

T  
1209

124764

 XOXIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**UTILIZACIÓN DE LA RICININA COMO INSECTICIDA  
BIORRACIONAL CONTRA LARVAS DE *Spodoptera  
frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ

COMITÉ TUTORIAL

Directores:

DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ

DR. CESÁREO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Asesor:

DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE DE 2010

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT, con número de convenio: PFP-20-93.

El alumno Miguel Angel Ramos López del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de enero de 2007 a diciembre de 2009 con número de registro 86826.

Para la culminación de este trabajo también se recibieron becas del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), de sus programas "Becas de Continuidad para Estudios de Posgrado 2010" y "Becas Tesis de Posgrado 2010".

El jurado asignado por la comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis:

**UTILIZACIÓN DE LA RICININA COMO INSECTICIDA BIORRACIONAL CONTRA LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).**

Que presentó

Miguel Angel Ramos López.

El día 20 de septiembre de 2010

Sinodales:

Presidenta: DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ



Secretario: DR. CESÁREO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ



Vocal: DR. MIGUEL ANGEL ZAVALA SÁNCHEZ



Vocal: DR. DANIEL MOTA ROJAS



Vocal: DR. ANTONIO FLORES MACÍAS



---

## COMITÉ TUTORIAL:

### DIRECTORES DE TESIS

#### DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

#### DR. CESÁREO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Profesor Investigador Titular, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

### ASESOR

#### DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Profesor de Carrera Titular "A", Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

El trabajo de investigación se desarrolló en las siguientes instituciones:

1. Laboratorio de Investigación de Química Orgánica. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X).
2. Laboratorio de Entomología. Centro Internacional del Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT), Unidad "El Batán".
3. Laboratorio de Insecticidas Vegetales. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo.

## AGRADECIMIENTOS.

A mis Directores:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez, y Dr. Cesáreo Rodríguez Hernández por todas sus observaciones y sugerencias importantes en el desarrollo de la presente tesis.

A los Doctores: Dr. Antonio Flores Macías, Dr. Silverio García Lara, Dra. Patricia Guevara Fefer, Dr. Daniel Mota Rojas, y Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez por sus comentarios y contribuciones en este trabajo.

Muy especialmente a La Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biológicas por todo su apoyo.

Al Lic. Ernesto Olivares, por su amistad pero sobre todo por su disponibilidad en auxiliarme durante todo el proceso que hoy culmina.

Al Dr. Kevin Pixley, Dr. Petr Kosina, Dr. Roberto Javier Peña y Dr. George Mahuku por su apoyo en las estancias realizadas en el CIMMYT para esta investigación.

A los compañeros del CIMMYT con quienes compartí momentos inmejorables durante mi estancia allá (Carlos, Agustín, Nazario, Josafat) y muy especialmente al Sr. Emiliano Gutiérrez González por su disposición para la enseñanza en la crianza de *Spodoptera frugiperda*, pero sobre todo por su amistad.

## DEDICATORIAS.

A mi hijo Emiliano por ser mi impulso en esta pendiente.

A Blanca que agradezco su apoyo, compañía, comprensión y sobre todo por su amor, gracias chaparrita.

A Paz por enseñarme a ser quien soy y porque siempre has sido mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos Edgar, Jacobo, Jacqueline y Mario, por seguir luchando por esta amistad a pesar de la distancia y del tiempo.

A mis compadres Chucho y Estelita, gracias.



## INDICE.

	Pág
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Sustancias vegetales insecticidas e insectistáticas.....	3
2.2 Composición química de <i>R. communis</i> .....	5
2.3 Actividad de <i>R. communis</i> contra insectos.....	6
2.4 Importancia económica de <i>S. frugiperda</i> .....	9
3 JUSTIFICACIÓN.....	11
4 OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos específicos.....	12
5 HIPÓTESIS.....	13
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Colecta del material vegetal.....	14
6.2 Cría de <i>S. frugiperda</i> .....	14
6.3 Preparación de extractos.....	17
6.4 Identificación de ácidos grasos en el EHH de <i>R. communis</i> .....	18
6.5 Separación y aislamiento de ricinina (Kang <i>et al.</i> , 1985).....	19
6.6 Aceite de ricino, ácidos linoléico y palmítico.....	20
6.7 Bioensayo.....	20
6.8 Curva de calibración de ricinina en el EMH de <i>R. communis</i> por HPLC.....	22
6.9 Toxicidad aguda oral.....	23
6.10 Análisis estadísticos.....	24
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
7.1 Efectividad de extractos.....	25
7.2 Efectividad del aceite de ricino.....	32
7.3 Componentes del EHH de <i>R. communis</i> y efectividad de los ácidos linoléico y palmítico.....	34
7.4 Contenido de ricinina en hoja y bagazo de semilla de <i>R. communis</i> , su	

efectividad en <i>S. frugiperda</i> .....	38
7.5 Toxicidad oral en ratones del EMH.....	46
8 CONCLUSIONES.....	48
9 LITERATURA CITADA.....	49
10 APÉNDICE 1.....	62
10.1.1. Efecto preliminar de ocho extractos de <i>R. communis</i> contra <i>S. frugiperda</i> .....	62
10.1.2. Efecto preliminar del aceite de ricino contra <i>S. frugiperda</i> .....	66
10.1.3. Efecto preliminar de los ácidos linoléico y palmítico contra <i>S. frugiperda</i> .....	67
10.1.4. Efecto preliminar de ricina contra <i>S. frugiperda</i> .....	68
10 APÉNDICE 2.....	69
10.2.1. Artículo publicado.....	69

## INDICE DE CUADROS.

Cuadro	Pág.
1. Composición del aceite de ricino (Merck Index, 1981).....	6
2. Ingredientes y cantidades empleadas para preparar 1 Kg de dieta artificial, para la cría de <i>S. frugiperda</i> (Bergvinson y Kumar, 1997).....	15
3. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EAH y EAS de <i>R. communis</i> incorporados a la dieta artificial.....	26
4. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EMH y EMS de <i>R. communis</i> incorporados a la dieta artificial.....	27
5. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EAEH y EAES de <i>R. communis</i> incorporados a la dieta artificial.....	28
6. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EHH y EHS de <i>R. communis</i> incorporados a la dieta artificial.....	29
7. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con aceite de ricino incorporado a la dieta artificial.....	33
8. Componentes del EHH de <i>R. communis</i> .....	35
9. Duración y viabilidad larval y pupal y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con los ácidos linoléico y palmítico incorporados a la dieta artificial.....	36
10. Area bajo la curva de cuatro concentraciones de ricinina comercial y del EMH.....	39
11. Duración y viabilidad larval y pupal y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con ricinina incorporada a la dieta artificial.....	45
12. Mortalidad y DL <sub>50</sub> para ratón macho y hembra con el EMH de <i>R. communis</i> .....	46
13. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EAH y EAS de <i>R. communis</i> .....	62
14. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EMH y EMS de <i>R. communis</i> .....	63
15. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y	

peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EAEH y EAES de <i>R. communis</i> .....	64
16. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> con EHH y EHS de <i>R. communis</i> .....	65
17. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con aceite de ricino.....	66
18. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con los ácidos linoléico y palmítico.....	67
19. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con ricinina.....	68

## INDICE DE FIGURAS.

Figura	Pág.
1. Hoja (a) y semilla (b) de <i>R. communis</i> .....	14
2. Jaula para emergencia de adultos de <i>S. frugiperda</i> .....	16
3. IR de los cristales obtenidos de hojas de <i>R. communis</i> .....	40
4. <sup>13</sup> CRMN de los cristales obtenidos de hojas de <i>R. communis</i> .....	41
5. <sup>1</sup> HRMN de los cristales obtenidos de hojas de <i>R. communis</i> .....	42
6. <sup>1</sup> HRMN de ricinina aislada por Skursky y colaboradores (1969).....	43
7. Cromatogramas de los cristales aislados del bagazo de semilla de <i>R. communis</i> (a) y de ricinina comercial (b).....	44

