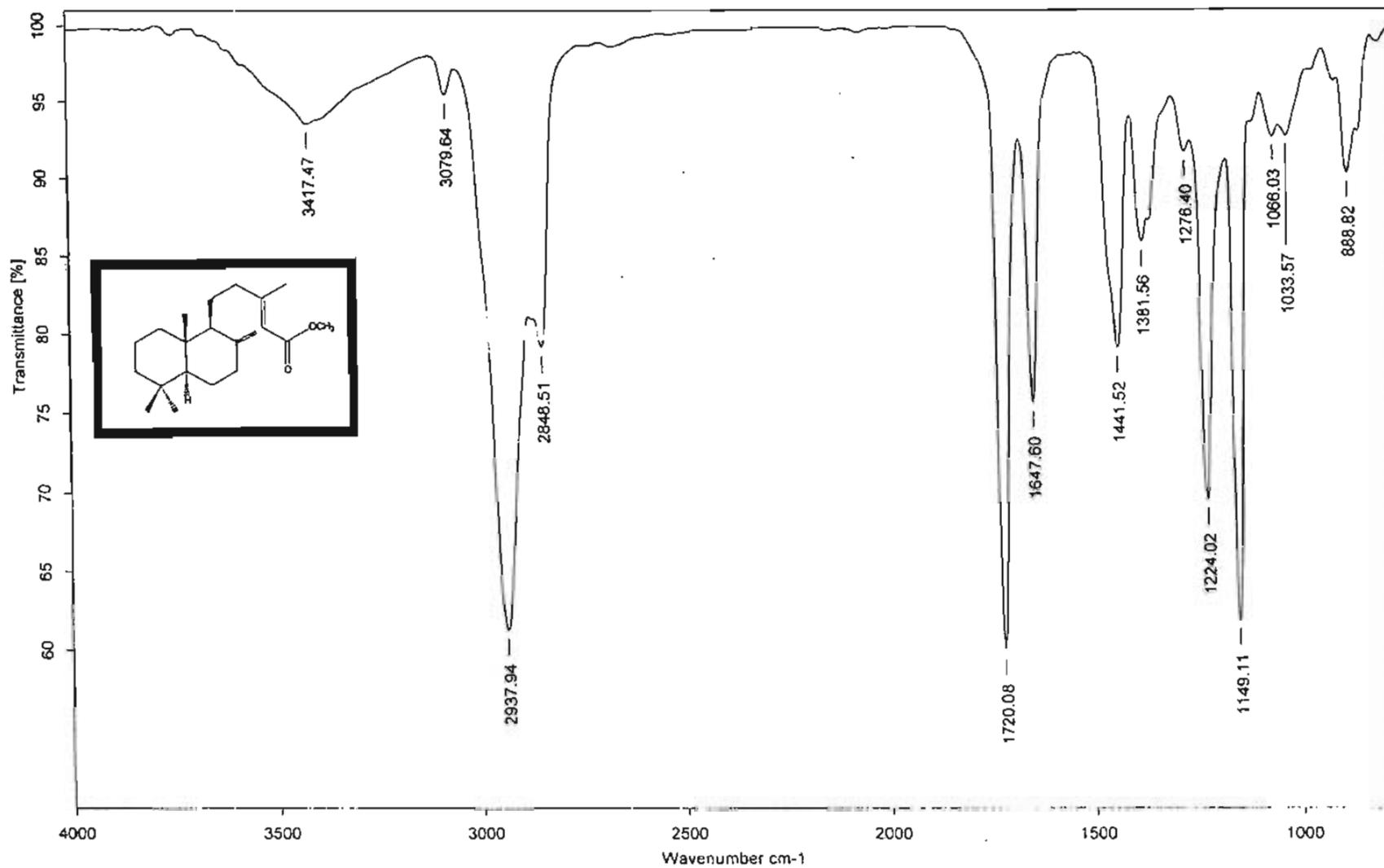


### Ácido anticopálico



Espectro de Masas

Espectro No. 5



C:\infrarrojo\AIR-2003\2475.0

M.C.B.Esquivel Prep-16-1

Película

MAB

09/09/2003

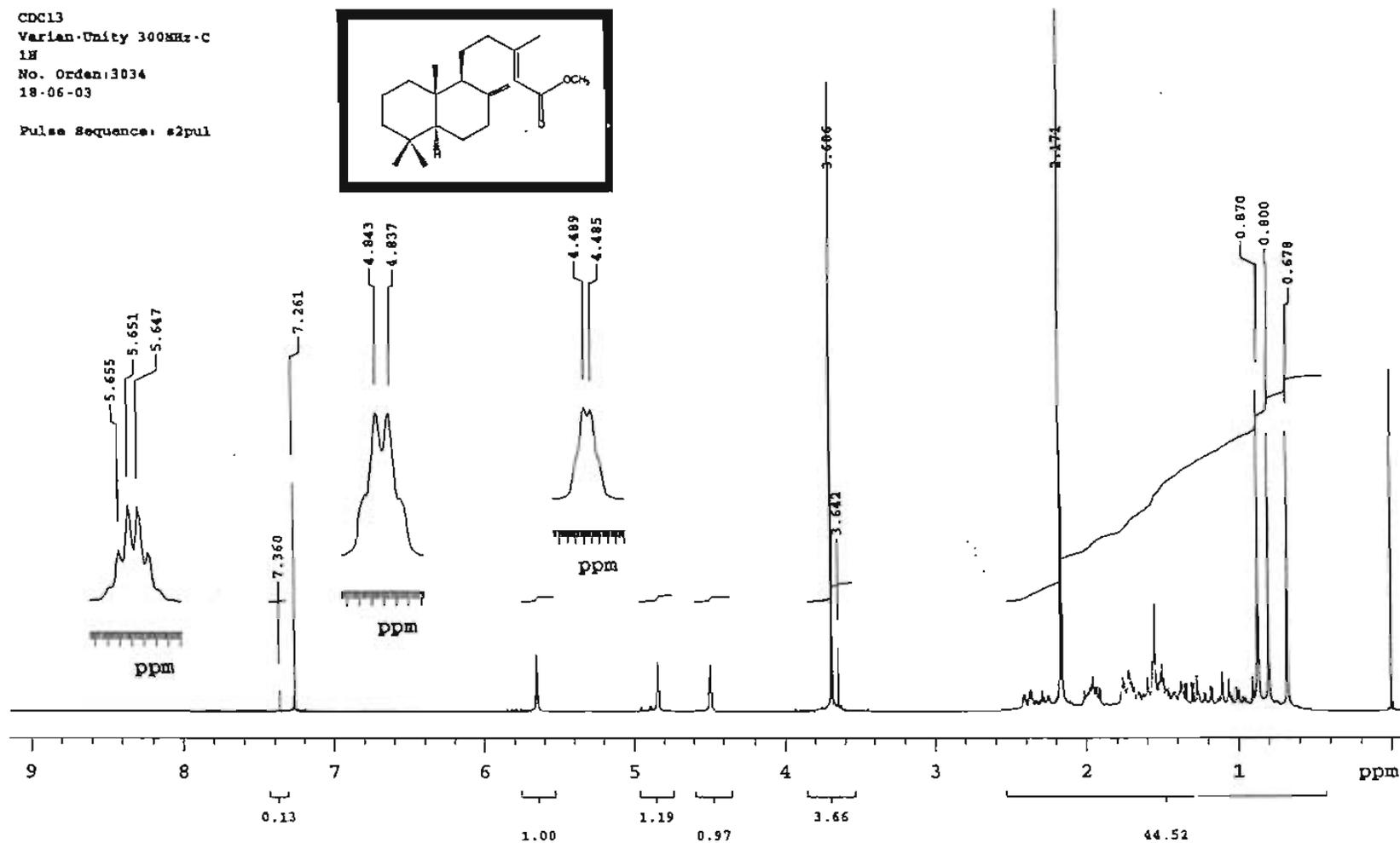
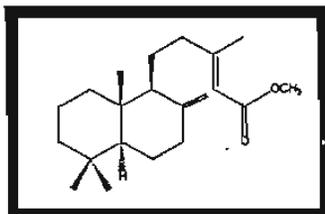
