



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Evaluación de extractos orgánicos de *Lippia graveolens*
(orégano mexicano), en la alimentación de *Spodoptera*
frugiperda”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JORGE IVAN REYNA SEGURA



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

PRESIDENTE.

Dra. Josefina Herrera Santoyo

VOCAL.

Dra. Sonia Vázquez Santana

SECRETARIO: TUTOR

Dra. Patricia Guevara Fefer

SUPLENTE

M.C. Beatriz Zúñiga Ruiz

SUPLENTE

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado: Dra. Josefina Herrera Santoyo, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Patricia Guevara Fefer, M.C. Beatriz Zúñiga Ruiz y Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, por sus revisiones y comentarios para la finalización de este trabajo.

A la **Dra. Josefina Herrera Santoyo**, por su asesoramiento en cromatografía y en Densitometría.

A la **M. C, Beatriz Zúñiga Ruiz**, por el apoyo y la asesoría brindada en la realización de los ensayos biológicos.

A la **Química Verónica Muñoz** y la **Dra. Eva Aguirre** en la realización de los perfiles cromatográficos.

Al **M.C. Enrique Ilanos Romero**, por el apoyo técnico Brindado en el análisis e interpretación por Densitometría.

A la **M.C Laura Patricia Lina García**, por el suministro de las larvas para la realización del ensayo.

Al **Dr. Gerardo Sánchez** Ramos por el material biológico proporcionado.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitoquímica de la facultad de ciencias, bajo la dirección de la **Dra. Patricia Guevara Fefer**.

Doy gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado ser parte de ella, por formarme como profesionista, y por vivir experiencias que nunca olvidare. Gracias!!

Mis padres, que me apoyaron hasta este momento, en especial a mi madre, quien nunca tiro la toalla por mí, siempre ahí apoyándome, aguantándome en mis momentos malos y **buenos, Gracias Mä... Mil gracias.....**

A la profesora Patricia Guevara, quien me brindó su apoyo, en los momentos más difíciles, gracias por confiar en mí, por sus consejos, por escucharme, por siempre estar ahí, gracias; A Josefina Herrera, quién siempre me hacía reflexionar sobre lo que hacía, gracias Jose, por enseñarme a ser mejor siempre, gracias; Beatriz Zúñiga, Gracias por todo este tiempo, de compartir conmigo tu experiencia, por ayudarme siempre, por tu apoyo, mil gracias; Verónica Muñoz y Eva Aguirre, gracias por su apoyo, por escucharme y apoyarme en todo momento, Gracias; Enrique, gracias por todo la paciencia que tuviste conmigo, por ayudarme y por tus tips, ahora ya respaldo todo!! Gracias Enrique. Muchas gracias a tod@s.....

A mis amigos de la infancia, Jair, Maribel, Paty, Omar, J. Carlos, Daniel gracias por seguir **conmigo aún... A mis amigos que se sumaron durante esta travesía de la carrera, Laura,** Viry, Diego, Alejandro, Mariana, Abigail, Getsemaní, Iliana, Mayra y en especial a la Gris. Gracias por seguir soportándome, por sus consejos, por escucharme; Al grupo de TKD de química, quien sin conocerme me aceptaron, gracias a todos, y en especial a la profesora Daniela Bustamante, a mi profesor de TKD Javier Galicia, gracias por apoyarme durante estos 10 años!!

A mi familia

Gracias a todos por su apoyo!!!

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Antecedentes.....	9
3.1 Metabolitos secundarios.....	9
3.2. Productos Naturales utilizados como plaguicidas.....	9
3.3. Principales familias de plantas con actividad insecticida.....	12
3.4. Distribución del genero <i>Lippia</i>	12
3.5. <i>Lippia graveolens</i> (orégano mexicano).....	14
3.5.1 Características y distribución de la especie <i>L. graveolens</i>	14
3.6. Composición química y actividad biológica del género <i>Lippia</i>	16
3.7. Química de <i>Lippia graveolens</i>	22
3.8. <i>Spodoptera frugiperda</i> como modelo biológico.....	23
4. Justificación.....	25
5. Objetivos.....	26
6. Materiales y métodos.....	27
7. Resultados y discusión.....	35
7.1. Rendimientos extractos orgánicos.....	35
7.2. Análisis de los extractos.....	35
7.2.1 Ensayos de larga duración con dieta artificial.....	35
7.3. Análisis cromatográfico.....	46
7.3.1 Extractos hexánicos.....	46
7.3.2 Extractos acetato de etilo.....	48
7.3.3 Extractos metanólicos.....	53
8. Conclusión.....	56
9. Anexo.....	57
10. Bibliografía.....	58

1.- Resumen

Verbenaceae es una de las familias botánicas reportadas con presencia de compuestos con actividad frente a insectos. El género *Lippia* está representado por compuestos de tipo terpénico y flavonoide, los cuales presentan una diversa actividad biológica, entre las que se encuentra la actividad frente a insectos.

En este trabajo se llevó a cabo una extracción en frío (maceración) de hojas de *Lippia graveolens* con distintos disolventes (hexano, acetato de etilo y metanol); el material vegetal fue recolectado en 3 localidades distintas del estado de Tamaulipas y en dos épocas del año (verano/invierno).

Se evaluaron los extractos hexánicos de hojas de *Lippia graveolens*, en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* a dos concentraciones (10 y 100ppm), mostrando un efecto mayor en la concentración de 100 ppm, detectándose retardo en el crecimiento respecto al control; deformaciones de pupas y alteraciones morfológicas en los individuos adultos (deformación de alas). Utilizando el índice de crecimiento relativo, todos los extractos de todas las localidades presentaron efecto que va de 0.8 a 1.0.

Se llevó a cabo un análisis cromatográfico comparativo de los extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólicos de hojas de las diferentes localidades. El análisis cromatográfico de los extractos hexánicos y de acetato de etilo mostraron un perfil rico en terpenos, sin embargo, se detectó una diferencia en los porcentajes relativos de cada una de las manchas en las diferentes muestras; estos resultados representan una riqueza de terpenos polares y medianamente polares. Los extractos de acetato de etilo y metanólicos mostraron un perfil similar en cuanto a la presencia de compuestos revelados con el reactivo de productos naturales (flavonoides). El patrón de coloración obtenido para los extractos de acetato de etilo y metanólicos sugiere una diversidad de compuestos de tipo flavonoide.

Lippia graveolens puede representar una alternativa en el aislamiento de compuestos con actividad insecticida.

2.-Introducción

Algunos insectos causan daños considerables en diversos cultivos de importancia económica, por lo que surge la necesidad de estudios integrales biodirigidos, encaminados a conocer los mecanismos de acción de los productos naturales sobre los insectos. Así mismo, la utilización de modelos experimentales, para llevar a cabo dichas evaluaciones, los cuales van desde determinar efectos tóxicos sobre el desarrollo hasta su evaluación fisiológica, como la valoración de número de huevos eclosionados y alteraciones en los estadios del insecto entre otros (Guzmán, 2011).

Es probable que el combate a las plagas haya empezado desde los inicios de la agricultura hace unos 10 000 años, para lo cual se empleaban diversos métodos, incluyendo la aplicación de productos obtenidos de plantas. Esta práctica aún sigue vigente; hoy en día el método más utilizado es el uso de plaguicidas sintéticos, que son sumamente efectivos para el control, sin embargo el empleo excesivo y prolongado de estos productos ha generado serios problemas ambientales, daños a la salud humana e incremento de especies de plagas resistentes a los plaguicidas sintéticos y lo que fue una solución ahora también es un serio problema (Villavicencio *et al.*, 2011).

Los numerosos problemas generados por el uso de los plaguicidas sintéticos han sido una de las motivaciones principales para considerar la búsqueda de otros productos que sean efectivos y seguros. En la búsqueda de alternativas para el control, se considera que las plantas son una fuente potencial de productos plaguicidas, efectivos y más seguros, tanto para los seres humanos como para el ambiente (Villavicencio *et al.*, 2011).

Generalmente los productos de origen natural tienen una serie de ventajas sobre los productos sintéticos. Su toxicidad en mamíferos es baja o nula; son biodegradables, como el limoneno, α -pineno, γ -terpineno y α -terpineol, que son utilizados por los microorganismos del suelo como

fuentes de carbono y energía; tienen una baja persistencia, como los aceites esenciales cuya toxicidad decrece hasta 20% o menos después de 4 a 24 horas de que son aplicados; son de bajo riesgo de contaminación de mantos freáticos y hay pocos riesgos de desarrollo de resistencia a esos productos (Isman *et al.*, 2007), se ha demostrado que presentan actividad en organismos resistentes, por ejemplo, en piojos en humanos con resistencia a malation, actúan rápido pues de inmediato impiden la alimentación de las plagas (Yang *et al.*, 2009); una sola especie vegetal puede contener sustancias que presentan un amplio rango de efectos y son menos dañinos para organismos no blanco; no son fitotóxicos para algunos cultivos como el jitomate, no afectan la viabilidad de semillas y granos tratados, ni la germinación; tampoco afectan las cualidades alimenticias de los granos, en general no son tóxicos para los seres humanos, y pueden estar disponibles para los usuarios prácticamente a bajo costo (Villavicencio *et al.*, 2011).

La utilización de extractos vegetales es una estrategia promisorio para el control de ciertas plagas y enfermedades en cultivos de importancia económica, pues no solo se reduce el impacto ambiental y ecológico producido por el uso indiscriminado de pesticidas sintéticos, sino que también contribuyen al desarrollo de una agricultura orgánica (Bahena, 2003 y Mosquera *et al.*, 2009)

En la búsqueda de especies vegetales con potencial frente a insectos se encuentran aquellas representadas por la producción de compuestos de tipo terpenoico como *Lippia*, un género de amplia distribución, presenta numerosos reportes con actividad biológica y medicinal.

Por lo anterior en este trabajo se llevó a cabo una evaluación de los extractos orgánicos de *Lippia graveolens* frente al desarrollo del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, un insecto ampliamente distribuido en América.

3.- Antecedentes

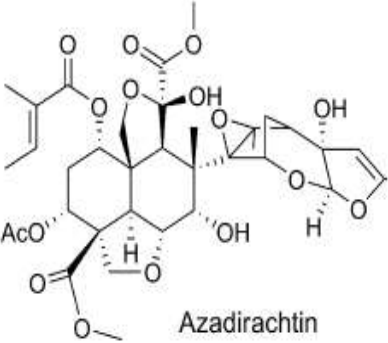
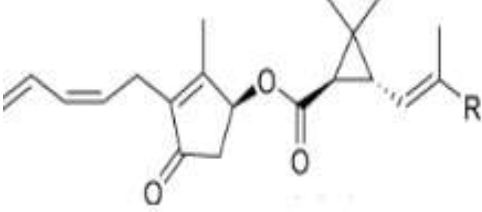
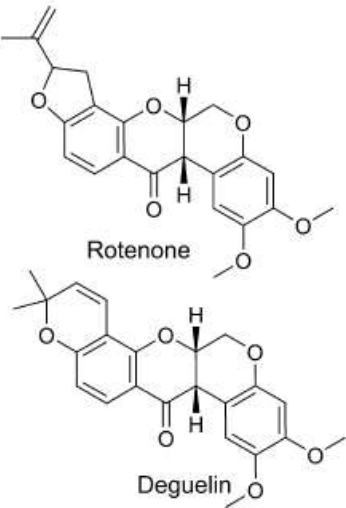
3.1- Metabolitos secundarios

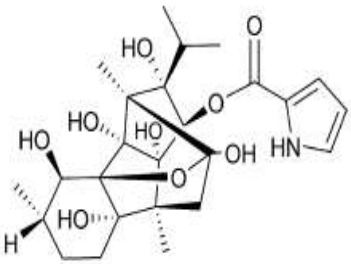
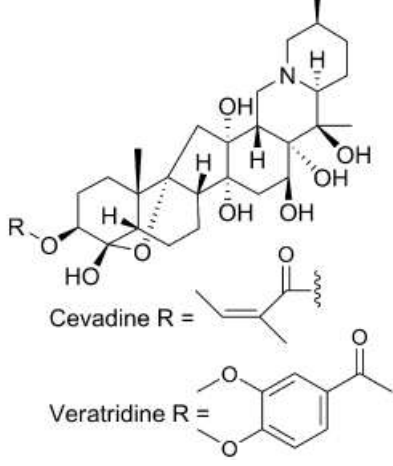
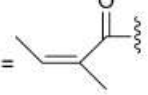
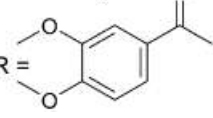
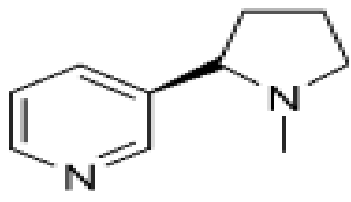
Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica por que participan en la adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros, el ataque por microorganismos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición de la luz solar u otros tipos de estrés abiótico. Los precursores de la biosíntesis de metabolismo secundario se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de krebs o la vía del shikimato (Sepúlveda *et al.*, 2003). La cantidad de metabolitos secundarios que se presentan en las plantas difieren según el tejido donde se encuentren (hojas, tallo, flores, etc.); el desarrollo de la planta y la estación del año, ya que su concentración pueden fluctuar considerablemente (Guzmán, 2011).

3.2- Productos naturales utilizados como plaguicidas

Existen numerosos estudios que reportan compuestos con actividad frente a insectos cuyos modos de acción van desde la inhibición alimentaria hasta la toxicidad letal. Existen productos comerciales a base de extractos de plantas, para el control de plagas (Cuadro 1).

Cuadro 1 Productos comerciales a base de extractos de plantas, para el control de plagas.
(Dayanet *al.*, 2009)

Productos	Obtención	Estructura
<p>Productos a base de Neem.</p>	<p>El árbol del Neem o <i>Azadirachta indica</i> es un insecticida botánico, cuya actividad está dada por los diversos análogos de la azadiractina.</p>	 <p style="text-align: center;">Azadirachtin</p>
<p>Pyrethrum</p>	<p>Extraída de la oleoresina de flores secas de <i>Tanacetum cinerariaefolium</i>, es el precursor de las piretrinas.</p>	
<p>Insecticidas de Rotenona</p>	<p>Las preparaciones del genero <i>Derris</i> o <i>Lonchocarpus</i> Leguminosae), contienen rotenona. Además de un segundo compuesto activo una isoflavona, deguelin</p>	 <p style="text-align: center;">Rotenone</p> <p style="text-align: center;">Deguelin</p>

<p>Preparaciones de <i>Ryaniaspeciosa</i></p>	<p>Se obtienen de la raíz y hojas de la de un arbusto del sur de América (<i>Ryaniaspeciosa</i>). La rianodina es un complejo policíclico, diterpenopolihidroxiílico</p>	 <p>Ryanodine</p>
<p>Sabadilla</p>	<p>Es un derivado de las semillas de plantas del género <i>Schoenocaulon</i>. La sabadilla es usada como insecticida desde hace muchos años por personas nativas del sur y centro de América. La actividad se le atribuye a los alcaloides cevadina y veratridina</p>	 <p>Cevadine R = </p> <p>Veratridine R = </p>
<p>Nicotina</p>	<p>Extractos acuosos de tabaco, contienen el alcaloide nicotina, que ha sido usado como control de plagas en diversas cosechas</p>	

3.3- Principales familias de plantas con actividad insecticida.