## RESUMEN.

El abuso en el uso de insecticidas químicos sintéticos para el control del gusano cogollero del maíz ocasiona contaminación y resistencia a estos productos por lo que se deben implementar medidas biorracionales. El empleo de sustancias de origen vegetal provenientes del metabolismo secundario de las plantas es una alternativa efectiva y biodegradable. En este trabajo se evaluó la actividad de extractos con diferente polaridad: acuoso, metanólico, acetato de etilo, y hexánico de hojas y semillas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), así como de aceite de ricino, ácidos linoléico y palmítico, y ricinina en el desarrollo larval y pupal que presentan contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a diferentes concentraciones. Por otro lado el EHH se analizó por cromatografía de gases (CG) acoplado a espectrómetro de masas (EM), encontrando que los componentes mayoritarios fueron el ácido linoléico (47.79%), ácido linolénico (15.28%) y ácido palmítico (13.01%). También se aisló, e identificó por punto de fusión, cromatografía de líquidos (HPLC), IR, <sup>13</sup>CRMN, y <sup>1</sup>HRMN, el alcaloide ricinina de hojas y semillas de *R. communis*, y se determinó la mortalidad media (DL<sub>50</sub>) del EMH en ratones machos y hembras cepa CD1. Los extractos acuosos de hojas (EAH) y semillas (EAS), metanólicos de hojas (EMH), y semillas (EMS), acetato de etilo de hojas (EAEH), y semillas (EAES), y hexánicos de hojas (EHH), y semillas (EHS), de *R. communis*, incorporados a la dieta artificial contra *S. frugiperda*. La principal actividad fue la insectistática, y el gradiente de efectividad insecticida fue EMS, EAES, EMH, EAEH, EHS, EAH, EAS y EHH. El metanol extrajo mejor las

sustancias insectistáticas e insecticidas, seguido del acetato de etilo, agua y hexano, y las semillas fueron mejores que las hojas, de acuerdo a la actividad insecticida observada a partir de la Viabilidad Larval media ( $VL_{50}$ ), el mejor extracto fue el EMS con 750 ppm. El aceite de ricino presentó de igual forma actividad los dos tipos de actividad con  $VL_{50}$  de 2,690 ppm, los ácidos linoléico y palmítico valores para la  $VL_{50}$  de 860 y 780 ppm y para la ricinina fue de 380 ppm. La  $DL_{50}$  promedio en ratones hembra y macho fue de 1,311.75 mg  $Kg^{-1}$ . Este es el primer trabajo que aclara la actividad e identifica algunos principios activos de de la higuierilla contra el gusano cogollero del maíz.

## ABSTRACT.

The excessive use of synthetic chemical insecticides to fall armyworm control causes pollution and that insect acquires resistance to these products, therefore be implement biorational approaches. The use of substances of plant origin from the secondary metabolism of plants is an effective and biodegradable alternative. In this work it was evaluated the activity of the aqueous, methanolic, ethyl acetate, and hexane extracts from leaves and seeds of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), and castor oil, linoleic and palmitic acids, and ricinine in the larval and pupal development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), to different concentrations. Moreover the EHH was analyzed by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrum (EM), showed the composition and the mayors components, these were linoleic acid (47.79%), linoleic acid (15.28%) and palmitic acid (13.01%). Was also isolated and identified by melting point, liquid chromatography (HPLC), IR, <sup>13</sup>CRMN, y <sup>1</sup>HRMN, the ricinine alkaloid from leaves and seeds of *R. communis*, also it was determined the DL<sub>50</sub> in females and males mice strain CD1. The aqueous extracts from leaves (EAH) and seeds (EAS), methanolic from leaves (EMH) and seeds (EMS), ethyl acetate from leaves (EAEH) and seeds (EAES), and hexanic from leaves (EHH) and seeds (EHS) from *R. communis*, incorporated into artificial diet against against *S. frugiperda*. The principal activity showed was insectistatic, and the effective insecticide gradient were EMS, EAES, EMH, EAEH, EHS, EAH, EAS and EHH. The methanol extracted substances better than ethyl acetate; aqueous, and hexane, and the seeds were better than leaves, according with the insecticide activity



showed from Lethal Viability fifty (VL<sub>50</sub>), the best extract was EMS with 750 ppm. The castor oil showed both activities with VL<sub>50</sub> of 2,690 ppm, the linoleic y palmitic acids VL<sub>50</sub> were 860 y 780 ppm and to ricinine was 380 ppm. The average of DL50 in female and male mice was 1,311.75 mg Kg<sup>-1</sup>. This is the first work clarifying the activity and identifies some active compounds from castor bean against fall armyworm.

# 1 INTRODUCCIÓN.

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)<sup>1</sup>, es una plaga que ataca el meristemo de crecimiento del maíz, que afecta también a otras plantas cultivadas y silvestres, lo cual dificulta su control. El método más utilizado en el combate de esta plaga es mediante insecticidas químicos sintéticos, sin obtener los beneficios deseados, ya que presenta resistencia a varios insecticidas, además el uso de estos productos perjudica más de lo que ayuda, porque contaminan los mantos acuíferos, el suelo, el aire, matan organismos que no son el objetivo como insectos benéficos, polinizadores, parasitoides y depredadores, afectan aves, peces, mamíferos y al ser humano de diversas formas.

Otra forma de combate de *S. frugiperda* que se ha estado implementado en la última década es el uso de metabolitos secundarios de las plantas, a través de extractos, aceites y polvos, constituyendo una alternativa más segura para los animales, el ambiente, y el humano.

La higuierilla *Ricinus communis* (Euphorbiaceae)<sup>2</sup>, presente en las regiones templadas y tropicales (Cuadra, 1981; Martínez, 1987), ha destacado por su actividad contra insectos que son plagas.

---

<sup>1</sup> Los nombres científicos y la ubicación taxonómica de los insectos presentados en este escrito se tomaron de Bugguide (2010).

<sup>2</sup> Los nombres científicos y la ubicación taxonómica de las plantas que se mencionan en este trabajo fueron tomadas de Tropicos (2010).

Los extractos acuosos (Upanasi *et al.*, 2003; Aouinty *et al.*, 2006; Tinzaara *et al.*, 2006) y metanólicos (Upanasi *et al.*, 2003) de las hojas han reportado actividad insecticida; los extractos acuosos y acetónicos de hojas actúan como repelentes e insecticidas (Caffarini *et al.*, 2008), los polvos de hojas actúan como insectistáticos en granos almacenados (Araya-González *et al.*, 1996); y el aceite también actúa como insecticida (Salas y Hernández, 1985; Pacheco *et al.*, 1995). Las partes aéreas de presentan actividad insectistática e insecticida contra *S. frugiperda* (López-Olguín *et al.*, 1994; Rodríguez-Hernández, 2005).

En esta investigación se evaluaron los extractos acuosos de hojas (EAH) y semillas (EAS), metanólicos de hojas (EMH), y semillas (EMS), acetato de etilo de hojas (EAEH), y semillas (EAES), y hexánicos de hojas (EHH), y semillas (EHS), de *R. communis*, aceite de ricino, ácidos linoléico y palmítico y ricinina en el desarrollo de larva y pupa de *S. frugiperda*; también se realizó una propuesta metodológica para determinar la cantidad de ricinina en el EMH de *R. communis*, y se estimó la DL<sub>50</sub> vía oral en ratones machos y hembras.

## 2 MARCO TEÓRICO.

Antes del descubrimiento de los insecticidas sintéticos, se usaron los extractos botánicos en el manejo de plagas de insectos (Isman, 1997). En el periodo actual se siguen considerando como fuente importante de compuestos, debido a que al ser aplicados a los cultivos contra plagas de insectos no afectan al ambiente, a los cuales se les denomina aleloquímicos (Mareggiani, 2001).

Las sustancias químicas vegetales tienen actividad insectistática y/o insecticida (Rodríguez-Hernández y Vendramim, 1996), y tienen menor probabilidad de generar resistencia ya que ejercen menor presión selectiva y múltiples en éstos (Saxena, 1986).

### 2.1 Sustancias vegetales insectistáticas e insecticidas.

Las sustancias vegetales insecticidas más conocidas son: anabasina aislada de anabis *Anabasis aphylla* (Amaranthaceae) (Ware y Whitaker, 2004), azadiractina separada del nim *Azadirachta indica* (Meliaceae) (Koul *et al.*, 1990), la juvabiona obtenida del abeto de Sajalín *Abies sachalinensis* (Pinaceae), nicotina extraída del tabaco *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), piretrina obtenida del piretro *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae), rianodina extraída del riania *Ryania speciosa*, (Salicaceae), rotenonas separadas de roten *Derris elliptica* (Fabaceae) y del barbasco *Lonchocarpus utilis* (Fabaceae), y veratrina aislada de la sabadilla *Schoenocaulon officinale* (Melanthiaceae) (Ware y Whitaker, 2004).