Espectro de Infra rojo

Espectro No. 6

Instituto de Química UNAM MZ  
M.C. Baldomero Esquivel

CDC13  
Varian-Unity 300MHz-C  
1H  
No. Orden: 3034  
18-06-03

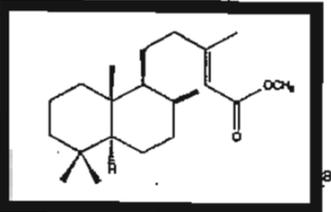
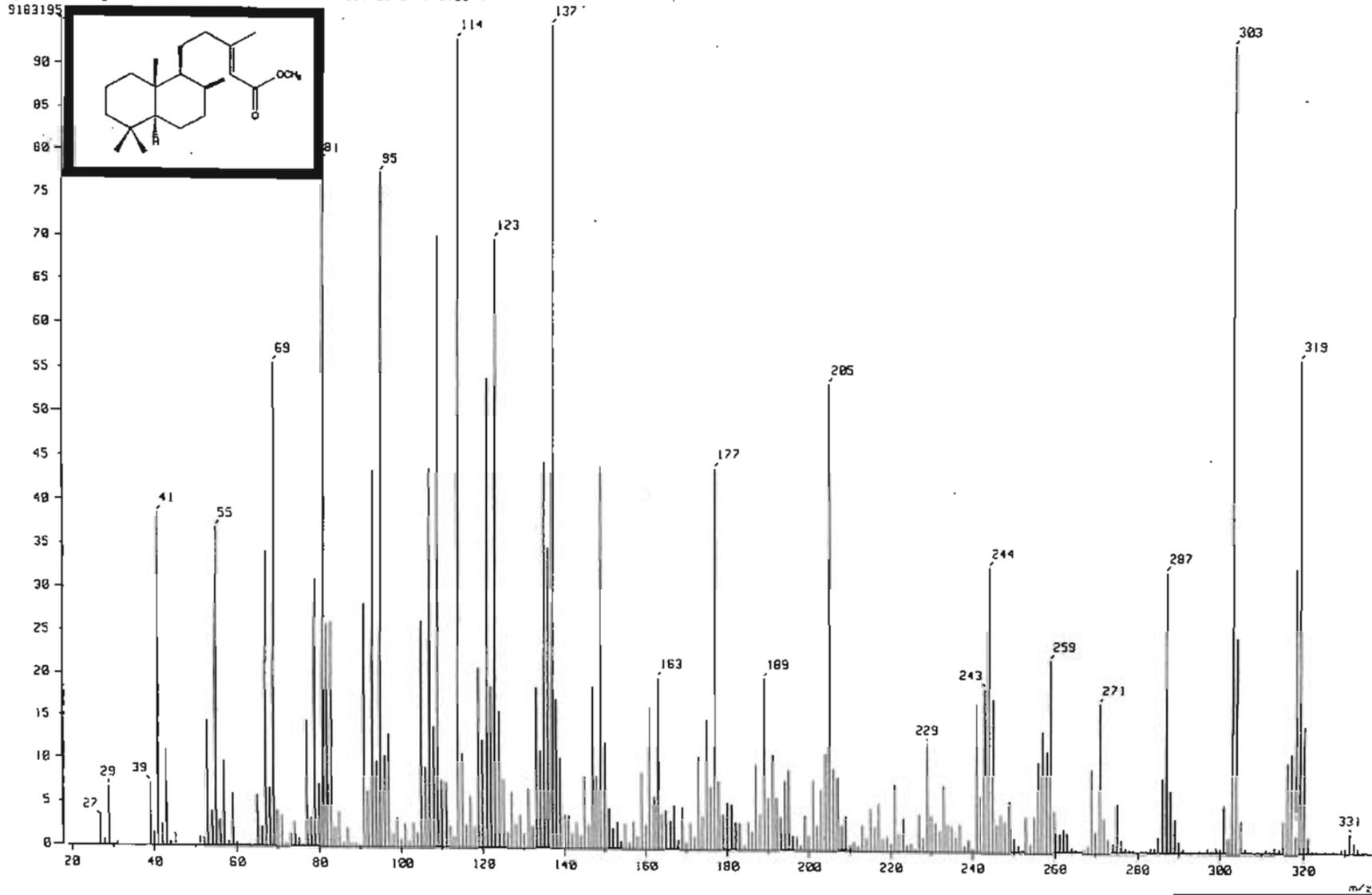
Pulse Sequence: s2pul



Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

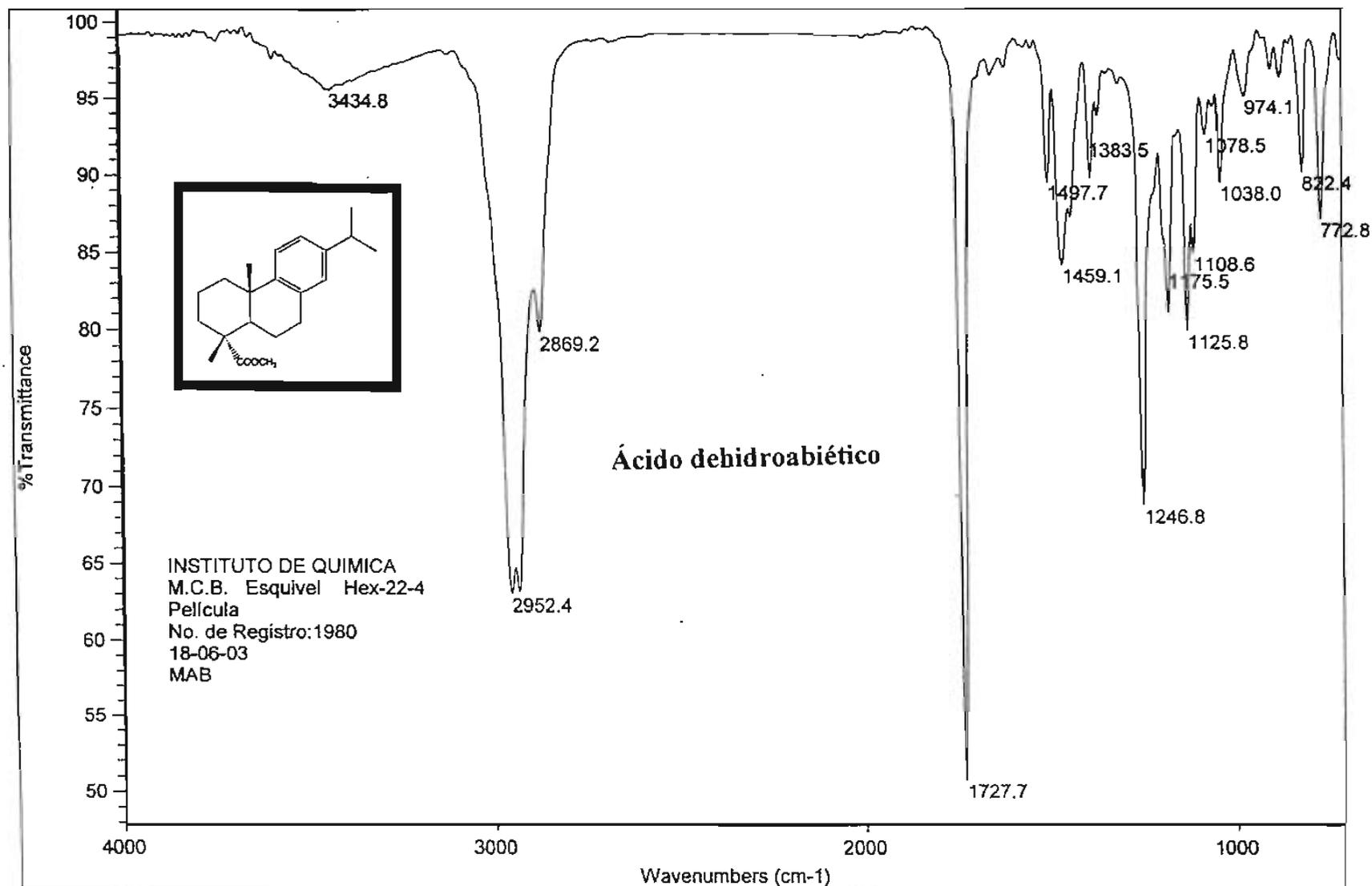
Espectro No. 7

Mass Spectrum  
Data: D-Baldomero-Esquivel(1) Date: 12-Nov-10 09:23  
Sample: 121103-09 Hg-COPR  
Note: Luis-Velasco-I  
Inlet: Direct Ion Mode: EI+  
Spectrum Type: Normal Ion [M<sup>+</sup>-Linear]  