Con respecto a las familias botánicas más estudiadas se encuentran: Meliaceae, Asteraceae, Leguminosae, Lamiaceae, Lauraceae, Umbelliferae, Cruciferae, Solanaceae, Euphorbiaceae, Celastraceae, Rutaceae, Aroideae, Capparidaceae, Verbenaceae, Piperaceae, Chenopodiaceae, Phytolaccaceae, Caryophyllaceae, Portulacaceae, Convolvuceae, Moraceae y Pedaliaceae, las que han sido objeto de estudios químicos para detectar la actividad insecticida y aislar los compuestos activos (Rodríguez *et al.*, 1994)

3.4- Distribución del género *Lippia*

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies, representadas por hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies se encuentran distribuidas en el sur y centro de América y el territorio tropical de África (Barbosa *et al.*, 2006).

México cuenta con cerca de 40 especies conocidas, siendo algunas endémicas, que se distribuyen en varios estados de la República Mexicana (Figura 1) (García *et al.*, 2012).

Entre los usos tradicionales del género encontramos el medicinal, para remedios gastrointestinales y respiratorios; varias especies del género *Lippia* han mostrado actividad contra la malaria y actividad citotóxica, además de propiedades antifúngicas, antiparasitarias y antioxidantes, utilizando las diferentes estructuras de la planta (flores, hojas y tallos), comúnmente preparados en infusiones o decocciones y administrado oralmente (Barbosa *et al.*, 2006 y García *et al.*, 2012); otro uso tradicional es el alimenticio, ya que las hojas se utilizan como condimento en la elaboración de diferentes platillos.

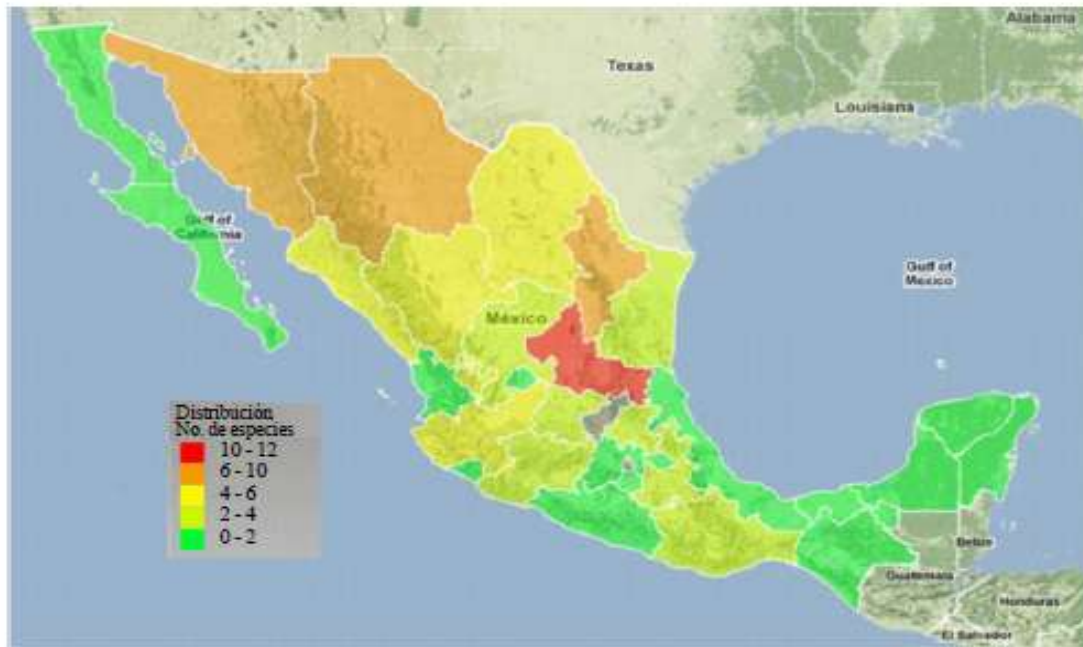


Figura 1 Mapa de distribución de especies del género *Lippia* en México. Con base en la información del Herbario Virtual de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (García et al., 2012)

3.5- *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

3.5.1- Características y distribución de la especie

Lippia graveolens, es una especie que pertenece al orden de las Lamiales y a la familia Verbenaceae. Esta especie se describe como un arbusto de 2 a 3 m de alto (Meléndez *et al.*, 2009 y Ríos, 2010). Es originaria de América y es la especie más explotada en el país, destacando los estados de Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo Y Baja California Sur (García *et al.*, 2012).

La distribución de esta especie en México, se establece a lo largo del litoral del Golfo, la vertiente del Pacífico, en la península de Yucatán, en las depresiones y valles interiores (Balsas, Tehuacán, depresión de Chiapas, Istmo de Tehuantepec), en las zonas áridas tamaulipeca e hidalguense y en el desierto chihuahuense. La distribución descrita es disyunta en 6 parches de tamaños muy variables (Figura 2). El intervalo altitudinal que ocupa *L. graveolens* va desde el nivel del mar hasta los 2300 msnm (Sánchez *et al.*, 2007).

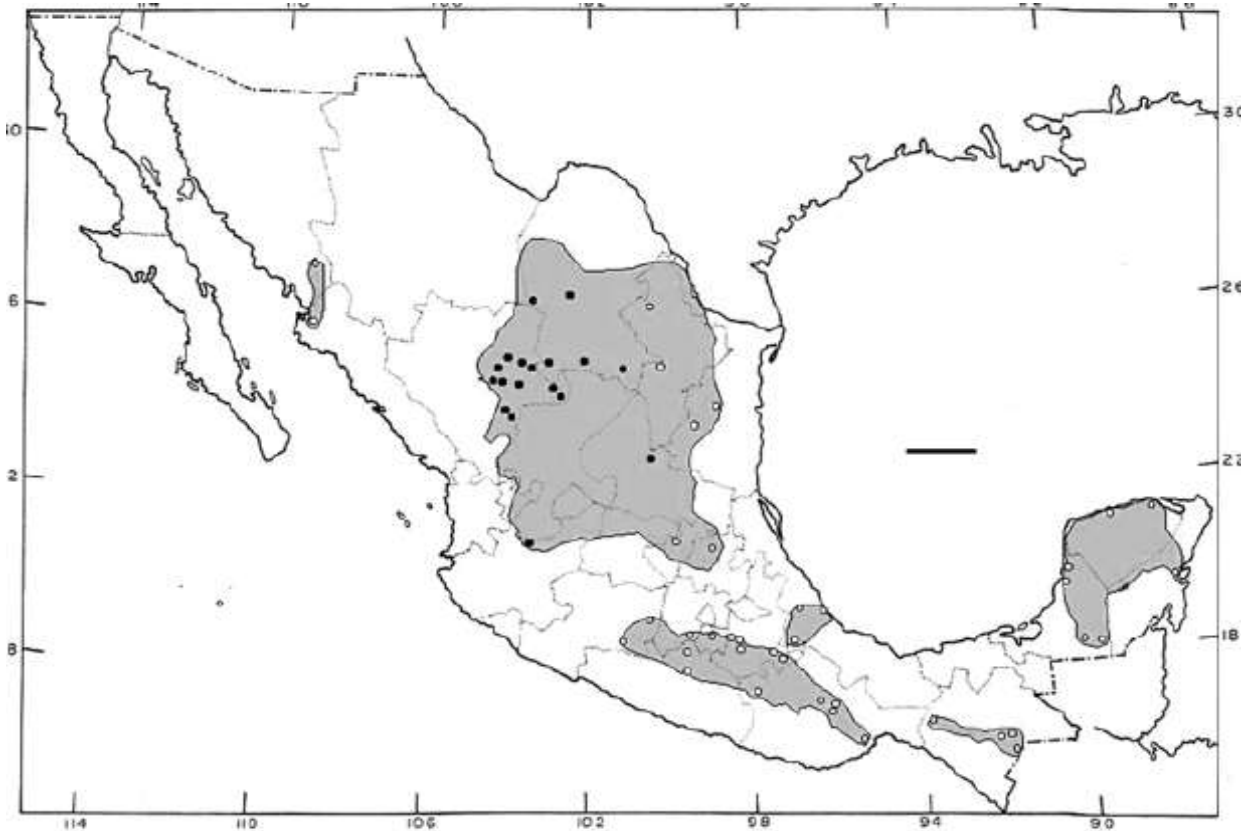
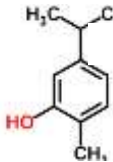
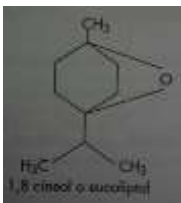
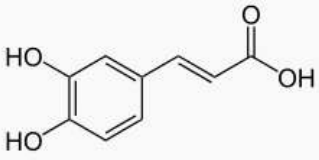
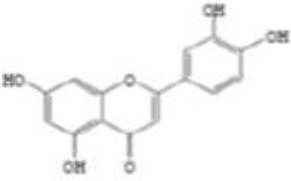



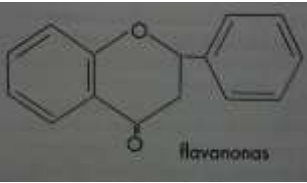
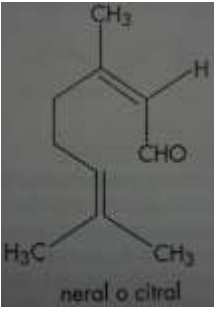
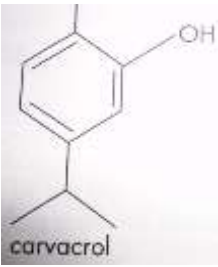
Figura 2 Distribución geográfica aproximada de *L. graveolens* (los círculos llenos representan poblaciones fuertemente aromáticas) (Sánchez et al., 2007)

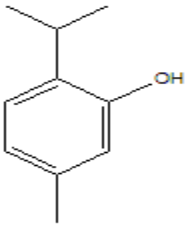
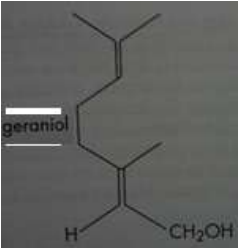
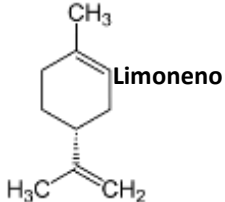
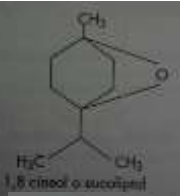
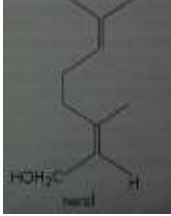
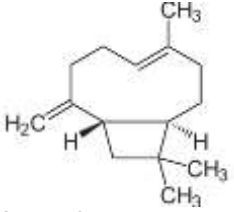
3.6- Composición química y actividad biológica de varias especies de *Lippia*


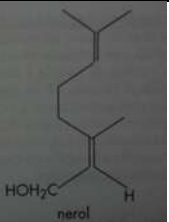
En el cuadro 2 se muestran los principales compuestos identificados para algunas especies del género *Lippia*, la mayoría representados por compuestos volátiles y compuestos fenólicos.

Cuadro 2 Principales compuestos reportados para el género *Lippia*.

Especie	Compuestos	Estructura	Referencia
<i>Lippia gracilis</i>	Se identificaron en el aceite esencial 35 compuestos, la mayoría monoterpenos. p-cimeno γ-terpineno carvacrol y timol.	 <p>Carvacrol</p>	Ferraz <i>et al.</i> 2013
<i>Lippia javanica</i>	Se purifico un nuevo compuesto del extracto de acetato de etilo. α-pirona (actividad antimalaria). Mircenona, Fenilaldehido, germacreno D, p-menta-8dien-4-ol, carvona y 1,8cineol.		Ludere <i>et al.</i> 2013 Combrinck <i>et al.</i> 2011
<i>Lippia graveolens</i>	Ácido cafeico, ácido rosmarinico, eriodictiol, galangina, luteolina, naringenina. β-mirceno, α-terpineno, terpineno, p-cimeno, cineol, carvacrol, timol El extracto metanólico presentó más de 20 flavonoides individuales y al realizar una hidrólisis se identificaron 11 flavonoides más.	 <p>Ácido caféico</p>  <p>Luteolina</p>	Lin <i>et al.</i> 2007 Rodríguez <i>et al.</i> 2011

<p><i>Lippia myriocephala</i></p>	<p>Ácido ursólico, B-sitosterol, Estigmasterol, Pinocebrina, Dihidroflavonol, Flavononas Flavonoles</p>	 <p>Acido ursolico</p>	<p>Maldonado <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia salviaefolia</i></p>	<p>Flavononas Tetrahidroxiflavonona B-glucopyronosido 6-hidroxiluteolina Eriodyctiol Glucopyranosido</p>	 <p>flavononas</p>	<p>Funari <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia alba</i></p>	<p>Citral, geranial, neral, granoliol, trans-β cariofileno, carvona, limoneno, biclosesquifelandreno, piperitenona, piperitona, β-bourboneno.</p>	 <p>neral o citral</p>	<p>Celis <i>et al.</i> 2007 Mesa <i>et al.</i> 2009 Ocazonez <i>et al.</i> 2010 Escobar <i>et al.</i> 2010 López <i>et al.</i> 2011 Haldar <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia sidoides</i></p>	<p>Timol, carvacrol, p-cimeno, etermetil timol, aromadendreno. Además de alcaloides, compuestos fenólicos y esteroides.</p>	 <p>carvacrol</p>	<p>Botelho <i>et al.</i> 2007 Figueiroa <i>et al.</i> 2012</p>

<p><i>Lippia palmeri.</i></p>	<p>Los mayores constituyentes del aceite esencial fueron: p-cimeno, timol, isoaromandreno, cavacrol, γ-terpineno, p-timol, eudesmol, acetato de timol, α-bisoboleno, α-cariofileno.</p>	 <p style="text-align: center;">Timol</p>	<p>Ortega <i>et al.</i> 2011.</p>
<p><i>Lippia rehmanii</i></p>	<p>Geraniol, camfor, neral, isocariofileno, oxido cariofileno y β- cariofileno.</p>		<p>Combrinck <i>et al.</i> 2011</p>
<p><i>Lippia scaberrima</i></p>	<p>R-carvona, limoneno, camfor, 1,8-cineol, Borneol y P-cimeno.</p>	 <p style="text-align: center;">Limoneno</p>	<p>Combrinck <i>et al.</i> 2011</p>
<p><i>Lippia microphylla</i></p>	<p>1,8 cineol, β-ocimeno, biciclogermacreno, oxido de cariofileno.</p>	 <p style="text-align: center;">1,8 cineol o succinipol</p>	<p>Fernández <i>et al.</i> 2011</p>
<p><i>Lippia citridora</i></p>	<p>geraniol, neral, limoneno, cineol, spatuleno, geraniol, trans-β-cariofileno, nerol, acetato geraniol, carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno, carvona y timol.</p>		<p>Escobar <i>et al.</i> 2010 Ocazonez <i>et al.</i> 2010 Combrinck <i>et al.</i> 2011</p>
<p><i>Lippia dulcis</i></p>	<p>α-Bisabolo, δ- Cadineno, Trans β cariofileno</p>	 <p style="text-align: center;">βcariofileno</p>	<p>Saldarriaga <i>et al.</i> 2010</p>

<p><i>Lippia origanoides</i></p>	<p>Geranial, neral, limoneno, nerol, carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno, carvona, timol, β-felandreno, trans β-cariofileno.</p>	 <p>p - cimeno</p>	<p>Oliveira <i>et al.</i> 2007 Celis <i>et al.</i> 2007 Ruiz <i>et al.</i> 2007 Escobar <i>et al.</i> 2010 Vicuña <i>et al.</i> 2010</p>
<p><i>Lippia micromera</i></p>	<p>Geranial, neral, limoneno, nerol, carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno, carvona, timol</p>	 <p>nerol</p>	<p>Escobar <i>et al.</i> 2010</p>

Actividad biológica.