Algunas sustancias pueden presentar actividad Insectistática que es aquella sustancia que no es tóxica rápidamente, y es capaz de interferir negativamente sobre la alimentación, crecimiento y refugio de una especie de insecto determinada y que puede servir para su manejo en caso de ser plaga (Levinson y Levinson, 1973; Serratos, 1993; Gottlieb *et al.*, 2002). En la búsqueda de fuentes alternas, que sean efectivas para el control de insectos plaga, se trata de no eliminar a los insectos de forma fulminante, prefiriendo repeler, inhibir el crecimiento, la alimentación y la oviposición, entre otros efectos por lo que se buscan sustancias insectistáticas en lugar de insecticidas (Rodríguez- Hernández y Vendramim, 1998), algunos compuestos con actividad antialimentaria son 1,14-diacetilcardiopetalina, 18-hidroxi-14-O-metilgadesina, caracolina, cardiopetalina, 18-O-demetilpubescenina, 14-O-acetildeltatsina, tacaosamina, ajadina y 8-O-metilcolumbianina, contra adultos de *L. decemlineata* y larvas de la rosquilla negra *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (González-Coloma *et al.*, 2004).

Otras sustancias actúan de forma fulminante contra los insectos actividad denominada como insecticida, de acuerdo al DLE (2001), dice que es un producto que sirve para matar insectos. Algunos compuestos con este tipo de actividad son los alcaloides erisovina y  $\beta$ -eritroidina contra larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (García-Mateos *et al.*, 2004); los alcaloides acotina; cardiopetalina; 14-deacetilpubescenina; 18-O-benzoil-18-O-demetil-14-O-deacetilpubescenina; 14-O-acetildelcosina; 14-deacetilajadina y metillicaconitina,

actúan contra adultos del escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Ruiz-Mesia *et al.*, 2005).

En general la mayor parte de las sustancias vegetales presentan los dos tipos de actividad, siendo la azadiractina el ejemplo más conocido (Mareggiani, 2001, Rodríguez-Hernández, 2001).

## 2.2 Composición química de *R. communis*.

Las hojas de *R. communis* contienen el alcaloide ricinina (Essery *et al.*, 1963; Olaifa *et al.*, 1991; Bigi *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005), la N-demetilricinina (Waller y Henderson, 1961; Skursky *et al.*, 1969; Waller y Skursky, 1972; Kang *et al.*, 1985); así como el canferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, canferol-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosido, canferol-3-O- $\beta$ -D-rutinósido, quercetina-3-O- $\beta$ -D-rutinósido, quercetina-3-O- $\beta$ -D-xilopiranosido y quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y (Kang *et al.*, 1985); los ácidos decanóico, docosanóico, esteárico, eicosanóico, heptadecanóico, mirístico, palmítico, pentadecanóico, tetracosanóico y tricosanóico (Bigi *et al.*, 2004).

Las semillas contienen alrededor del 50% de aceite de ricino (Achaya *et al.*, 1964; Pascual, 1995; Kim, 2001), el cual contiene cinco ácidos grasos, de los cuales el mayoritario es el ácido ricinoléico (87%) (Cuadro 1) (Achaya *et al.*, 1964; Atsmon, 1989; Bafor *et al.*, 1991; Harborne y Baxter, 1995; Broun y Somerville, 1997; Smith *et al.*, 2003), que se encuentra únicamente en las semillas (Atsmon, 1989); también contienen una proteína toxica, la lectina ricina (Mise *et al.*, 1977; Hsuan y Koh, 1978; Darby *et al.*, 2001; Kim, 2001; Yuldashev, 2001), la fracción proteica CB1A que es un

compuesto alérgeno (Kim, 1995), y la ricinina (Waller y Henderson, 1961; Waller y Skursky, 1972; Reyes, 1991; Kim, 2001; Yuldashev, 2001).

Cuadro 1. Composición del aceite de ricino (Merck Index, 1981).

Ácido	Porcentaje
Ricínoléico	87
Oléico	7
Linoléico	3
Palmítico	2
Esteárico	1

### 2.3 Actividad de *R. communis* contra insectos.

Se ha demostrado que *R. communis* tiene actividad biológica contra algunos insectos, por ejemplo en plantaciones de tabaco se ha usado como planta trampa para reducir el daño ocasionado por la mosquita blanca del tabaco *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y del gusano gris del tabaco *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Dhawan *et al.*, 2008).

La ricinina, principal alcaloide de *R. communis*, ha sido reportada con actividad insecticida. En un experimento se indujo a que adultos de pulgón verde *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) se alimentaran con hojas de frijol y de *R. communis*, sobreviviendo el 100% de los individuos alimentados con frijol después de 24 h<sup>3</sup>, mientras que los adultos alimentados con *R. communis* murieron antes de 60

<sup>3</sup> Los símbolos del sistema general de unidades de medida presentados en este escrito se tomaron de la SCFI (1993).

min, a todos los organismos se les maceró con metanol y las muestras se analizaron por HPLC, en los organismos alimentados con *R. communis* se encontró ricinina, mientras que en los otros no, con este resultado, se infirió que la ricinina era la causante de la mortalidad de *M. persicae* (Olaifa *et al.*, 1991). También el polvo de las hojas al 15% provoca 100% de mortalidad contra la polilla India de la harina *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Phycitinae) (Collavino *et al.*, 2005); el extracto acuoso de semillas al 10% presenta actividad insecticida contra la mosquita blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), con efectividad similar al del control químico convencional (Bifentrina) (Herrera, 1997). Por otro lado se determinaron las Concentraciones Letales medias (CL<sub>50</sub>) del extracto acuoso de hojas para 2° y 4° instares cuator especies de mosquitos, las cuales fueron de 220 ±45 y 340 ±36 mg L<sup>-1</sup> para *Aedes caspius* (Diptera: Culicidae), 180 ±33 y 210 ±36 mg L<sup>-1</sup> para *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae), 190 ±45 y 530 ±31 mg L<sup>-1</sup> para *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) y 110 ±31 y 230 ±47 mg L<sup>-1</sup> para *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) (Aouinty *et al.*, 2006).

En el caso de *S. frugiperda* López-Olguín y colaboradores (1994) demostraron la actividad insectistática e insecticida del extracto acuoso de la planta completa de *R. communis* al 5% en etapa de fructificación, sin raíz, incorporado a la dieta, la cual mostró inhibición de la alimentación de 50% en larvas y mortalidad superior a 30%. Además se encontró que el extracto acuoso de las hojas inhibió la emergencia de adultos, disuadió la oviposición y presentó actividad larvicida en mosquitos *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), con



CL<sub>50</sub> de 403.65, 445.66 y 498.88 ppm contra larvas de 2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> instar de *A. arabiensis* y de 1 091.44, 1 364.58 y 1 445.44 ppm contra larvas de los mismos instares de *C. quinquefasciatus*, la Inhibición de la Emergencia media de ambas especies fue de 374.97 ppm y 1180.32 ppm (Elimam *et al.*, 2009). Los extractos acuosos de hojas, frutos y tallos presentaron actividad insecticida y repelente contra la termita *Macrotermes natalensis* (Isoptera: Termitidae), el extracto de los frutos logró mayor mortalidad y repelencia con 82 y 90%, seguido por el extracto de hojas con 53.03 y 87.27% y del extracto de los tallos con 49.6 y 40% (Babarinde *et al.*, 2008). Por otra parte, los extractos acuosos y acetónicos de las hojas tienen mayor actividad repelente contra la hormiga negra *Acromirmex lundi* (Hymenoptera: Formicidae), que los extractos de hojas del paraíso *Melia azedarach* (Meliaceae) y triquilia *Trichillia glauca* (Meliaceae) (Caffarini *et al.*, 2008).

El aceite de ricino, el cual se encuentra en las semillas de *R. communis*, provoca 100 % de mortalidad a las 18 h en el gorgojo del frijol *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) y gorgojo de cuatro manchas *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) al evaluar seis aceites vegetales diferentes al 1% (peso/volumen) para proteger semillas almacenadas de chícharo gandú *Cajanus cajan* (Fabaceae) (Salas y Hernández, 1985). La ricinina presente en la misma estructura vegetal actúa como repelente e insecticida contra *T. vaporariorum*, al evaluar diferentes concentraciones de ricinina no purificada, la Concentración de Repelencia media (CR<sub>50</sub>) fue de 67.51 mg mL<sup>-1</sup>, y la CL<sub>50</sub> fue de 25.69 mg mL<sup>-1</sup> (Ramos-López, 2006). Además, se comprobó que concentraciones de 0.2 y 0.4 mg

mL<sup>-1</sup> de ricinina (adicionadas a la dieta), tienen efecto letal contra la hormiga cortadora *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), también provocó mortalidad de algunos individuos entre 4 y 10 d, además observaron que a concentraciones de 10, 20 y 40 µg de ricinina por hormiga administrada tópicamente, hubo síntomas de intoxicación, como movimientos lentos, temblor de patas y postración; sin embargo, poco tiempo después recuperaron la movilidad y sobrevivieron (Bigi *et al.*, 2004).