RT: 1.10 min Scan#: (27,34) Temp: 246.9 deg.C  
BP: m/z 137.0000 Int.: 926.66  
Output m/z range: 19.0000 to 336.4985 Cut Level: 0.00 %



Espectro No. 8

Espectro de Masas



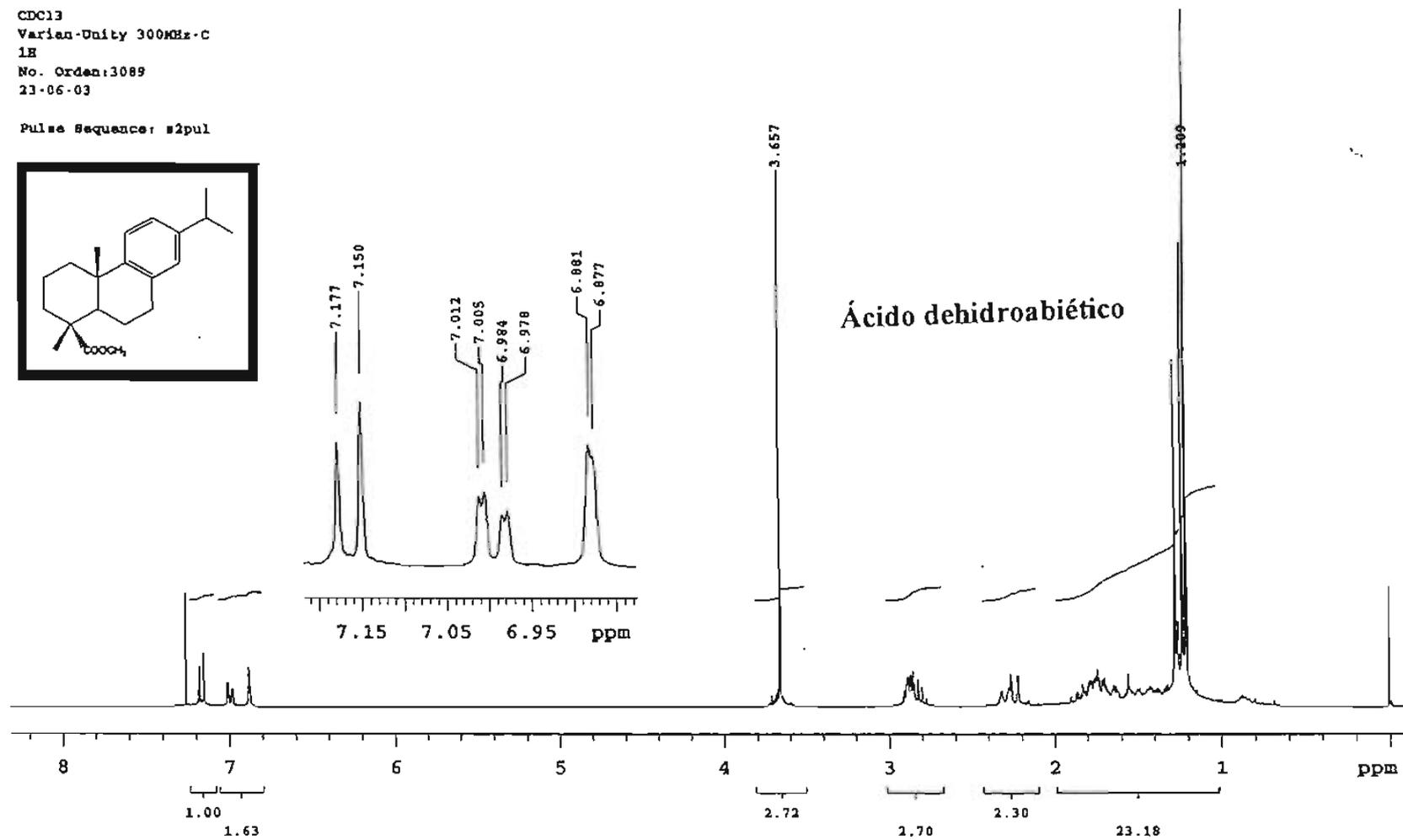
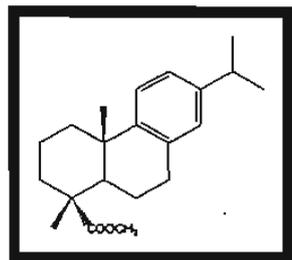
**Espectro No. 9**