El cuadro 3 muestra la actividad biológica reportada para varias especies del género *Lippia*, destacando su actividad bactericida y fungicida.

Especie	Actividad	Referencia
<p><i>Lippia javanica</i></p>	<p>Extracto de acetato de etilo, mostró actividad frente a <i>Plasmodium falciparum</i> además de actividad antimalaria.</p>	<p>Ludere <i>et al.</i> 2013</p>
<p><i>Lippia gracilis</i></p>	<p>El aceite esencial presento actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares (HepG2,KS62 y B16-F10)</p>	<p>Ferraz <i>et al.</i> 2013</p>
<p><i>Lippia alba</i></p>	<p>Extractos orgánicos de hoja mostraron actividad analgésica y antiinflamatoria.</p>	<p>Haldar <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia sidoides</i></p>	<p>Extractos etanólicos de hoja de <i>L. sidoides</i> presentaron actividad de inhibición frente a diferentes especies de <i>Candida</i>.</p>	<p>Figueroa <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia graveolens</i></p>	<p>Extracto etanólico, mostró inhibición del 70% frente a bacterias Gram negativas.</p>	<p>Méndez <i>et al.</i> 2012</p>
<p><i>Lippia graveolens</i></p>	<p>Extractos etanólicos de hoja de <i>L. graveolens</i>, presentaron inhibición de crecimiento del 100% sobre <i>R. stolonifer</i></p>	<p>Rodríguez <i>et al.</i> 2011</p>

<i>Lippia rehmanii</i>		
<i>Lippia javanica</i>	Los aceites esenciales mostraron actividad de inhibición de crecimiento en varias especies de hongos.	Combrinck <i>et al.</i> 2011
<i>Lippia citridora</i>		
<i>Lippia seaberrina</i>		
<i>Lippia mycrophilla</i>	Aceite esencial presentó actividad bacteriostática en contra de <i>Shigella flexneri</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Stafilococcus aureus</i> .	Fernández <i>et al.</i> 2011
<i>Lippia barlandieri</i>	Aceite esencial presentó actividad de inhibición de crecimiento del hongo, <i>Fusarium oxysparum</i> .	Cueto <i>et al.</i> 2010
<i>Lippia palmeri</i>	El aceite esencial mostró Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Escherichiacoli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Ortega <i>et al.</i> 2011
<i>Lippia dulcis</i>	Presencia de α - Bisbolol, el cual tiene un efecto protector que previene la formación de úlceras, provocadas por indometacina y el alcohol y reduce el tiempo de curación de las mismas. Compuesto antiinflamatorio, diurético y antiséptico.	Saldarriaga <i>et al.</i> 2010
<i>Lippia alba</i> <i>Lippia citridora</i>	Los aceites esenciales mostraron actividad de inhibición en la replicación del virus del Dengue.	Ocazonez <i>et al.</i> 2010
<i>Lippia alba</i>	El aceite esencial mostró gran actividad en contra de <i>Trypanosoma cruzi</i> y en líneas celulares Vero (THP-1).	Escobar <i>et al.</i> 2010
<i>Lippia organoides</i>	El aceite esencial presentó actividad frente a <i>Leishmania chagasi</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Escobar <i>et al.</i> 2010
<i>Lippia alba</i>	El aceite esencial mostró toxicidad en líneas celulares HeLa y actividad de inhibición en el crecimiento de hongos, <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> .	Mesa <i>et al.</i> 2009
<i>Lippia sidoides</i>	El aceite esencial presentó inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarios</i> , <i>S. sanguis</i> y <i>Candida albicans</i>	Bothelo <i>et al.</i> 2007

<i>Lippia origanoides</i>	Aceite esencial mostró Inhibición de crecimiento frente a, <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Lactobacillus casei</i> .	Oliveira et al. 2007
<i>Lippia gracilis</i>	El aceite esencial mostró actividad bactericida en concentraciones mayores a 400µl (v:v) en contra de: <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Bacillus thuriengensis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>E. hormaechei</i> y <i>Salmonella choleraeuis</i>	Cavalcanti et al. 2006
<i>Lippia graveolens</i>	Extractos etanólicos presentaron actividad de inhibición de crecimiento frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas.	Hernández et al. 2003

3.7- Química de *Lippia graveolens*

Respecto a la composición química de la especie *Lippia graveolens*, se reportan compuestos volátiles y compuestos fenólicos (Figura 3). Los compuestos volátiles son los principales responsables de las características sensoriales presentes en el orégano, dado que su concentración modifica el olor y el sabor de las hojas. Machado *et al.* 2010, determinaron que la composición del aceite de *L. graveolens* HBK, contiene monoterpenos, sesquiterpenos y otros compuestos. En el caso de los compuestos fenólicos y flavonoides se encontraron en la especie, eriodictiol, galangina, luteolina, naringenina, quercetina y taxifolina (García *et al.*, 2012).

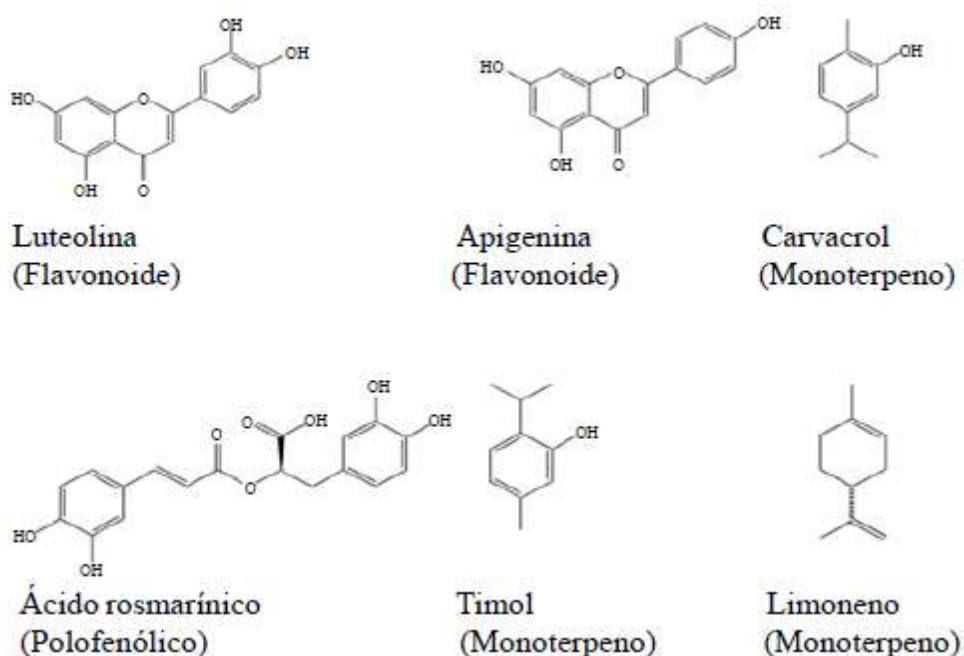


Fig 3. Estructura de los principales componentes fitoquímicos en orégano
(Tomado de: García, E., et al 2012)

3.8- *Spodoptera frugiperda* como modelo biológico

Los modelos biológicos nos sirven para poder estudiar el efecto de diversos fenómenos sobre poblaciones específicas de organismos. Los fenómenos a estudiar pueden ser de naturaleza variable, como por ejemplo exposiciones a sustancias variadas, condiciones ambientales adversas e incluso se pueden provocar enfermedades para poder estudiarlas en organismos y extrapolar los estudios al ser humano (Reguera, J. 2010).

Como modelo biológico los organismos deben cumplir ciertos requisitos para ser funcionales. Deben tener una alta tasa de reproducción, un ciclo de vida corto, que el mantenimiento del organismo sea de bajo costo y preferentemente que sea de pocas necesidades ya que esto reduce los costos y optimiza la disponibilidad de individuos de prueba y que su ciclo de vida este bien documentada (Reguera, 2010).

Una metodología a seguir es considerar a los insectos modelos, como *Spodoptera frugiperda* para la evaluación de la actividad biológica de extractos vegetales a fin de aislar compuestos de utilidad para el ser humano. *Spodoptera frugiperda* es un lepidóptero que pertenece a la familia Noctuidae. Es un herbívoro generalista que se alimenta principalmente de gramíneas, pero es capaz de alimentarse de 87 especies distintas. Debido a que en el país hay un cultivo importante de maíz, se le puede encontrar en prácticamente cualquier región donde se cultive éste. *Spodoptera frugiperda* es capaz de adaptarse al consumo de una variada cantidad de partes vegetales e incluso a la alimentación por medio de dieta artificial, esto permite la adición de sustancias de prueba para ensayos toxicológicos sin provocar estrés excesivo en los organismos (Reguera, 2010).

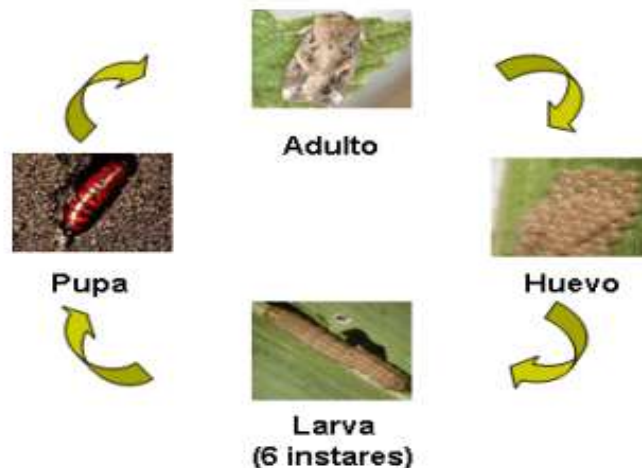
Casmuz *et al.*, (2010) distingue las diferentes etapas del ciclo de vida de *S. frugiperda*. Estas etapas son:

Huevo o postura: Individualmente son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosado pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión.

Larva o gusano: Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida. Las larvas pasan por 6 estadios o mudas en el primero estas miden hasta 2-3 milímetros y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 milímetros y la cabeza es carmelita claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 milímetros en su último estadio.

Pupa: Son de color caoba y miden 14 a 17 milímetros de longitud. Está en reposo hasta los 8 a 10 días en que emerge el adulto o mariposa.

El ciclo completo dura aproximadamente entre 35 y 40 días y depende de la temperatura y humedad.



Ciclo de vida de *S. frugiperda*

4.- Justificación

Lippia graveolens, es una especie que se caracteriza por la presencia de compuestos de tipo terpeno y flavonoide, resulta ser una especie potencial para ser utilizada como control biológico frente a plagas, por lo cual se evaluara el efecto de los extractos hexánicos en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda*, un lepidóptero plaga de varios cultivos de gramíneas de importancia económica en México.

Enriqueciendo la actividad biológica de la especie, pues solo existen reportes, sobre su uso medicinal.

5.-Objetivos

Objetivo general

En este trabajo se llevó a cabo una extracción de hojas de *Lippia de graveolens*, con 3 disolventes de diferente polaridad. Se evaluó el efecto de los extractos hexánicos sobre el desarrollo de *Spodoptera frugiperda*. Por otro lado se realizó una comparación cromatografica de los tres extractos orgánicos obtenidos, con el fin de evidenciar la variación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en la especie de estudio.

Objetivos particulares

- Obtener extractos crudos a partir de hoja de *Lippia graveolens*.
- Evaluar el efecto en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda*, de los extractos hexánicos de hoja de *Lippia graveolens*.
- Realizar una comparación de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos de *Lippia graveolens*, recolectadas en diferentes épocas del año.

6.- Materiales y Métodos

Recolecta de material

El material vegetal fue proporcionado por el Dr. Gerardo Sánchez Ramos, del Instituto de Ecología aplicada de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

El material vegetal fue recolectado en los municipios, Casas, Hidalgo y Jaumave, en el Estado de Tamaulipas en dos épocas del año, verano e invierno, el material fue secado y molido.

Descripción de los sitios de colecta

A continuación se presenta la descripción de cada uno de los municipios del Estado de Tamaulipas, en donde se llevó a cabo la colecta de *L. graveolens*. (Enciclopedia de los Municipios de México. Secretaría de Gobernación).

Casas

Se localiza en la porción media del territorio de la entidad, en las coordenadas 23° 42' latitud norte y 98° 44' longitud oeste, a una altura de 150 m snm. Su extensión territorial es de 2,874.33 km², mismos que representan el 5.11% de la superficie total del estado.

Se representan 3 formas características del relieve. Las zonas accidentadas, abarcando aproximadamente el 37.95% de la superficie, se localizan al oriente del municipio, en la Sierra de Tamaulipas; las zonas semiplanas cubren aproximadamente el 42.23 % y se localizan al centro del municipio; y las zonas planas, cubren el 20.75%, se localizan en el noreste y sureste del municipio

El clima es el más seco de los esteparios, con lluvias de mayo a septiembre; las temperaturas máximas oscilan entre 43 a 46° C y se presentan de mayo a agosto y la mínima de 0 a 2° C, presentándose de diciembre a enero. La precipitación media anual es de 600 a 800 mm³, la que se

incrementa en la época de ciclones; la velocidad de los vientos varía entre uno y dos metros por segundo.

La asociación de vegetal en la porción alta es el bosque caducifolio. En las laderas de la Sierra, la asociaciones de matorrales y selva baja hasta llegar a ser en la porción más occidental, matorral bajo espinoso.

Los suelos son de tres tipos predominantes: i) la porción central (sobre la mayor extensión), con suelo vertisol poco apta para la agricultura, ii) la porción occidental del suelo con chernozem con mayor aptitud para la agricultura y iii) la porción sur con suelos litosoles y xerosoles, clasificado como montañoso y forestal.

Hidalgo

Localizada a 24° 9' latitud norte y a 100° 5' longitud oeste, a una altitud de 400 m snm. Comprende una extensión territorial de 2,142.43 Km², que representa el 2.33 % del total de la superficie de la entidad.

El clima predominante es de tipo sub-húmedo, semicálido y extremoso. La precipitación media es de 700 mm³, la temperatura mínima es de 2°C y la máxima de 41°C.

La vegetación presenta una asociación de bosque caducifolio y escleroaciculifolio. En las laderas de la sierra la vegetación es de matorral alto subinerme y en el resto del municipio, sobre el plano inclinado, aparecen asociaciones de matorral caducifolio espinoso.

Existen varios tipos de suelos: al suroeste los montañosos y forestales (histoles y xerosoles), en la mayor extensión del territorio se encuentran los suelos verticales que son aptos para la

agricultura. Al norte, en una pequeña porción, el suelo es kastanozem cálcico poco apto para la agricultura.

Jaumave

Situado geográficamente a 23° 24' latitud norte y 99° 24' de longitud oeste a una altura de 735 m snm. El municipio cuenta con una extensión territorial de 2,737.59 Km², que representan el 3.33% del total del Estado.

El clima imperante es el más seco de los esteparios, cálido extremoso con presencia de canícula y en las zonas semicálidas se presenta un clima estepario, no muy seco. Las temperaturas medias anuales son de 21° a 23° C y de 17° C, en el noreste; las máximas son de 43° C en el este y centro; de 45° C en el noreste y las mínimas de 4 a 0° C. La precipitación pluvial es, mayor en el este, donde alcanza 1,200 mm³ y solo 500 mm³ en el noreste.