#### 2.4 Importancia económica de *S. frugiperda*.

Los adultos son de color gris oscuro, las hembras tienen alas delanteras grises y sin manchas, las posteriores son blancas, las alas delanteras de los machos son de color pardo claro con manchas blancas en el ápice y una mancha amarilla cerca del centro (Coto, 1997), son activos durante la noche y se pueden desplazar varios kilómetros cuando soplan vientos (Fernández, 2002). Las hembras depositan los huevos tanto en el haz como en el envés de las hojas, éstos son puestos en masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo (Andrews, 1988). Las larvas al eclosionar se alimentan del corion, más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo (Marenco *et al.*, 1992; Willink *et al.*, 1993; Kumar y Mihm, 2002). 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, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca

invertida (Andrews, 1988; Ortega, 1987; Bergvinson y Kumar, 1997). Las larvas pasan generalmente por 5 y 6 instares (Sparks, 1979; Bergvinson y Kumar, 1997; Kumar y Mihm, 2002; Villa y Catalán, 2004). Las pupas son de color caoba con su extremo abdominal terminando en 2 ganchos en forma de "U" invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta los 8 a 10 días en que emerge el adulto (Sparks, 1979; Andrews, 1988). Su ciclo biológico es de 43 a 58 días (Bergvinson y Kumar, 1997; Murua *et al.*, 2003).

Este insecto comúnmente se le conoce como "gusano cogollero del maíz"; es de hábitos generalistas, se encuentra ampliamente distribuido en América, que se alimenta de aproximadamente 50 especies de plantas (Arana, 1996). Su hospedante preferido es el maíz, en México y en América Latina constituye un factor limitante del cultivo (Sparks, 1979; Andrews, 1988; Molina *et al.*, 2003). Las larvas causan defoliaciones al maíz, pero su daño más importante es cuando se alimentan del meristemo de crecimiento de la planta, lo que ocasiona su muerte (Willink *et al.*, 1993; Fernández, 2002).

### 3 JUSTIFICACIÓN.

El hecho de que *S. frugiperda* sea una plaga de importancia económica, junto a la facilidad con que se puede criar en condiciones de laboratorio, hace que sus larvas puedan utilizarse fácilmente en bioensayos de actividad insectistática e insecticida realizados con dieta artificial, por otra parte tomando en consideración de que *R. communis* ha sido reportada con actividad insecticida con anterioridad, y que el uso de insecticidas sintéticos, empleados para controlar *S. frugiperda*, es muy perjudicial para el humano y el ambiente, se hace necesario encontrar sustancias alternativas derivadas del metabolismo secundario de las plantas que sean menos tóxicas pero eficientes para el control de insectos plaga.

## 4 OBJETIVOS.

### 4.1 Objetivo general.

Evaluar la actividad biológica en condiciones de laboratorio, el efecto que presentan los extractos con diferente gradiente de polaridad de hojas y semillas de *R. communis* así como de sus fracciones y sustancias activas contra *S. frugiperda*, con la finalidad de estandarizar el extracto que presente las condiciones más propicias de manejo en laboratorio y de actividad biológica.

### 4.2 Objetivos específicos.

Los objetivos específicos que se derivan del anterior son los siguientes:

- ❖ Determinar las concentraciones mínimas y máximas necesarias para cada extracto evaluado con hojas y semillas de *R. communis*, que presenten actividad insectistática o insecticida contra *S. frugiperda*.
- ❖ Identificar la sustancia activa de los extractos de hojas o semillas de *R. communis* que presenten actividad insecticida o insectistática en *S. frugiperda*.
- ❖ Estandarizar el extracto de hojas o semillas de *R. communis* que presente la actividad insecticida o insectistática sobre *S. frugiperda*.

## 5 HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos de hojas o semillas de *R. communis* contiene metabolitos secundarios los cuales presentaran actividad insectistática y/o insecticida en el desarrollo de larvas y pupas de *S. frugiperda*.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Colecta del material vegetal.

Se recolectaron 19 Kg de hojas verdes y 2 Kg de semillas (Figura 1) de *R. communis*, entre diciembre de 2006 y marzo de 2007, en la Colonia Jardines de Casanueva, del Municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México, entre las coordenadas 19° 36' 56" latitud norte; 99° 03' 44" longitud oeste; a una altitud de 2,251 msnm. Se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente por 15 d, posteriormente las hojas se pulverizaron en un molino marca Thomas-Wiley, Modelo N°4, y las semillas se trituraron en un mortero de porcelana, obteniéndose 3.2 Kg de polvo de hojas y 1.9 Kg de semillas trituradas.

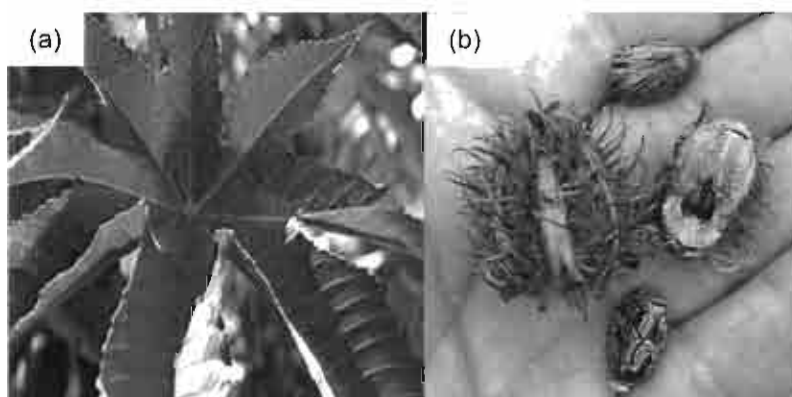


Figura 1. Hoja (a) y semilla (b) de *R. communis*.

### 6.2 Cría de *S. frugiperda*.

La cría de *S. frugiperda* se realizó acorde a la metodología empleada en el Centro Internacional del Mejoramiento del Maíz y Trigo, usando insectos reproducidos en el Laboratorio de Entomología de la Unidad de Estrés Biótico. Con los ingredientes que

se muestran en el Cuadro 2, se preparó 1 Kg de dieta y se vertió en una charola de acrílico transparente (30x30x5 cm), dejándola solidificar a temperatura ambiente por 24 h, luego se realizó un estriado en la superficie de la dieta con un tenedor de acero inoxidable desinfectado, después se colocó sobre ésta a presión una rejilla de acrílico blanco (256 espacios y 3 cm<sup>3</sup>).

Cuadro 2. Ingredientes y cantidades empleadas para preparar 1 Kg de dieta artificial, para la cría de larvas de *S. frugiperda* (Bergvinson y Kumar, 1997).

Ingrediente	Cantidad
Ácido sórbico	1.7 g*
Agar	10.0 g
Agua destilada	800 mL
Dieta (Product# F0635 S. W. Corn Borer, Bio-Serv, Canada)	60.0 g
Espiga estéril	20.0 g
Etanol	17 mL*
Formaldehído	2.5 mL
Levadura de cerveza	40.0 g
Maíz molido	100.0 g
Metil <i>p</i> -hidroxibenzoato	1.7 g
Sulfato de neomicina	0.6 g
Vitaminas (vitamin mix fortification lepidoptera, Bio-Serv)	10.0 g**

\* El ácido sórbico se disuelve en el etanol antes de mezclarlo con los demás ingredientes de la dieta; \*\* Las vitaminas se adicionaron cuando la dieta, ya hecha, tiene < de 60°C.

Por otro lado se preparó en un recipiente de plástico (de 100 mL), una mezcla de 1 g de larvas de 1<sup>er</sup> instar con 20 g de olote molido estéril, y se espolvoreó sobre la superficie de la dieta cuidando que por lo menos en cada compartimento quedara



una larva. La charola se cubrió con una malla alámbrica y sobre ésta se pusieron cuatro hojas de papel absorbente (servitoalla Kleenex) y otra rejilla de plástico, sujetando todo el conjunto con cinco ligas elásticas. Esta se puso en una cámara de crecimiento a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 5\%$  de humedad relativa, y fotoperiodo de 14 h luz hasta que se formaron las pupas.

