

PROPIEDADES ENTOMOTÓXICAS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* PARA EL CONTROL DE *Spodoptera exigua* Hübner

Erika Delgado Barreto¹; Ma. del Rosario García-Mateos^{1,2†}; Ma. del Carmen Ybarra-Moncada³;
César Luna-Morales¹; Ma. Teresa Martínez-Damián¹.

¹Instituto de Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5. C. P. 56230, Chapingo, Estado México. MÉXICO.

²Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5. C. P. 56230, Chapingo, Estado de México. MÉXICO. Correo-e: rosgar08@hotmail.com ([†]Autor para correspondencia).

³Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5. C. P. 56230, Chapingo, Estado de México. MÉXICO.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto antialimentario y la toxicidad de los extractos de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* en larvas de *Spodoptera exigua* en condiciones de laboratorio y en un cultivo orgánico de tomate uva var. Santa a campo abierto. El trabajo se realizó con los extractos hexánico y metanólico de semillas de *A. indica* y hojas de *P. auritum* y de *P. alliacea* aplicados en diferentes concentraciones en larvas 4to estadio de *S. exigua*. Las variables que se evaluaron fueron Índice de disuasión alimentaria (FDI), Índice de supresión alimentaria (FSI), Porcentaje de mortalidad y CL_{50} . El mayor efecto disuasivo alimentario se encontró en el extracto metanólico de *Azadirachta indica*, seguido por el de *P. auritum*, y el menor efecto en el extracto de *P. alliacea*. Los porcentajes de mortalidad para *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* fueron 38.88, 28.8 y 21.22 %, respectivamente; la misma tendencia que en condiciones de laboratorio, se encontró en campo. La CL_{50} mostró que el extracto metanólico de *A. indica* fue el más tóxico (4.03 ppm), y le siguió en efectividad el de *P. auritum* (42.08 ppm). En campo, la CL_{50} de los extractos metanólicos de *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* fueron 9.61, 21.21 y 104.1 ppm, respectivamente.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Azadirachta indica*, disuasión alimentaria, extractos, *Piper auritum*, *Petiveria alliacea*, toxicidad.

ENTOMOTOXIC PROPERTIES OF PLANT EXTRACTS OF *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* FOR THE CONTROL OF *Spodoptera exigua* Hübner

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antifeedant effect and toxicity of *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* extracts on *Spodoptera exigua* larvae under laboratory conditions and in an open-field crop of organically-grown grape tomatoes var. Santa. The work was carried out with hexane and methanol extracts of *A. indica* seeds and *P. auritum* and *P. alliacea* leaves applied in different concentrations against 4th-stage *S. exigua* larvae. The variables evaluated were feeding deterrence index (FDI), feeding suppression index (FSI), mortality rate and LC_{50} . The strongest feeding deterrent effect was found in the methanol extract of *Azadirachta indica*, followed in descending order by that of *P. auritum* and *P. alliacea*. The mortality rates for *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* were 38.88, 28.8 and 21.22 %, respectively, under laboratory conditions; the same trend was found in the field. The LC_{50} showed that the methanol extract of *A. indica* was the most potent (4.03 ppm), followed in effectiveness by that of *P. auritum* (42.08 ppm). In the field, the LC_{50} of the methanol extracts of *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* were 9.61, 21.21 and 104.1 ppm, respectively.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Azadirachta indica*, feeding deterrence, extracts, *Piper auritum*, *Petiveria alliacea*, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de insecticidas sintéticos para evitar las pérdidas económicas en la producción de algunos cultivos por el ataque de insectos plaga ha provocado la contaminación del planeta (Zapata *et al.*, 2009), así como, un aumento de la resistencia de las plagas (Lagunes y Villanueva, 1999); tal es el caso de *Spodoptera* spp. (Meagher *et al.*, 2008). El gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hübner) es una plaga que afecta a aproximadamente 130 cultivos hortícolas de 30 familias diferentes (Merkx-Jacques *et al.*, 2008; Saeed *et al.*, 2009), entre ellos el tomate (Liburd *et al.*, 2000), lo que repercute en considerables daños económicos (Merkx-Jacques *et al.*, 2008).

Una alternativa para el control de plagas, sin afectar al medio ambiente y evitar el desarrollo de la resistencia, puede ser el uso de extractos vegetales biodegradables (Regnault-Roger *et al.*, 2004). Recientemente, el estudio de la actividad insecticida de los extractos vegetales y fitoquímicos se ha intensificado debido a la demanda de alimentos orgánicos (De Souza *et al.*, 2009) y a las exigencias actuales de la defensa fitosanitaria de los productos hortícolas (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

La actividad tóxica y la eficacia de extractos vegetales en las plagas han contribuido a la identificación de metabolitos secundarios con actividad insecticida. Los diversos efectos biológicos de fitoquímicos han llevado a reevaluar sus diferentes funciones en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas y en el desarrollo de mecanismos de defensa contra insectos (Wink, 2003). Sin embargo, muchos metabolitos secundarios, como insecticidas o disuasorios alimentarios, aún se encuentran en estudio (Ulrichs *et al.*, 2008).

Algunos ingredientes activos se han identificado en las familias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiatae y Piperaceae (Regnault-Roger *et al.*, 2004; Ulrichs *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2009), Annonaceae, Cannellaceae, Labiateae, Meliaceae, Mimosaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Solanaceae (Zabel *et al.*, 2002; González Coloma *et al.*, 2005; Ybarra *et al.*, 2005; Isman *et al.*, 2006), Fabaceae (García-Mateos *et al.*, 2004).

Por ejemplo, *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) llamada comúnmente ajillo o hierba del zorrillo por su olor característico, debido a la presencia de compuestos de azufre (De Souza *et al.*, 1990), es endémica de México, de las islas del Caribe, de Centroamérica y de Sudamérica. Es una de las plantas medicinales más usadas en América Latina; se encuentra descrita su actividad insecticida, acaricida y bactericida (Benavides *et al.*, 2001). Scott *et al.* (2008), señalan que el género *Piper*, representado por 700 especies, en particular *P. auritum* Kunth (Piperaceae), conocida como hoja santa o acuyo, es una especie aromática originaria de México y distribuida hasta Colombia; tiene propiedades insecticidas, repelentes y antialimentarias por la presencia de aceites esenciales (metabolitos volátiles) y las conocidas piperamidas (Olivero-

INTRODUCTION

The indiscriminate use of synthetic insecticides to avoid economic losses in the production of some crops due to pest insect attack has resulted in the pollution of the planet (Zapata *et al.*, 2009) and increased pest resistance (Lagunes and Villanueva, 1999), as in the case of *Spodoptera* spp. (Meagher *et al.*, 2008). The armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner) is a plague that affects about 130 horticultural crops of 30 different families (Merkx-Jacques *et al.*, 2008; Saeed *et al.*, 2009), including tomato (Liburd *et al.*, 2000), which results in considerable economic damage (Merkx-Jacques *et al.*, 2008).

One possible alternative for pest control, without affecting the environment and avoiding the development of resistance, may be the use of biodegradable plant extracts (Regnault-Roger *et al.*, 2004). Recently, the study of the insecticidal activity of plant extracts and phytochemicals has increased due to the demand for organic food (De Souza *et al.*, 2009) and to current phytosanitary requirements for horticultural products (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

The toxic activity and effectiveness of plant extracts against pests have contributed to the identification of secondary metabolites with insecticidal activity. The various biological effects of phytochemicals have led to reevaluating their different functions in plants, especially in the context of ecological interactions and the development of defense mechanisms against insects (Wink, 2003). However, many secondary metabolites, such as insecticides or feeding deterrents, are still under study (Ulrichs *et al.*, 2008).

Some active ingredients have been identified in the families Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiatae and Piperaceae (Regnault-Roger *et al.*, 2004; Ulrichs *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2009), Annonaceae, Cannellaceae, Labiateae, Meliaceae, Mimosaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Solanaceae (Zabel *et al.*, 2002; González-Coloma *et al.*, 2005; Ybarra *et al.*, 2005; Isman *et al.*, 2006) Fabaceae (García-Mateos *et al.*, 2004).

For example, *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae), commonly known as garlic or skunk weed for its characteristic odor, which is due to the presence of sulfur compounds (De Souza *et al.*, 1990), is endemic to Mexico, the Caribbean islands, and Central and South America. One of the most widely used medicinal plants in Latin America, its insecticidal, acaricidal and bacterial activity have been previously reported (Benavides *et al.*, 2001). Scott *et al.* (2008) note that the genus *Piper* encompasses 700 species, including *P. auritum* Kunth (Piperaceae), which is known as *hoja santa* (holy leaf) or *acuyo*, and which is an aromatic species native to Mexico that is now found as far away as Columbia; it has insecticidal, repellent and antifeedant properties due to the presence of essential oils (volatile metabolites) and the known piperamides (Olivero-Verbel *et al.*, 2009). Azadirachtin is the main active ingredient in *Azadirachta*

Verbel *et al.*, 2009). Azadiractina es el principal ingrediente activo de *Azadirachta indica* (A. Juss., Meliaceae), y sus derivados, del tipo limonoide, son responsables de diversas propiedades fisiológicas (inhibidor de crecimiento, repelente, actividad insecticida y antialimentaria) en diferentes familias de insectos (Pavela *et al.*, 2009).

