

1991 - B

084964778

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“ EVALUACION DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE
CINCO ESPECIES DE PLANTAS DE LA FAMILIA
MELIACEAE DEL EDO. DE JALISCO. ”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

MARIA FATIMA SANCHEZ GUTIERREZ

LAS AGUJAS, JAL.

MARZO DE 1994.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....

Número.....

Sección.....

C. MA. FATIMA SANCHEZ GUTIERREZ

P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "EVALUACION DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE CINCO ESPECIES DE PLANTAS DE LA FAMILIA MELIACEAE DEL ESTADO DE JALISCO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Marcelino Vázquez García.



FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal., 19 de Enero de 1994

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- Dr. Marcelino Vázquez García, Director de Tesis.-pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno

EPB/MGGG/cglr.

Campus Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Tel. celular 90 (5) 677-79-36

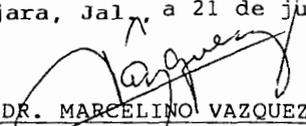
Al contestar este oficio cítese fecha y número

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA
P R E S E N T E

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted,
que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la)
Pasante MARIA FATIMA SANCHEZ GUTIERREZ
código número 084964778 con el título EVALUACION DE
LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE CINCO ESPECIES DE PLANTAS DE
LA FAMILIA MELIACEAE DEL ESTADO DE JALISCO
consideramos que reúne los méritos necesarios para la impre-
sión de la misma y la realización de los exámenes profesiona-
les respectivos.

Comunico lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E
Guadalajara, Jal., a 21 de junio 1994


DR. MARCELINO VAZQUEZ
DIRECTOR DE TESIS

SINODALES

1. M.C. JOSE LUIS NAVARRETE
Nombre Completo


Firma

2. BIOL. GEORGINA QUIROZ
Nombre Completo


Firma

3. M.C. ENRIQUE PIMIENTA B.
Nombre Completo


Firma

SUPLENTE: Q.F.B. MARICRUZ ARRIAGA

DEDICATORIA

A FERNANDO SANCHEZ VALDIVIA

A TI PADRE, QUE AUNQUE SE QUE YA NO ESTAS, TE AGRADEZCO TODO TU TIEMPO, TU AMOR Y PACIENCIA QUE ME TUVISTE, ADEMÁS DEL APOYO TAN GRANDE QUE ME DISTE PARA QUE PUDIERA ESTUDIAR.

A MI MAMA: MARTHA GUTIERREZ CASILLAS

A MIS HERMANOS:

BERTHA
CONSUELO
MARIA
MARIA GUADALUPE
FERNANDO
RAUL
RAMON
SOCORRO
MARTHA ENRIQUETA
CARMEN

QUIENES GRACIAS A SU CARIÑO Y CONSTANTE APOYO HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DE LA PRESENTE TESIS.

A ISAAC, POR SU COMPAÑIA Y AMOR.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS: ADRIANA L. OROZCO, JUANA PALACIOS, JUANA LÓPEZ Y MARIO VÁZQUEZ, POR SU APOYO Y AMISTAD BRINDADOS.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra alma mater, la Universidad de Guadalajara por brindarme la oportunidad de realizar una carrera profesional en sus aulas.

A la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica (DGICSA-SEP), por haberme otorgado la beca para la realización del presente trabajo.

Al doctor Marcelino Vázquez García por su atinada dirección de esta tesis.

Al M. en C. Gil Virgen Calleros y al Ing. Aarón Rodríguez por su constante apoyo en la asesoría del trabajo.

Al Laboratorio Bosque La Primavera en cuyas instalaciones se llevó a cabo esta investigación.

Reciban un reconocimiento particular los investigadores, Ofelia Vargas, Gregorio Nieves, Héctor Luquín, Raymundo Ramírez, Antonio Vázquez, Francisco Casas, Juan Pedro Corona y Oscar Reina por sus comentarios y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mis maestros y compañeros de la Licenciatura en Biología por ser compañeros en este viaje hacia el interior de los temas de la vida y el hombre.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	iii
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 El uso de las plantas de la familia Meliaceae para el control de insectos	3
2.1.1 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	3
2.1.1.1 "Azadirachtin", terpenoide derivado de <i>Azadirachta indica</i>	4
2.1.1.2 Aplicación de extractos del "neem" sobre mosquitos.	5
2.1.2 <i>Melia azedarach</i> L.	6
2.1.3 <i>Trichilia hirta</i> L.	7
2.1.4 <i>Trichilia havanensis</i> Jacq y <i>Trichilia americana</i> (Sessé & Mociño) Pennington.	7
2.1.5 <i>Swietenia humilis</i> Zucc.	8
3. OBJETIVOS.	9
4. HIPÓTESIS.	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Recolecta de planta.	11
5.2 Preparación de extractos.	11
5.3 Recolecta y cría del mosquito.	12
5.4 Bioensayos.	12
5.5 Análisis de resultados.	15
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	16
7. CONCLUSIONES.	30
8. LITERATURA CITADA.	32

RESUMEN

De las hojas, pulpa y semillas de *Melia azedarach* L., *Trichilia hirta* L., *Guarea glabra* Vahl, *Cedrela dugesii* L. y *Swietenia humilis* Zucc., se prepararon extractos y se evaluó su toxicidad contra larvas de *Culex quinquefasciatus*. Los extractos consistieron en macerar separadamente 25 gr de hoja, pulpa y semilla en 100 ml de agua destilada o solventes orgánicos como acetona y alcohol etílico. Los extractos se usaron para la realización de las pruebas de toxicidad que consistieron en agregar, en vasitos de plástico, 100 ml de agua destilada, 25 larvas del 3er. estadio tardío de *C. quinquefasciatus* y el extracto a concentraciones de 2500, 1975, 1250 y 625 ppm más un testigo que consistió en 1 ml de agua o 1 ml de solvente. Las evaluaciones de mortalidad se realizaron a las 24, 48 y 72 h. Los datos de mortalidad se sometieron a un Análisis Próbit para determinar su CL_{50} y la línea log-dosis-próbit de respuesta. De los datos obtenidos los que mostraron mejor respuesta fueron todos aquellos extractos elaborados con alcohol etílico. El extracto con mayor actividad sobre las larvas fue el de semilla con etanol de *Trichilia hirta*, al obtenerse una CL_{50} de 60 ppm. Asimismo, los extractos de semilla con etanol de *Guarea glabra* y *C. dugesii*, tuvieron CL_{50} 's de 394 y 892 ppm, respectivamente. Con los resultados obtenidos se puede señalar que el principio insecticida activo en estas meliáceas se encuentra en mayor proporción en las semillas.

A aquellos extractos elaborados con hojas de las cinco especies, no mostraron mortalidades significativas ya que éstas no excedieron el 4 % aún en las más altas concentraciones.

1. INTRODUCCION

Las plagas de insectos son de interés para el hombre en la medida en que compiten por su alimento, forraje y fibra. Además sirven como vectores de organismos que producen enfermedades tales como la malaria, dengue, paludismo, entre otras.

Uno de los métodos más utilizados para su control son los insecticidas convencionales, que por su uso indiscriminado han traído consecuencias secundarias como la contaminación del ambiente, encontrándose residuos en agua, aire, suelo y productos agrícolas. Esto ha provocado la intoxicación de peces, aves, y mamíferos, incluido en estos últimos el hombre.

Las plantas en el transcurso de su evolución han desarrollado mecanismos de protección para defenderse del ataque de los insectos; entre estos mecanismos tenemos la repelencia y la acción insecticida. Por ello algunas de esas plantas han sido utilizadas por el hombre desde tiempos muy remotos.

A raíz de esto, el estudio de productos botánicos se ha intensificado con la búsqueda de plantas que contienen compuestos de propiedades repelentes, antialimentarios o de acción reguladora del crecimiento. Estos compuestos han venido siendo una buena alternativa, ya que reducen la contaminación del medio ambiente, son rápidamente degradados y muchos de ellos no son tóxicos para los animales ni para el hombre.

2. ANTECEDENTES

Los productos naturales derivados de las plantas proporcionan una vasta fuente de sustancias bioactivas, que se han utilizado a través del tiempo como insecticidas, en forma de polvos, cenizas o extractos (Cremlin, 1982).