Espectro de Infra rojo

Instituto da Química UNAM N2  
M.C. Baldomero Esquivel/

CDC13  
Varian-Unity 300MHz-C  
1H  
No. Orden:3089  
21-06-03

Pulse Sequence: s2pul



Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

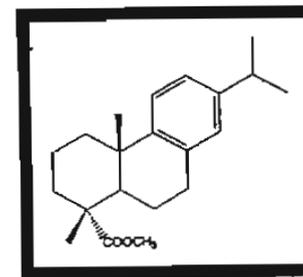
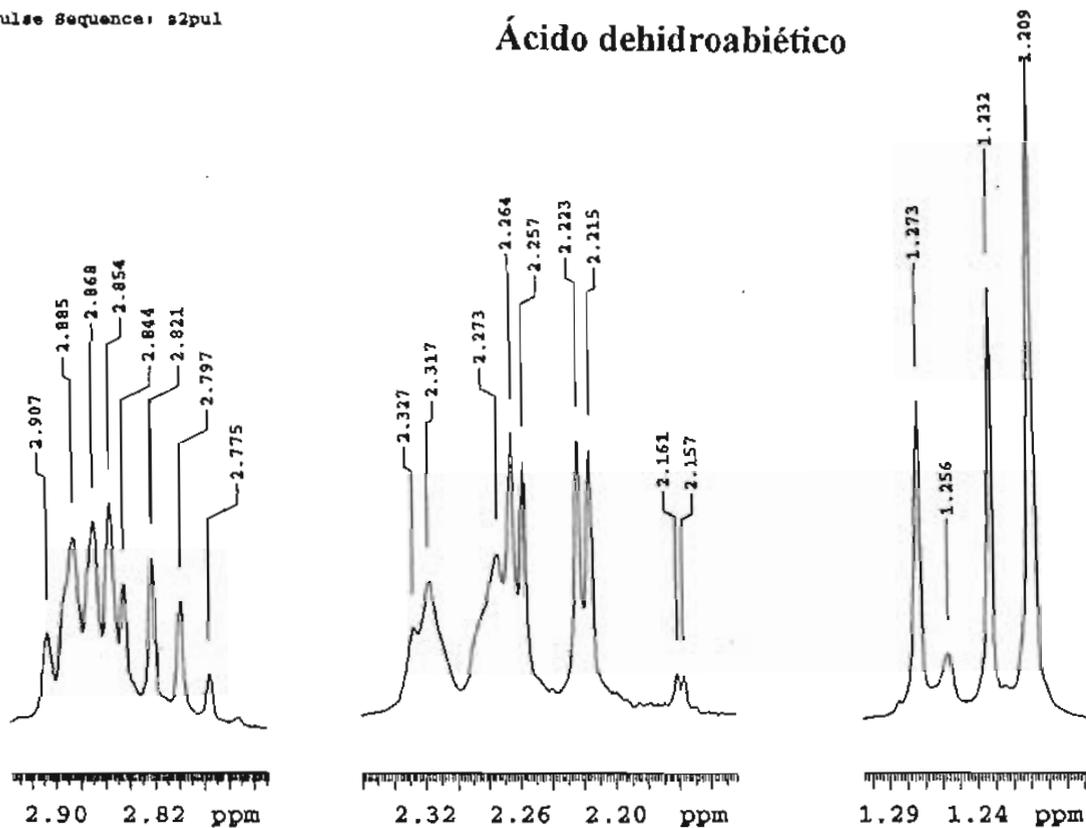
Espectro No. 10