El estudio de la actividad antialimentaria y/o insecticida de extractos vegetales en diversas especies del género *Spodoptera* se encuentra documentado (Ulrichs *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha estudiado en *S. exigua* la actividad insecticida de las especies de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea*. En el presente estudio se evaluaron el efecto tóxico y la actividad antialimentaria de los extractos hexánico y metanólico de *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* en larvas de 4^{to} estadio de *S. exigua* en laboratorio y en un cultivo orgánico de tomate uva var. Santa a campo abierto, con la finalidad de encontrar una alternativa para el control de la plaga que afecta el rendimiento de este cultivo orgánico, sin contaminar el medio ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Las hojas de *P. auritum* fueron recolectadas al azar de varios ejemplares en el mes de febrero de 2010 en el municipio de Actopan, Veracruz, México, situado a 19° 30' LN y 96° 37' LO a 311 m de altitud, con un clima tropical cálido Awo(w)(i')gw'', donde la temperatura varía de 21.1 a 27.3 °C y hay una precipitación media anual de 860.1 mm (García, 1988). Las semillas de *A. indica* (neem) fueron recolectadas en el mes de marzo del mismo año en el poblado La Brecha, municipio de Guasave, Sinaloa, México, situado a 25° 22' LN y 108° 25' LO a una altitud de 15 m, donde el clima es seco, muy cálido y cálido BS(h'), la temperatura varía de 18.5 a 29.9 °C y su precipitación media anual es de 392.8 mm (García, 1988). Las hojas de *P. alliacea* fueron recolectadas en el mes de junio de 2009 en el municipio de Rodríguez Clara, Veracruz, México, situado a 17° 59' LN y 03° 43' LO a una altitud de 16 m, con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano Aw2(w)(i')w'', la temperatura promedio varía de 21.5 a 27.8 °C, y hay una precipitación media anual de 1,500 mm (García, 1988).

Preparación de extractos vegetales

La hoja seca y molida (500 g) de *P. alliacea* y *P. auritum* separadamente se maceró en hexano (2 x 1000 ml) durante 24 h (rendimiento: 0.40 y 0.19 %, respectivamente). El mismo procedimiento se siguió para preparar el extracto hexánico con 400 g de semilla seca y molida de *A. indica* (rendimiento: 10.20 %). Posteriormente, cada extracto se filtró y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador Büchi para eliminar el disolvente. Para la preparación del extracto metanólico, se colocó separadamente el material vegetal seco y molido de cada especie en un equipo soxhlet por 48 h. La eliminación del disolvente se realizó

indica (A. Juss., Meliaceae), and its limonoid derivatives are responsible for various physiological properties (growth inhibitor, repellent, insecticidal and antifeedant activity) in different insect families (Pavela *et al.*, 2009).

The study of the antifeedant and/or insecticidal activity of plant extracts against various species of the genus *Spodoptera* has been documented (Ulrichs *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2009). However, the insecticidal activity of the species *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* against *S. exigua* has not been studied. This study evaluated the toxic effect and antifeedant activity of hexane and methanol extracts of *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* on 4th-stage *S. exigua* larvae in the laboratory and on a field crop of organically-grown grape tomatoes var. Santa, in order to find an alternative method to control this pest that affects the yield of this organic crop, without polluting the environment.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plant material

The *P. auritum* leaves were collected at random from several specimens in February 2010 in the municipality of Actopan, Veracruz, Mexico, located at 19° 30' NL and 96° 37' WL at an altitude of 311 m, with a warm tropical climate Awo(w)(i')gw'', where the temperature varies from 21.1 to 27.3 °C and there is an average annual rainfall of 860.1 mm (García, 1988). The *A. indica* (neem) seeds were collected in March of that year in the town of La Brecha, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico, situated at 25° 22' NL and 108° 25' WL at an altitude of 15 m, where the climate is dry, very warm and warm BS(h'), the temperature varies from 18.5 to 29.9 °C and average annual rainfall is 392.8 mm (García, 1988). The *P. alliacea* leaves were collected in June 2009 in the municipality of Rodríguez Clara, Veracruz, Mexico, located at 17° 59' NL and 03° 43' WL at an altitude of 16 m, with a warm subhumid climate with summer rains Aw2(w)(i')w'', an average temperature of between 21.5 to 27.8 °C, and average annual rainfall of 1,500 mm (García, 1988).

Preparation of plant extracts

The dried and ground leaves (500 g) of *P. alliacea* and *P. auritum* were separately macerated in hexane (2 x 1000 ml) for 24 h (yield: 0.40 and 0.19 %, respectively). The same procedure was followed to prepare the hexane extract with 400 g of dried, ground *A. indica* seeds (yield: 10.20 %). Subsequently, each extract was filtered and concentrated under reduced pressure in a Büchiroto evaporator to remove the solvent. For the preparation of the methanol extract, the dried and ground plant material of each species was placed separately in a soxhlet extractor for 48 h. Solvent removal was performed under vacuum. Yields obtained from *A. indica*, *P. auritum* and *P.*

a vacío. Los rendimientos obtenidos de los extractos de *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* fueron 4.91, 0.83 y 4.64 %, respectivamente. Las concentraciones (1, 5, y 10 %) para las pruebas en laboratorio (actividad antialimentaria, % de mortalidad y CL_{50}) y 5, 10 y 15 % para las evaluaciones (% de mortalidad y CL_{50}) en campo se prepararon a partir de los extractos orgánicos.

Cría de *Spodoptera exigua*

Las poblaciones de larvas y huevos colectados en cultivos de maíz y algodón del campo experimental del CIMMYT, campus Estado de México, en 1997, se establecieron bajo condiciones ambientales controladas (26 ± 2 °C de temperatura, 65 ± 5 % de HR y fotoperiodo de 16:8 h [luz:oscuridad]). Para las pruebas antialimentarias y de toxicidad en laboratorio y en campo se usó una población de larvas del 4^{to} estadio de *S. exigua*.

Actividad antialimentaria

Pruebas con posibilidades de elección de alimento. En una caja Petri (unidad experimental:UE) de 9 cm de diámetro se colocó una base de papel filtro húmedo con agua destilada y en la superficie se ubicaron dos discos foliares de lechuga de 3 cm de diámetro, previamente pesados. Uno de los discos fue asperjado por ambos lados de la hoja (haz y envés) con 600 µl de cada concentración por extracto, y el segundo disco fue rociado con la misma cantidad de agua destilada.

Sobre los discos foliares se colocaron dos larvas de *S. exigua*, previamente pesadas y en abstinencia de alimento por 5 h. Las cajas Petri fueron cubiertas por una malla de tela organza, se mantuvieron a una temperatura de 24 ± 2 °C, 63 ± 5 % de HR y un fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad). Después de 72 h, las larvas se retiraron de los discos foliares y se pesaron para obtener su peso final. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, incluyendo el testigo.

Las variables a evaluar fueron: índice de disuasión alimentaria (FDI) = $100 [(C-T) / (C+T)]$; donde: T = Peso de disco tratado con extracto, C = Peso de disco sin extracto. Índice de supresión alimentaria (FSI) = $100 [(Cv-(C+T)) / Cv]$; donde: T = Peso de disco tratado con extracto, Cv = Variable control (peso de disco sin extracto), C = Peso de disco del tratamiento control (Zapata *et al.*, 2009).

Evaluación de toxicidad en laboratorio

Pruebas sin posibilidades de elección de alimento. Para la adaptación de las larvas durante 24 h, se colocaron tres larvas de 4^{to} estadio de *S. exigua* en tres discos foliares (3 cm de diámetro) de lechuga sin extracto por cada caja Petri de cristal (9 cm diámetro). Después del tiempo de adaptación de las larvas, se registró el peso de cada una. Posteriormente, en cada caja Petri se colocaron tres larvas sobre tres nuevos discos foliares de lechuga (3 cm de diámetro), cada uno previamente rociado por ambos lados (haz y envés) con 800 µl de extracto por concentración (1, 5

alliacea extracts were 4.91, 0.83 and 4.64 %, respectively. The concentrations (1, 5 and 10 %) for the laboratory tests (antifeedant activity, mortality rate and LC_{50}) and those (5, 10 and 15 %) for the field trials (mortality rate and LC_{50}) were prepared from the organic extracts.