Las pupas formadas se separaron de la dieta y se colocaron en una jaula (realizada con malla de alambre con abertura de 4 mm, 21 cm de diámetro y 30 cm de altura), luego se pusieron sobre dos hojas de papel absorbente en su parte central (Figura 2), colocándola a  $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 70 % de humedad relativa, y fotoperiodo de 14 h luz, hasta la emergencia de adultos, los cuales se separaron por sexo, después se colocaron 25 hembras y 25 machos dentro de una bolsa encerada de papel blanco, para que se aparearan y las hembras ovipositarán en la pared interna de la bolsa, colocándoseles un recipiente de plástico de 5 cm de diámetro con un algodón humedecido con agua azucarada al 5% dentro de la bolsa, para la alimentación de los adultos. A las 72 h se se cambiaron los adultos de bolsa para que continuarán ovipositando por 5 d más y los huevos se retiraron raspando el papel con una espátula.



Figura 2. Jaula para emergencia de adultos de *S. frugiperda*.

Los huevos se colocaron en una charola circular de acrílico transparente de 24 cm de diámetro y 10 cm de altura, la cual se cubrió con dos hojas de papel absorbente y con tapa de acrílico, a la que previamente se le cortó una superficie cuadrangular de 10 cm de diámetro en su parte central y se le pegó una malla de alambre para que permitiera la entrada de aire al interior de la charola; después ésta se colocó en el interior de una cámara climatizada a  $22 \pm 2$  °C, 85 % de humedad relativa, y fotoperiodo de 14 h luz, hasta la eclosión.

### 6.3 Preparación de extractos.

En un matraz balón de 1 L se colocaron 50 g de hojas o semillas secas y molidas, con 500 mL de agua, la mezcla se dejó reposar 24 h, y después se filtró, siguiendo la metodología de Rodríguez-Hernández y Vendramim (1996).

Para la preparación de los extractos hexánico, metanólico y de acetato de etilo, se usó 1 Kg de hojas o semillas secas y molidas, sometiéndose a una extracción con 3 L de hexano calentando durante 4 h a temperatura de ebullición, luego se filtró obteniéndose por un lado el extracto hexánico y por el otro lado el residuo vegetal al cual se le adicionaron 3 L de acetato de etilo o metanol. Se calentó a temperatura de ebullición por 4 h, se filtró y el disolvente, se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio, los extractos fueron ocho:

Extracto acuoso de hojas (EAH)

Extracto acuoso semillas (EAS)

Extracto metanólico de hojas (EMH)

Extracto metanólico de semillas	(EMS)
Extracto acetato de etilo de hojas	(EAEH)
Extracto acetato de etilo de semillas	(EAES)
Extracto hexánico de hojas	(EHH)
Extracto hexánico de semillas	(EHS)

Los EMS y EHH se separaron por cromatografía en columna empacada con sílica gel utilizando como eluyentes, en cada extracto:

EMS: cloroformo, incrementando la polaridad con metanol.

EHH: hexano aumentando su polaridad con acetato de etilo.

#### 6.4 Identificación de ácidos grasos en el EHH de *R. communis*.

Se usó el método con trifluoruro de boro AOAC-IUPAC N° 969.33 (AOAC, 1990). En un matraz de 50 mL se colocaron 90 mg del extracto y 4 mL de una disolución de hidróxido de sodio en metanol 1N, la mezcla de reacción se calentó a temperatura de ebullición con agitación por 15 min., al término de este tiempo se añadieron 5 mL de trifluoruro de boro al 15% en metanol y se continuó calentando por 5 min, enseguida se añadieron bajo las mismas condiciones 2 mL de isooctano y se dejó en agitación por 5 min. Al término de este tiempo la mezcla de reacción se enfrió y se añadieron 0.2 g de cloruro de sodio.

La fase orgánica se separó en un embudo de separación, y a la fase acuosa se le realizó una segunda extracción con 2 mL de hexano, después de separar la fase orgánica se junto con la fase de isooctano y se secó con sulfato de sodio anhidro.

La muestra esterificada se analizó en un cromatografo de gases Agilent Technologies 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas, con un detector selectivo de masas 5973 y una columna capilar HP-5MS de 25 mm de diámetro por 30 m de largo y 0.25  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula .Se pesaron 10 mg de la muestra, se disolvieron en 1 mL de acetona y se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra al cromatografo de gases por el método de split en una relación 2:1, a 330 °C del puerto de inyección. El programa de temperatura que se siguió fue el siguiente: 60 °C por 3 min, con una rampa de 3 °C por min. hasta 170 °C por 1 min y 10 °C por min hasta 330 °C por 10 min. A un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura de la fuente fue de 230 °C, del cuadrupolo de 150 °C y el rango de masas de 20 a 800 uma. La identificación de los componentes se llevó a cabo por comparación con los espectros de masas de la biblioteca NIST 02.

#### 6.5 Separación y aislamiento de ricinina (Kang *et al.*, 1985).

En un matraz balón se colocó 1 Kg de hojas secas y molidas con 3 L de hexano, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 8 h. Posteriormente se filtró y a las hojas se le adicionaron 3 L de metanol, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 8 h, luego se filtró, y el disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido resultante de la extracción se lavó con éter etílico, y después con acetato de etilo. El disolvente se eliminó en un rotovapor a presión reducida y luego en una estufa de vacío a temperatura ambiente. El residuo se separó por cromatografía en columna empacada con silica gel 60, usando como

eluyente cloroformo al cual se le aumentó la polaridad con metanol. Las fracciones se concentraron a presión reducida y por cromatografía en capa fina se determinaron las fracciones que presentaron un patrón similar, se mezclaron y se les realizaron pruebas de alcaloides con ácido silicotúnsrgico y con reactivo de dragendorff. A los cristales obtenidos se les determinó el punto de fusión, IR,  $^{13}\text{CRMN}$  y  $^1\text{HRMN}$ .

#### 6.6 Aceite de ricino, ácidos linoléico y palmítico.

El aceite de ricino se adquirió grado comestible en la Farmacia París; el ácido linoléico y el ácido palmítico se adquirieron en Sigma-Aldrich, con 95% de pureza.

#### 6.7 Bioensayo.

En la prueba preliminar se evaluaron siete concentraciones logarítmicas entre 16,000 y 0.016 ppm de los EAH, EAS, EMH, EMS, EAEH, EAES, EHH, y EHS de *R. communis*, los cuales se añadieron en la parte final de la elaboración de la dieta, antes de que solidificará, usando la metodología propuesta por Rodríguez-Hernández y Vendramim (1996). Este experimento permitió encontrar las concentraciones con mínima y máxima efectividad, tomando para ello solo la variable de viabilidad larval, posteriormente se evaluó en una segunda fase las concentraciones que permitieron la mejor correlación entre concentración y efectividad.

A los tratamientos EAH, EAS, EMH, EHH y EHS, se les aumentó en el bioensayo a la concentración de 24,000 ppm, debido a que en estos tratamientos la concentración

de 16,000 ppm no ocasionó 50% de la viabilidad larval y se intercalaron los seis valores restantes entre 16,000 y 16 ppm, y en los tratamientos EMS, EAEH y EAES se intercalaron los valores entre 16,000 y 16 ppm. Las concentraciones para cada tratamiento fueron las siguientes: EMH: 24,000, 16,000, 8,000, 4,000, 1,600, 560, 160 y 0 ppm; para EAH, EAS, EHH y EHS 24,000, 16,000, 9,600, 4,000, 1,600, 560, 160 y 0 ppm, y para EMS, EAEH y EAES 16,000, 9,600, 1,600, 560, 160, 112, 16 y 0 ppm.

Al encontrar actividad biológica con el EHS, se decidió probar la actividad biológica del aceite de ricino, realizando la prueba preliminar a las mismas concentraciones valoradas en los demás extractos y en su evaluación final se evaluaron 16,000, 9,600, 1,600, 560, 160, 112, 16 y 0 ppm.

Después de la esterificación del EHH, se determinó la actividad biológica del ácido linoléico y del ácido palmítico, a los que se les realizaron sus ensayos preliminares utilizando concentraciones entre 1,600 y 0.0016 ppm, quedando 1,600, 960, 400, 160, 120, 56, 16 y 0 ppm como concentraciones a probar en su bioensayo final.

La última sustancia evaluada fue la ricinina, usando las concentraciones de 16,000, 9,600, 1,600, 560, 160, 112, 16 y 0 ppm, después de su ensayo preliminar realizado entre 16,000 y 0.016 ppm.