A través de la historia, un buen número de especies de plantas se han utilizado para el desarrollo de insecticidas. El "tabaco" *Nicotiana tabacum* que se utilizó para la producción de sulfato de nicotina, el "crisantemo" *Crysanthemum cinerariaefolium* para la producción de piretrinas naturales, *Ryania speciosa* de la cual se obtiene la rotenona, *Schenocaulon officinale* de la que se extrae la sabadilla y, más recientemente, el "árbol del neem" *Azadirachta indica* para la producción de azadirachtin. Los productos naturales de estas plantas tienen la ventaja de ser efectivos contra una gran variedad de insectos. Diversas investigaciones de laboratorio e invernadero realizadas en los últimos 10 años han dejado recientemente constancia de la posibilidad del uso de sustancias vegetales para el control de plagas en el campo. Se han obtenido resultados prometedores contra "gusano cogollero" *Spodoptera frugiperda*, "mosquito casero" *Culex quinquefasciatus*, "Conchuela del frijol" *Epilachna varivestis*, "frailecillo" *Macrodactylus mexicanus*, "picudo del ejote" *Apion* spp. y algunas plagas de granos almacenados (López y Aragón, 1991).

Negherbon (1959; citado por Holyoke y Reese, 1987) hace una referencia de los alcaloides y la gran variedad de los insectos controlados por el tabaco. Señala que la "nicotina" es un alcaloide que presenta un amplio espectro de aplicación. Por ejemplo, en forma fumigante se aplica en adultos de *Eriosema americanum*, *Aphis gossypii*, *Macrosiphaniella sanbarni*, *Aphis rumicis*, *A. farbessi*, *Myzus solanifollii*, *M. parosus*, *Thrips tabaci*, *Myzus persicae*, *Macrosiphium pisi*, entre otros.

El "piretro" debe su importancia a la rápida acción de derribo (unos cuantos segundos) que tiene sobre insectos voladores, aunado a la baja toxicidad para los mamíferos debido a su rápido metabolismo (Hartley y West, 1973; Martin, 1973), es por esto que las aspersiones de las piretrinas es ideal para hacer insecticidas caseros, los que se emplean contra mosquitos, moscas, hormigas, pulgones, y otros insectos de importancia doméstica (Metcalf y Flint, 1984).

En cuanto a la aplicación de las rotenonas Negherbon (1959; citado por Holyoke y Reese, 1987) reporta a la "rotenona" como un compuesto utilizado en el control de varias especies de insectos. Presenta un amplio espectro de aplicación, ya sea en forma oral, por contacto, incorporación a la dieta, por ingestión y aplicación tópica. La "rotenona" historicamente se utilizó para controlar larvas de *Culex spp*, *Aphis rumicis*, *Heliothis armiguera*, *Bombix mori*, *Musca domestica*, *Vanessa cardui* y *Trips tabaci*, entre otros.

2.1. El uso de plantas de la familia Meliaceae para el control de insectos

2.1.1 *Azadirachta indica* A. Juss

Esta planta es conocida comunmente como árbol del "neem" y se ha utilizado en la práctica rural de la India, en donde las hojas secas son empleadas para el control de plagas de granos almacenados. Los primeros reportes científicos de la acción repelente del "neem" contra plagas de granos almacenados datan de 1930 (Anonymous, 1932; Pruthi, 1937; citados por Koul *et al.*, 1990). Ahora, numerosos estudios describen las actividades insecticidas, antialimentarias, inhibidoras del crecimiento, disuación a la oviposición, antihormonal y antifertilidad, del "neem" contra un gran espectro de insectos. También se han reportado actividades antifúngicas, antivirales, y nematocidas; estas actividades han sido posibles con los extractos de hojas, frutos, semillas y aceites del "neem". Los compuestos que han sido aislados son: azadirachtin, meliantriol, nimbin, nimbilin, 3-deacetilsalanin, salanol, salanin, 1,3-diacetilvilasinin, diacetilvilasinin, nimbandiol, azadirone, azadiradion, gedunin, nimbinene, nimocinolide, isonimocinolide e isonimocinolide. Estos materiales fueron probados contra un gran número de plagas de insectos que

atacan a la col, coliflor, crucíferas, cucurbitáceas, frijol, garbanzo y otras leguminosas, tomate, berenjena, cebolla y papa. Árboles frutales como cítricos y aguacate así como cultivos ornamentales, granos almacenados e insectos de importancia médica y doméstica (Koul *et al.*, 1990).

Además existe gran seguridad para el hombre y los animales al utilizarlo como insecticida, sin embargo, el "neem" no afecta a los enemigos naturales pues sus reguladores de crecimiento y los antialimentarios no tienen acción de contacto (Schmutterer *et al.*, 1983). En un estudio realizado por Joshi *et al.* (1982) sobre la influencia que pudieran tener los extractos del "neem" en la parasitización de huevos de *Spodoptera litura* por *Telenomus remus*, mencionan que ésta no fue influenciada ni antes ni después de la aplicación del extracto así como tampoco afectó la emergencia del parasitoide, por lo que su uso es compatible con el control biológico.

En 1968 Pradhan y Jotwani, reportaron la actividad antialimentaria del neem contra locustidos.

Por otra parte Jaipal *et al.* (1983) reportaron el efecto de inhibición de la metamorfosis de las etapas juveniles de *Dysdercus koenigii*. Esto mismo sucedió para larvas de *Epilachna varivestis* y *Spodoptera frugiperda* (Kraus *et al.*, 1986).

La inhibición de la oviposición se ha reportado para *Crocidolomia binotalis*, *Epilachna varivestis*, *Callosobruchus maculatus* y *Sitophylus orizae* (Schulz, 1981; Makanjuola, 1989).

2.1.1.1. "Azadirachtin", terpenoide derivado de *Azadirachta indica*

Los insecticidas limonoides tetranortriterpenoides están considerados entre los más prometedores e interesantes insecticidas derivados de las plantas y "azadirachtin" es considerado el prototipo antialimentario y de tener acción insecticida (Lee *et al.*, 1991).

"Azadirachtin" es un importante insecticida para el control de plagas de

insectos de relevancia económica, presenta alta potencialidad que es comparable a la de los más potentes insecticidas sintéticos convencionales, además de ser altamente específico (con efectos en la conducta, desarrollo y procesos bioquímicos peculiares en los insectos), no es mutagénico, es biodegradable y tiene actividad sistémica en las plantas, encontrándose traslocado en ellas ya que es absorbido por las hojas y raíces (Lee *et al.*, 1991).

"Azadirachtin" mostró deformación así como inhibición del crecimiento en larvas del primer estadio de *Bombix mori* en los primeros tres días de ser suministrado, seguido por su muerte a los 12 días del tratamiento (Koul *et al.*, 1987), asimismo, en estudios realizados con *Rhodnius prolixus* mostraron que tuvo efecto tanto en la inhibición de alimentación como en la muda (De Souza y Rembold, 1984).

También se reportó que las hembras de *Epilachna varivestis* reducían su fecundidad en un 90% y retardaban su oviposición por ocho días, al estar confinadas en plantas tratadas con azadirachtin (Steets y Schmutterer, 1975).

2.1.1.2 Aplicación de extractos del "neem" sobre mosquitos

Existe poca información sobre la evaluación de los efectos de los productos del "neem" sobre Dipteros, especialmente mosquitos (Gill, 1972; Schmutterer, 1982; citados por Zebitz, 1984). Chavan *et al.* (1979) encontraron que las larvas del cuarto estadio de *Culex pipiens fatigans* mostraron susceptibilidad a extractos de hojas del "neem" con éter de petróleo, éter, cloroformo y alcohol.

Zebitz (1984) reportó que los extractos de ANSKE (extractos acuosos de la almendra del neem), AZT-VR-K-E (extracto de donde azadirachtin fue extraído de la almendra por medio de éter de petróleo) y MTB/H₂O-K-NR-E (extracto de la almendra en donde los compuestos fueron extraídos con agua y purificados con metil-ter-butyl éter) mostraron CL₅₀'s de 78.2, 18.1 y 5.9 ppm respectivamente, e igualmente obtuvo CL₉₀'s de 113.5, 28.4 y 9.1 ppm correspondientemente, aplicados contra larvas de *Aedes aegypti*. Los extractos de ANSKE, AZT-VR-K-E y MTB-VR-E (extracto en donde los compuestos grasos fueron extraídos con éter

de petróleo y purificados con metil-ter-butil) mostraron efectos morfogenéticos de pupas con visibles formas adultas. De igual forma el AZT-VR-K-E fué el que presentó mayor retraso del crecimiento en el insecto. Sin embargo, para los extractos de MeOH-E (extracto metanólico), MeOH-VR-E (extracto en donde los compuestos fueron extraídos con éter de petróleo y purificados con metanol), BuOH-VR-E (extracto donde los compuestos fueron extraídos con éter de petróleo y purificado con butanol), MEK-VR-E (extracto donde los compuestos fueron extraídos con éter de petróleo y purificados con metil-etil-acetona) y MTB-VR-E reportó porcentajes de mortalidad de 1.4, 2.6, 49.9, 69.1 y 77.2, respectivamente a concentraciones de 20 ppm sobre larvas de *A. aegypti*.