Rearing of *Spodoptera exigua*

The larval populations and eggs collected in maize and cotton crops at the CIMMYT (Spanish acronym for the International Maize and Wheat Improvement Center) experimental field, State of Mexico campus, in 1997, were established under controlled environmental conditions (26 ± 2 °C of temperature, 65 ± 5 % of RH and a photoperiod of 16:8 h [light: dark]). For the antifeedant and toxicity testing in laboratory and field conditions, a population of 4th-stage *S. exigua* larvae was used.

Antifeedant Activity

Choice tests. In a 9-cm-diameter Petri dish (experimental unit: EU), filter paper wetted with distilled water was installed as the base, and two lettuce leaf discs, both pre-weighed and 3 cm in diameter, were placed on the surface. One of the discs was sprayed on both sides of the leaf (top and bottom) with 600 µl of each concentration per extract, and the second disc was sprayed with the same amount of distilled water.

Two *S. exigua* larvae, pre-weighed and starved for 5 h beforehand, were placed on the leaf discs. The Petri dishes were covered by an organza fabric mesh, kept at a temperature of 24 ± 2 °C, 63 ± 5 % of RH and a photoperiod of 16:8 (light: dark). After 72 h, the larvae were removed from the leaf discs and weighed to obtain their final weight. There were five replicates per treatment, including the control.

The variables assessed were: feeding deterrence index (FDI) = $100 [(C-T) / (C+T)]$, where: T = Weight of extract-treated disc, C = Weight of disc without extract. Feeding suppression index (FSI) = $100 [(Cv-(C+T)) / Cv]$, where: T = Weight of extract-treated disc, Cv = Control variable (weight of disc without extract), C = Weight of control treatment disc (Zapata *et al.*, 2009).

Laboratory evaluation of toxicity

No-choice tests. For adaptation purposes, three 4th-stage *S. exigua* larvae were placed for 24 h in three lettuce leaf discs (3 cm in diameter) without extract per glass Petri dish (9 cm in diameter). After the adaptation time, the weight of each larva was recorded. Subsequently, in each Petri dish three larvae were placed on three new lettuce leaf discs (3 cm in diameter), each pre-sprayed on both sides (top and bottom) with 800 µl of extract per concentration (1, 5 and 10 %). There were five replicates per concentration of each extract, including the control.

y 10 %). Se realizaron cinco repeticiones por concentración de cada extracto, incluyendo el testigo.

Las lecturas del número de larvas vivas y muertas se hicieron cada 24 h durante cinco días. Las condiciones del bioensayo fueron: temperatura ambiente promedio de 19 ± 2 °C, 60 ± 5 % de HR y fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad). Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL_{50}) para los extractos hexánico y metanólico de cada especie.

Evaluación de toxicidad en campo

El establecimiento del cultivo de tomate uva var. Santa (*Solanum lycopersicum* Mill) se llevó a cabo bajo sistema de producción a campo abierto en el Rancho Los Hoyos, ubicado en el km. 91 de la carretera internacional Obregón-Guaymas, 7.6 km al norte, municipio de Empalme, Sonora, México, ubicado a 27° 55' LN y 110° 48' LO. La zona de cultivo presenta un clima seco muy cálido del tipo BW (h') w (e), una temperatura media máxima de 18 a 34 °C, con una precipitación anual de 320 mm. Los tipos de suelos identificados en el área del cultivo son: litosol, regosol y yermosol.

Manejo del cultivo

La siembra de las semillas de tomate se inició en charolas de polietileno; se utilizó como sustrato peat moss marca TBK y vermiculita (2:1). A los 35 días de la siembra, las plántulas fueron trasplantadas a campo abierto. La mezcla de fertilizante que se aplicó fue 0.4 – 0 – 5 (N, P, K), disolviendo 78 kg de nitrato de sodio y 288 kg de sulfato de potasio en 3,000 L de agua. El fertirriego se realizó cada tercer día. En cada surco se sembraron las plantas de tomate uva con una separación de 55 cm entre plantas y la distancia entre surcos fue de 1.2 m, obteniéndose una densidad de cuatro plantas por m².

Infestación del cultivo

Se seleccionaron aleatoriamente 30 plantas (unidades experimentales) de una altura de 45 a 50 cm en la etapa fenológica de ramificación de tomate uva, después de cuatro semanas del trasplante. Se colocaron 15 larvas (4to. estadio) por planta durante 24 h para su adaptación. Las plantas se aislaron mediante jaulas entomológicas elaboradas con tela de organza blanca de 70 cm de largo por 50 cm de diámetro, sujetas por las estacas del tutorio y el amarre de la planta. Después de 24 h de la infestación se realizaron tres aplicaciones cada 30 min únicamente por la mañana con la aspersión de 35 ml por cada concentración de los extractos metanólicos de *P.alliacea*, *P. auritum* y *A. indica*. Las condiciones de la prueba biológica fueron: temperatura ambiente promedio de 26 ± 2 °C, 55 ± 5 % de HR y fotoperiodo de 12:12 h (luz:oscuridad). Las lecturas del número de larvas vivas y muertas se realizaron tres horas después de la aplicación para cuantificar el descenso de la población. A las plantas seleccionadas se les asignaron los tratamientos de acuerdo con un diseño completamente

Observations of the number of live and dead larvae were made and recorded every 24 h for five days. The bio-assay conditions were: average ambient temperature of 19 ± 2 °C, 60 ± 5 % of RH and photoperiod of 16:8 (light: dark). The variables assessed were: mortality rate and median lethal concentration (LC_{50}) for hexane and methanol extracts of each species.

Field evaluation of toxicity

The establishment of the grape tomato var. Santa (*Solanum lycopersicum* Mill) crop was carried out under an open-field production system at Rancho Los Hoyos, located at km. 91 of the Obregón-Guaymas international highway, 7.6 km north of the municipality of Empalme, Sonora, Mexico, located at 27° 55' NL and 110° 48' WL. The crop area has a very warm, dry climate of type BW (h') w (e), with an average maximum temperature of 18 to 34 °C and annual rainfall of 320 mm. Soil types identified in the crop area are: lithosol, regosol and yermosol.

Crop management

The tomato seeds were sown in polyethylene trays, with TBK-brand peat moss and vermiculite used as substrate (2:1). At 35 days after sowing, the seedlings were transplanted into the open field. The fertilizer mixture applied was 0.4 – 0 – 5 (N, P, K), dissolving 78 kg of sodium nitrate and 288 kg of potassium sulfate in 3,000 L of water. Fertigation was performed every other day. In each row, the grape tomato seedlings were planted 55 cm apart and with 1.2 m row spacing, giving a density of four plants per m².

Crop infestation

Four weeks after transplantation, 30 grape tomato plants (experimental units), 45 to 50 cm in height, in the phenological stage of branching were randomly selected. Fifteen larvae (4th stage) were placed per plant for 24 h for adaptation. The plants were isolated using entomological cages made with white organza fabric, 70 cm long by 50 cm in diameter, fastened by the tutoring stakes and the plant tyings. After 24 h of infestation, three applications were made every 30 min in the morning only, spraying 35 ml of each concentration of the *P. alliacea*, *P. auritum* and *A. indica* methanol extracts. The biological test conditions were: average ambient temperature of 26 ± 2 °C, 55 ± 5 % of RH and photoperiod of 12:12 h (light: dark). Observations of the number of live and dead larvae were made and recorded every three hours after application for quantifying the decrease in the population. The selected plants were assigned treatments according to a completely randomized design. There were three replicates per concentration of each extract; the control was water + Tween 20 at 1 % v/v. The variables evaluated were: mortality rate and median lethal concentration (LC_{50}) for the methanol extract of each species.

al azar. Se realizaron tres repeticiones por concentración de cada extracto; el control fue agua + Tween 20 al 0.1 % v/v. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL_{50}) para el extracto metanólico de cada especie.

Análisis fitoquímico

Con la finalidad de asociar el efecto tóxico con el tipo de metabolito secundario (alcaloides, fenólicos y terpenoides) presente en cada extracto, se realizó un análisis fitoquímico de los extractos hexánico y metanólico de cada especie. La identificación se realizó por cromatografía en capa fina aplicando 1 μ l de cada extracto en cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 (Merck). Para la detección de flavonoides se empleó como eluyente una mezcla de butanol: ácido acético: agua en una proporción de 40:10:50 % v/v; los agentes cromogénicos fueron 2-aminoetilidifenilborinato y polietilenglicol 4000; los componentes se visualizaron a una longitud de onda de 365 nm. Para la detección de alcaloides se usó como eluyente metanol:diclorometano (8:2 % v/v), y el agente cromogénico fue el reactivo de Dragendorff. Para la identificación de terpenoides se utilizó una mezcla de tolueno:acetato de etilo (93:7 % v/v); el agente cromogénico empleado fue vainillina al 1 % en etanol y ácido sulfúrico al 10 % en etanol (Wagner y Bladt, 1996).