En el municipio predominan en su mayor parte los mezquiales que alcanzan una altura aproximada de 3.5 m y matorrales espinosos de baja altura, y como es peculiar del clima seco abundan los cactus tales como la biznaga, pitayos, jacubos, nopales, lechuguilla y pastos bajos; en lo más alto de la sierra Madre Oriental abunda el pino y encino. La mayor parte de la superficie es suelo con bisoles acrícos, ubicados en el extremo este, de norte a sur, y en la parte central se localizan los litosoles y xerosol. En lo que respecta al uso del suelo, es eminentemente agrícola, siguiéndole en segundo término la actividad ganadera y forestal.

Obtención de extractos

Las hojas secas y molidas fueron sometidas a una extracción en frío (maceración) durante 24 h, (hexano, acetato de etilo y metanol). Tres veces cumplidos estos periodos se procedió a concentrar el extracto por destilación a presión reducida. El extracto obtenido fue trasvasado y colocado en una cámara de vacío para eliminar por completo el disolvente y se calculó el rendimiento para cada uno de los extractos.

Análisis de los extractos

Lippia graveolens, es una especie cuya composición química está caracterizada por compuestos fenólicos y terpenos. Por presentar estos tipos de compuestos es una especie potencial para ser considerada como una especie con actividad insecticida.

En su actividad biológica y química destacan los compuestos de tipo terpénicos, por lo que se evaluó únicamente los extractos hexánicos.

Evaluación biológica

Ensayos de larga duración con dieta artificial

Con el fin de evaluar el efecto de los extractos orgánicos en la alimentación de *Spodoptera frugiperda*, se realizaron ensayos de larga duración. Para el montaje de este tipo de ensayos se siguió el método de Cole (1994) usando la dieta artificial para la crianza de *S. frugiperda* (Singh *et al.*, 1984). Los ensayos fueron montados con larvas de 1^{er} estadio de desarrollo. Se colocaron individualmente en un recipiente que contenía 10 g de dieta artificial (cantidad óptima de dieta para que la larva cumpla su ciclo vital), manejando un total de 10 réplicas por cada tratamiento (10 y 100 ppm).

Las unidades experimentales se mantuvieron en una cámara de ambiente controlada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad del $60 \pm 10\%$ y un fotoperiodo de 16/8h. Estas condiciones se mantuvieron constantes durante el desarrollo del ensayo.

Los datos obtenidos de los ensayos de larga duración se procesaron aplicando el índice de crecimiento implementado por Zhang (1993) (Fórmula 1) que estima las diferencias entre las poblaciones control y de los tratamientos por medio de la obtención de un valor que nos permite comparar las diferencias entre las distintas concentraciones. Los tratamientos se monitorearon cada 7 días hasta observar que el porcentaje de pupación en el control represento el 95% del total de individuos que lo conforman, al ocurrir esto tanto en las larvas control como en las larvas bajo tratamiento fueron clasificadas según el estadio larval en el que se encontraran.

El índice de crecimiento (IC) representa de manera matemática la tasa de crecimiento en el insecto modelo, al considerar que si estos no están mudando, para pasar de un estadio a otro, no estarían creciendo, razón por la cual los estadios larvales son utilizados como parámetro para estimar el desarrollo de un insecto bajo ensayo.

El IC se define como la suma de los estadios observados en los individuos bajo tratamiento entre la suma de los estadios totales que podía alcanzar toda la población bajo tratamiento (Fórmula 1).

$$\text{IC} = \frac{\sum_{i=1}^{i_{\max}} [n_{(i)} \times i] + \sum_{i=1}^{i_{\max}} [n'_{(i)} \times (i - 1)]}{N \times i_{\max}}$$

Fórmula 1. Representación matemática de la formula usada para obtener el Índice de Crecimiento (IC)(Reguera, 2008)

Dónde:

i = es el número de estadio

$n_{(i)}$ = número de larvas vivas en el estadio i

$n'_{(i)}$ = número de larvas muertas en el estadio i
 i_{max} = estadio máximo que puede alcanzar el modelo usado
 N = número total de individuos que conforman el ensayo

El índice de crecimiento relativo (ICR, siglas en inglés) fue obtenido mediante la comparación de los IC de los tratamientos contra los IC de la muestra control, como se muestra en la **Fórmula 2**.

$$\text{ICR} = \frac{\text{IC del grupo tratado}}{\text{IC del grupo control}}$$

Fórmula2. Representación matemática para obtener el Índice de Crecimiento Relativo (ICR)

(Reguera, 2008)

El valor del índice de crecimiento relativo utilizando sólo los datos de controles siempre deberá ser muy cercano o igual a 1, las diferencias se verán reflejadas en función de que tan alejado este el valor del tratamiento respecto al valor de 1 en control, es decir que entre más se aleje este valor, mayor será la diferencia existente entre el control y el tratamiento.

Además se cuantifico el porcentaje de individuos adultos, comparando los tratamientos con respecto al control.

Análisis cromatográfico de los extractos

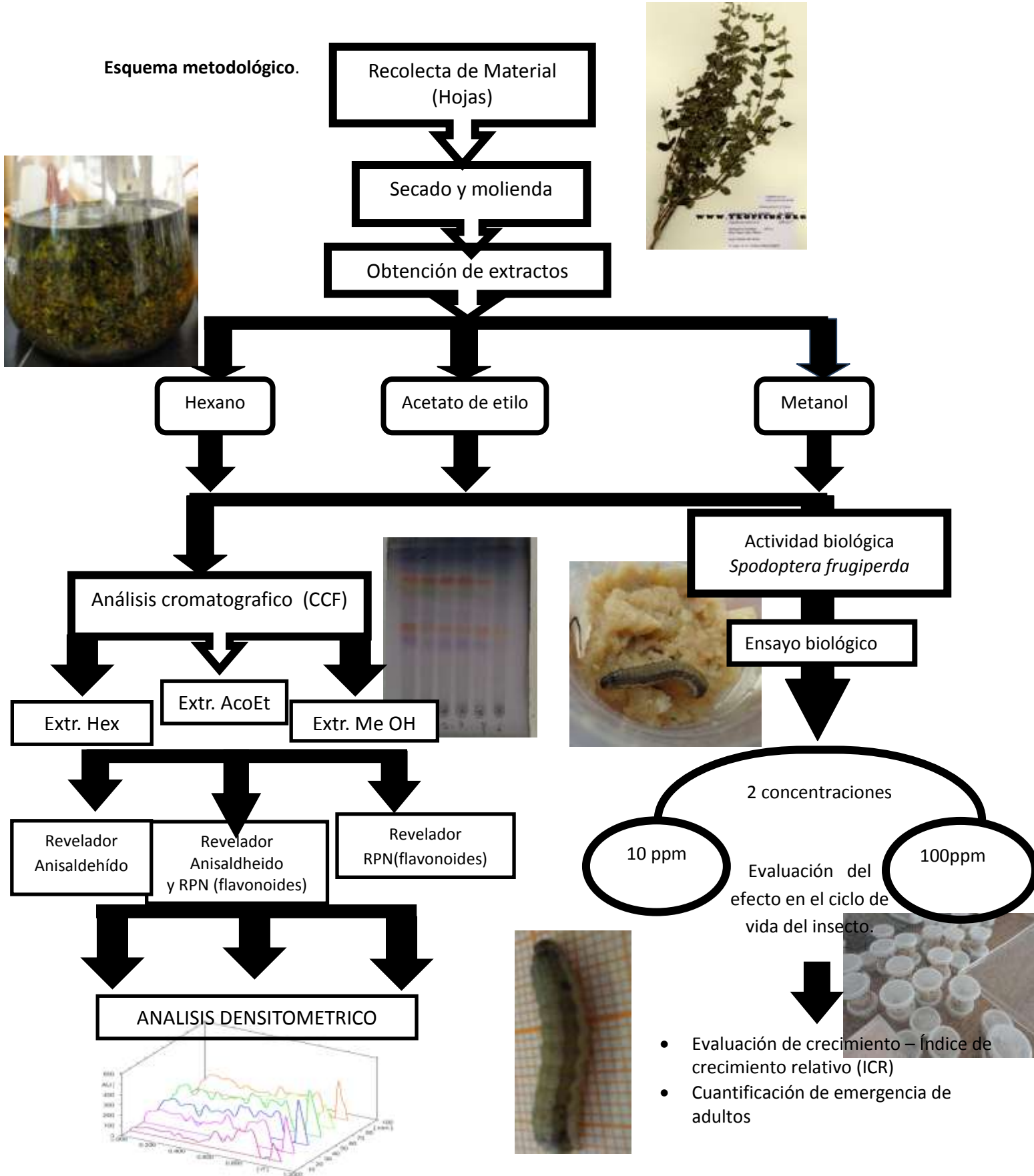
Se realizó cromatografía en capa fina (CCF), para los extractos orgánicos obtenidos (hexano, acetato de etilo y metanol) de cada una de las muestras. Los extractos fueron redisueltos a una concentración de 5mg/mL y con la ayuda de un aplicador (equipo CAMAG automatic TLC Sampler 4) se aplicaron 15 µl de muestra en una placa de vidrio de silica gel de 5 x 10 cm (Merck, con indicador de fluorescencia y con un espesor de capa de 0.25mm), la aplicación que se realizó fue en banda con una longitud de 7mm y una distancia entre banda y banda de 16mm. Después de la aplicación se procedió a eluir la placa, para después ser tratada con reveladores específicos para

evidenciar la presencia de grupos de metabolitos secundarios, utilizando reveladores específicos (Anisaldheido^{sigma} y revelador de productos naturales (RPN) (Anexo A).

Las placas cromatograficas reveladas se sometieron a un análisis por densitometría, mediante un Scanner 3 CAMAG TLC, usando diferentes longitudes de onda (400 a 60nm).Las longitudes de onda se eligieron, por el mayor número de picos presentes en los cromatogramas, posteriormente se analizaron con el programa WinCats-Planar Chromatography versión 1.2.0.

La metodología descrita se resume en el siguiente esquema metodológico.

Esquema metodológico.



7.-Resultados y discusión

7.1- Rendimientos de extractos orgánicos

A continuación se presentan los rendimientos de las diferentes muestras obtenidas de los pasos de extracción.

Cuadro 5. Rendimientos obtenidos después del proceso de extracción.

Municipio	Época año	Peso(g)	Hexano	Acetato De Etilo	Metanol
			Rendimiento %	Rendimiento %	Rendimiento %
Casas	V	67.00	1.45	3.73	2.74
	I	25.00	2.58	12.43	4.76
Hidalgo	V	40.00	1.47	10.488	22.56
	I	40.00	2.48	11.99	18.72
Jaumave	V	40.00	2.78	12.49	5.74
	I	15.00	3.95	23.30	18.35

V= verano; I= invierno

El mayor rendimiento se presentó en la época de invierno para la mayoría de los extractos obtenidos, a excepción del extracto metanólicos que corresponde a la localidad de Hidalgo, ya que el mayor rendimiento corresponde a la época de verano. Estos resultados sugieren que la estacionalidad representa un factor importante en el rendimiento obtenido, sin embargo es importante determinar con estudios sistemáticos el origen de esta variación.

7.2- Análisis de los extractos

7.2.1- Ensayos de larga duración con dieta artificial

Este ensayo permite evaluar de forma preliminar los efectos a largo plazo que provoca la administración de planta seca o extracto, en el desarrollo de larvas de *Spodoptera frugiperda*, de las poblaciones bajo tratamiento, estos datos fueron comparados con los obtenidos para las poblaciones control.

El valor de los Índices de Crecimiento Relativo (ICR), para las diferentes muestras, se presentan en el cuadro 6, los mismos valores se muestran en la Figura 5 y 6, de tal modo que es posible observar una comparación entre las concentraciones y los tratamientos.

Cuadro 6. Resultados de los ICR obtenidos de las diferentes muestras

Concentración	10ppm			100ppm		
Localidad	Casas	Hidalgo	Jaumave	Casas	Hidalgo	Jaumave
*Verano	M1 / 0.96	M3 / 1	M5 / 1	M1 / 0.84	M3 / 0.88	M5 / 0.85
*Invierno	M2 / 0.93	M4 / 0.88	M6 / 0.89	M2 / 0.93	M4 / 0.86	M6 / 0.94
Control	C/1			C/1		

Evaluación realizada cuando el 95% de las larvas del testigo alcanzaron el estado pupal; #de muestra / valor del ICR; *época de colecta.

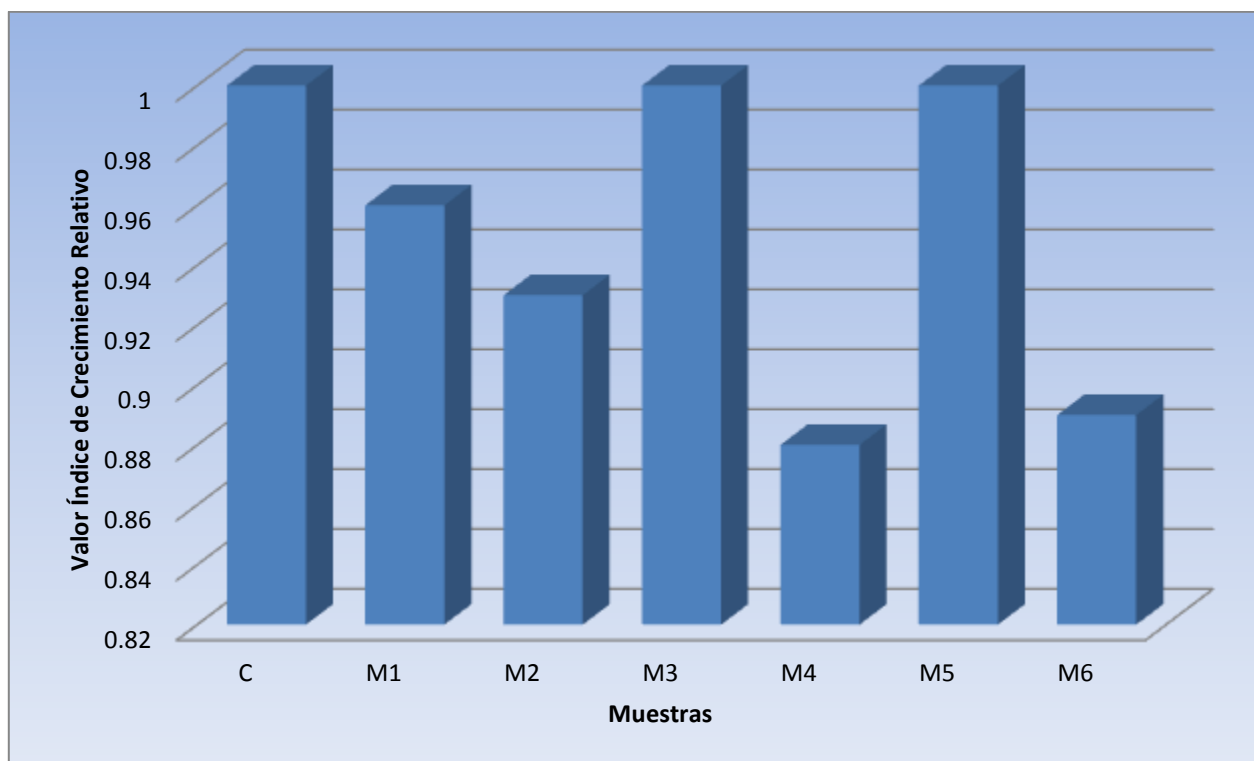


Figura 5. Índices de Crecimiento Relativo obtenidos para las diferentes muestras- concentración de 10 ppm

C= control; M1 colecta en verano, Localidad Casas; M2 colecte en invierno, Localidad Casa; M3 colecta en verano, Localidad Hidalgo; M4 colecta en invierno, Localidad Hidalgo; M5 colecta en verano, Localidad Jaumave; M6 colecta en invierno, Localidad Jaumave

La Figura 5 que corresponde a la concentración de 10ppm, se observa que el valor del ICR de los tratamientos con respecto al control en la época de verano (M1, M3 y M5), son muy cercanos al valor de 1 del control, sin embargo las muestras que corresponde a la época de invierno (M2, M4 y M6), son levemente diferentes al compararlas con las muestras colectadas en verano, se observa un ICR menor con respecto al control.