Estudios realizados por Zebitz (1986), reportan que huevecillos de *Culex quinquefasciatus* puestos en agua tratada con Azt-VR-K-E (extracto donde azadirachtin fue extraído de la almendra por medio de éter de petróleo) a concentraciones de 2.5, 5, 7.5, 10 y 20 ppm tuvieron una marcada reducción en los porcentajes de emergencia. Para las especies de *Aedes aegypti*, *A. togoi* y *C. quinquefasciatus*, tratadas con extractos acuosos de semilla del "neem" (ANSKE) dieron las siguientes Concentraciones Letales 50's (CL_{50}): 78.2, 6.35 y 26.14 ppm. De igual forma para pruebas realizadas con extractos de azadirachtin crudo, se obtuvo para *A. togoi* una CL_{50} de 1.10 ppm y con solución de Methoprene se obtuvo para *A. aegypti* una CL_{50} de 0.088 ppm y para *A. togoi* una CL_{50} de 0.013 ppm. Asimismo menciona que más del 90% de los individuos muertos tuvieron un desarrollo incompleto, ya que algunas larvas alcanzaron la muda pupal pero no melanizada y en otros casos, hubo pupas con visibles formas adultas.

2.1.2 *Melia azedarach* L.

El principio activo de *Melia azedarach*, se localiza en el tallo y órganos fructíferos. Se utiliza como insecticida de contacto en forma de extracto acuoso (Greing *et al.*, 1985; citado por Villar y Jiménez, 1991).

Las aspersiones con extractos crudos de *M. azedarach*, provocaron mortalidad total en larvas de conchuela del frijol. Además se señala que en aplicaciones tópicas sobre este mismo insecto se provocaron cambios morfológicos y muestra-

ron baja mortalidad (Steets y Schmutterer, 1975).

También *Melia azedarach* ha dado buenos resultados sobre la mortalidad de *Locusta migratoria migratoroides* tanto con extractos acuosos como metanólicos utilizando frutos (Wen y Schmutterer, 1991).

Extractos crudos de la madera y corteza de *Melia azedarach* dieron evidentes efectos en las etapas juveniles de *Dysdercus koenigii* en donde la metamorfosis fue inhibida en grado diferente, consecuentemente hubo irregularidades en las proporciones biométricas de las diferentes partes del cuerpo, lo que provocó su muerte en períodos cortos. También los individuos que sobrevivieron fueron incapaces de reproducirse (Jaipal *et al.*, 1983)

2.1.3 *Trichilia hirta* L.

En cuanto a *T. hirta* sólo se tienen reportes sobre el aislamiento químico de sus componentes y uno de ellos fue reportado por Cortez *et al.* (1992) en donde mencionan que de los frutos y hojas de *T. hirta* se aislaron dos nuevos limonoides: Metil 11-B-acetoxi-6-hidroxi-12(alfa)-2-metil propioniloxi-3,7-dioxo-1,5,14,20,22-meliacarpenten-29-oato (sitosterol) y metil-11,B-acetoxi-6,23-dihidroxi-12(alfa)(2-metil propioniloxi)-3,7,21-trioxo,1,5,14,20-meliacartetraen-29-oato (sitostenone). Hasta el momento no se tienen reportes sobre su acción insecticida.

2.1.4 *Trichilia havanensis* Jacq y *Trichilia americana* (Sessé & Mociño) Pennington

Villar (1988; citado por Villar y López, 1991) reportó que los extractos acuosos de *Trichilia havanensis* y *T. americana* al 10% proporcionaron una buena protección al maíz contra el ataque de *S. frugiperda*. También menciona que hubo un incremento significativo en el rendimiento comparable al testigo. De igual manera Ayala y Lagunes (1986) reportaron a *T. americana* como promisoría para el control de *S. frugiperda*.

En la Sierra Norte de Puebla, en la región de Zacapoaxtla, se utiliza la semilla de la planta conocida como "xopiltetl" *Trichilia havanensis* para hacer una pasta con la cual impregnan la semilla de maíz durante tres días antes de la siembra, este tratamiento es considerado efectivo para repeler el ataque de parásitos durante la germinación (López y Aragón, 1991); por consiguiente, el mismo autor reportó un incremento del 21.8 y 31.1% en la germinación y producción del maíz con la aplicación de polvo de semilla de *T. havanensis*. Por su parte, Romo y Rodríguez (1987) señalan que en el laboratorio únicamente los macerados de *Trichilia havanensis* y *T. americana*, resultaron tóxicas para larvas del primer estadio de *E. varivestis*, con una mortalidad superior al 75%.

2.1.5 *Swietenia humilis* Zucc.

Martínez (1983; citado por Villar y López, 1991), evaluó 79 especies de plantas en forma de extractos acuosos y después de tres ciclos de selección, *Swietenia humilis* dio resultados prometedores en la disminución de peso sobre larvas del gusano cogollero.

El estudio de las plantas meliáceas de Jalisco, con el propósito de conocer sus propiedades insecticidas, se debió a que están estrechamente relacionadas con *Azadirachta indica* (miembro de la misma familia), planta que hoy en día es estudiada y de la que se tienen resultados positivos, pero que tiene la desventaja de pertenecer a la región asiática y cuya exportación está muy controlada; por ello, se ha realizado un proyecto que consiste en estudiar las plantas meliáceas nativas de nuestra entidad y de llegar a obtener si no los mismos efectos cuando menos muy parecidos.

3. OBJETIVOS

General:

Evaluar la actividad insecticida de cinco especies de plantas de la familia Meliaceae

Particular:

Determinar la CL_{50} (concentración letal 50) de los extractos acuosos, etanólicos y con acetona, de las cinco especies de meliaceas.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* (Meliaceae) poseen tetranortriterpenoides reguladores del crecimiento, antialimentarios, antagonistas de la fecundidad y la oviposición; por lo que los extractos de otras especies de meliaceas pueden presentar actividad similar.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Recolecta de plantas

En la recolecta de las plantas las muestras botánicas constaron de hojas y frutos que fueron trasladadas al laboratorio en bolsas de papel y puestas en refrigeración para su mejor conservación. Las cinco especies que se utilizaron para este trabajo son: "palo de tlacuache" *Trichilia hirta* procedente de San Ramón, Mpio. de Zapopan; "árbol del paraíso" *Melia azedarach* de la zona de amortiguamiento del Bosque La Primavera; "cedro rojo" *Cedrela dugesii* de San Ignacio Cerro Gordo, Mpio. de Arandas; *Guarea glabra* de Los Mazos, Mpio. de Autlán; y "caoba" *Swietenia humilis* de Camichi, Mpio. de Tuxcacuesco. Durante el trabajo de campo se contó con la colaboración de botánicos del Instituto de Botánica así como del Dr. Antonio Vázquez. También se colectaron muestras para corroborar las especies, comparándolas con las existentes en el herbario del IBUG.

5.2 Preparación de extractos

Para la preparación de los extractos se siguieron los procedimientos utilizados por Villar *et al.* (1988). De los frutos de las cinco plantas se procedió a separar la pulpa de la semilla, luego, se pesaron y licuaron separadamente 25 gr de hoja, pulpa y semilla de las diferentes especies de meliaceas. Posteriormente, se colocaron en un mortero con 100 ml de agua destilada y solventes orgánicos como etanol y acetona para la obtención del extracto. Después fue puesto en un embudo Bushner y matraz Kitasato con papel filtro Watman No. 4 y por medio de una bomba de succión al vacío se filtró, obteniendo el total de compuestos solubles para posteriormente aforar separadamente a 100 ml con el agua destilada, etanol

y acetona y así obtener una solución a 250,000 ppm. Después de obtener el extracto, éste se pasó a un frasco perfectamente cerrado que fue conservado en refrigeración para su posterior utilización.

5.3 Recolecta y cría del mosquito

Se utilizó al mosquito doméstico *Culex quinquefasciatus* Say, ya que es fácil de reproducir en laboratorio, además de ser el insecto modelo en donde se realizan la mayoría de las pruebas de toxicidad de extractos e insecticidas.

Los huevecillos de *C. quinquefasciatus* se recolectaron en un pequeño estanque que se encuentra en la Facultad de Agronomía, se trasladaron al laboratorio y se colocaron en charolas con agua. Al eclosionar las larvas se alimentaron con una dieta propuesta por Santos *et al.* (1990) que consiste en una parte de harina de pescado, dos partes de pan dorado molido y dos partes de germen de trigo. Al convertirse las larvas en pupas, éstas se trasladaron a jaulas entomológicas de 30 por 40 cm cubiertas con tela de mosquitero. Al emerger los adultos, los machos se alimentaron de agua con azúcar al 10 % y pasas. Las hembras se alimentaron con pollos de tres a cinco días de nacidos. Se mantuvo una temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$, una humedad relativa de $75 \pm 6\%$ y un fotoperiodo de doce h en la cámara de cría.