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y de comparación de medias LSD Fisher ($P \leq 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0. Las tasas de mortalidad fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925), y después fueron analizadas mediante el análisis Probit (Finney, 1971). El Análisis estadístico Probit permitió calcular la Concentración Letal Media (CL_{50}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antialimentaria

Los resultados de la actividad antialimentaria en *S. exigua* que ocasionaron los extractos de *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* se muestran en el Cuadro 1. No se encontraron diferencias significativas de la disuasión del extracto hexánico ($P \leq 0.608$) entre las tres especies vegetales (Cuadro 1). Tampoco se encontró variación estadística del peso final del alimento en relación con el testigo (Cuadro 1), lo que permitió inferir que hubo consumo del alimento, con excepción de la concentración menor (1 %) del extracto hexánico de *P. alliaceae*. Asimismo, el peso final de *S. exigua* a las 48 h fue significativamente igual en los tratamientos del extracto hexánico de *P. alliacea* con el testigo; solamente en aquellas que fueron alimentadas con *A. indica* y *P. auritum* hubo diferencias con menor peso (Cuadro 1).

Phytochemical analysis

In order to associate the toxic effect with the type of secondary metabolite (alkaloids, phenolics and terpenoids) present in each extract, phytochemical analysis of the hexane and methanol extracts of each species was carried out. Identification was performed by thin layer chromatography by applying 1 μ l of each extract on silica gel 60 F254 chromatoplates (Merck). For detection of flavonoids, a mixture of butanol: acetic acid: water at a ratio of 40:10:50 % v/v was used as eluent; the chromogenic agents were 2-aminoethyl diphenylborinate and polyethylene glycol 4000; the components were visualized with a wavelength of 365 nm. For detection of alkaloids, methanol: dichloromethane (8:2 v/v) was used as eluent, and the chromogenic agent was Dragendorff's reagent. For identification of terpenoids, a mixture of toluene: ethyl acetate (93:7 % v/v) was used; the chromogenic agent used was 1 % vanillin in ethanol and 10 % sulfuric acid in ethanol (Wagner and Bladt, 1996).

Statistical analysis

An Analysis of Variance (ANOVA) and Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$) were performed using Statistical Analysis System (SAS) software program version 9.0. Mortality rates were corrected by Abbott's formula (Abbott, 1925), and then analyzed by Probit analysis (Finney, 1971). The Probit statistical analysis allowed calculating the Median Lethal Concentration (LC_{50}).

RESULTS AND DISCUSSION

Antifeedant activity

The results of the antifeedant activity in *S. exigua* caused by the *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* extracts are shown in Table 1. No significant differences were found in the deterrence effect of the hexane extract ($P \leq 0.608$) among the three plant species (Table 1). Nor was there any statistical variation in the final food weight in relation to the control (Table 1), which allowed inferring that there was food consumption, except for the lowest concentration (1 %) of the hexane extract of *P. alliaceae*. Also, the final weight of *S. exigua* at 48 h was, significantly, the same in the *P. alliacea* hexane extract treatments and the control; only in those fed *A. indica* and *P. auritum* were there differences in terms of lower weight (Table 1).

Antifeedant substances are classified as repellents (they repel the insect without contact), suppressants (they suppress intake after contact) and deterrents (they deter the insect from intake after having tasted them) (Sengonca *et al.*, 2006). Based on these definitions and according to the behavior of the larvae, the FSI was significantly lower in the larvae treated with the *A. indica* hexane extract than with the *P. auritum* and *P. alliacea* extracts.

CUADRO 1. Comparación de medias de los índices de disuasión alimentaria y supresión en *Spodoptera exigua* por efecto de los extractos orgánicos de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea*.

Especie	Con. (%)	FDI		FSI		DPL		DPD	
		Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH
<i>Petiveria alliacea</i>	1	5.69 a	5.73 ab	95.24 a	77.05 bc	0.024 a	0.035 a	0.432 b	0.532 abc
	5	8.26 a	6.45 ab	83.37 ab	59.88 c	0.023 ab	0.017 b	0.509 ab	0.501 c
	10	3.41 a	5.17 b	83.19 ab	75.58 bc	0.024 a	0.016 b	0.537a	0.599 a
<i>Piper auritum</i>	1	3.98 a	5.49 ab	88.50 a	76.54 bc	0.014 cd	0.024 ab	0.504 ab	0.580 ab
	5	4.32 a	5.79 ab	87.51 a	82.52 ab	0.014 cd	0.022 ab	0.499 ab	0.533 abc
	10	4.58 a	7.41 ab	80.22 ab	75.55 bc	0.014 cd	0.020 b	0.509 ab	0.571 ab
<i>Azadirachta indica</i>	1	6.67 a	4.39 b	70.62 bc	77.83 bc	0.012 d	0.021 ab	0.459 ab	0.558 abc
	5	7.68 a	9.75 ab	64.37 c	97.18 a	0.016 cd	0.024 ab	0.474 ab	0.575 ab
	10	6.91 a	10.88 a	64.14 c	74.23 bc	0.018 bc	0.019 b	0.493 ab	0.592 a
Control	-	-	-	-	-	0.023 ab	0.022 ab	0.543 a	0.523 bc
DHMS	-	5.60	5.42	15.31	19.23	0.0055	0.0088	0.0995	0.0668

FDI: Índice de disuasión alimentaria; FSI: Índice de supresión alimentaria; DPL: Diferencia peso de larva; DPD: Diferencia peso del disco; Hex: Extracto hexánico; MeOH: Extracto metanólico. Medias con igual letra por columnas son iguales a una $P \leq 0.05$. DHMS = Diferencia Honesta Mínima Significativa.

TABLE 1. Comparison of feeding deterrence and suppression index means in *Spodoptera exigua* as a result of organic extracts of *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea*.

Species	Con. (%)	FDI		FSI		LWD		DWD	
		Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH
<i>Petiveria alliacea</i>	1	5.69 a	5.73 ab	95.24 a	77.05 bc	0.024 a	0.035 a	0.432 b	0.532 abc
	5	8.26 a	6.45 ab	83.37 ab	59.88 c	0.023 ab	0.017 b	0.509 ab	0.501 c
	10	3.41 a	5.17 b	83.19 ab	75.58 bc	0.024 a	0.016 b	0.537a	0.599 a
<i>Piper auritum</i>	1	3.98 a	5.49 ab	88.50 a	76.54 bc	0.014 cd	0.024 ab	0.504 ab	0.580 ab
	5	4.32 a	5.79 ab	87.51 a	82.52 ab	0.014 cd	0.022 ab	0.499 ab	0.533 abc
	10	4.58 a	7.41 ab	80.22 ab	75.55 bc	0.014 cd	0.020 b	0.509 ab	0.571 ab
<i>Azadirachta indica</i>	1	6.67 a	4.39 b	70.62 bc	77.83 bc	0.012 d	0.021 ab	0.459 ab	0.558 abc
	5	7.68 a	9.75 ab	64.37 c	97.18 a	0.016 cd	0.024 ab	0.474 ab	0.575 ab
	10	6.91 a	10.88 a	64.14 c	74.23 bc	0.018 bc	0.019 b	0.493 ab	0.592 a
Control	-	-	-	-	-	0.023 ab	0.022 ab	0.543 a	0.523 bc
HSD	-	5.60	5.42	15.31	19.23	0.0055	0.0088	0.0995	0.0668

FDI: Feeding deterrence index; FSI: Feeding suppression index; LWD: Larva weight difference; DWD: Disc weight difference; Hex: Hexane extract; MeOH: Methanol extract. Means with the same letter in columns are equal at $P \leq 0.05$. HSD = Honest Significant Difference.

Las sustancias antialimentarias se clasifican como repelentes (repelen al insecto sin establecer contacto), supresivas (suprimen la ingesta después del contacto) y disuasivas (disuaden al insecto de ingerirlas después de haberlas degustado) (Sengonca *et al.*, 2006). Con base en estas definiciones y de acuerdo al comportamiento de las larvas, la FSI fue significativamente menor en las larvas tratadas con el extracto hexánico de *A. indica* que con los extractos de *P. auritum* y *P. alliacea*.