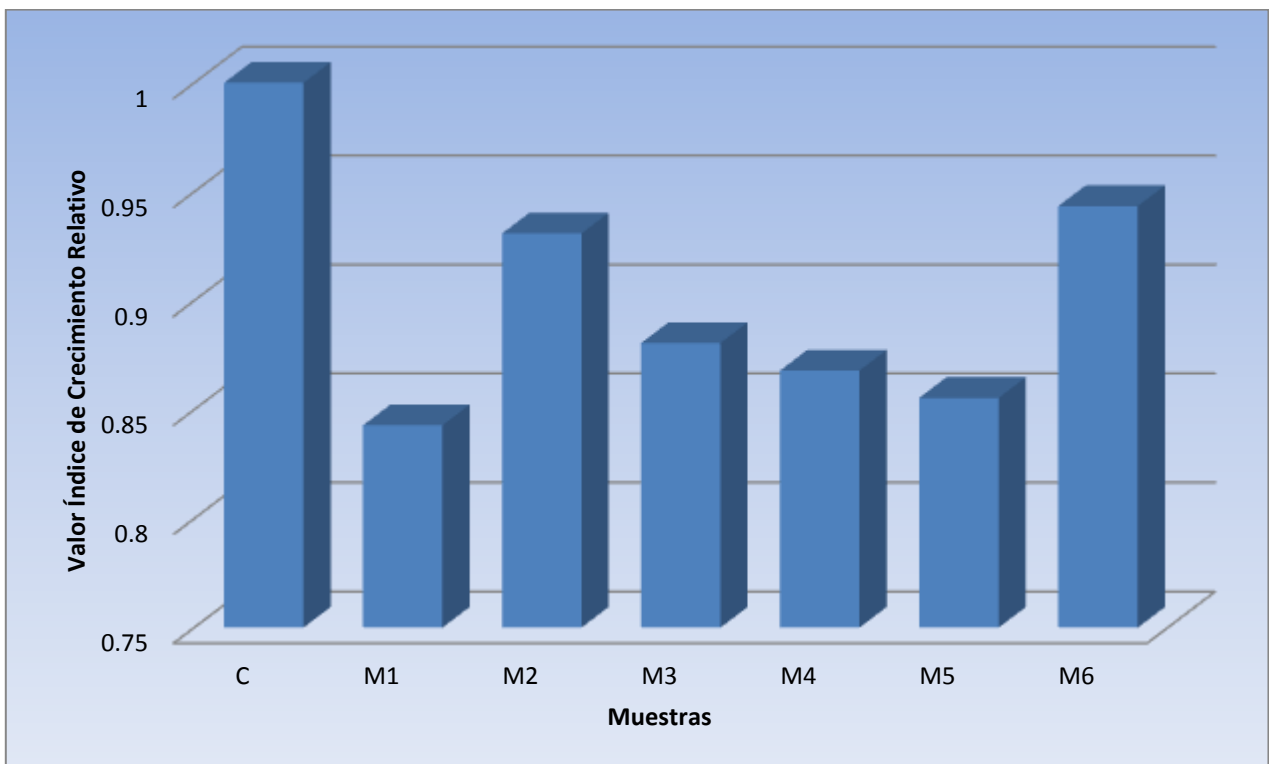


Figura 6 Índices de Crecimiento Relativo obtenidos para las diferentes muestras, concentración de 100 ppm

C= control; M1 colecta en verano, Localidad Casas; M2 colecte en invierno, Localidad Casa; M3 colecta en verano, Localidad Hidalgo; M4 colecta en invierno, Localidad Hidalgo; M5 colecta en verano, Localidad Jaumave; M6 colecta en invierno, Localidad Jaumave

La figura 6 muestra los ICR a una concentración de 100ppm, las muestras que corresponden a la estacionalidad de verano, son ligeramente diferentes con respecto al control, siendo la M1 la que presentó el menor ICR, seguido por la M5 y después la M3.

Se observa que la estacionalidad de invierno la M2 100 presentó el mismo ICR con respecto a la concentración de 10 ppm, además de un ICR mayor que la M1; la muestra M4 a 100 ppm presentó un ICR muy parecido a la muestra colectada en verano M3- 100ppm , en cuanto a la muestra M6 100 ppm, el ICR es superior al de la muestra M5- 100ppm ; a pesar de que los ICR son ligeramente diferentes con respecto al control, se puede apreciar una mayor inhibición del desarrollo del insecto a la concentración de 100ppm, siendo las muestras de la estacionalidad de verano las que presentaron un menor ICR de inhibición del crecimiento del insecto.

Los resultados del ICR de las dos concentraciones evaluadas, indican que las concentraciones juegan un papel importante para inhibir el desarrollo del insecto ya que las muestras M3 y M5 presentaron ICR menor a 1 a la concentración de 100ppm mientras que a la concentración de 10 ppm mostraron un ICR igual a 1, lo que nos indicaría que el extracto no tuvo efecto en el desarrollo del insecto. La estacionalidad con mayor actividad cambia, si se aumenta la concentración a 10 ppm la estacionalidad de invierno es más activa que la de verano, pero al incrementar la concentración a 100ppm la estacionalidad activa es la de verano, por lo que el tipo de compuestos y la concentración juegan un papel importante para inhibir el desarrollo del insecto.

Emergencia de adultos

Cuadro 7. Porcentaje de emergencia de adultos vivos (Hembras/Machos), tanto normales como deformes y porcentaje de individuos que no emergieron (muerte en el estadio de pupa)

4ta medición		Adultos %		Adultos (Deformes) %		%			
Localidad	Época	Tratamiento	Macho%	Hembra%	Macho%	Hembra%	Pupas Normales muertas	Pupas deformes (muertas)	pupas vivas (retraso del desarrollo)
	Casas		CONTROL	70	20	0	0	10	0
V		M1-10	0	0	0	0	50	50	0
		M1-100	0	0	0	0	90	10	0
I		M2-10	0	0	10	0	80	10	0
	M2-100	0	0	0	0	100	0	0	
Hidalgo	V	M3-10	50	10	10	0	30	0	0
		M3-100	0	0	20	0	50	30	0
	I	M4-10	20	0	10	0	30	40	0
		M4-100	10	0	10	0	70	0	10
Jaumave	V	M5-10	0	0	40	10	30	20	0
		M5-100	10	0	30	0	40	10	10
	I	M6-10	40	0	10	0	40	0	10
		M6-100	30	0	0	0	50	20	0

V=verano, I=invierno; deformes= alteraciones morfológicas.

En el cuadro 7, observamos que el tratamiento control tuvo un 90% de emergencia de adultos, en donde un 70% son individuos machos y un 20% hembras. Al compararlo con los tratamientos de 10ppm, la muestra M3-10 presentó el más alto porcentaje de emergencia (50% macho y 10% de hembras), seguido de las muestra M6-10 (40% solamente machos) y finalmente la M4-10 (20% únicamente machos). En la concentración de 100 ppm, el porcentaje más alto de emergencia corresponde a la muestra M6-100 (30% individuos machos) seguido de la muestra M4-100 (20% individuos machos). Esto se puede apreciar en la Figura 7

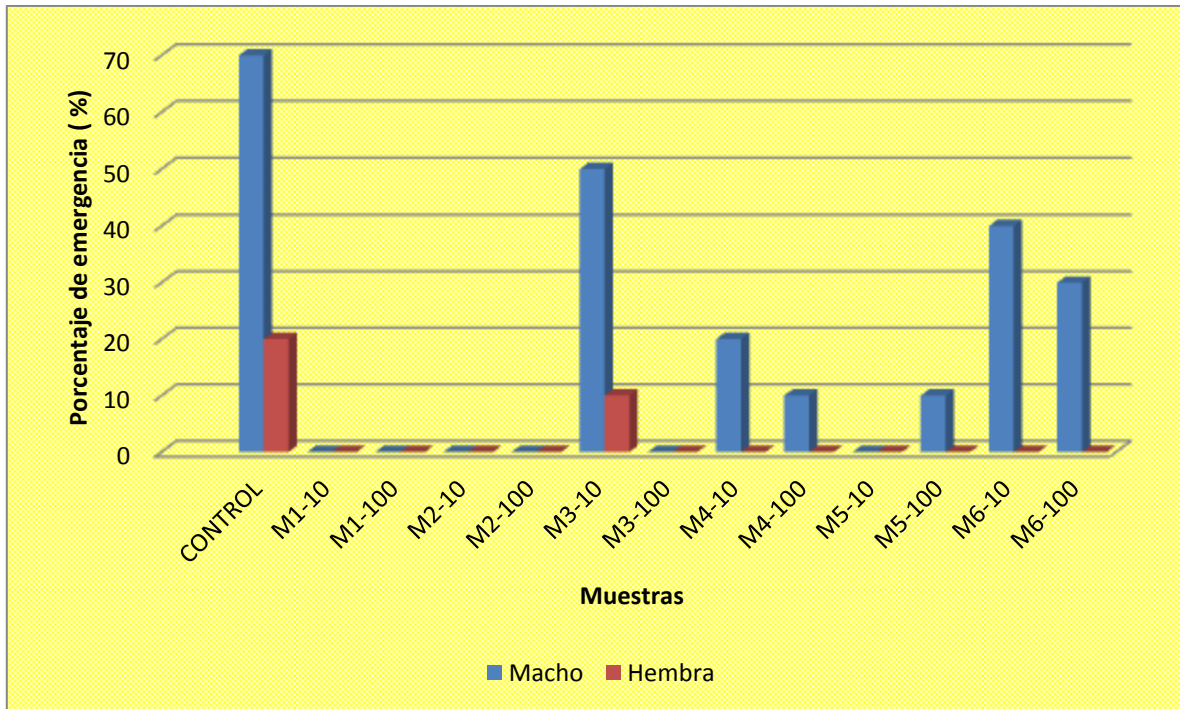


Figura 7. Emergencia de individuos adultos machos/hembras.

Sin embargo, encontramos individuos que presentaron alteraciones morfológicas lo que impide una viabilidad exitosa para reproducirse y sobrevivir en su ambiente natural. Esto se puede apreciar en la Figura 8, en donde el tratamiento con mayor porcentaje de emergencia es la M5-100 con un 50% (40% individuos machos y 10% hembras), en donde la concentración de 100ppm es la que presentó mayor número de individuos con alteraciones morfológicas. Por lo que los efectos de los compuestos del extracto hexánico están afectando en el desarrollo del último estadio de las larvas, teniendo efectos a largo plazo que afectan el desarrollo del insecto (Figuras 10 y 11).

Pavela, (2005) evaluó el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, que se caracteriza por las altas concentraciones de timol y carvacrol, compuestos reportados para la especie *L. graveolens*, en su ensayo reporta efectos letales (alteraciones morfológicas) en el desarrollo de *Spodoptera littoralis*

a una concentración de 10µl/100ml; Zoubiri, et al. (2011) reporta los compuestos limoneno, geraniol y carvona, como los principales componentes tóxicos del aceite esencial de *L. citridora*, y que tuvieron un efecto letal en larvas del insecto *Sitophilus granarius* a una concentración de 500µl/ml después de ser expuestos por 24 horas al extracto. Lo que confirma que los compuestos presentes en el extracto son los causantes de las alteraciones en la morfología de los individuos adultos de *S. frugiperda*.

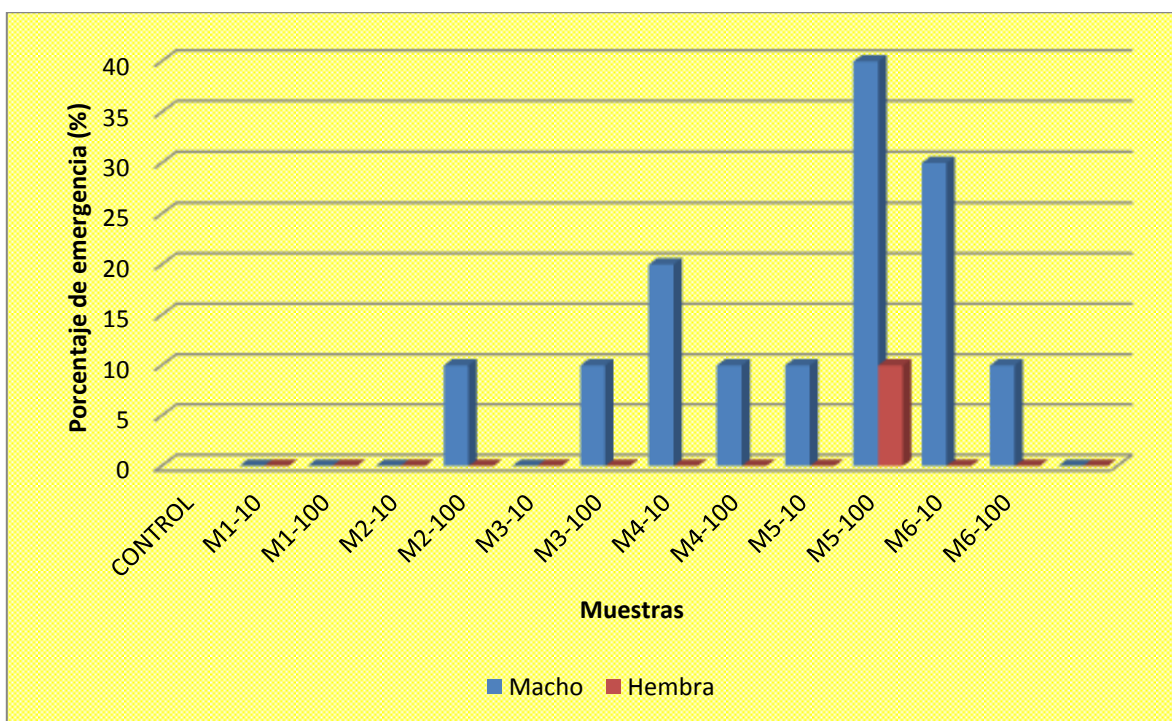


Figura 8. Individuos con alteraciones morfológicas (emergencia de adultos deformes).

La mortalidad de individuos en el estadio pupal fue alta en todos los tratamientos, en este último estadio se cuantificaron individuos tanto normales (figura 10 a) como deformes (10 figuras b y c), encontrando variaciones en los porcentajes de estas categorías. Sin embargo la muestra M1 presentó el 100% de mortalidad de las larvas en las dos concentraciones evaluadas (10 y 100ppm), el 100% se encuentra distribuido en las categorías antes mencionadas (cuadro 6). La muestra M2-

100 presentó la mortalidad del 100% de pupas, sin provocar malformaciones, por lo que destacan estas tres muestras.