5.4 Bioensayos

Los bioensayos para determinar la CL_{50} de cada extracto sobre larvas de *C. quinquefasciatus* se hicieron de acuerdo a los procedimientos estándares de la World Health Organization (1980). Se colocaron 25 larvas del tercer estadio tardío en pequeños vasos de plástico que contenían 100 ml de agua destilada. Posteriormente se procedió a agregar el extracto de acuerdo a la siguiente combinación.

M. azedarach

Semilla/etanol/acetona

Pulpa/etanol/acetona/agua

Hoja/etanol/acetona/agua

T. hirta

Semilla/etanol/acetona/agua

Pulpa/etanol/acetona/agua

Hoja/etanol/acetona/agua

C. dugesii

Semilla/etanol/acetona/agua

Hoja/etanol/acetona/agua

G. glabra

Semilla/etanol/acetona

Hoja/etanol/acetona/agua

S. humilis

Semilla/acetona/agua

Hoja/etanol/acetona/agua

Aquí cabe mencionar que la falta de uniformidad en la preparación de extractos fue debido a problemas que se presentaron en la recolecta de las plantas, como por ejemplo: por su estado fenológico o porque la zona de la recolecta se hallaba muy accidentada.

Cada extracto se aplicó a concentraciones de 625, 1250, 1875 y 2500 ppm. Se utilizaron 4 repeticiones con su respectivo testigo, para un total de 100 larvas por cada dosis de cada tratamiento. Las evaluaciones de mortalidad se llevaron a cabo a las 24, 48 y 72 h.

En el siguiente esquema se presenta de manera más sintetizada lo que anteriormente se señala.

PLANTA	PARTE	SOLVENTE	DOSIS ppm	EVALUACION DE MORTALIDAD
<i>M. azedarach</i>	hoja	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	semilla	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	pulpa	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
<i>T. hirta</i>	hoja	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	semilla	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	pulpa	aetanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
<i>C. dugesii</i>	hoja	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	semilla	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
<i>G. glabra</i>	hoja	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	semilla	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
<i>S. humilis</i>	hoja	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs
	semilla	etanol-acetona-agua	625-1250-1875-2500	24-48-72 hrs

5.5 Análisis de resultados

Los datos de mortalidad se utilizaron para determinar las correspondientes concentraciones letales medias (CL_{50} 's) y las líneas de respuesta log-dosis-probit, mediante Análisis Probit. Las CL_{50} 's sirvieron para hacer la comparación y el cálculo de la toxicidad relativa entre extractos o factor de actividad relativo con respecto a la toxicidad de *A. indica*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Melia azedarach

Los resultados se encuentran en el cuadro 1 y Fig. 1. Los extractos que mostraron mayor actividad insecticida fueron aquellos en que se usó la pulpa y como solventes el etanol y acetona (pulpa-etanol y pulpa-acetona). Estos mostraron concentraciones letales medias (CL_{50} 's) de 936 y 998 ppm, respectivamente.

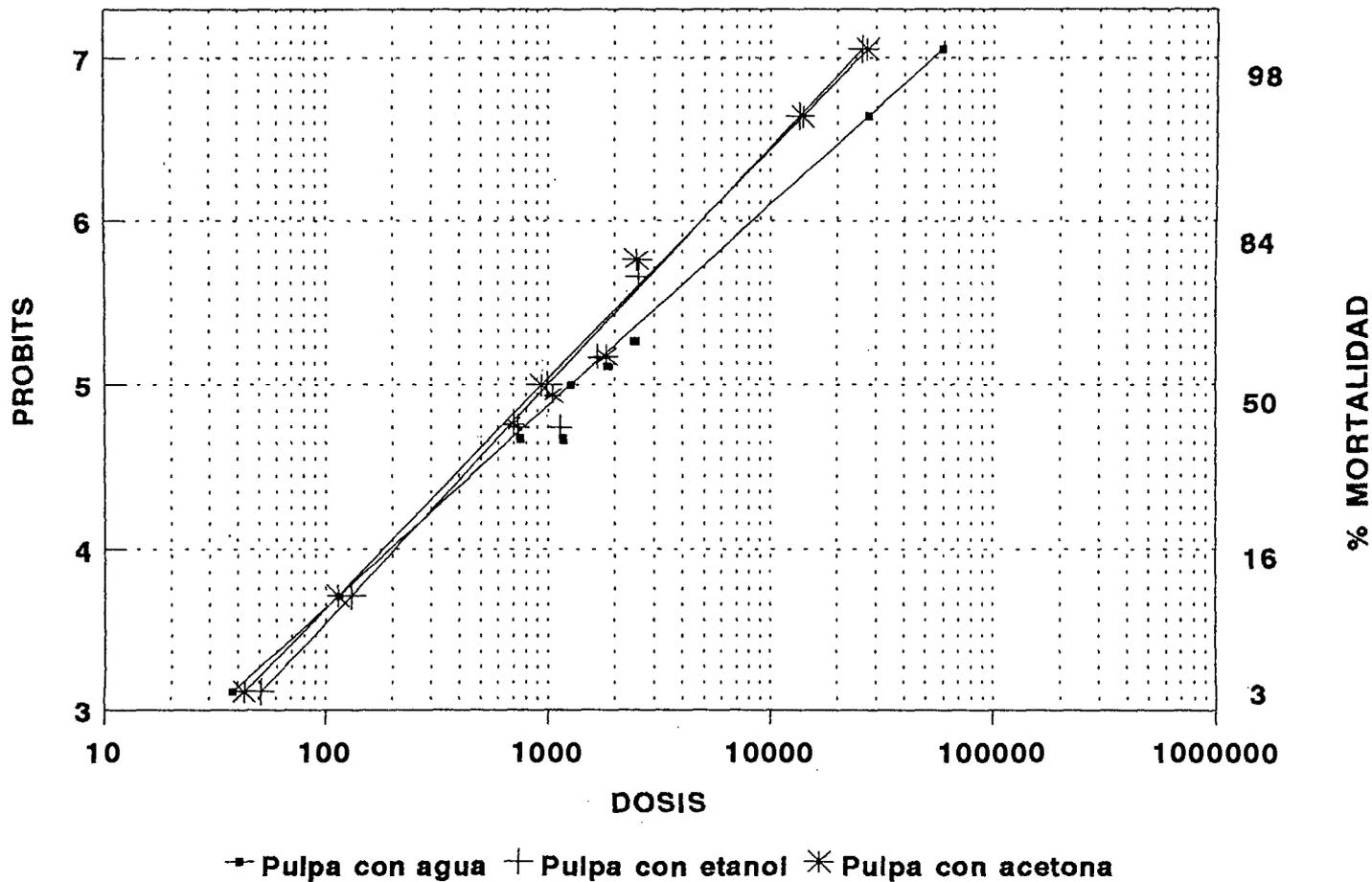
El extracto de pulpa, usando como solvente agua (pulpa-agua) fue menos activo como insecticida porque mostró una CL_{50} de 1268 ppm. Comparaciones con la $CL_{50} = 26.14$ ppm del extracto acuoso de semilla del "neem" obtenido por Zebitz (1986) indica un factor de actividad relativa de 998, 936 y 1268 de los extractos estudiados (cuadro 6). Jaipal *et al.* (1983) y Saxena *et al.* (1981) reportaron que *A. indica* presenta efectos inhibidores del desarrollo de insectos. Este mismo efecto fue observado por los extractos de semilla usando etanol y agua como solventes (semilla-etanol y semilla-agua) los que produjeron mortalidades muy bajas pero con características de inhibición del crecimiento al momento de la muda pupal (Fig. 2). Observaciones post-mortem de las pupas bajo el microscopio nos permiten preliminarmente hacer la hipótesis de que la actividad de los extractos podría efectuarse a nivel hormonal, al encontrarse efectos morfogenéticos típicos de reguladores de crecimiento (IGR'S) al momento de las mudas, en las que se retienen características del estado anterior. Esto mismo fue observado para *Locusta migratoria migratoroides* con extractos acuosos de frutos de *M. azedarach* (Wen and Schmutterer, 1991). A este respecto es importante citar a Vázquez (1993) quien menciona un efecto similar para larvas, pupas y adultos de *Spodoptera frugiperda* donde encontró tales características.

Los extractos de semilla-acetona (en el que se usó la acetona como solvente), semilla-etanol y semilla-agua así como los elaborados con hojas no mostraron mortalidades significativas ya que no difirieron mucho del testigo, y probablemente esto haya respondido a que los principios activos no se encuentran en concentraciones suficientes para que sean extraídos por los solventes o en su caso, que la técnica que se utilizó no fue la adecuada.