El extracto metanólico de las tres especies ocasionó un efecto de disuasión positivo en comparación con el extracto hexánico. Se observaron diferencias estadísticas en el FDI ($P \leq 0.265$) entre los extractos metanólicos de las tres especies (Cuadro 1). El mayor efecto disuasivo de la alimentación en larvas de *S. exigua* se encontró en la concentración más alta (10 %) del extracto de *A. indica*, y el menor efecto en la concentración más baja de *A. indica* (1 %) y en la mayor (10 %) de *P. alliacea*. Rossetti *et al.* (2008) describen un elevado efecto disuasivo del extracto del fruto de *M. azeradach* en *Spodoptera eridania* a las concentraciones de 2 y 10 % y moderado en la concentración intermedia (5 %). Los mecanismos químicos de la actividad antialimentaria en insectos plaga aún son poco claros (Harmatha y Nawrot, 2002) para explicar estos resultados. En el Cuadro 1 se presentan las variaciones de los pesos del alimento (DPD) y de la larva (DPL) para cada tratamiento del extracto metanólico. Estadísticamente, los resultados muestran que no hubo consumo de alimento en la mayoría de los tratamientos; solamente las larvas que lo consumieron fueron las del control.

Es importante señalar que no hubo diferencia estadística del FSI en la mayoría de los tratamientos del extracto metanólico de las tres especies; solamente el tratamiento del extracto metanólico de *A. indica* ocasionó mayor supresión desde la concentración más baja que un efecto antialimentario en comparación con los extractos de *P. alliacea* y *P. auritum*, lo que permitió inferir un efecto tóxico en la especie. Al respecto, Regnault-Roger *et al.* (2004) mencionan que la mayor parte de los metabolitos con actividad antialimentaria en insectos plaga provocan otras propiedades biológicas (e. g. actividad insecticida, alteraciones hormonales).

Toxicidad en laboratorio y en campo

El porcentaje de mortalidad que se observó en larvas de *S. exigua* 4^{to} estadio al ser tratadas con el extracto hexánico en condiciones de laboratorio, mostró diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.0003$) en las tres especies. El mayor efecto se manifestó en las concentraciones más altas (10 %) de *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* en relación con el control (Figura 1).

El extracto metanólico resultó ser más tóxico que el hexánico. La concentración más alta (10 %) del extracto metanólico de *A. indica* ocasionó el mayor porcentaje de mortalidad; en *P. auritum* se encontró un efecto de

The methanol extract of the three species caused a positive deterrent effect compared to the hexane extract. Statistical differences were observed in the FDI ($P \leq 0.265$) among the methanol extracts of the three species (Table 1). The greatest feeding deterrent effect in the *S. exigua* larvae was found in the highest concentration (10 %) of the *A. indica* extract, and the least effect in the lowest concentration of *A. indica* (1 %) and in the highest (10 %) of *P. alliacea*. Rossetti *et al.* (2008) describe a high dissuasive effect of fruit extract of *M. azeradach* on *Spodoptera endania* at concentrations of 2 and 10 % and moderate with the intermediate concentration (5 %). The chemical mechanisms of antifeedant activity in pest insects are still not clear enough (Harmatha and Nawrot, 2002) to explain these results. Table 1 shows the variations in the food and larva weights for each methanol extract treatment. Statistically, the results show that there was no food consumption in most treatments; only the larvae used in the control consumed it.

Importantly, there was no statistical difference in the FSI in most of the methanol extract treatments of the three species; only the *A. indica* methanol extract treatment caused greater suppression from the lowest concentration as an antifeedant effect in comparison with the *P. alliacea* and *P. auritum* extracts, which allowed inferring a toxic effect on the species. In this regard, Regnault-Roger *et al.* (2004) mention that most metabolites with antifeedant activity in pest insects also cause other biological properties (e.g. insecticidal activity, hormonal changes).

Laboratory and field toxicity

The mortality rate observed in 4th-stage *S. exigua* larvae when treated with the hexane extract under laboratory conditions showed significant statistical differences ($P \leq 0.0003$) in the three species. The greatest effect occurred with the highest concentrations (10 %) of *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* in relation to the control (Figure 1).

The methanol extract was more toxic than the hexane one. The highest concentration (10 %) of the *A. indica* methanol extract caused the highest mortality rate; in *P. auritum*, there was an intermediate mortality effect compared to the two other species (Figure 2). It has been widely documented that *A. indica* produces multiple effects, both antifeedant and toxic (Batabyal *et al.*, 2009), which is consistent with the results found in this study; however, for the species *P. auritum* and *P. alliacea*, no studies were found that report toxic effects in *S. exigua*.

Because the hexane extract of the three species resulted in low toxicity (Figure 1), only the methanol extract was evaluated in the field experiment; it caused a less toxic effect in the field (Figure 3) than under laboratory conditions (Figure 2) despite the application of higher concentrations, which coincides with the findings reported by García-Mateos *et al.* (2007). Once again the *A. indica* methanol

mortalidad intermedio en relación a las dos especies (Figura 2). Se encuentra ampliamente documentado que *A. indica* produce efectos múltiples tanto antialimentarios como tóxicos (Batabyal *et al.*, 2009), lo cual es congruente con los resultados encontrados en el presente estudio; sin embargo, para las especies *P. auritum* y *P. alliacea* no se encontraron descritos los efectos tóxicos en *S. exigua*.

Debido a que el extracto hexánico de las tres especies ocasionó baja toxicidad (Figura 1), únicamente se evaluó en campo el extracto metanólico; éste ocasionó un efecto tóxico menor en campo (Figura 3) que en condiciones de laboratorio (Figura 2) a pesar de la aplicación de concentraciones más elevadas, lo cual coincide con lo reportado por García-Mateos *et al.* (2007). Nuevamente el extracto metanólico de *A. indica* fue el que ocasionó mayor porcentaje de mortalidad en larvas de *S. exigua*, en campo, en segundo lugar *P. auritum*, y finalmente *P. alliacea* (Figura 3). Lewis y Van Endmen (1986) señalan que los ensayos realizados con insectos en campo pueden confirmar los resultados obtenidos en el laboratorio, aunque estos últimos no pueden ser extrapolados a los realizados en campo o invernadero debido a diversos factores como la alteración de las sustancias por factores ambientales, así como a la adaptación del insecto al uso de sustratos artificiales en el laboratorio. Sin embargo, Regnault-Roger *et al.* (2004) mencionan que la composición de los extractos crudos es temporalmente estable; esto representa una ventaja para el control de insectos plagas.

extracto causó la mayor *S. exigua* larval mortalidad rate in the field, followed in descending order by *P. auritum* and *P. alliacea* (Figure 3). Lewis and Van Endmen (1986) point out that trials conducted with insects in the field can confirm the results obtained in the laboratory, although the latter cannot be extrapolated to the field or greenhouse due to various factors such as the alteration of substances by environmental factors, as well as the adaptation of the insect to the use of artificial substrates in the laboratory. However, Regnault-Roger *et al.* (2004) mention that the composition of crude extracts is temporarily stable, which represents an advantage for the control of pest insects.

Table 2 shows the LC_{50} obtained in laboratory and field conditions. The *A. indica* hexane and methanol extracts were the most potent, followed in effectiveness by the *P. auritum* extracts which killed half the *S. exigua* population. In the field, the methanol extract caused a toxic effect less than that found in the laboratory.

The comparison of means analysis showed lower mortality in *S. exigua* from the hexane extract ($\bar{X} = 21.48b$) compared with the methanol extract ($\bar{X} = 37.77a$), possibly due to: 1) the less polar nature (lipophilic), 2) the different chemical composition of the hexane and methanol extracts, 3) the different metabolites of each species, and 4) the concentration of the various extract components.

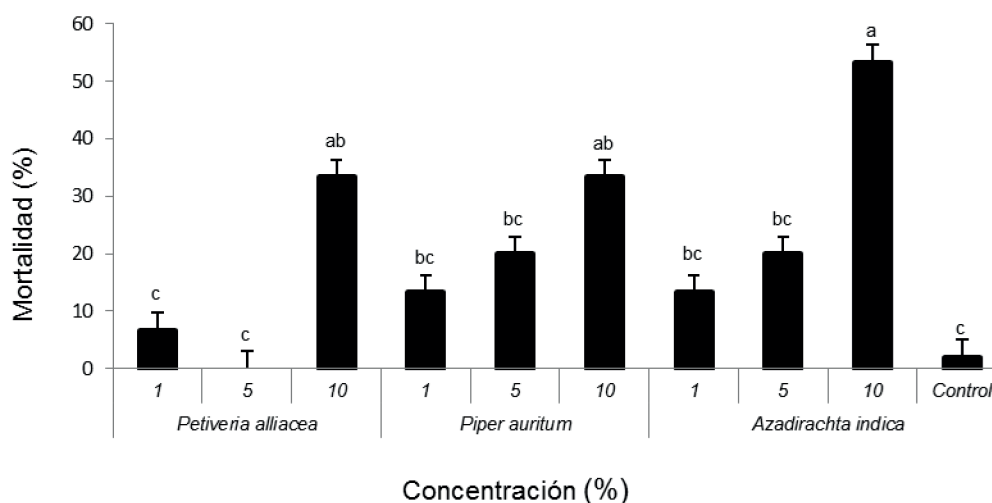


FIGURA 1. Toxicidad de los extractos hexánicos de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* en condiciones de laboratorio en *Spodoptera exigua*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas a una $P \leq 0.05$.