Para la realización de los ensayos, se vertieron aproximadamente 10 mL de las dietas con extractos en 100 vasos de acrílico, para los ocho extractos y para el aceite de ricino y 24 vasos para el ácido linoléico, ácido palmítico y ricinina, de una onza de capacidad (Bio-Serv N° 9051) previamente esterilizados, se dejó solidificar la dieta a

temperatura ambiente por 24 h, posteriormente se colocó una larva de primer instar de *S. frugiperda* con un pincel del N° 0, luego se cubrió cada vaso con una tapa de cartón blanco ajustable (Bio-Serv N° 9049). Los vasos se colocaron de manera aleatoria, en una charola de cartón con 30 espacios, y se pusieron en el interior de una cámara bioclimática en condiciones de  $27 \pm 2$  °C;  $70\% \pm 5\%$  HR y fotoperiodo de 14 h luz. Los tratamientos se observaron cada tercer día, y cuando se comenzaron a formar larvas de 6° instar en el control se realizaron observaciones diarias para registrar el día en que se alcanzó el estado de pupa.

Para cada tratamiento se evaluaron cinco variables: a) el tiempo transcurrido desde la infestación a la formación de pupa, el cual correspondió a la duración de la fase larval; b) el número de pupas formadas, que correspondió a la viabilidad larval; c) el peso de pupa de 24 h de edad; d) el tiempo transcurrido de la formación de la pupa hasta la emergencia del adulto, registrado como duración de la fase pupal, y e) el número de adultos emergidos que correspondió a la viabilidad pupal (Rodríguez-Hernández y Vendramim, 1996).

#### 6.8 Curva de calibración de ricinina en el EMH de *R. communis* por HPLC.

Se preparó una solución de 10 mg de ricinina, en 5 mL de metanol en un matraz volumétrico, de esta muestra se tomó 1 mL y en un matraz volumétrico se aforó a 10 mL, esto se repitió dos veces más para obtener cuatro concentraciones (2, 0.2, 0.02 y  $0.002 \text{ mg mL}^{-1}$ ), haciendo tres determinaciones para cada concentración, hecha ésta, se tomaron 10 mg del EMH y se disolvieron en 5 mL de MeOH, efectuando tres

inyecciones, para calcular el área bajo la curva para poder determinar la concentración de ricinina.

Se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian, modelo Pro Star 330, con una columna C<sub>18</sub> de fase inversa (250 x 4.6 mm i.d. tamaño de partícula 5 µm) de la marca Grace, la columna se eluyó con una mezcla de metanol: agua (75:25 v/v), con un flujo de 0.6 mL min<sup>-1</sup>, el detector se ajustó a 250 nm de absorbancia, y con un tiempo de análisis de 20 min.

Se emplearon metanol y agua grado HPLC, el primero de la marca J.T. Baker y la segunda de la marca CALEDON, así como ricinina estándar con un mínimo de pureza de 98%, de la marca Latoxan.

#### 6.9 Toxicidad aguda oral.

Se determinó la toxicidad aguda oral del EMH de *R. communis* a 200, 400, 800, 1,600 y 2,000 mg Kg<sup>-1</sup> y un control al que se le administró solamente el vehículo por el método de Lagarto *et al.* (2005), usando 60 ratones hembras y 60 ratones macho de la cepa CD 1, con peso promedio entre 20 y 26 g, los cuales se mantuvieron a temperatura controlada de 20 ± 2 °C con ciclo de luz de 12 h. La alimentación consistió en alimento peletizado y agua *ad libitum*. Se dividieron en doce grupos con 10 animales para cada sexo con ayuno de 12 h, a 10 grupos se administró vía oral. Los animales se observaron cada 60 min., durante las primeras 7 h, y después diariamente por un período de 7 d, registrando los síntomas de toxicidad.



## 6.10 Análisis estadísticos.

Los tratamientos con 100 observaciones, se dispusieron en cinco grupos de 20 vasos cada uno, y para los tratamientos con 24 se dividieron en cuatro grupos con seis vasos cada uno, empleando un diseño experimental completamente al azar, no incluyendo en el análisis los tratamientos con viabilidades inferiores a 10%, y la comparación entre medias de los tratamientos se efectuó a través de la prueba de Tukey a nivel de 95% de confiabilidad con el paquete estadístico SAS (Delwiche y Slaughter, 2002); la Viabilidad Larval media ( $VL_{50}$ ) se calculó con el paquete Probit (Raymond, 1985); a los cromatogramas obtenidos por HPLC se les realizó análisis de correlación entre el área bajo la curva obtenida y las concentraciones evaluadas, con el paquete estadístico SAS, y finalmente la  $DL_{50}$ , se determinó con el paquete estadístico Probit.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 Efectividad de extractos.

Los resultados obtenidos en la fase preliminar de la evaluación de cuatro disolventes y de hojas y semillas de *R. communis* mostraron que la efectividad de los extractos contra el desarrollo de larva y pupa del gusano cogollero *S. frugiperda* se manifestó entre 0.16 y 16,000 ppm (Apéndice 10.1.1); la duración del periodo larval se prolongó a partir de 0.16 ppm, la viabilidad larval fue significativa desde 16 ppm, la viabilidad pupal se afectó a 160 ppm y el peso pupal a las 24 h fue menor a partir de 160 ppm. La duración pupal, que no fue significativa en el EAH, se prolongó desde la concentración de 160 ppm.

El EMS, con viabilidad de 0%, evitó el desarrollo de la fase larval a 16,000 ppm y el EAES prorrogó el tiempo de duración larval a partir de 0.16 ppm. Las concentraciones que afectaron la viabilidad pupal, no permitieron que durante el tiempo del desarrollo de la larva, éstas las destoxificaran, por lo que se manifestó este efecto en la pupa, y las concentraciones que disminuyeron el peso pupal, siempre prolongaron la duración larval.

En los resultados que correlacionan concentración y efectividad, de manera más directa, todos los extractos mostraron efectividad de 160 a 24,000 ppm en las cinco variables evaluadas (Cuadro 3 a 6); la duración de la etapa larval se prolongó desde 160 ppm, la duración de la fase pupal y la viabilidad pupal fueron significativas a partir de 1,600 ppm, y la viabilidad larval y el peso de pupa se afectaron desde 560 ppm.

Cuadro 3. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EAH y EAS de *R. communis* incorporados a la dieta artificial.

EAH					
Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
24,000	26.6 ±1.0*	12.8 ±0.4*	31 ±1.9*	77.4 ±3.6*	219.5 ±3.3*
16,000	24.6 ±0.6*	12.4 ±0.2	71 ±1.9*	93.0 ±1.7	229.5 ±4.2*
9,600	24.5 ±0.3*	12.3 ±0.1	78 ±2.6*	93.6 ±4.3	232.5 ±2.4*
4,000	22.9 ±0.3*	12.3 ±0.1	83 ±2.6*	95.2 ±2.2	236.3 ±2.6
1,600	22.5 ±0.3*	12.2 ±0.1	90 ±1.6	95.6 ±1.1	238.0 ±2.7
560	21.9 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±2.0	96.8 ±1.3	240.6 ±2.8
160	21.5 ±0.2	12.1 ±0.1	95 ±2.2	96.8 ±1.3	241.4 ±2.4
0	21.1 ±0.2	12.1 ±0.1	95 ±2.2	96.8 ±1.3	242.1 ±2.7
VL <sub>50</sub>	12.55×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	10.3	8.1	26.1	7.8	9.5
EAS					
24,000	31.1 ±0.9	13.7 ±0.3	15 ±1.0 **	60.0 ±10.5	207.9 ±4.6
16,000	29.1 ±0.6*	13.0 ±0.2*	43 ±1.2*	88.4 ±4.0	212.6 ±4.6*
9,600	28.2 ±0.5*	12.7 ±0.1	61 ±1.0*	91.8 ±2.6	219.2 ±3.7*
4,000	26.0 ±0.5*	12.5 ±0.1	70 ±1.6*	94.3 ±2.7	228.9 ±4.0*
1,600	25.1 ±0.4*	12.3 ±0.1	83 ±1.2*	96.4 ±1.5	231.8 ±3.6
560	24.3±0.3	12.3 ±0.1	89 ±1.0	96.6 ±2.2	235.8 ±3.4
160	23.7 ±0.3	12.2 ±0.1	93 ±2.0	96.8 ±1.3	235.8 ±2.9
0	22.9 ±0.2	12.2 ±0.1	94 ±1.0	96.8 ±2.1	235.8 ±3.3
VL <sub>50</sub>	7.40×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	14.9	8.6	23.8	6.3	13.9

Los valores son promedio de 100 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

Cuadro 4. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EMH y EMS de *R. communis* incorporados a la dieta artificial.