Cuadro 1. CL_{50} de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*.

EXTRACTO	CL_{50} (ppm)	Lim. fiduciales 95%	Linea Log-dosis-probit
Pulpa			
acetona	936	(616 - 1184)	$Y=5.23 + 1.40(X-13.14)$
etanol	998	(724 - 1224)	$Y=5.19 + 1.45(X-13.13)$
agua	1268	(919 - 1644)	$Y=5.05 + 1.23(X-13.14)$
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)			
semilla			
agua	26.14		

Fig. 1- Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* Say, a extractos de *Melia azedarach*.



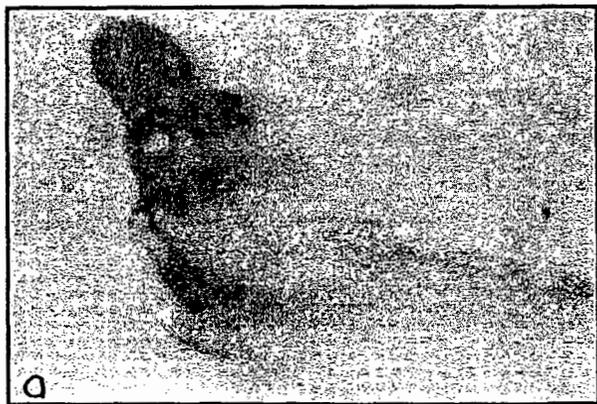
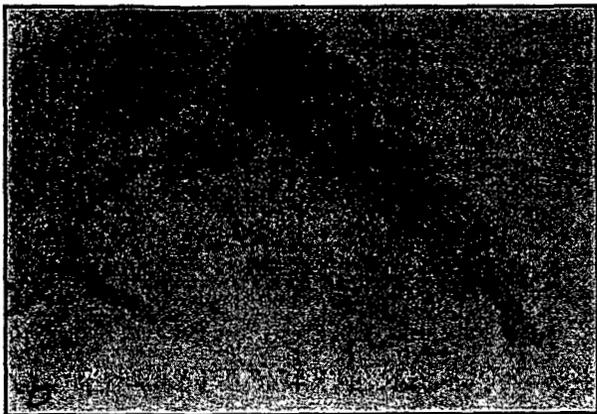


Fig. 2. a) Malformación de una Pupa de *C. quinquefasciatus* con características morfológicas alteradas y b) Pupa del mismo insecto en donde la exuvia del estado anterior quedó adherida a ella.

Trichilia hirta

En el cuadro 2, se muestran los resultados obtenidos de los bioensayos, en donde el extracto etanólico de semilla de *T. hirta* mostró una CL_{50} de 60 ppm, y es solamente 2.2 veces menos activa (cuadro 6) que el extracto acuoso de semilla de *A. indica* (Zebitz, 1986), lo cual indica una actividad muy similar.

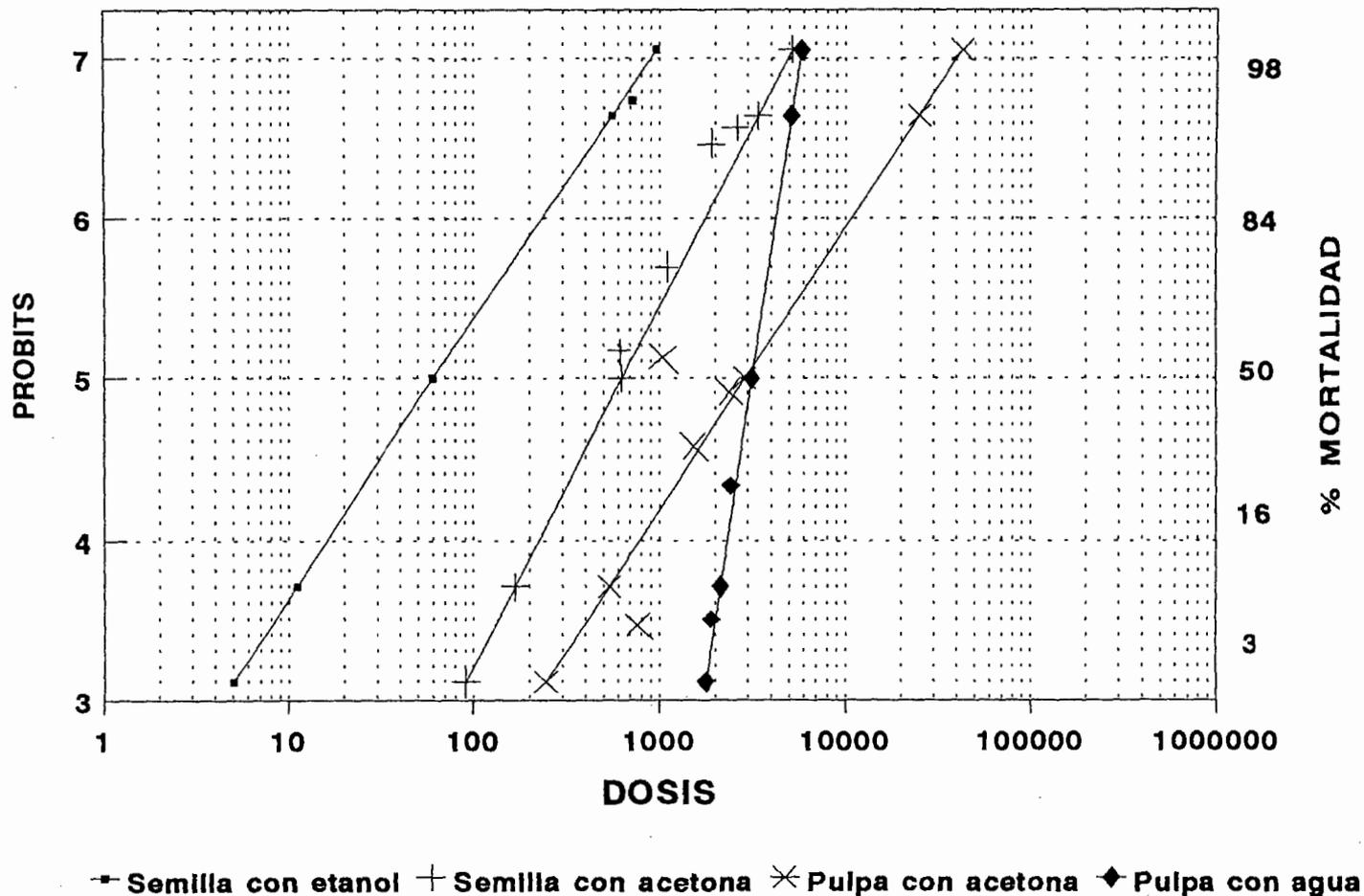
• El extracto de semilla-agua presentó mortalidad muy baja y probablemente se deba a que el agua no es el solvente adecuado para la extracción de los principios activos al presentar una polaridad muy alta. Para el caso del extracto de pulpa-etanol también presentó mortalidad muy baja y quizá sea debido a que los principios activos se encuentran en concentraciones muy bajas, ya que también los extractos de pulpa-acetona y pulpa-agua presentaron las CL_{50} 's más altas de todas las especies estudiadas (cuadro 6). Asimismo los extractos elaborados con hojas no mostraron mortalidad alguna.

Por otro lado, se observó que en los extractos de pulpa-acetona como los de pulpa-etanol presentaron mortalidades al momento de la muda pupal y que esto respondió a que poseen componentes con similar potencial insecticida al extracto acuoso de semilla de *A. indica*, hipótesis que se fortalece al considerar que la mortalidad fue debida a efectos sobre el desarrollo metamórfico similar a los reportados por Rembold *et al.* (1984), quien encontró que los diferentes tipos de azadirachtinas interfieren en el desarrollo metamórfico de las larvas causando una pérdida del control del programa morfogénico.

Cuadro 2. CL_{50} para extractos de *Trichilia hirta* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*.