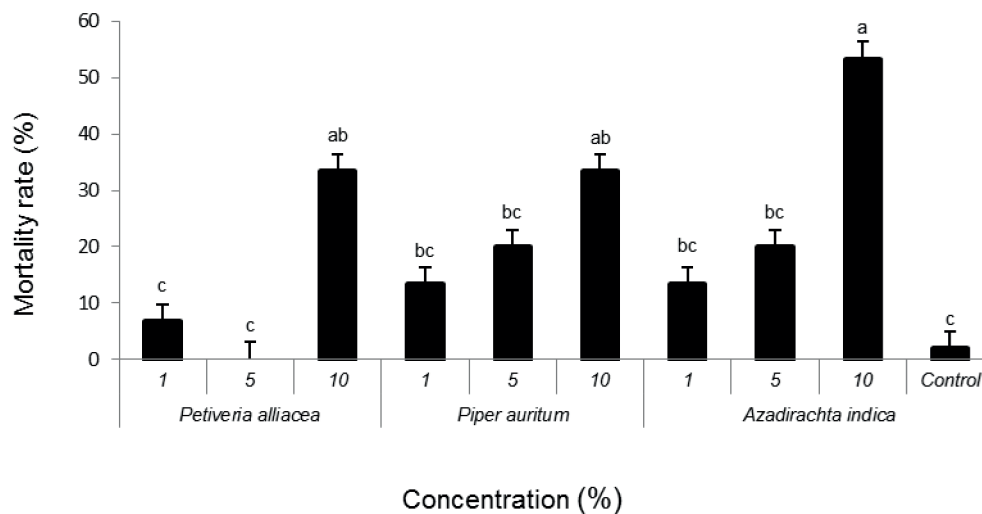


FIGURE 1. Toxicity of the *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* hexane extracts in *Spodoptera exigua* under laboratory conditions. Treatments with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

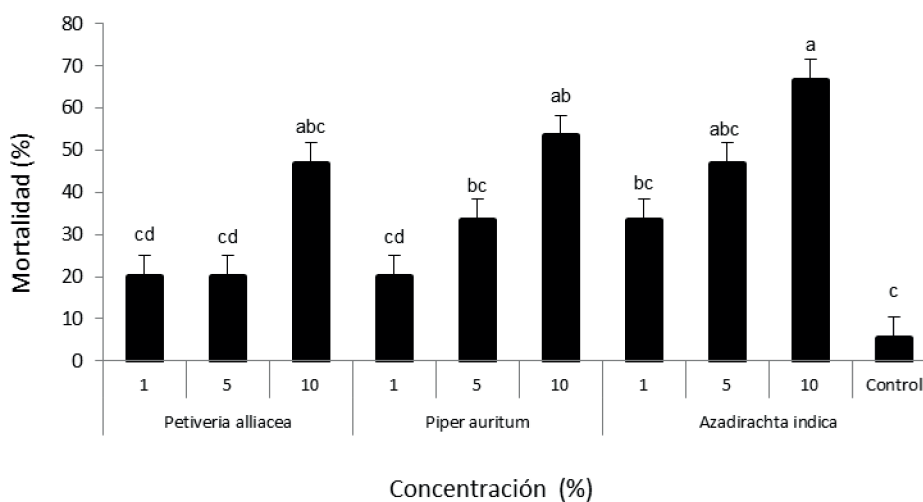


FIGURA 2. Toxicidad del extracto metanólico de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* en *Spodoptera exigua* en condiciones de laboratorio. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas a una $P \leq 0.05$.

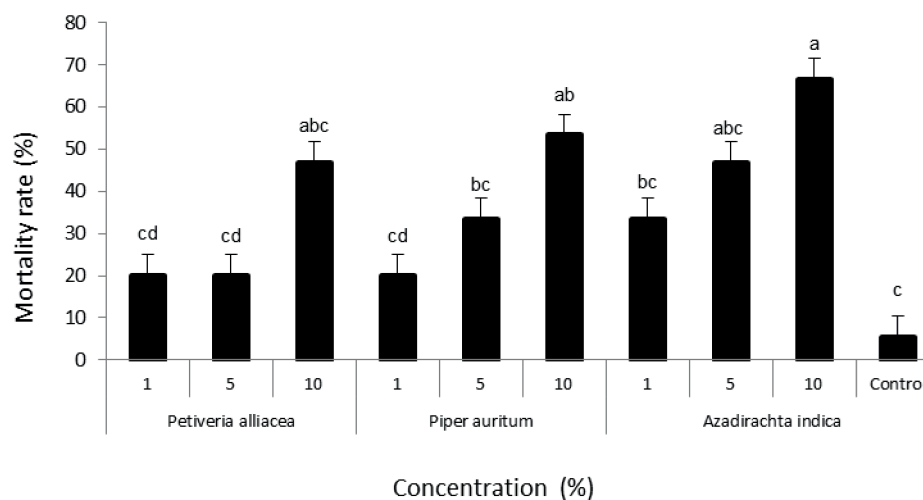


FIGURE 2. Toxicity of the *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* methanol extracts in *Spodoptera exigua* under laboratory conditions. Treatments with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

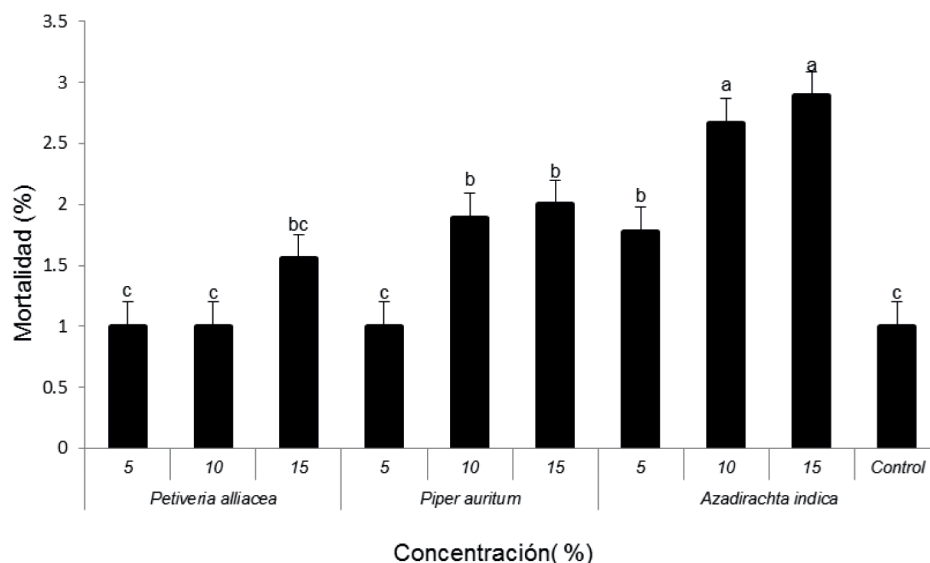


FIGURA 3. Toxicidad del extracto metanólico de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* en *Spodoptera exigua* en campo. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas a una $P \leq 0.05$.

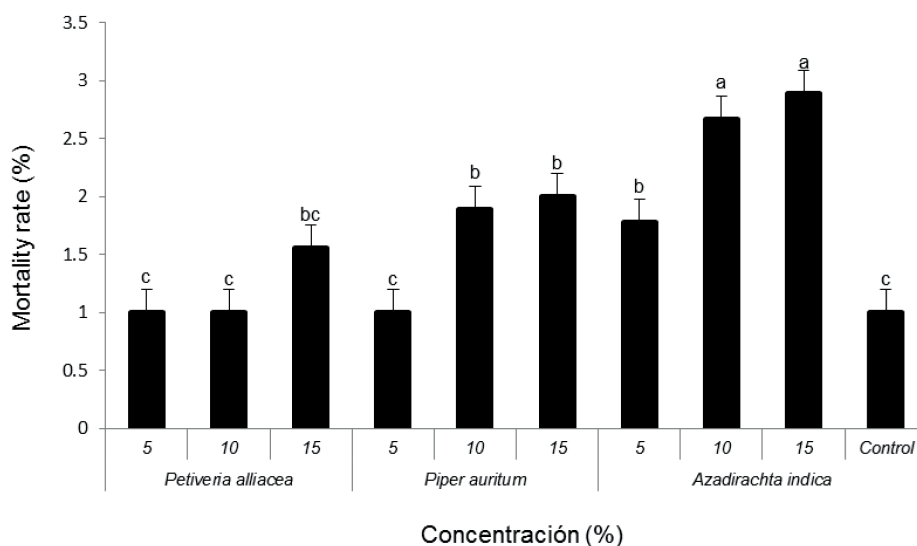


FIGURE 3. Toxicity of the *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* methanol extracts in *Spodoptera exigua* in the field. Treatments with the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

En el Cuadro 2 se muestra la CL_{50} obtenida en laboratorio y en campo. Los extractos hexánico y metanólico de *A. indica* fueron los más tóxicos; le siguieron en efectividad los extractos de *P. auritum* para matar a la mitad de la población de *S. exigua*. En campo, el extracto metanólico ocasionó un efecto tóxico menor al que se encontró en el laboratorio.