Rodríguez, (2003), menciona algunos de los síntomas de la inhibición del crecimiento en los insectos: las larvas suelen ser poco vigorosas incapaces de moverse, no se alimentan, no completan la muda, no se desprenden de la cutícula anterior, presentan mudas adicionales, alargan su periodo de tiempo o mueren durante la ecdisis. Se forman estadios intermedios entre larva y pupa (figura 10 d y 10 e) y entre pupa y adulto (Figura 11a), se deforman las pupas (figura 10 b y 10c, Figura 11 f), los adultos emergen parcialmente o emergen con alas distorsionadas (figura 11b y 11c).

Los efectos de inhibición del crecimiento se pudieron apreciar al final del ensayo biológico, encontrando pupas deformes, y adultos con alteraciones morfológicas, por lo que los extractos evaluados a las concentraciones de 10 y 100 ppm mostraron actividad a largo plazo, lo que nos sugiere llevar a cabo una identificación de los compuestos presentes en las diferentes muestras de los extractos hexánicos y llevar a cabo ensayos más detallados con el insecto.



Figura 9, a) inicio del ensayo; b) larvas a los 7 días; c y d) medición de la longitud de las larvas a los 7 días



Figura 10. Revisión del ensayo a los 14 días. a) Pupa normal de tratamiento control; Ejemplos: b y c) pupas deforme; d y e) el desarrollo es afectado, las prepupas no logran pasar al último estadio; f) larvas del 5ºestadio muertas.



Figura 11.a) individuo adulto deforme, abdomen muy amplio y alas alteradas; b y c) individuos muertos después de emerger, alas enchinadas y abdomen muy amplio; d y e) Machos normales; f) pupa deforme; g) pupa muerta; H) pupa normal, retraso en el ciclo de vida

7.3- Análisis cromatográfico

7.3.1- Extractos hexánicos

Los resultados acerca del análisis cromatográfico de los extractos hexánicos muestra la presencia de una riqueza y concentración de estos compuestos que se visualiza de forma cualitativa con la intensidad de color y la variación de estos, lo que indica diferentes tipos de terpenos (Figura 12 y 13).

Se observó una similitud en el perfil de los diferentes muestras, con un total de 11 compuestos detectados, y con una variación en el porcentaje relativo de dichos compuestos (Cuadro 8).

La muestra M1 contiene 10 compuestos de los 11 detectados, y uno de estos no se encontró en las demás. La muestra M1, presentó mortalidad del 100% en el ensayo biológico y es la única que presentó un compuesto diferente a las demás, que a pesar de que la concentración de éste es mínima, podría estar influyendo en el desarrollo del insecto; la muestra M2, también presentó mortalidad del 100% en el estadio pupal, pero no provocó deformaciones como las demás muestras evaluadas, por lo que se necesitaría de la identificación de los compuestos activos de los extractos para poder correlacionarlos con la actividad.

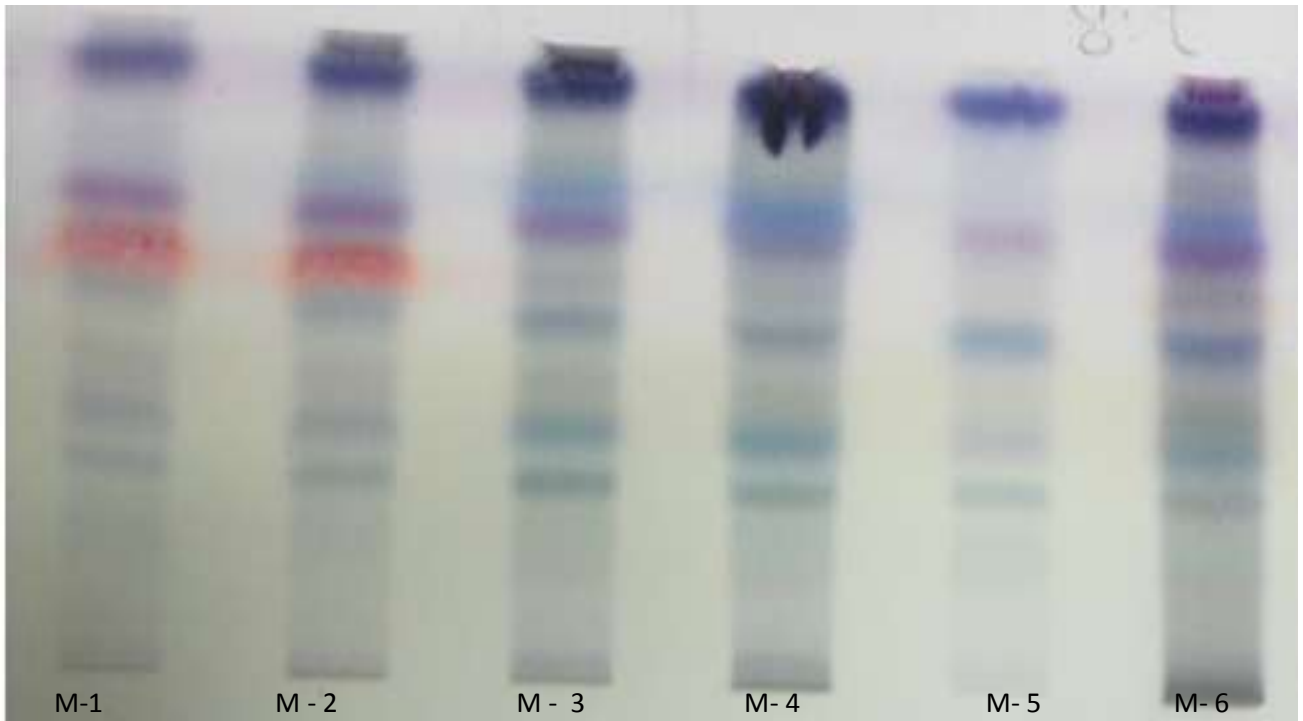


Figura 12 Placa cromatografica de los extractos hexánicos, revelada con anisaldheido.

Sistema de elución: Hexano: acetato de etilo 16:4

Revelador: Anisaldheido

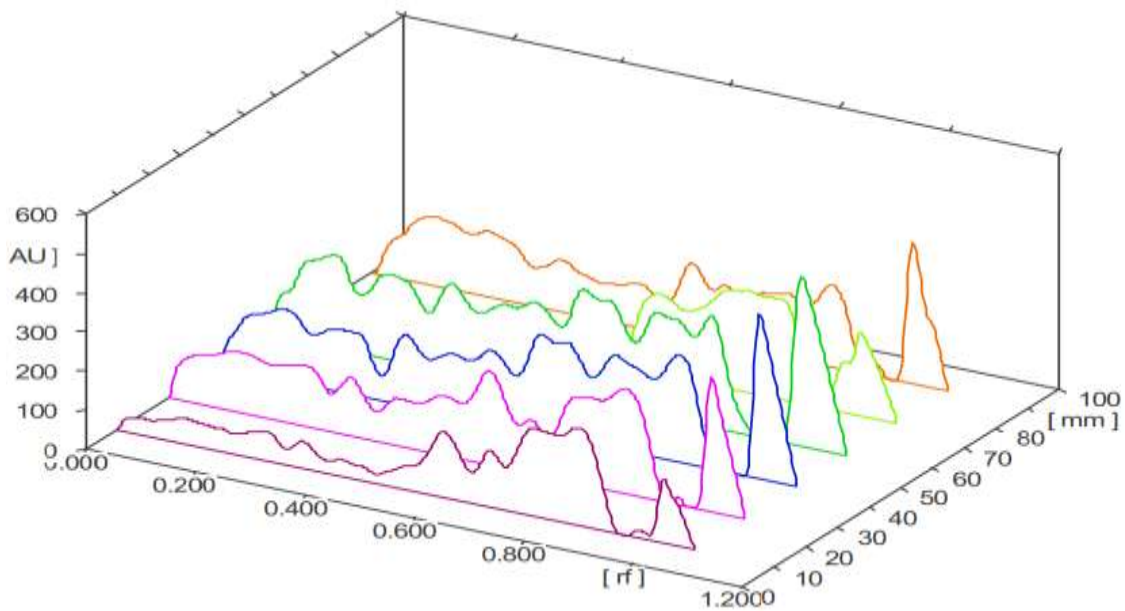


Figura 13 Cromatograma de extractos crudos de hexano, placa revelada con Anisaldheido y leída a 420nm.

Cuadro 8. RF de extractos hexánicos de los diferentes compuestos presentes en las diferentes muestras, leída a 420nm

RF	M-1		M-2		M-3		M-4		M-5		M-6	
	Rf	%	RF	%	RF	%	RF	%	RF	%	Rf	%
0.04	X	2.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.12	X	8.09	X	14.41	X	14.92	X	16.41	X	9.28	X	19.39
0.27	X	6.95	X	12.01	X	11.30	X	13.33	X	4.12	X	13.85
0.34	X	4.73	X	7.36	X	7.73	X	10.03	X	3.18	X	11.90
0.41	X	3.65	X	6.04	X	6.88	X	7.46	-	-	-	-
0.50	-	-	X	8.90	X	9.10	X	9.39	X	1.53	X	9.63
0.59	X	18.69	X	14.65	X	10.20	X	18.97	X	22.24	X	10.66
0.68	X	8.62	X	4.88	X	10.26	-	-	-	-	X	6.90
0.76	X	21.95	-	-	X	15.08	X	14.60	X	37.67	X	14.45
0.85	X	24.64	X	31.51	X	14.08	X	9.81	X	21.99	X	12.77
0.96	X	0.66	X	0.24	x	0.45	.	-	-	-	x	0.45

X= ausencia de compuesto.

7.3.2- Extractos Acetato de etilo

El perfil cromatográfico de los extractos de acetato de etilo (Figura 14), mostraron una riqueza en la presencia de terpenos, que por el tipo de coloración indica diferencias con los detectados en los extractos hexánicos, se apreció una diferencia en la concentración, observada en los porcentajes relativos obtenidos para cada uno de los extractos (Cuadro 9).

Las muestras M-2 a la M-6, tienen en común una serie de bandas de coloración naranja, que no son evidentes en la M-1, sin embargo la M-1 y M-2 comparten un perfil muy similar difiriendo únicamente en la intensidad, sin embargo podemos apreciar una gama de bandas de coloración en la parte superior de la placa de las diferentes muestras.

Esta presencia de compuestos de tipo terpénicos en los extractos de acetato de etilo sugiere la evaluación de dicho extractos en la alimentación del insecto, a fin de conocer y evaluar el efecto del extracto, y realizar una búsqueda de los compuestos responsables de la actividad presente en ambos extractos (Hexánicos y de acetato de etilo).

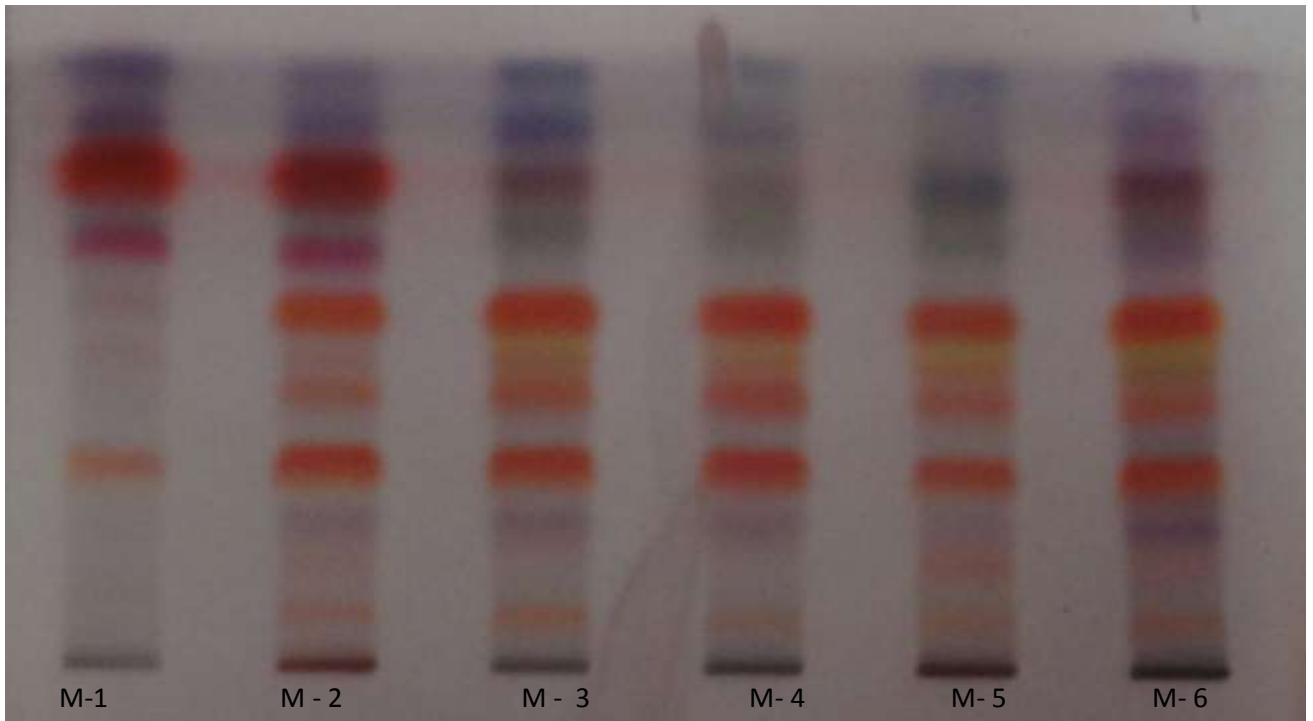


Figura 14 .Placa cromatografica de extractos de acetato de etilo, revelada con anisaldheido

Sistema de elución: Hexano: acetona: acetato de etilo 12:4:4

Revelador: Anisaldheido

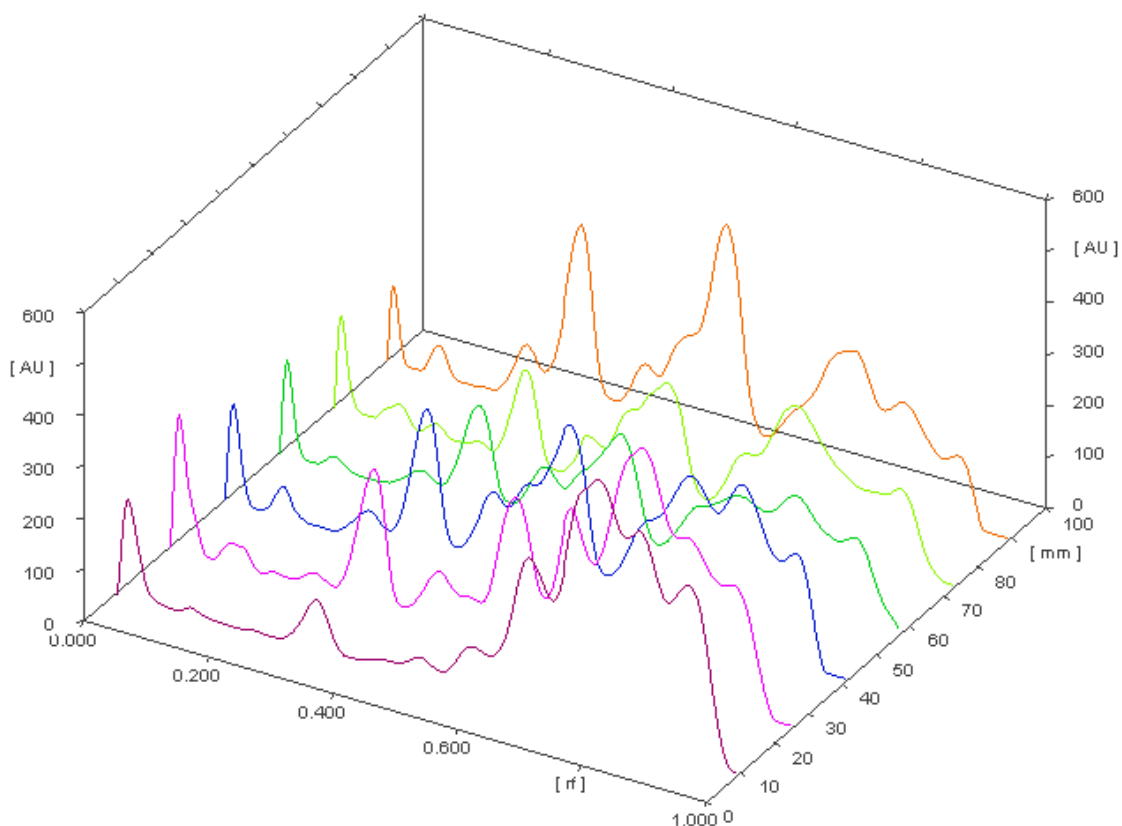


Figura 15 Cromatograma de extractos crudos de acetato de etilo, placa revelada con Anisaldheido y leída a 500 nm.