EXTRACTO	CL_{50} (ppm)	Lim. fiduciales 95%	Linea log-dosis-probit
Semilla			
acetona	629	(459 - 766)	$Y=5.64 + 2.23 (X-13.08)$
etanol	60	(0 - 233)	$Y=7.03 + 1.71 (X-12.47)$
Pulpa			
acetona	2900	(2303-4442)	$Y=4.50 + 1.75 (X-13.18)$
agua	3150	(2746-7441)	$Y=4.06 + 7.62 (X-13.37)$
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)			
semilla			
agua	26.14		

Fig. 3.- Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* Say, a extractos de *Trichilia hirta*



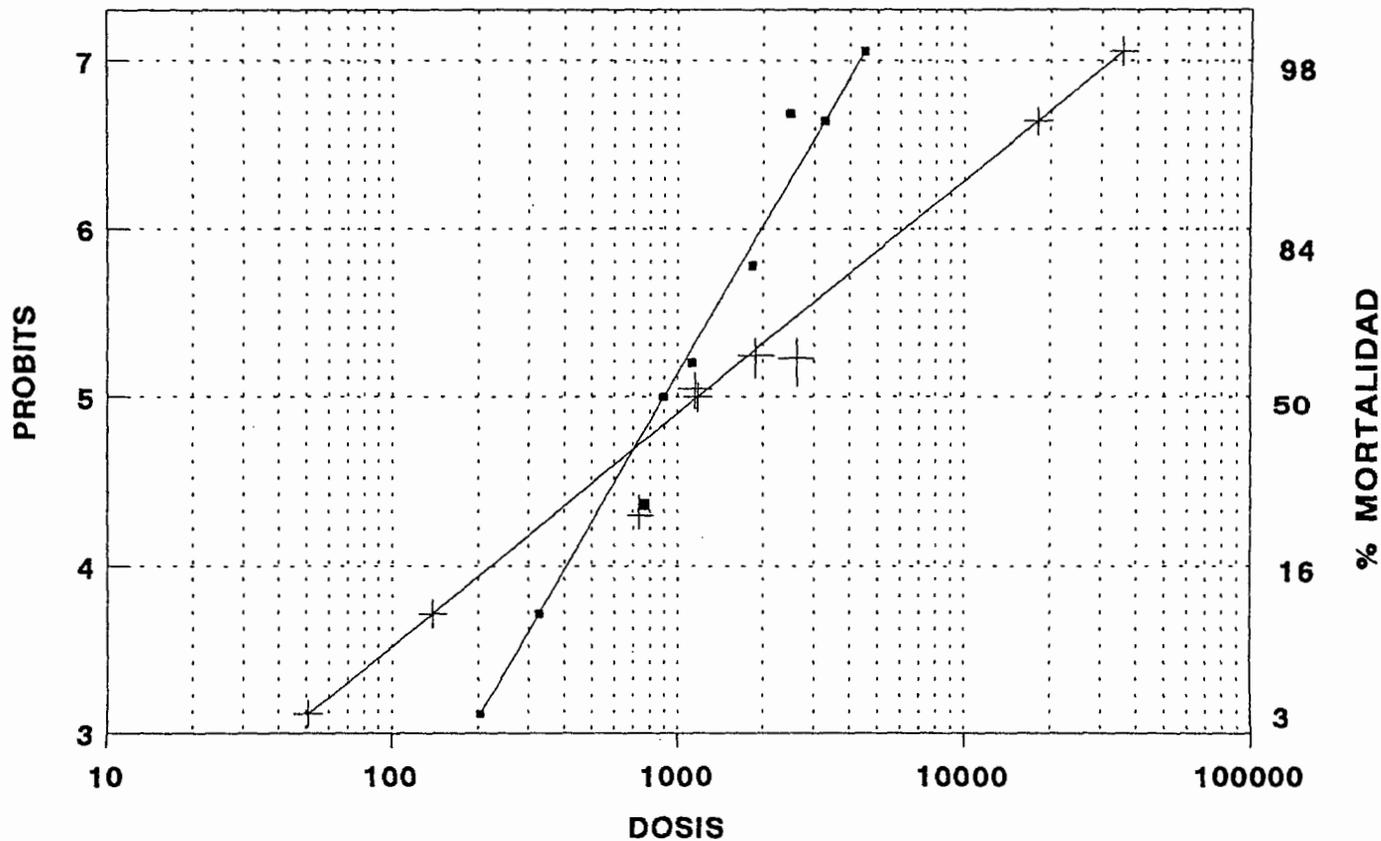
Cedrela dugesii

Los resultados en el análisis de *Cedrela dugesii* se observan en el cuadro 3. Allí podemos apreciar que el extracto que mostró mayor mortalidad fue el de semilla-etanol ya que presentó una CL_{50} de 892 ppm, seguido por el de semilla-acetona con una CL_{50} de 1175 ppm. Para el caso del extracto elaborado con semilla-agua no presentó mortalidad significativa, factor que pudo responder a las características propias del agua al presentar polaridad muy alta haciéndolo un solvente inadecuado para la extracción de los principios activos. Así mismo los extractos realizados con hojas no mostraron mortalidad alguna, y probablemente se deba a que los principios activos se encuentren a concentraciones muy bajas evitando que los solventes los extraigan o en su caso, que la técnica utilizada no fue la adecuada.

Comparaciones con el extracto de semilla-agua de *A. indica* se tienen factores de actividad relativa/*A. indica* de 892 y 1175 para los extractos de semilla-etanol y semilla acetona, respectivamente. Sin embargo, en otro orden de observaciones, es importante decir que el extracto de semilla-agua presentó mortalidades en las pupas con características del estado anterior en donde la exhubia larval quedó adherida a la pupa.

Cuadro 3. CL_{50} de extractos de <i>Cedrela dugesii</i> sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .			
EXTRACTO	CL_{50} (ppm)	Lim. fiduciales 95%	Linea log-dosis-probit
Semilla			
acetona	1175	(940 - 1402)	$Y=5.10 + 1.38 (X-13.14)$
etanol	892	(748 - 1018)	$Y=5.47 + 2.93 (X-13.11)$
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)			
Semilla			
agua	26.14		

Fig. 4.- Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* Say, a extractos de *Cedrela dugesii*.



■ Semilla con etanol + Semilla con acetona

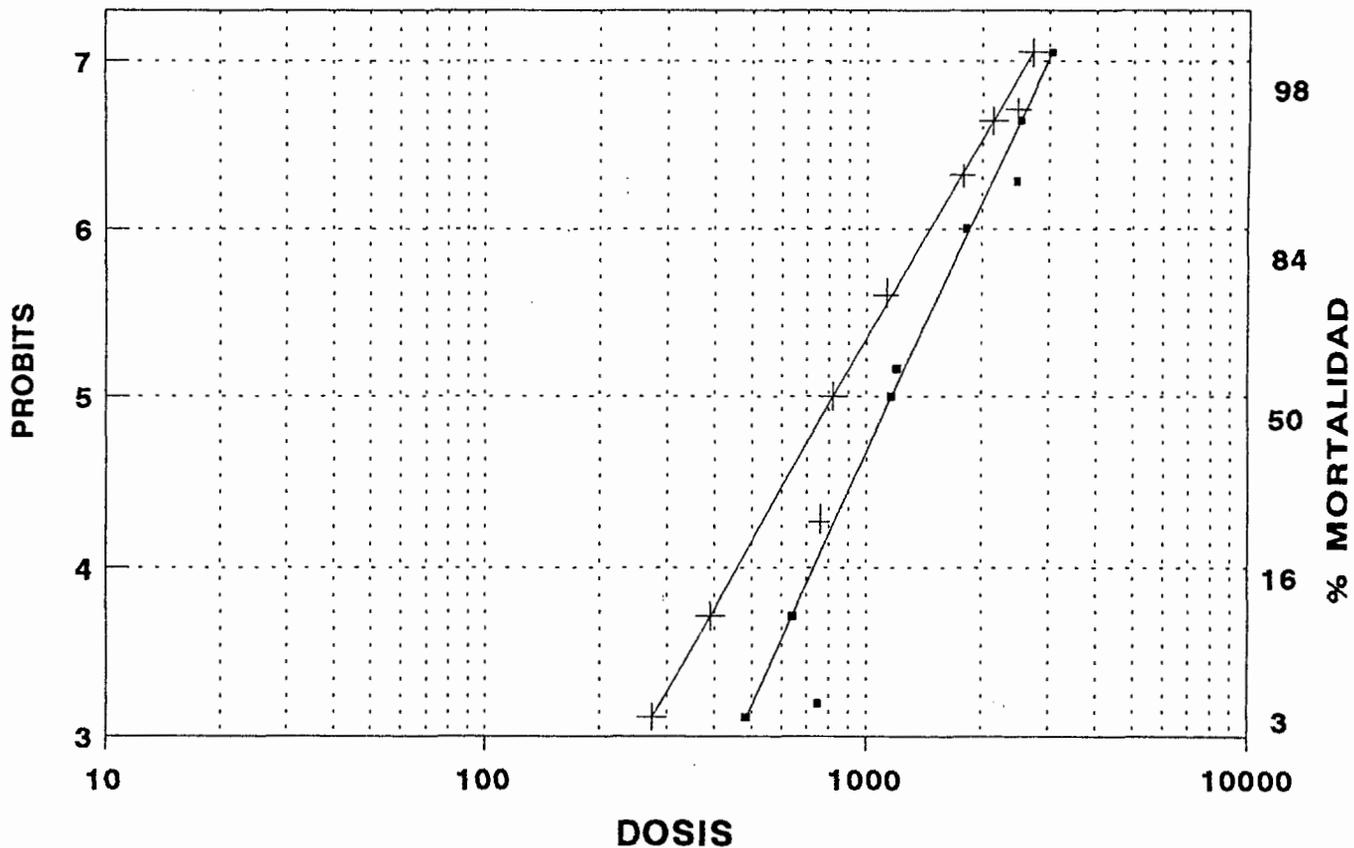
Swietenia humilis

Como podemos observar en el cuadro 4; el extracto de semilla-acetona mostró una CL_{50} de 820 ppm y el extracto de semilla con etanol con una CL_{50} de 1166 ppm. Comparaciones con el extracto acuoso de semilla del "neem", se tiene que su factor de actividad relativa/*A. indica* es de 31 y 44, respectivamente (cuadro 6).