El análisis de comparación de medias mostró baja mortalidad en *S. exigua* por el extracto hexánico ($\bar{X} = 21.48b$) comparada con el extracto metanólico ($\bar{X} = 37.77a$), debido posiblemente a: 1) la naturaleza menos polar (lipofílica), 2) la diferente composición química de los extractos hexánico y metanólico; 3) los diferentes metabolitos de cada especie, y 4) la concentración de los diferentes componentes del extracto.

The phytochemical analysis allowed the qualitative detection of several terpenoids in the *A. indica* methanol extract (Table 3); azadirachtin is the predominant triterpenoid in the species and which confers its insecticidal properties (Pavela *et al.*, 2009). In *P. auritum*, terpenoids were detected in the hexane extract due to the presence of volatile oils, which explains its moderate toxicity; in the methanol extract, flavonoids and alkaloids were identified, as reported in *P. auritum* by Harmatha and Nawrot (2002), Castañeda *et al.* (2007) and Olvero-Verbel *et al.* (2009), but Scott *et al.* (2008) associate the insecticidal activity with the presence of piperamides, which explains the toxicity detected in this study. On the other hand, the presence of alkaloids, flavonoids and terpenoids in *P. alliacea* has been reported (Bezerra *et al.*, 2005). This study only found evi-

El análisis fitoquímico permitió detectar cualitativamente la presencia de varios terpenoides en el extracto metanólico de *A. indica* (Cuadro 3); azadiractina es el triterpenoide predominante en la especie y el que confiere las propiedades insecticidas (Pavela *et al.*, 2009). En *P. auritum* se detectaron terpenoides en el extracto hexánico debido a la presencia de aceites volátiles, lo que explica la moderada toxicidad; en el extracto metanólico se identificaron flavonoides y alcaloides, como lo reportan en *P. auritum* Harmatha y Nawrot (2002), Castañeda *et al.* (2007) y Olivero-Verbel *et al.* (2009); pero Scott *et al.* (2008) asocian la actividad insecticida a la presencia de piperamidas, lo que explica la toxicidad detectada en este estudio. Por otro lado, se menciona la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenoides en *P. alliacea* (Bezerra *et al.*, 2005); en el presente estudio sólo se observaron evidencias de flavonoides y alcaloides, pero las propiedades insecticidas descritas se deben a la presencia de compuestos derivados de azufre, metabolitos no estudiados en el presente estudio (Kubec *et al.*, 2002; 2003).

dence of flavonoids and alkaloids, but the insecticidal properties described are due to the presence of sulfur-derived compounds, metabolites which were not examined in this study (Kubec *et al.*, 2002; 2003).

Regnault-Roger *et al.* (2004) note that the mortality of pest insects depends directly on the extract concentration and exposure time, but the mixture of compounds in an extract can present a potentiation. De Souza *et al.* (2009) mention that the presence of various metabolites in an extract causes a synergistic effect, which increases the activity and decreases resistance problems. Therefore, the toxicity of an extract will be greater than that of an isolated metabolite, as indicated by García-Mateos *et al.* (2004). This allowed inferring that the observed differences in the toxic effect of the species *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea* are due to the different chemical nature of metabolites present in each extract; however, the study of these species should be continued in order to extract other active ingredients with other polar solvents.

CUADRO 2. Concentración letal media de los extractos hexánico y metanólico de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* en *Spodoptera exigua*.

Especie	Extracto	Laboratorio			Campo		
		CL ₅₀ (ppm)	Límites fiduciales	X ²	CL ₅₀ (ppm)	Límites fiduciales	X ²
<i>Azadirachta indica</i>	Hexánico	15.18	12.79-17.56	0.13	-	-	-
	Metanólico	4.03	2.61-5.45	0.08	9.61	7.86-11.35	0.03
<i>Piper auritum</i>	Hexánico	113.48	107.81-119.14	0.42	-	-	-
	Metanólico	42.08	38.63-45.52	0.19	21.21	19.09-23.32	0.03
<i>Petiveria alliacea</i>	Hexánico	143.48	136.71-150.24	0.41	-	-	-
	Metanólico	140.27	133.43-147.10	0.50	104.1	100.12-108.07	0.26

(-) = Extracto no evaluado.

TABLE 2. Median lethal concentration of hexane and methanol extracts of *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea* in *Spodoptera exigua*.

Species	Extract	Laboratory			Field		
		LC ₅₀ (ppm)	Fiducial limits	X ²	LC ₅₀ (ppm)	Fiducial limits	X ²
<i>Azadirachta indica</i>	Hexánico	15.18	12.79-17.56	0.13	-	-	-
	Metanólico	4.03	2.61-5.45	0.08	9.61	7.86-11.35	0.03
<i>Piper auritum</i>	Hexánico	113.48	107.81-119.14	0.42	-	-	-
	Metanólico	42.08	38.63-45.52	0.19	21.21	19.09-23.32	0.03
<i>Petiveria alliacea</i>	Hexánico	143.48	136.71-150.24	0.41	-	-	-
	Metanólico	140.27	133.43-147.10	0.50	104.1	100.12-108.07	0.26

(-) = Extract not evaluated.

CUADRO 3. Tipo de metabolito secundario identificado en los extractos hexánico y metanólico de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea*.

Especie	Flavonoides		Terpenoides		Alcaloides		Referencia
	Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH	
<i>Azadirachta indica</i>	nd	nd	nd	+++	nd	nd	Isman, 1997 Pavela <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper auritum</i>	nd	++	++	nd	nd	+	Castañeda <i>et al.</i> , 2007; Olivero-Verbel <i>et al.</i> , 2009; Harmatha y Nawrot, 2002
<i>Petiveria alliacea</i>	nd	+	nd	nd	nd	+	Bezerra <i>et al.</i> , 2005.

Hex = extracto hexánico; MeOH = extracto metanólico. (+) = afirmativo; nd = no detectado

TABLE 3. Type of secondary metabolite identified in the hexane and methanol extracts of *Azadirachta indica*, *Piper auritum* and *Petiveria alliacea*.

Species	Flavonoids		Terpenoids		Alkaloids		Reference
	Hex	MeOH	Hex	MeOH	Hex	MeOH	
<i>Azadirachta indica</i>	nd	nd	nd	+++	nd	nd	Isman, 1997 Pavela <i>et al.</i> , 2009
<i>Piper auritum</i>	nd	++	++	nd	nd	+	Castañeda <i>et al.</i> , 2007; Olivero-Verbel <i>et al.</i> , 2009; Harmatha y Nawrot, 2002
<i>Petiveria alliacea</i>	nd	+	nd	nd	nd	+	Bezerra <i>et al.</i> , 2005.

Hex = hexane extract; MeOH = methanol extract. (+) = yes; nd = not detected

Regnault-Roger *et al.* (2004) señalan que la mortalidad de insectos plaga depende directamente de la concentración del extracto y del tiempo de exposición; pero la mezcla de compuestos en un extracto puede presentar una potenciación. De Souza *et al.* (2009) mencionan que la presencia de varios metabolitos en un extracto causan un efecto sinérgico, lo que incrementa la actividad y disminuye problemas de resistencia. Por lo tanto, la toxicidad de un extracto será mayor a la de un metabolito aislado, como lo señalan García-Mateos *et al.* (2004); esto permitió inferir que las diferencias del efecto tóxico que se observaron en las especies *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea* se deben a la diferente naturaleza química de metabolitos presentes en cada extracto; pero no debe descartarse el estudio de estas especies para extraer otros principios activos con disolventes de otra polaridad.