<b>EMH</b>					
Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
24,000	-	-	0**	-	-
16,000	32.7 ±0.8	13.3 ±0.3	37 ±2.0 *	40.0 ±1.5	198.0 ±4.5
8,000	30.0 ±0.4*	12.3 ±0.2*	54 ±1.9*	59.3 ±2.5*	211.3 ±3.2*
4,000	29.2 ±0.4*	11.8 ±0.2	70 ±1.6*	81.4 ±1.5*	217.7 ±3.0*
1,600	27.0 ±0.5*	11.7 ±0.2	79 ±1.9*	83.5 ±2.6*	219.2 ±2.8*
560	22.2 ±0.5*	11.6 ±0.1	94 ±1.9	95.7 ±1.1	225.9 ±2.8
160	22.0 ±0.4	11.5 ±0.1	96 ±1.9	96.9 ±2.1	227.4 ±2.8
0	20.5 ±0.4	11.5 ±0.1	96 ±1.9	96.9 ±1.3	233.0 ±3.1
VL <sub>50</sub>	4.83×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	21.9	9.9	20.1	16.9	12.3
<b>EMS</b>					
16,000	-	-	0**	-	-
9,600	-	-	0**	-	-
1,600	27.4 ±0.6*	12.9 ±0.2*	36 ±1.9*	76.9 ±2.2*	209.5 ±3.8*
560	24.7 ±0.3*	12.5 ±0.1	75 ±2.7*	94.1 ±2.1	226.8 ±2.7*
160	23.9 ±0.2*	12.3 ±0.1	90 ±1.6	95.6 ±2.1	228.7 ±2.6
112	23.1 ±0.2	12.3 ±0.1	93 ±1.2	95.7 ±2.1	233.0 ±3.1
16	22.7 ±0.2	12.3 ±0.1	94 ±1.9	95.7 ±2.0	234.4 ±2.6
0	22.6 ±0.2	12.1 ±0.1	94 ±1.9	95.7 ±1.1	235.0 ±2.6
VL <sub>50</sub>	0.75×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	10.8	7.5	26.9	6.5	11.5

Los valores son promedio de 100 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

Cuadro 5. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EAEH y EAES de *R. communis* incorporados a la dieta artificial.

<b>EAEH</b>					
Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	30.5 ±0.6*	13.0 ±0.2*	34 ±2.9*	85.3 ±2.2*	211.6 ±4.0*
9,600	28.4 ±0.5*	12.6 ±0.1	50 ±3.2*	92.0 ±2.4	217.4 ±2.8*
1,600	26.9 ±0.5*	12.3 ±0.1	64 ±1.9*	93.8 ±2.7	228.8 ±3.5
560	25.5 ±0.4*	12.2 ±0.1	88 ±2.0	96.6 ±1.4	233.6 ±2.2
160	24.9 ±0.4*	12.2 ±0.1	89 ±1.9	96.6 ±1.4	235.5 ±2.8
112	23.9 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±2.9	96.8 ±2.0	238.1 ±2.5
16	23.4 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±2.6	96.8 ±1.3	238.7 ±2.4
0	23.0 ±0.2	12.1 ±0.1	94 ±1.9	97.9 ±1.3	238.7 ±2.3
VL <sub>50</sub>	5.07×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	14.5	8.9	30.0	6.6	10.7
<b>EAES</b>					
16,000	33.5 ±1.0*	13.5 ±0.4*	11 ±1.0 *	54.5 ±3.3*	191.7 ±3.3*
9,600	30.8 ±0.6*	12.8 ±0.2*	19 ±1.9*	78.9 ±5.6*	223.7 ±4.2*
1,600	26.5 ±0.3*	12.5 ±0.1	60 ±3.5*	91.7 ±2.5	237.0 ±2.4*
560	24.3 ±0.3*	12.2 ±0.1	85 ±2.2*	95.3 ±2.2	242.1 ±2.6
160	23.9 ±0.3*	12.2 ±0.1	86 ±1.9	95.3 ±1.2	244.0 ±2.7
112	22.8 ±0.2	12.1 ±0.1	90 ±3.5	96.7 ±1.4	246.9 ±2.8
16	22.6 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±2.0	96.7 ±1.3	248.0 ±2.4
0	22.4 ±0.2	12.0 ±0.1	93 ±1.3	97.8 ±1.3	249.4 ±2.7
VL <sub>50</sub>	1.97×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	11.1	7.5	15.0	4.1	9.8

Los valores son promedio de 100 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

Cuadro 6. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EHH y EHS de *R. communis* incorporados a la dieta artificial.

<b>EHH</b>					
Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
24,000	27.1 ±0.5	13.1 ±0.2	19 ±1.9**	68.4 ±2.9	211.3 ±6.4
16,000	25.6 ±0.4*	12.5 ±0.2	46 ±2.9*	89.1 ±3.2*	219.1 ±4.1*
9,600	24.5 ±0.3*	12.4 ±0.1	76 ±2.5*	96.1 ±2.5	223.1 ±3.0*
4,000	23.1 ±0.3*	12.3 ±0.1	88 ±2.6	96.6 ±2.1	226.6 ±3.0
1,600	22.6 ±0.2*	12.3 ±0.1	88 ±2.6	97.7 ±2.1	229.3 ±3.5
560	22.1 ±0.2	12.2 ±0.1	92 ±3.0	97.8 ±1.3	234.4 ±3.2
160	21.9 ±0.3	12.1 ±0.2	92 ±2.6	97.8 ±1.3	237.8 ±2.9
0	21.6 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±3.0	97.8 ±1.2	238.4 ±3.1
VL <sub>50</sub>	10.01×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	11.1	10.0	20.5	5.3	12.9
<b>EHS</b>					
24,000	31.6 ±0.9	13.2 ±0.5	11 ±1.0**	54.5 ±3.3	210.5 ±3.0
16,000	30.1 ±0.5*	12.7 ±0.2*	43 ±2.0 *	88.4 ±3.2*	214.2 ±4.0*
9,600	28.1 ±0.4*	12.4 ±0.1	65 ±3.5*	92.3 ±1.3*	217.8 ±2.8*
4,000	26.5 ±0.4*	12.3 ±0.1	73 ±2.6*	94.5 ±0.3	222.7 ±2.8*
1,600	25.7 ±0.3*	12.2 ±0.1	79 ±4.0*	94.9 ±1.5	225.3 ±2.5
560	24.6 ±0.3*	12.2 ±0.1	85 ±2.2	96.5 ±1.5	229.0 ±2.4
160	23.6 ±0.2	12.1 ±0.1	90 ±2.7	96.7 ±2.0	230.1 ±2.3
0	22.8 ±0.2	12.1 ±0.1	92 ±2.6	97.8 ±1.3	230.1 ±2.3
VL <sub>50</sub>	9.95×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	14.2	8.6	22.7	16.9	10.3

Los valores son promedio de 100 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

La duración de la fase larval se prolongó, significativamente, a partir de la concentración de 160 ppm de los extractos en la dieta (Cuadro 3 a 6), siendo mayor que el testigo, lo que indica que las sustancias del extracto intoxicaron al insecto, por lo que éste mantuvo más tiempo el alimento en el intestino medio hasta que logró la desintoxicación, o bien los extractos retardaron la digestión o ambos; así el tiempo para cada instar se prolongó, más de lo normal, indicando un crecimiento más lento para alcanzar el desarrollo larval y por lo que se manifestó una inhibición en el crecimiento. Los EAES y EMS, que prolongaron en 11 y 12.2 d, el período larval, fueron los tratamientos que mayor inhibición de crecimiento ocasionan al ocupar 49.5 y 59.5% de tiempo más que el control para completar el desarrollo larval, respectivamente. Ningún extracto acortó la duración larval.

Las concentraciones altas que inhibieron el crecimiento prolongaron la duración pupal (Cuadro 3 a 6), lo que sugiere que el tiempo de duración en la fase larval, el cual se prolongó, no es suficiente para que la larva desintoxicara al alimento, afectando al estado biológico subsecuente, al prolongar la duración pupal y por lo tanto inhibir el desarrollo del insecto. Los EAS, EAES y EMH, que prolongaron en 12.3, 12.5 y 15.7% el tiempo para terminar la fase pupal, inhibieron el desarrollo de *S. frugiperda*.