Asimismo, todos aquellos extractos realizados con hojas, no mostraron mortalidad alguna y, como se mencionó anteriormente, quizá respondió a que la técnica utilizada no fue la adecuada o que los solventes no fueron capaces de extraer los principios activos al encontrarse éstos en concentraciones insuficientes.

Cuadro 4. CL_{50} para extractos de <i>Swietenia humilis</i> sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .			
EXTRACTO	CL_{50} (ppm)	Lim. fiduciales 95%	Linea log-dosis-probit
Semilla			
acetona	820	(723 - 909)	$Y=5.54 + 3.95 (X-13.05)$
etanol	1166	(1068-1260)	$Y=5.37 + 4.92 (X-13.14)$
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)			
semilla			
agua	26.14		

Fig. 5.- Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* Say, a extractos de *Swietenia humilis*.



—■— Semilla con etanol + Semilla con acetona

Guarea glabra

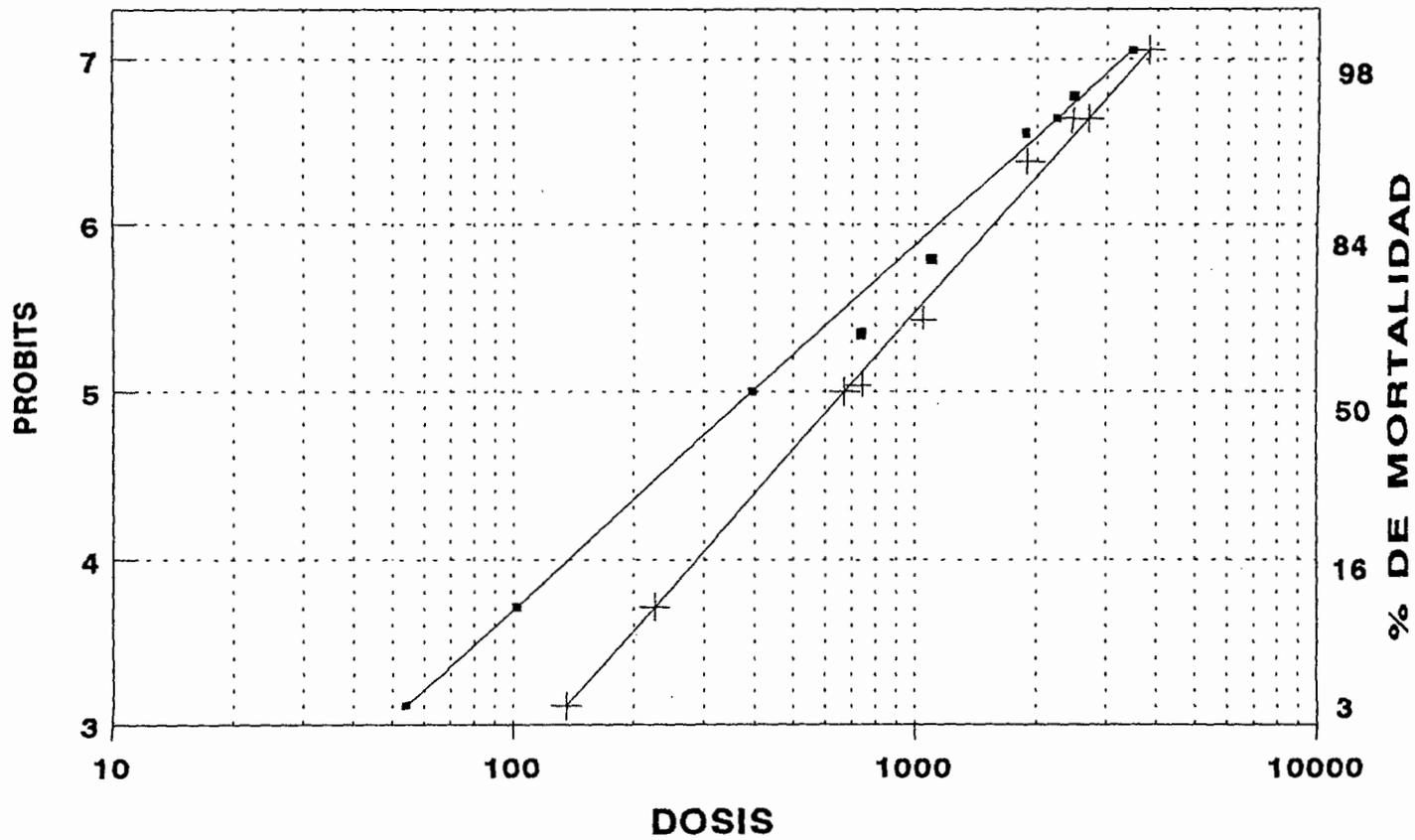
El cuadro 5, muestra la actividad de los extractos de *Guarea glabra*, en donde se observa que después del extracto de semilla-etanol de *T. hirta*, el extracto que mostró mejor resultado fue el de semilla-etanol de *G. glabra*, ya que presentó una CL_{50} de 394 ppm. Cabe mencionar, como se puede observar en el cuadro 6, que es 15 veces menos activo que el extracto acuoso de semilla de *A. indica* lo cual indica que está cerca de su actividad y para el caso del extracto de semilla-acetona su factor de actividad relativa/*A. indica* es 25, sin embargo, en observaciones realizadas durante el experimento, se pudo notar que a las 24 h después de haber sido expuestas a este extracto, las larvas manifestaron un efecto casi inmediato de engorgimiento, efecto que por el momento resulta difícil de explicar. Asimismo, se observó que la mayoría de las larvas muertas presentaron un estado intermedio entre larva y pupa, efecto visto por los extractos de *T. hirta* (obs. personal), *M. azedarach* (Wen y Schmutterer, 1991) y *A. indica* (Rembold *et al.*, 1984).

Todos aquellos extractos elaborados con hojas no mostraron mortalidades muy diferentes al tésigo y quizá se deba a los factores señalados anteriormente en las otras especies.

Cuadro 5. CL_{50} para extractos de *Guarea glabra* sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*.

EXTRACTO	CL_{50} (ppm)	Lim. fiduciales 95%	Linea log-dosis-probit
Semilla			
acetona	668	(520 - 791)	$Y=5.67 + 2.71 (X-13.07)$
etanol	394	(228 - 530)	$Y=5.98 + 2.17 (X-13.04)$
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)			
semilla			
agua	26.14		

Fig. 6.- Espectro de susceptibilidad de larvas de *C. quinquefasciatus* Say, a extractos de *Guarea glabra*.



■ Semilla con etanol + Semilla con acetona

Cuadro 6. Comparación de toxicidad de los extractos de las cinco especies de meliáceas a el extracto acuoso de semilla del neem.

EXTRACTO	CL ₅₀	FACTOR DE ACTIVIDAD RELATIVA/A. indica
<i>M. azedarach</i>		
Pulpa/etanol	998	38
Pulpa/acetona	936	35
Pulpa/agua	1268	48
<i>T. hirta</i>		
Semilla/etanol	60	2.2
Semilla/acetona	629	25
Pulpa/acetona	2900	110
Pulpa/agua	3150	120
<i>C. dugesii</i>		
Semilla/etanol	892	34
Semilla/acetona	1175	44
<i>G. glabra</i>		
Semilla/etanol	394	15
Semilla/acetona	668	25
<i>S. humilis</i>		
Semilla/etanol	1166	44
Semilla/acetona	820	31
<i>A. indica</i> (Zebitz, 1986)		
Semilla/agua	26.14	

Para sacar el factor de actividad relativa a *Azadirachta indica* se dividió el CL₅₀ obtenido por cada uno de los extractos entre el CL₅₀ del extracto acuoso de semilla del "neem", así tenemos que $60/26.14=2.2$, esto quiere decir que el extracto etanólico de semilla de *T. hirta* es 2.2 veces menos activo que el extracto acuoso de semilla del "neem".