En el presente estudio se encontró que son marcadas las diferencias que existen entre las variaciones de toxicidad por especie y por el tipo de extracto. De Souza *et al.* (2009) evaluaron extractos de diferente polaridad de varias especies de Asteraceae en larvas de *Spodoptera frugiperda*, donde encontraron una variación de la mortalidad de 8.7 a 87.0 %. También se observó que existe una respuesta diferencial del insecto receptor

This study found marked differences in toxicity levels by species and type of extract. De Souza *et al.* (2009) assessed different-polarity extracts of several species of Asteraceae on *Spodoptera frugiperda* larvae, finding a variation in mortality from 8.7 to 87.7 %. It was also observed that there is a differential response by the receptor insect to the different polarity and chemical composition of the extracts. It should be noted that these are the first studies conducted with *P. auritum* and *P. alliacea* on *S. exigua* larvae in laboratory and field conditions. Evaluating the efficiency of previously-unstudied plant extracts on *S. exigua* larvae contributes to the search for natural insecticides, especially in regards to those plant species that have been little studied or those which are on the point of extinction (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

CONCLUSIONS

The methanol extract was more potent (mortality rate and LC₅₀) than the hexane extract of the species *A. indica*, *P. auritum* and *P. alliacea*. The *A. indica* methanol extract caused greater mortality in *S. exigua* than *P. auritum*, and the least effect was found in the *P. alliacea* extract. No significant differences in the FDI of the hexane extract of the three

a la diferente polaridad y composición química de los extractos. Cabe mencionar que estos son los primeros estudios que se realizan con *P. auritum* y *P. alliacea* en larvas de *S. exigua* en condiciones de laboratorio y en campo. Evaluar la eficiencia de los extractos de plantas no estudiadas en larvas de *S. exigua*, permite contribuir a la búsqueda de insecticidas naturales, sobre todo en aquellas especies vegetales que han sido poco estudiadas o aquellas que se encuentran a punto de extinción (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

El extracto metanólico fue más tóxico (porcentaje de mortalidad y CL_{50}) que el extracto hexánico de las especies *A. indica*, *P. auritum* y *P. alliacea*. El extracto metanólico de *A. indica* causó el porcentaje de mortalidad mayor en *S. exigua* que *P. auritum*, y el menor efecto se encontró en el extracto de *P. alliacea*. No se encontraron diferencias significativas del FDI del extracto hexánico de las tres especies vegetales. El extracto metanólico de las tres especies ocasionó un efecto de disuasión positivo en comparación con el extracto hexánico. En condiciones de laboratorio se encontró un efecto tóxico de los extractos mayor en *S. exigua* que en un cultivo de tomate uva var. Santa infestado con la plaga a campo abierto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la donación de las larvas de *Spodoptera exigua* por el doctor George Mahuku, del insectario del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), campus Estado de México, México.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- BATABYAL, L.; SHARMA, P.; MOHAN, L.; MAURYA, P.; SRIVASTAVA, C. 2009. Relative toxicity of neem fruit, bitter gourd, and castor seed extracts against the larvae of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Say). *Parasitology Research* 105: 1205-1210.
- BENAVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; GIESBRECHT, A. M. 2001. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry Reviews* 57: 743-747.
- BEZERRA, G. P.; DA SILVA, O. M. M.; ALVES, N. C. R.; COELHO, N. E.; VASCONCELOS, C. L. M.; FRANÇA, F. M. M.; BARRO, V. G. S.; FLORENÇO, D. S. F. C. 2005. Study of antinociceptive effect of isolated fractions from *Petiveria allicea* L. (tipi) in mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 28: 41-46.
- CASTAÑEDA, M. L.; MUÑOZ, A.; MARTÍNEZ, J. R.; STANS-
HENKO, E. E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica* 33: 165-166.
- DE SOUZA, J. R.; DEMUER, A. J.; PINHEIRO, J. A. 1990. Dibenzyl trisulphide and trans-N-methyl- α -methoxyproline from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry Reviews* 29: 3653-3655.
- DE SOUZA, T. W.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; DE SOUSA, F. S.; COLA, Z. J.; SERRÃO, J. E. 2009. Potential use of *Asteraceae* extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops and Products* 30: 384-388.
- FINNEY, D. J. 1971. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge University Press. London. 318 p.
- GARCÍA, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Offset Larios, S. A. México. 217 p.
- GARCÍA-MATEOS, R.; PÉREZ PACHECO, R.; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, C.; SOTO-HERNÁNDEZ, M. 2004. Toxicity of *Erythrina americana* in mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 297-303.
- GARCÍA-MATEOS, M. R.; ELIZALDE SÁNCHEZ, E.; ESPINOSA-ROBLES, P.; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. E. 2007. Toxicity of *Petiveria alliacea* L. on white fly (*Trialeurodes vaporariorum* West.) in laboratory and greenhouse. *Interciencia* 32: 121-125.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GUARDANO, A.; INGÉS, C.; MARTÍNEZ DÍAZ, R.; CORTÉZ, D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I Inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung* 57: 1023-1034.
- HARMATHA, J.; NAWROT, J. 2002. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104: 51-60.
- ISMAN, M. B. 2006. The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annual Review Entomology* 51: 51-66.
- KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R. A. 2002. S-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*-part II. *Phytochemistry Reviews* 61: 675-680.
- KUBEC, R.; KIM, S.; MUSAH, R. A. 2003. The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry Reviews* 63: 37-40.
- LAGUNES, T. A.; VILLANUEVA, J. J. 1999. Toxicología y Manejo

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the donation of *Spodoptera exigua* larvae by George Mahuku of the International Maize and Wheat Improvement Center (known by the Spanish acronym CIMMYT in Mexico), State of Mexico campus, Mexico.

End of English Version

- de Insecticidas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 264 p.
- LEWIS A. C.; VAN EMDEN, H. F. 1986. Assays for insect feeding, pp. 95-19. *In*: Insect-Plant Interactions. MILLER, J. R. ; MILLER, T. A. (eds.). Springer-Verlag. New York.
- LIBURD, O. E.; FUNDERBURK, J. E.; OLSON, S. M. 2000. Effect of biological and chemical insecticides on *Spodoptera* species (Lep., Noctuidae) and marketable yields of tomatoes. *Journal of Applied Entomology* 124: 19-25.
- MEAGHER, R. L.; BRAMBILA, J.; HUNG, E. 2008. Monitoring for exotic *Spodoptera* species (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida. *Florida Entomologist* 91: 517-522.
- MERKX-JACQUES, M.; DESPLAND, E.; BEDE, J. C. 2008. Nutrient utilization by caterpillars of the generalist beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Physiological Entomology* 33: 51-61.
- OLIVERO-VERBEL, J.; GYETTE-FERNANDEZ, J.; STASHENKO, E. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* and essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5: 419-427.
- PAVELA, R.; KAZDA, J.; HERDA, G. 2009. Effectiveness of neem (*Azadirachta indica*) insecticides against *Brassica* pod midge (*Dasineura brassicae* Winn). *Journal of Pest Science* 82: 235-240.
- REED, E.; MAJUMDAR, S. K. 1998. Differential cytotoxic effects of azadirachtin of *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 221-221.
- REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGENE, B. J.; VINCENT, C. 2004. Biopesticidas de Origen Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 337 p.
- RIZWAN-UL-HAQ, M.; BO HU, Q.; YING HU, M.; SHEN LIN, Q.; LI ZHANG, W. 2009. Biological impact of harmaline, ricine, and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal Pesticide Science* 82: 327-334.
- ROSSETTI, M. R.; DEFAGÓ, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. M.; VALLADARES, G. 2008. Actividad biológica de extractos de *Meüa azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina* 67: 115-125.
- SAEED, S.; SAYYED, A. H.; AHMAD, I. 2009. Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Pest Science* 83: 165-172.
- SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGÉNE, B. J.; ARNASON, J. T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65-75.
- SENGONCA, C.; LIU, B.; ZHU, Y. J. 2006. Insecticidal activity and antifeedant effect of a new type biocide GCSC-BtA against *Plutella sylostella* L. (Lep., Plutellidae). *Journal Pesticide Science* 79: 3-8.
- ULRICH, C.; MEWIS, I.; ADHIKARY, S. 2008. Antifeedant activity and toxicity of leaf extracts from *Porteresia coarctata* Takeoka and their effects on the physiology of *Spodoptera litura* (F). *Journal of Pesticide Science* 81: 79-84.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 1996. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. 384 p.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry Reviews* 64: 3-19.
- YBARRA, M. I.; POPICH, S.; BOKORSKY, S. A.; ASAKAWA, Y.; BARDON, A. 2005. Manoyl oxide diterpenoides from *Grindelia scorzonifolia*. *Journal Natural Products* 68: 554-558.
- ZABEL, A.; MANOJLOVIC, B.; RAJKOVIC, S.; STANKOVIC, S.; KOSTIC, M. 2002. Effect of neem of extract of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) and *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera:Chrysomelidae). *Journal Pesticide Science* 75: 19-25.
- ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VIÑUELA, E.; MEDINA, P. 2009. Anti-feedant and growth inhibitory effects of extracts and di-manes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Industrial Crops and Products* 30: 119-125.