Instituto de Química UNAM NZ  
M.C. Baldomero Esquivel/

CDCl<sub>3</sub>  
Varian-Unity 300MHz-C  
1H  
No. Orden:3089  
23-06-03

Pulse Sequence: s2pul

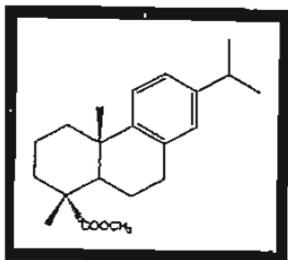
### Ácido dehidroabiético



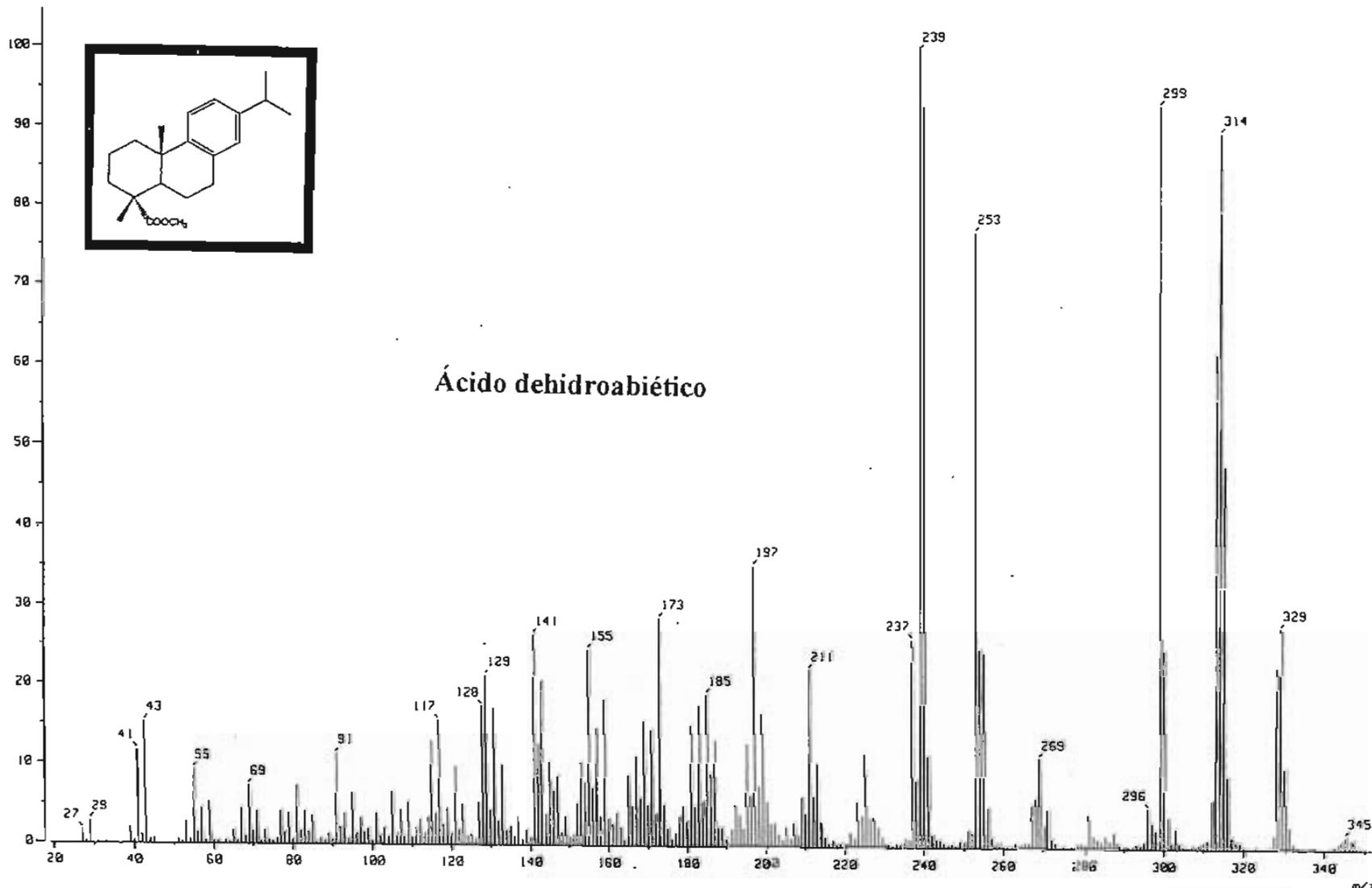
Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

Espectro No. 10<sup>a</sup>

[Mass Spectrum]  
Data : Dr-Baldomero-Esquivel118 Date : 12-Nov-103 09:17  
Sample: 121103-08 Ac-ABIET  
Note : Luis-Velasco-I  
Inlet : Direct Ion Mode : E[+]  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 1.17 min Scan# : (29,36) Temp : 252.5 deg.C  
BP : m/z 239.0000 Int. : 1599.98  
Output m/z range : 19.0000 to 352.7211 Cut Level : 0.00 %  
17552774