7. CONCLUSIONES

- Los extractos de semillas mostraron, en forma general, una mayor actividad insecticida que los extractos de hojas.
- Los extractos realizados principalmente con etanol fueron más activos que los extractos acuosos y con acetona, en todas las especies.
- Los extractos de pulpa-acetona y pulpa-etanol de *T. hirta*, semilla-agua y semilla-etanol de *M. azedarach*, semilla-acetona de *G. glabra* y semilla-agua de *C. dugesii* presentan actividad como reguladores del crecimiento, comparable a los de *A. indica*.
- Los extractos que mostraron mayor actividad como reguladores del crecimiento fueron los de pulpa con acetona de *T. hirta* y semilla con acetona de *G. glabra*.
- El extracto que mostró mayor actividad insecticida fue el de semilla con etanol de *T. hirta*.
- Los extractos de las plantas meliáceas del estado de Jalisco representan una buena alternativa para el control de insectos ya que comparaciones de los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por el árbol del neem, se tienen actividades similares como es la reguladora del crecimiento. Además, el extracto etanólico de semilla de *T. hirta* presentó una CL_{50} muy cercana a la de *A. indica*.

RECOMENDACIONES

Es recomendable seguir esta línea de investigación ya que nuestro estado cuenta con una amplia gama de diversidad de especies vegetales nativas tanto de meliáceas como de otras familias, las cuales pueden presentar compuestos con actividad insecticida para el control de insectos.

Asimismo, es importante señalar el valor positivo que tiene seguir estudiando a los extractos de las especies meliáceas, principalmente a *T. hirta*, en el aislamiento de sus entidades responsables de la actividad, para así obtener un compuesto que pueda competir con *A. indica*. Además, se aconseja hacer estudios sobre el impacto que puedan tener en el ambiente, así como en los animales.

8. LITERATURA CITADA

- Ayala, O.J.L. y A. Lagunes T. 1986. Evaluación de substancias vegetales contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). *Agrociencia* (63):51-60.
- Chavan, S.R., P.B. Deshmukh and D.M. Rehapurkar. 1979. Investigation of indigenous plants for larvicidal activity. *Bul. Haffkine Inst.* 7:23-33.
- Cortez, A.G.D., P.C. Vieira, J.B. Fernández, M.F. Da Silva G. and A.G. Ferreira. 1992. Limonoids from *Trichilia hirta*. *Phytochemistry*, 31(2):625-628.
- Cremlin, R. 1982. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Limusa, México, pp. 63.
- De Souza G. and H. Rembold. 1984. Effects of azadirachtin on ecdysis of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 30(12):939-941.
- Hartley, G.S. and T.F. West. 1973. *Chemical for Pest Control*. Pergamon Press, Oxford, pp. 26.
- Holyoke, W.C. and J.C. Reese. 1987. Aute Insect Toxicants From Plants. CRC Hanbook of Natural Pesticides. *Insect Growth Regulators Part B.* 3:74-75.
- Jaipal, S., Z. Singh and R. Chauhan. 1983. Juvenile-hormone-like activity in extracts of some common Indian plants. *Indian J. Agric. Sci.*, 53(8):730-733.
- Joshi, G.B., G. Ramaprasad and S. Sitaramajah. 1982. Effect of a neem seed kernel suspension on *Telenomus remus*, an egg parasite of *Spodoptera litura*. *Phytoparasitica*, 10(1): 51-63.
- Koul, O., K. Amanai and T. Ohtaki. 1987. Effect of azadirachtin on the endocrine events of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 33(2):103-108.
- Koul, O., M.B. Isman and C.M. Ketkar. 1990. Propierties and uses of neem *Azadirachta indica*. *Can. J. Bot.* 68:1-11.
- Kraus, W., S. Baumann, M. Bokel, U. Keller, A. Klenk, M. Klingele, H. Pohnl and M. Schwinger. 1986. Control of insect feeding and development by constituents of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. *Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi*, pp. 111-125.
- Lee, S. M., J.A. Klocke, M.A. Barnby, R. B. Yamasaki and M.F. Balandrin. 1991. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). *Naturally Ocurring Pest Bioregulators* By Paul A. Hedin. ACS Symposium Series 449. Chapter 19, pp. 293-304.
- López, O.J.F., A. Aragón G. 1991. Pruebas de campo con polvos vegetales para el combate de "gallina ciega" (*Phyllophaga* spp.) y "gusano cogollero" (*Spodoptera frugiperda* Smith) en la sierra norte de Puebla. II Simposio Nacional Sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas, pp. 74-87.

- Makanjuola, W.A. 1989. Evaluation of extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) for the control of some stored product pest. *J. Stored Prod. Res.* 25(4):231-237.
- Martin, H. 1973. *The Scientific Principles of Crop Protection*. 6a. ed., Arnold, Londres. pp. 179.
- Metcalfe, C.L. and W.P. Flint. 1984. *Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control*. México, Cia. Editorial Continental, pp. 372-375.
- Pradhan, P.K. and M. Jotwani. 1968. Neem as an insect deterrent. *Indian Farming*. 12:756-760.
- Rembold, H., H. Foster, Ch. Czoppelt, P.J. Rao and K.P. Sieber. 1984. The azadirachtins, a group of insect growth regulators from the neem tree. In *natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*. GTZ Press, Eschborn. W. Germany. pp. 153.
- Romo, O.J.M. y C. Rodríguez H. 1987. Combate de la conchueladel frijol *Epilachna varivestis* Muls. (Coccinellidae: Coleoptera) con extractos acuosos vegetales en Chapingo, Edo. de México. Resúmenes del XXIII Congreso Nacional de Entomología. Morelia Michoacán, México, pp. 282.
- Santos, F.J.L., E. Bergo S., G. Burelli M. 1990. Avalicao do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado en laboratorio sob diferentes dietas. *Revista Saude Pública*; Sao Paulo, 24(2):95-100.
- Saxena, R.C., G.P. Waldbaver, N.J. Liquido, and B.C. Puma. 1981. Effect of neem oil on rice leaf-folder *Cnaphalo crocis medinalis*. In: *Natural Pesticides from the Neem Tree* A. indica A. Juss) Proc Inst. Int. Neem Conf. (W. Germany, 1980) pp. 189-203.
- Schmutterer H., R.C. Saxena and J.V.D. Heyde. 1983. Morphogenetic effects of some partially-purified fraction and mehanolic extract of neem seeds on *Mythimma separata* (Walker) and *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee). *Z. Ang. Ent.* 95:230-237.
- Schulz, W.P. 1981. Pathological alterations in the ovarioles of *Epilachna varivestis* induced by an extract from neem kernels. Proc. Ins. Neem Conf. (West germany, 1980), pp. 81-96.
- Steets R. and H. Schmutterer. 1975. The effect of azadirachtin on the longevity and reproduction of *Epilachna varivestis* Muls. (Coleoptera: Coccinellidae) *Z. Pflkrankh PflSchutz* (Journal of Plants Disease and Protection) 82:176-179.
- Vázquez, G.M. 1993. Evaluación de la susceptibilidad del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a insecticidas de diferente grupo toxicológico y a extractos de origen botánico. Tesis, Fac. de Agronomía, U. de G., Guad. Jal. Mex. pp. 42-52.

- Villar, M.C.; T. Lagunes y C. Rodríguez H. 1988. Evaluación de soluciones vegetales contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:Noctuidae) en condiciones de campo en San Luis Potosí. Resúmenes del XXIII Congreso Nacional de Entomología. Morelia, Michoacán, México, pp. 255.
- Villar, M.C. y F. J. Jiménez. 1991. Utilización de dos especies de plantas con propiedades tóxicas para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el C.A.E.A. Ciclo Primavera-Verano, 1988. II Simposio Nacional Sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. pp. 94-97.
- Villar, M.C. y M.A. López V. 1991. Evaluación de *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) y *Erodium cicutarium* (Geraniaceae) para el combate del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el C.A.E.A. San Luis Potosí. II Simposio Nacional Sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. pp. 63.
- Wen J. H. and H. Schmutterer. 1991. Effects of extracts from fruit and leaves of *Melia azedarach* L. on *Locusta migratoria migratoroides* (R. & F.). Anz. Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz, 64:128-133.
- WHO. 1980. The titration of experimental and commercial primary powders and formulations of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14. Problems and prospects. Unpublished document WHO/UBC/80.05 pp.
- Zebitz, W.C.P. 1984. Effect of some crude and azadirachtin-enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. Entomol. Exp. appl. 35:11-16.
- Zebitz, W.C.P. 1986. Potential of neem seed Kernel extracts in mosquito control. Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, pp. 555-573.