Cuadro 9. RF de extractos de acetato de etilo, de los diferentes compuestos presentes en las muestras, leída a 500nm

RF	M-1		M-2		M-3		M-4		M-5		M-6	
	Rf	%	RF	%	RF	%	RF	%	RF	%	Rf	%
0.01	X	3.94	X	4.52	X	1.86	-	-	-	-	-	-
0.10	X	0.29	X	1.25	X	1.37	X	0.73	X	1.71	X	1.25
0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.71	-	-
0.23	-	-	X	0.90	X	2.29	X	2.48	X	0.36	X	3.82
0.33	X	3.58	X	9.10	X	11.53	X	12.41	X	8.71	X	15.74
0.43	X	2.63	X	3.96	X	6.82	X	7.83	X	4.12	X	5.29
0.55	X	4.01	X	13.03	X	20.34	X	22.36	X	26.01	X	30.71
0.64	X	15.80	X	12.24	-	-	-	-	-	-	-	-
0.76	X	35.08	X	32.23	X	27.66	X	22.89	X	44.43	X	26.58
0.83	X	18.49	X	14.01	X	20.18	X	21.00	-	-	X	12.00
0.90	X	16.18	X	8.76	X	7.95	X	10.29	X	13.95	X	4.61

X= ausencia de compuesto

Los resultados del análisis de los extractos de acetato de etilo ponen de manifiesto la presencia de compuestos tales como los flavonoides, esto de acuerdo al tipo de coloración detectada una vez utilizado el revelador de productos naturales (Figura 16), se observan similitudes en el perfil cromatográfico, y diferencias en los porcentajes relativos para cada muestra (cuadro 10). Son muy parecidas las muestras M-1 y M-2 pero en cuanto a intensidad son diferentes a las cuatro muestras restantes. Las muestras M-3 y M-4 son muy similares, mientras que las muestras M-5 y M-6 difieren en intensidad de color. Destaca la presencia de un compuesto de coloración morado que se encuentra únicamente en la muestra M-1. En general el perfil cromatográfico es muy parecido en todas las muestras, difiriendo únicamente en la concentración, por lo que se esperaría que la variedad de flavonoides para estos extractos sea muy similar.

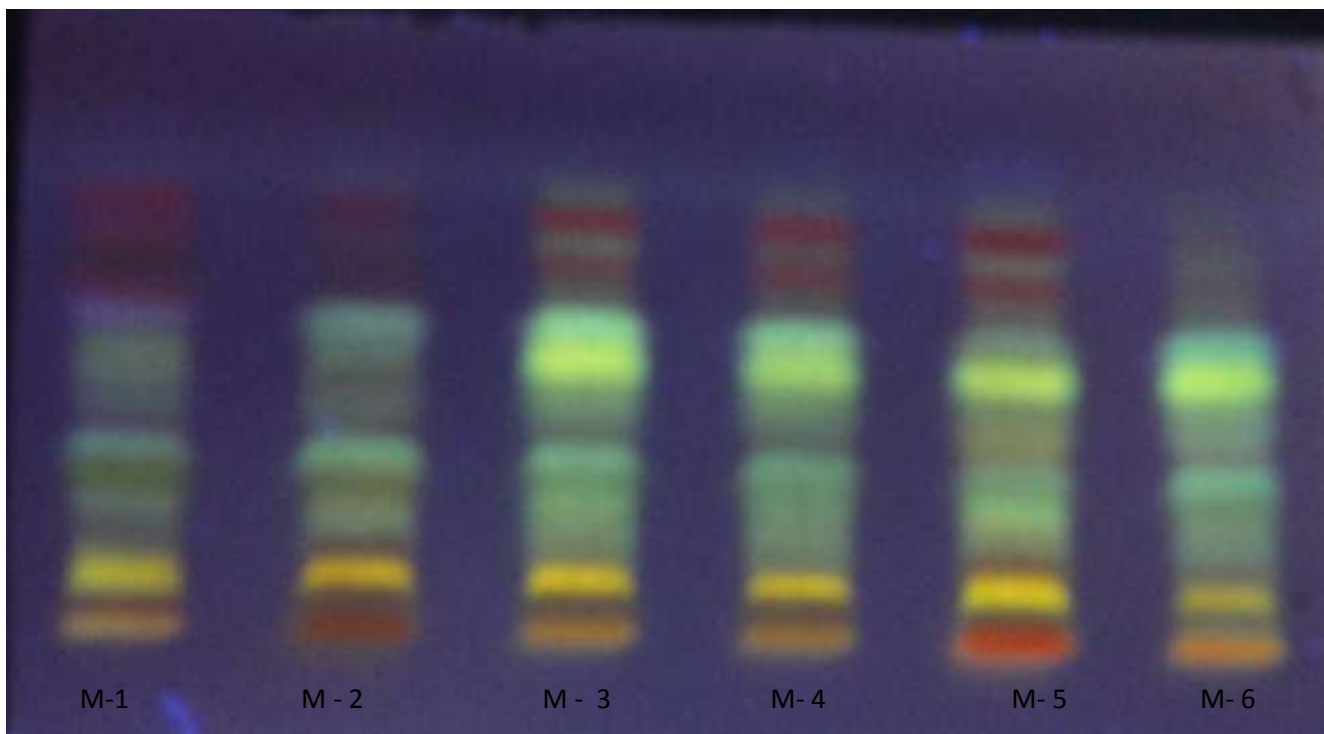


Figura 16 Placa cromatografica de extractos de acetato de etilo revelada con RPN y vista en longitud de onda larga

Sistema de elución: Hexano: acetona: acetato de etilo 12:4:4
Revelador: Revelador de productos naturales (flavonoides)

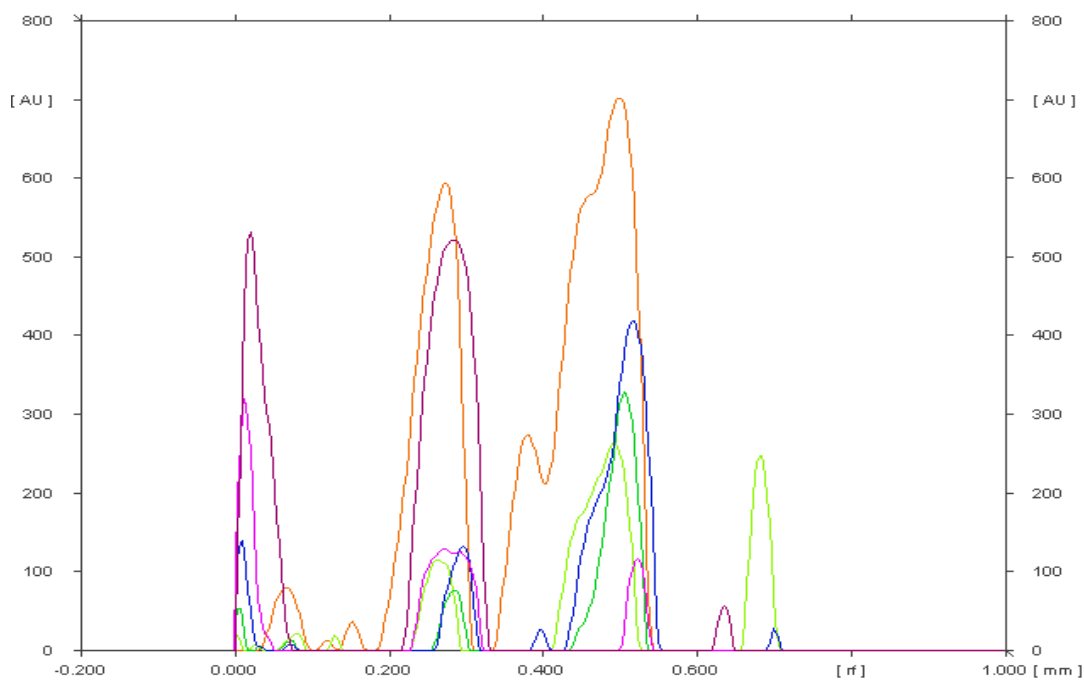


Figura 17. Cromatograma de extractos crudos de acetato de etilo, placa revelada con Revelador de Productos Naturales y leída a 380 nm.

Cuadro 10. RF de extractos de acetato de etilo, de los diferentes compuestos presentes en las muestras, leída a 380nm

RF	M-1		M-2		M-3		M-4		M-5		M-6	
	Rf	%	RF	%	RF	%	RF	%	RF	%	Rf	%
0.04	X	31.28	X	28.66	-	-	X	1.11	X	1.59	X	2.43
0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.72	X	0.17
0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.55
0.27	X	67.01	X	53.91	X	14.15	X	12.52	X	15.66	X	31.89
0.38	-	-	-	-	X	1.38	-	-	-	-	X	10.26
0.50	-	-	X	17.43	X	83.55	X	86.37	X	59.84	X	54.70
0.64	X	1.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.70	-	-	-	-	X	0.91	-	-	X	22.18	-	-

X= ausencia

7.3.3- Extractos metanólicos

El perfil cromatográfico de los extractos metanólicos, tratados con el revelador de productos naturales (Figuras 18 y 19), muestra una coloración relacionada con la presencia de flavonoides, que por el tipo de extracto presentan mayor polaridad (Cuadro 11). Se observa una mayor cantidad de bandas al ver la placa en longitud de onda larga, y una mayor gama de coloración. Se observan dos bandas de coloración café oscuro, que corresponde a las muestras M-5 y M-1, la muestra M-3 presenta poca intensidad en coloración, y las muestras M-4, M-5 y M-6 presentan mayor intensidad de color con respecto a las demás. En general, se observa una variación de compuestos de tipo flavonoide, para las diferentes muestras, la cual está influenciada, por la época y sitio de colecta.

Estos resultados son muy importantes a la hora de estudiar y determinar la presencia y variación de estos compuestos en función de las diferentes épocas o estaciones del año.

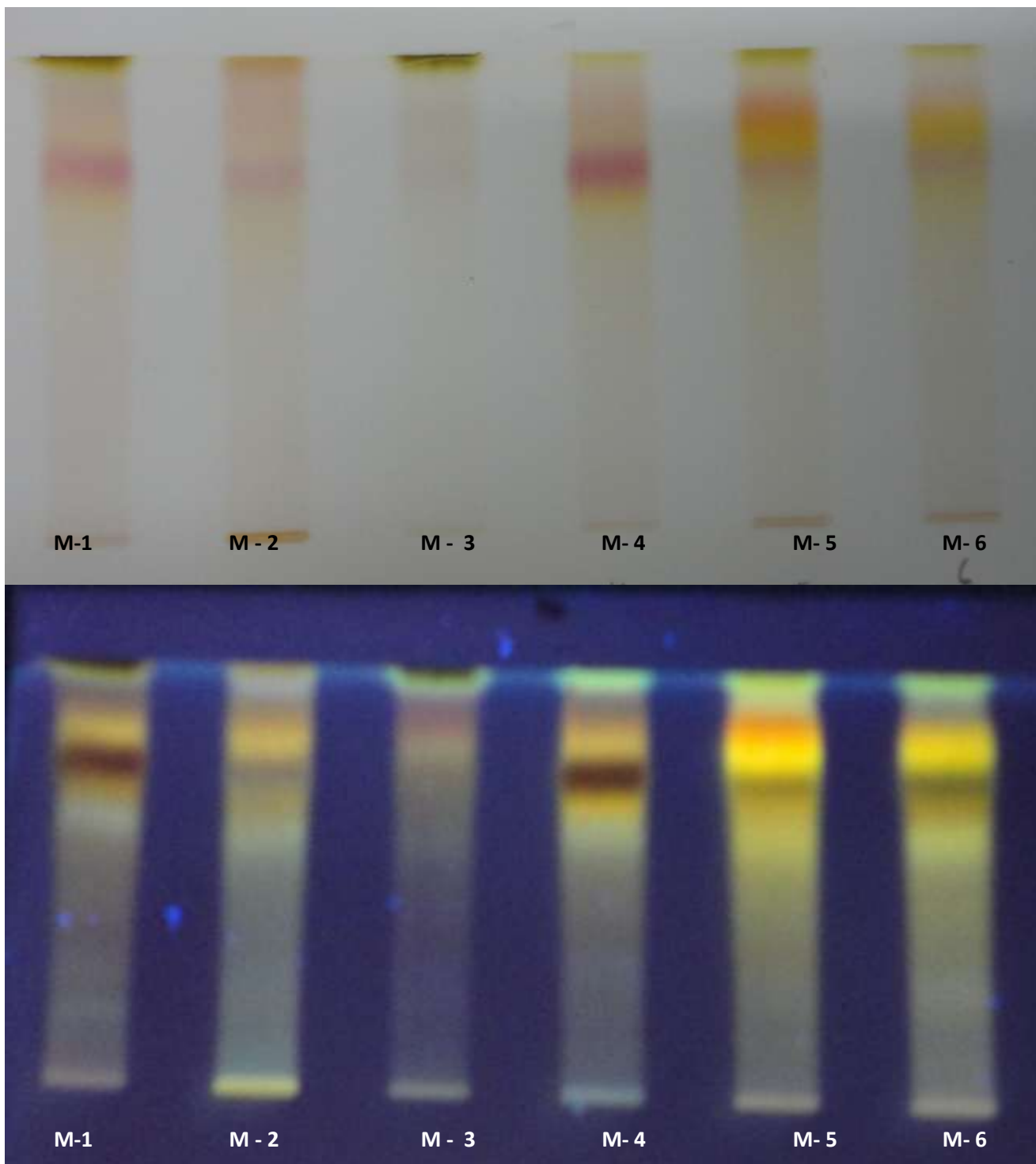


Figura 18. Extractos metanólicos, revelada con RPN (superior) y observada en longitud de onda larga (inferior).