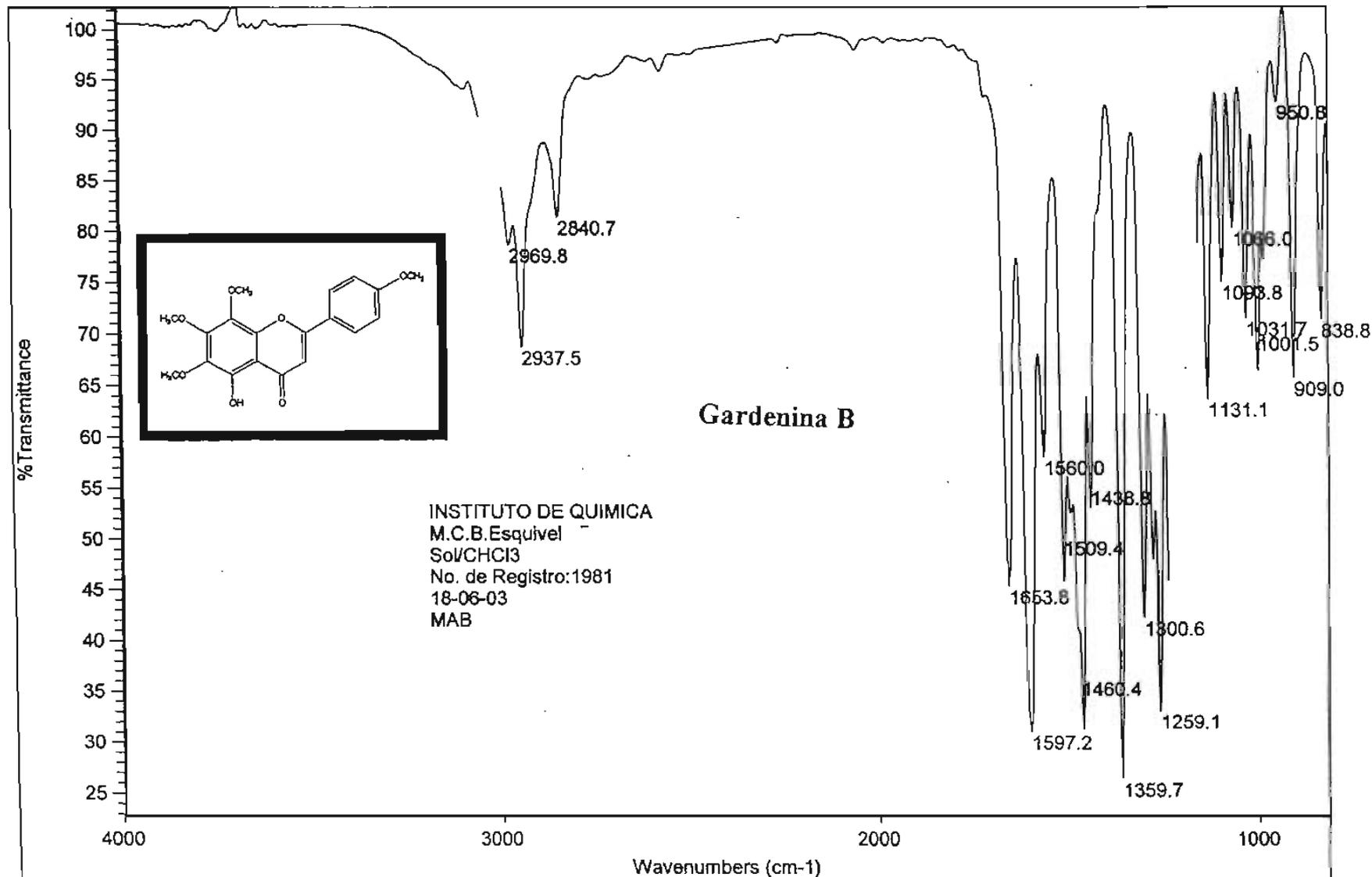


### Ácido dehidroabiético



Espectro de masas

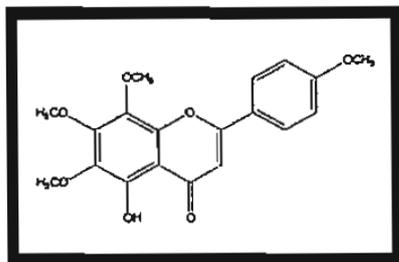
Espectro No. 11



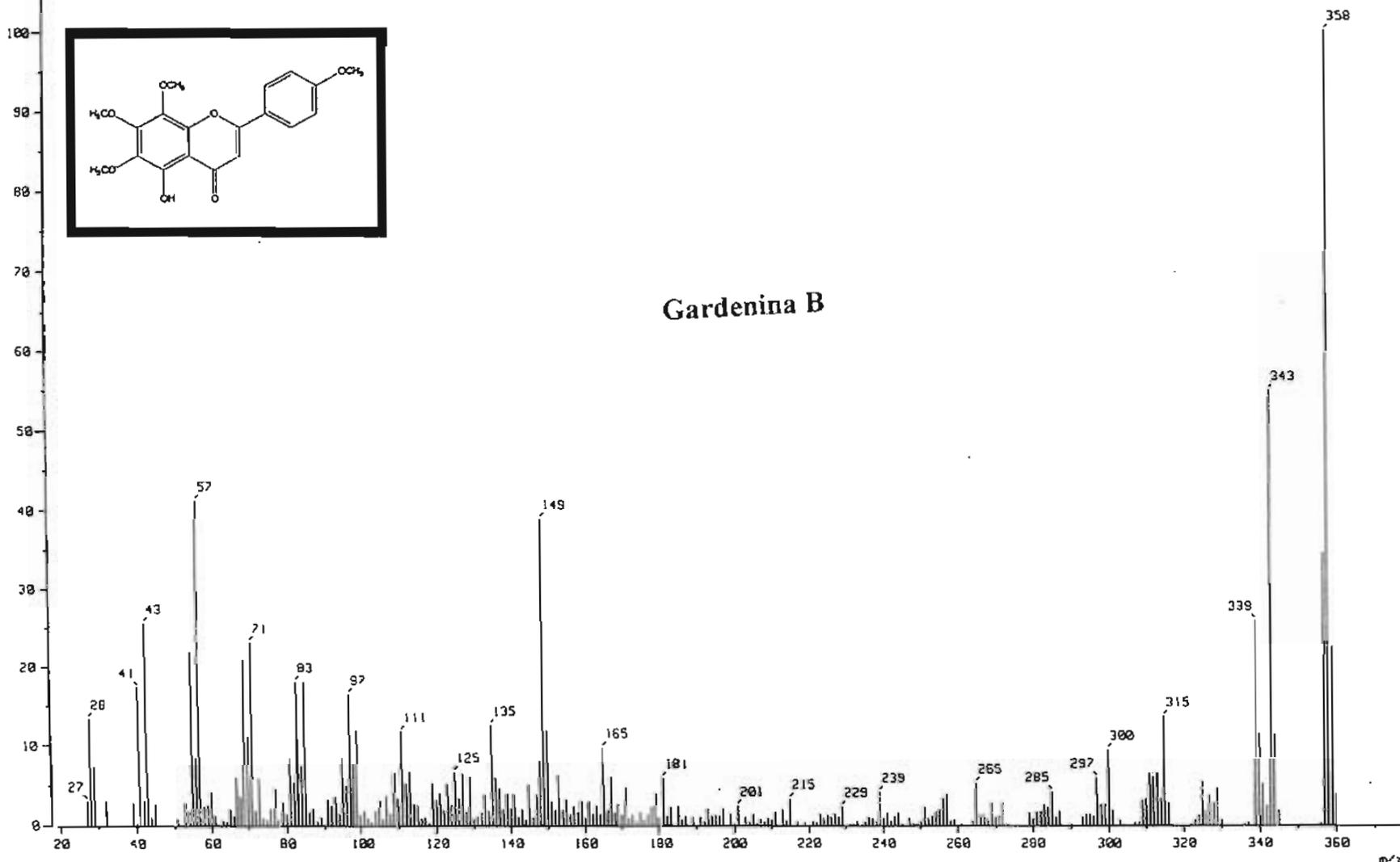
**Espectro No. 12**

**Espectro de Infrarrojo**

Mass Spectrum J  
Data : Dr-Baldomero-Esquivel109 Date : 12-Nov-103 09:13  
Sample: 121103-07 GR-B  
Note : Luis-Velasco-  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion (MF-Linear)  
RT : 8.87 min Scan# : (21,28) Temp : 207.6 deg.C  
BP : m/z 358.0000 Int. : 191.23  
Output m/z range : 19.0000 to 377.0549 Cut Level : 0.00 %  
2115279



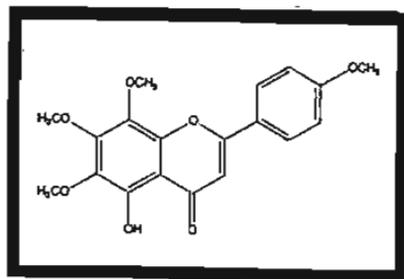
Gardenina B



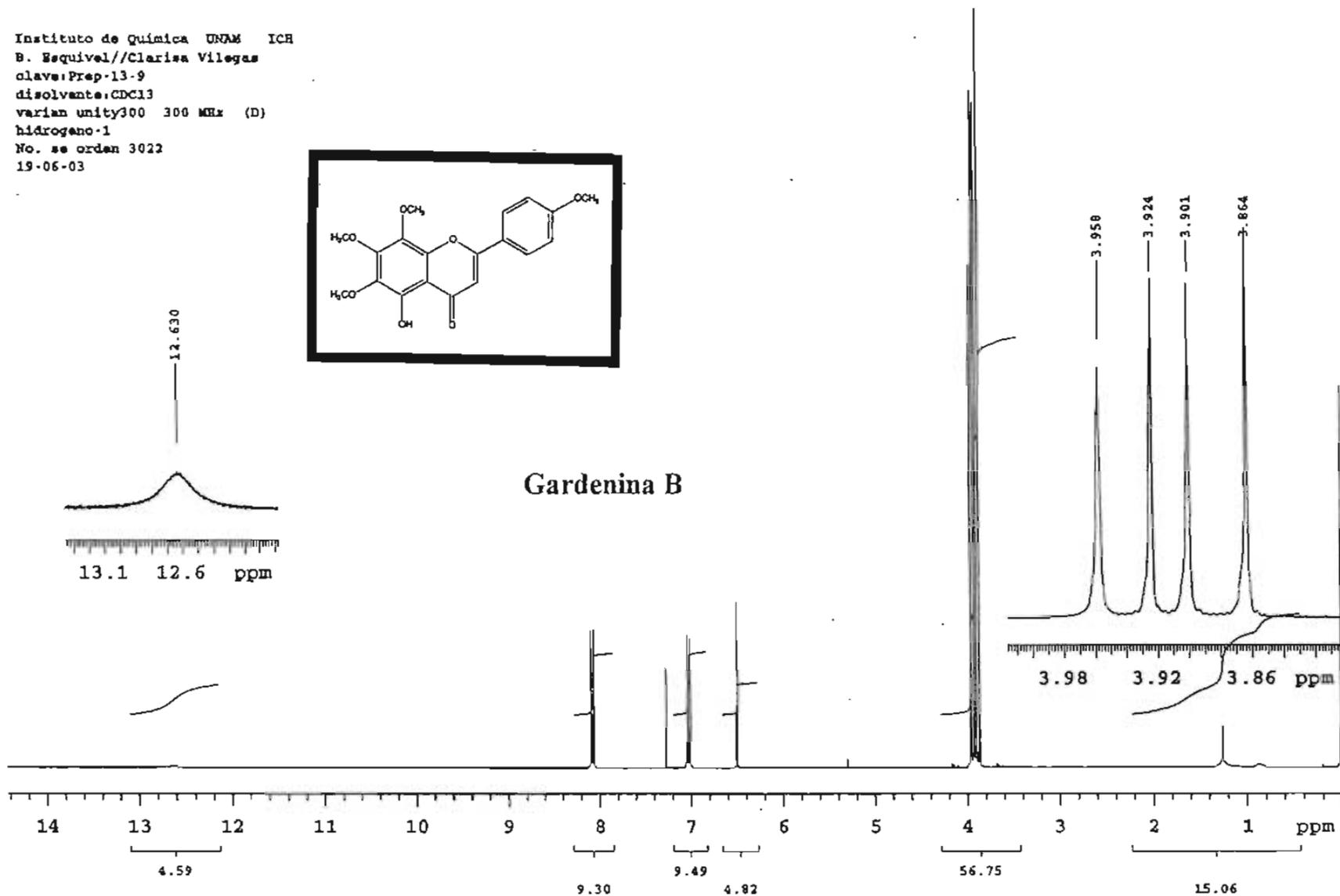
Espectro de masas

Espectro No. 13

Instituto de Química UNAM ICH  
B. Esquivel//Clarisa Vilegas  
clave:Prep-13-9  
disolvente:CDCl3  
varian unity300 300 MHz (D)  
hidrogeno-1  
No. se orden 3022  
19-06-03



Gardenina B



Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$

Espectro No. 14