Sistema de elución: Acetato de etilo: Propanol: Agua 36:18:1.8

Revelador: Revelador de productos naturales (flavonoides)

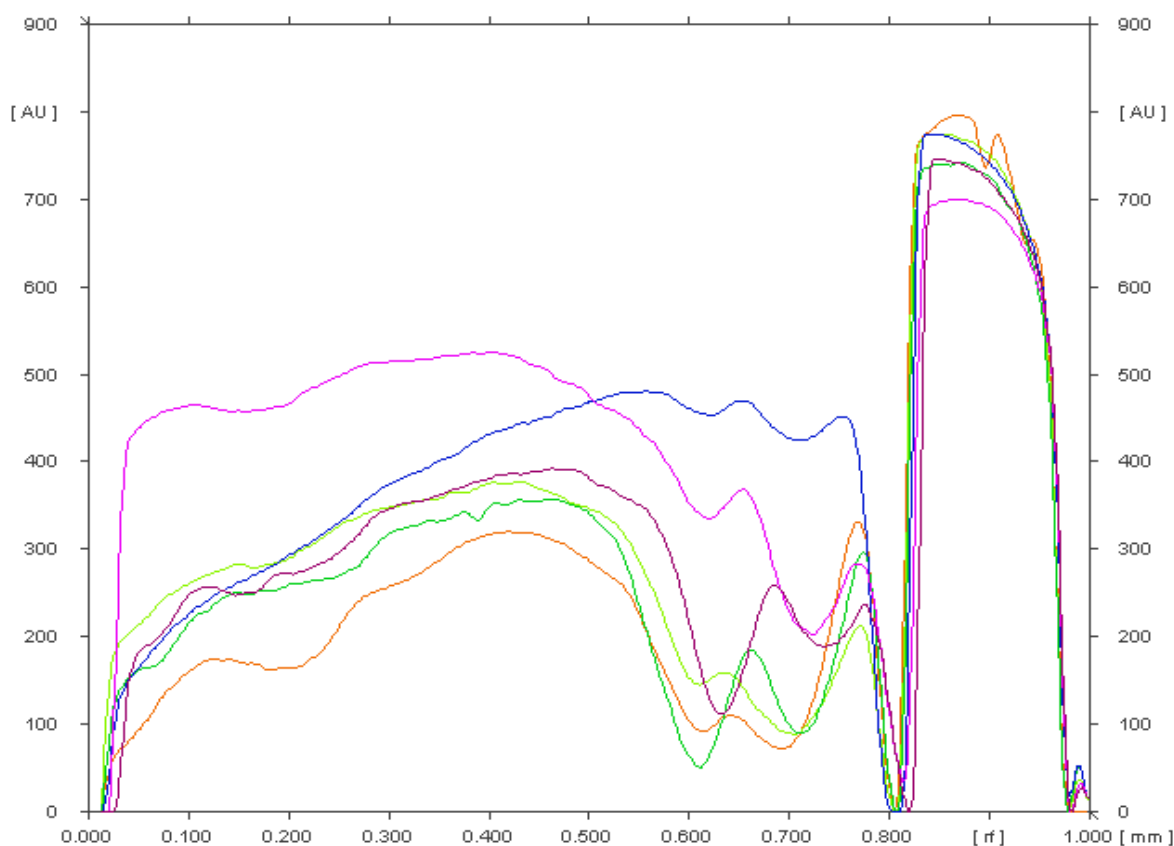


Figura 19. Cromatograma de extractos crudos metanólicos, placa revelada con Revelador de Productos Naturales y leída a 369 nm.

Cuadro 11. Muestra los RF de extractos metanólicos, de los diferentes compuestos presentes en las muestras, leída a 369nm

RF	M-1		M-2		M-3		M-4		M-5		M-6	
	Rf	%	RF	%	RF	%	RF	%	RF	%	Rf	%
0.06	X	31.28	X	28.66	-	-	X	1.11	X	1.59	X	2.43
0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.72	X	0.17
0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	0.55
0.27	X	67.01	X	53.91	X	14.15	X	12.52	X	15.66	X	31.8
0.38	-	-	-	-	X	1.36	-	-	-	-	X	10.2
0.50	-	-	X	17.43	X	83.55	X	86.37	X	59.84	X	54.7
0.64	X	1.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.70	-	-	-	-	X	0.91	-	-	X	22.18	-	-

X=ausencia

M-1 colecta en verano, Localidad Casas; M-2 colecte en invierno, Localidad Casa; M-3 colecta en verano, Localidad Hidalgo; M-4 colecta en invierno, Localidad Hidalgo; M-5 colecta en verano, Localidad Jaumave, M-6 colecta en invierno, Localidad Jaumave

8.- Conclusión

Las diferentes interacciones de las planta con su entorno juegan un papel importante para la síntesis de metabolitos secundarios. Las muestras colectadas de *Lippia graveolens*, que corresponden a la época de invierno, mostraron un mayor rendimiento, para la mayoría de los extractos.

Al incorporar a la dieta de *Spodoptera frugiperda*, los extractos hexánicos de hoja de *Lippia graveolens* se observó un efecto negativo en el ciclo de vida del insecto, afectando el ultimo estadio desarrollo, generando malformaciones en individuos adultos. Sin embargo se necesita de la identificación de los compuestos de los extractos y su evaluación en ensayos más detallados para determinar si es un solo compuesto el responsable o varios los involucrados en producir dicho efecto.

Los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios de *Lippia graveolens*, evidenciaron una variación en cuanto a concentración y número de compuestos presentes en los diferentes extractos, por lo que el sitio como la época del año juegan un papel importante en la síntesis de metabolitos secundarios, dada esta variación los extractos de acetato de etilo y metanol deben ser evaluados en ensayos posteriores para evaluar el efecto en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda*.

Lippia graveolens representa una alternativa en la búsqueda de compuestos con actividad biológica frente insectos, ya que los resultados de los extractos hexánicos son alentadores para seguir evaluando el resto de los extractos obtenidos de la planta.

9.- Anexo A

Reveladores

- **Revelador de anisaldheido.**

Detección de terpenoides, propilpropanoides, saponinas, glicósidos y esteroides.

Se prepara alcohol acidulado: 90% (v/v) metanol; 5% (v/v) ácido sulfúrico; 5% (v/v) ácido acético.

Se agregan 100µL de p-anisaldheido en 20 mL de alcohol acido. La placa se asperja y se calienta en la estufa por 5- 10 minutos

- **Revelador de productos naturales / Polietilenglicol (RPN/PEG).**

Detección de flavonoides

Solución A. 2-aminoetil difenilborato (2-APB, Sigma D9754) al 1% en metanol

Solución B. Polietilenglicol 4000 al 5% en metanol.

La placa se asperja primero con la solución A y posteriormente con la solución B. Se observa con luz UV₃₆₅

10.- Bibliografía

- Bahena, F. 2003. Manejo agroecológico de plagas para una agricultura sostenible. En: Agricultura, Ambiente y desarrollo sustentable. Editores: Tornero C.M., J, Olgún y A. Aragon.2003. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 149-182
- Barbosa, F., Lima, M., Braz, R., y E. Silveira. 2006. Irodooid and Phenylethanoid Glycosides from *Lippia alba*. *Biochemicals Systematics and Ecology*.34: 819-821.
- Botelho,M.,Nogueira,N.,Bastos,G.,Fonseca,S.,Lemos,T.,Matos,F.,Montenegro,D.,Heukelbach,J.,Rao,V. y G. Brito.2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*. 40: 349-356.
- Casmuz, A., Juarez,M.,Socias,M., Murua,M., Prieto,S., Medina,S., Willink,E. y G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Sociedad Entomológica de Argentina*. 69: 209-231.
- Cavalcanti, C., Rangel,T., Ramos,R., Willadino,L., Marcelino, C. y C. Ulisses.2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis*Schauer. *Brazilian archives of biology and technology*. 49(4) 527.535.
- Celis, C., Escobar,P., Isaza, J., Stashenko, E. y J. Martinez.2007.Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientiaet Technica*. 33: 103-105.
- Cole, M., 1994.Key antifungal, antibacterial and anti-insect Assays-a critical review .*Biochemical. Systematics and Ecology*. 22:837-856.
- Combrinck., Regnier,T. y G. Kamatou. 2011. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33: 344-349.

- Cueto, M., Rivas, C., Alanis, M., Oranday, A., Amaya, C., Nuñez, A., Samaniego, J. y P. cano. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Revista Mexicana de Micología. 31:29-35.
- Dayan, F., Cantrell, C., y S. Duke. 2009. Natural products in crop protection. Bioorganic y Medicinal Chemistry. 17: 4022-4034.
- Enciclopedia de los municipios de México. Secretaria de Gobernación. En:
http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_tamaulipas Consultado: 17-enero-2014
- Escobar, P., Milena, S. y L. Herrera. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 105(2):184-190.
- Fernandes, F., Douglas, H., Campos, A., Goncalo, S. y J. Martins. 2011. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. Acta Scientiarum. Biological sciences. 33(2) 141-144.
- Ferraz, R., Bomfin, D., Carvalho, N., Soares, M., Silva, T., Machado, W., Prata, A., Costa, E., Moraes, V., Nogueira, P. y D. Bezerra. 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). Phytomedicine. 20: 615-621.
- Figueiroa, E., Matos, R., Machado, L., Andrade, A., Fonseca, K. y J. Ferreira. 2012. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of candida species. Journal of Herbal Medicine. 2: 63-67.
- Funari, C., Eugster, P., Martel, S., Carrupt, P., Wolfender, J. y D. Silva. 2012. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry de replication satrategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. Journal of chromatography A. 1297: 167-178.

- García, E., Castro, F., Gutiérrez, A. y S. García. 2012. Revisión de la Producción Composición Fitoquímica y Propiedades Nutraceuticas del Oregano Mexicano. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 3(2):339-353.
- Guzmán, V. 2011. Investigación sobre el modo de acción de los productos naturales frente a insectos. Reporte de seminario de titulación, Licenciatura. UNAM.
- Haldar, S., Kar, B., Dolai, N., Suresh, R., Bahera, B. y P. Haldar. 2012. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. Asian Pacific Journal of tropical Disease. 667-670.
- Hernandez, T., Canales, M., Avila, J., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A. y R. Lira. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (México). Journal of Ethnopharmacology. 88: 181-188.
- Isman, M y Y. Akhtar. 2007. Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides. En: Ishaaya, I., Nauen, R y A. Horowitz. (Editores). Insecticides design using advanced technologies. Springer Verlag. Berlin. 235-248
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robinson, R. y J. Harnly. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. Journal of Food Composition y Analysis. 20: 361-369
- López, M., Stashenko, E. y J. Fuentes. 2011. Chemical composition and antegenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. Genetics and Molecular Biology. 34(3): 479-488
- Ludere, M., Ree, T. y R. Vleggaar. 2013. Isolation and relative stereochemistry of lippia lactona, a new antimalarial compound from *Lippia javanica*. Fitoterapia. 86:188-192.
- Machado, M., Dinis, A., Salguero, L., Cavaleiro, J., Custodio, J. y M. Souza. 2010. Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils. Effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*,

- Thymus zygis* subsp *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 106: 1205-1215.
- Maldonado, E., Padierna, G., Galicia, L., Torres, F. y M. Martínez. 2012. Flavonoides de *Lippia myriocephala*. *Revista latinoamericana de química.* 39: 326.
- Melendez, N., Rodríguez, R., Gonzalez, A., Silva, R. y R. Nevárez. 2009. El orégano mexicano. *Cincia cierta.* 20: 1-4.
- Méndez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales, D., Castillo, Hernández. y C. Aguilar. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and products.* 37: 445-450.
- Mereggiani, G. 2001. Manejo De Insectos Plaga Mediante Sustancias Semioquímicas De Origen Vegetal. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica).* 60: 22-30.
- Mesa, A., Montiel, J., Zapata, B., Duran, C., Betancur, L. y E. Stashenco. 2009. Citral and carvona chemotypes from the essential oils of Colombian *lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 104(6): 878-884.
- Mihn, J. 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva de infestación de insectos en la selección de plantas hospederas para resistencias al gusano cogollero de la mazorca o elotero *Heliothis zea*. Centro internacional para el mejoramiento del maíz y trigo. México. Folleto técnico Pp17
- Mosquera, O., y L. Henao. 2009. Evaluación de la actividad insecticida in vitro de extractos vegetales contra la broca del café. *Recursos naturales y ambiente.* 58: 45-50.
- Ocazonez, R., Meneses, R., Torres, F. y E. Stshenko. 2010. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 105(3): 304-309.

- Ortega, M., Robles, M., Acedo, E., Gonzalez, A., Morales, A. y L. Vazquez. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Rev Fitotec. Mex.* 34(1): 11-17.
- Pavela, R. 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76: 691-696
- Reguera, J. 2008. Estudio fitoquímicos y de actividad biológica de *Omphalea oleifera* (Hemsl) (Euphorbiaceae) frente a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Ríos, R. 2010. Comparación de los perfiles de flavonoides de orégano (*Lippia graveolens* HBK. s.l.) de varias poblaciones del Estado de Durango. IPN. Tesis de maestría. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional.
- Rodríguez, C. 2003. Cuantificación de la inhibición de crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. En: Agricultura, Ambiente y Desarrollo sustentable. Tornero, C., Lopez, J. y A. Aragon. (Eds). 2003. Publicación especial de la Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, México: 223-242.
- Rodríguez, D., Rodríguez, R., Hernández, F., Aguilar, C., Saenz, A., Villareal, J. y L. Moreno. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahua Desert plants against postharvest fruit fungi. 2011. *Industrial Crop and Products*. 34: 960-966.
- Rodríguez, L., B. Esquivel y J. Cárdenas. 1994. Clerodane Diterpenoids in Labiatae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 63: 107-196
- Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J. y E. Stashenko. 2007. Estudio comparativo por GC-MS de Metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*. Universidad tecnológica de Pereira. Colombia. 13(33): 325-328.
- Saldarriaga, L., Sánchez, G., Bonilla, C., Sánchez, M. y G. Torres. 2010. Evaluación agroindustrial de los aceites esenciales de *Artemisia dracunculoides* L, *Franseria*

- artemisioides* Willd, *Salvia officinales* L, *Lippia dulcis* Frev, y *Occimum americanum* L, en condiciones del valle de Cauca. Acta agronómica. 59 (3): 293-302.
- Sánchez, O., Medellín,R., Aldama, A.,Gottsch,B.,Soberon,J., y M. Tambutti. 2007. Método De Evaluación Del Riesgo De Extinción De Las Especies Silvestres En México (MER). 1edición, Mexico, pp 170.
- Sepulveda, G., Porta, H. y M. Rocha. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana De Fitopatología. 355-363.
- Singh, P. 1977.Artificial diets for insects, mites, and spiders. Plenum publishing co. New York. Pp. 594.
- Vicuña, C., Stashenko,E. y J. Fuentes.2010. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage.Fitoterapia. 81:343-349.
- Villavicencio, A., Pérez, B. y A. Gordillo. 2011. Plaguicidas vegetales de Hidalgo, México. Universidad autónoma del estado de Hidalgo, México. 183p.
- Yang, Y., Lee,S., Clark, J. y Y,Ahn. 2009. Ovicidal and adulticidal activities of *Origanum majorana* essential oil constituents against insecticide-susceptible and pyrethroid/malation-resistant *Pediculus humanuscapitis* (Anoplura: Pediculidae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(6):2282-2287
- Zhang, N., Chaudhuri, S. y I. Kubo.1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. Journal of Chemical Ecology 19: 1109-1118.
- Zoubiri, S., y A. Baaliouamer.2011. Chemical Composition and Insecticidal Properties of Some Aromatic Herbs Essential Oils From Algeria. Food Chemistry. 129: 179-182.