La viabilidad larval (Cuadro 3 a 6) representa la proporción de larvas que terminaron su desarrollo, por lo tanto los EMH y EMS, que ocasionaron 0% de esta viabilidad, evitaron el desarrollo larval, por ende que no se formen pupas, interrumpiendo el ciclo biológico de *S. frugiperda*. Las altas concentraciones que afectaron la viabilidad

larval también disminuyeron la viabilidad pupal (Cuadro 3 a 6), y por lo tanto, la población del insecto. En el caso de EMH las concentraciones que afectaron la viabilidad larval también disminuyeron la viabilidad pupal (Cuadro 4). Los EHS, EAES y EMH solo permitieron que el 53.3, 53.3 y 38.8% de pupas se desarrollaran, por consecuencia se formaron menos adultos.

Las pupas que pesaron significativamente menos de lo normal (testigo) (Cuadro 3 a 6), procedieron de larvas que fueron afectadas por el alimento-extracto, sea porque el extracto inhibió el estimulante de la dieta o el extracto tenía un disuasivo de la alimentación o por ambos. Al pesar menos la pupa, indicó que hubo alimentación anormal en la larva, menor aprovechamiento del alimento y por lo tanto menor peso corpóreo en la pupa, lo que denotó una inhibición de la alimentación. Los EMH y EAES, que disminuyeron en 15 y 23.1% el peso de pupa de 24 h de edad inhibieron la alimentación en mayor proporción.

La  $VL_{50}$ , que es el valor que indica el desarrollo de la mitad de la población larval, o que inhibe la formación del 50% de pupas, oscila de 750 a 12,550 ppm (Cuadro 3 a 6), siendo los EMS y EAES los que afectaron con mayor intensidad este parámetro con 750 y 1,970 ppm, y los EAH y EHH los menos efectivos con 10,010 y 12,550 ppm (Cuadro 3 a 6). En la comparación de las  $VL_{50}$  el gradiente de efectividad de los extractos fue el siguiente: metanol, acetato de etilo, hexano y agua de semilla, y estos fueron más activos que los obtenidos de las hojas. De esta manera la mejor extracción de las sustancias insectistáticas e insecticidas contra el desarrollo larval del gusano cogollero debe realizarse con metanol y semilla, como estructura vegetal.



Otras investigaciones también han indicado al metanol como el disolvente más eficiente para extraer las sustancias contenidas en semillas de higuierilla sobre el éter de petróleo, tetracloruro de carbono (Batabyal *et al.*, 2007); y en hojas de la misma planta comparado con diclorometano, acetato de etilo y agua (Bigi *et al.*, 2004), al ser evaluados contra *A. stephensi* en el primer trabajo y contra *A. sexdens rubropilosa* en el segundo.

Por otro lado el agua como disolvente menos eficiente para la extracción de sustancias termiticidas de *R. communis* ya fue reportado, seguido del metanol, éter de petróleo, hexano, butanol y cloroformo (Vasant y Narasimhacharya, 2008)

Con estos resultados se observó que las semillas presentaron mayor efectividad sobre las hojas. Al respecto, Rodríguez-Hernández (2005) y Ramos-López (2006) ya habían reportado que los extractos de semillas tienen más efectividad que los extractos con todas las otras partes vegetativas de la planta.

Sin embargo la hoja no fue inocua, lo que indica que hay cierta actividad, la cual es principalmente insectistática como Rodríguez-Hernández (2005) ya había mencionado.

## 7.2 Efectividad del aceite de ricino.

Los resultados de la efectividad del aceite de ricino en el desarrollo de gusano cogollero *S. frugiperda*, tanto de los obtenidos en la fase preliminar (Apéndice, 10.1.2), como los de la segunda fase que correlacionan de manera más directa concentración y efectividad (Cuadro 7), muestran que las concentraciones de 16

hasta 16,000 ppm afectan el desarrollo de larva y pupa, al inhibir el crecimiento por prolongar la duración del periodo larval a 16 ó 160 ppm, el desarrollo de la pupa por prolongar la duración de esta fase a 1600 ó 9,600 ppm, y la alimentación por disminuir el peso de pupa a 1,600 ppm; así como disminuir la viabilidad larval con 160 ppm, y la viabilidad pupal a 160 ó 9,600 ppm.

Cuadro 7. Duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con aceite de ricino incorporado a la dieta artificial.

Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	-	-	0**	-	-
9,600	26.0 ±0.4*	12.9 ±0.2*	45 ±1.6*	88.9 ±3.2*	222.7 ±3.3*
1,600	25.0 ±0.3*	12.6 ±0.2	69 ±1.0*	95.7 ±1.8	225.3 ±2.8*
560	23.9 ±0.3*	12.3 ±0.1	80 ±3.2*	96.3 ±1.5	238.2 ±2.7
160	23.3 ±0.2*	12.3 ±0.1	88 ±1.2*	97.7 ±1.4	242.7 ±3.0
112	22.8±0.2	12.2 ±0.1	93 ±2.0	97.8 ±1.4	245.5 ±2.7
16	22.4 ±0.1	12.1 ±0.1	94 ±1.9	97.8 ±1.3	246.7 ±2.4
0	22.2 ±0.1	12.1 ±0.1	94 ±2.5	97.8 ±1.3	247.6 ±2.8
VL <sub>50</sub>	2.69×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	9.7	8.8	21.8	6.0	11.0

Los valores son promedio de 100 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

Los resultados discordantes en ambos experimentos, como en duración larval y duración y viabilidad pupal, pueden deberse a que se utilizaron dos poblaciones de larvas en los dos tiempos de evaluación, con diferente vigor en el insecto,

obteniéndose una diversa aptitud biológica en la respuesta. No obstante las diferencias entre las poblaciones, no se afecta la viabilidad larval ni el peso de pupa. El aceite de ricino inhibió el crecimiento, el desarrollo y la alimentación del gusano cogollero *S. frugiperda*, y le disminuyó la supervivencia larval y pupal. Evitó que la mitad de la población larval terminara su desarrollo con 2,690 ppm, incluso disminuyó a 10 ó a 0% esta población con 16,000 ppm. Esta concentración, la más alta evaluada, afectó a las pupas y por ende no hubo emergencia de adultos.

La actividad insecticida, inhibición de desarrollo, y nula emergencia de adultos que ocasionó este aceite ya se habían reportado (Salas y Hernández, 1985; Singh *et al.*, 1994) contra gorgojos, donde además inhibió el desarrollo embrionario (Reddy *et al.*, 1994), y la oviposición (Singh *et al.*, 1994; Rajapakse y Senanayake, 1997), y protegió a la semilla (Pacheco *et al.*, 1995; Mushobozy *et al.*, 2009).

### 7.3 Componentes del EHH de *R. communis* y efectividad de los ácidos linoléico y palmítico.

Los componentes del EHH se enlistan en el Cuadro 8, donde se observa que el 84.25% se identificó. De los 10 componentes identificados, dos fueron hidrocarburos aromáticos, y ocho ácidos grasos, de éstos los ácidos linoléico, linolérico y palmítico fueron los más abundantes con 76.05%.

Los ácidos linoléico y palmítico a las concentraciones de 16 a 1,600 ppm afectaron el desarrollo de larva y pupa de gusano cogollero *S. frugiperda* (Apéndice, 10.1.3; y Cuadro 9).

**Cuadro 8. Componentes del EHH de *R. communis*.**

Componentes	%	Retención (min)
p-Xileno	0.74	3.55
o-Xileno	0.39	3.77
Ácido palmítico	13.01	41.63
Ácido linoléico	15.28	44.85
Ácido linolérico	47.76	44.97
Ácido esteárico	1.73	45.38
Ácido tricosanóico	1.22	47.39
Ácido tetracosanóico	1.85	48.36
Ácido pentacosanóico	1.30	49.25
Ácido hexacosanóico	0.97	50.08
Componentes no identificados	15.75	-

El ácido linoléico inhibió el crecimiento desde 16 y 160 ppm, así como el desarrollo a 960 y 1,600 ppm, también inhibió la alimentación y disminuyó la viabilidad pupal a 160 y 400 ppm, y redujo la viabilidad larval con 160 ppm (Cuadro 9). Acorde a este último parámetro, donde no hubo variación, se evitó que la mitad de la población larval terminara su desarrollo con 860 ppm.

El ácido palmítico, adicionado en la dieta del gusano cogollero *S. frugiperda*, inhibió la alimentación con 16 ó 400 ppm, inhibió el crecimiento con 16 y 160 ppm, así como el desarrollo a 160 y a 960 ppm, disminuyó la viabilidad pupal a 160 y 400 ppm, y redujo la viabilidad larval con 160 ppm (Cuadro 9). Con este ácido se evitó que la mitad de la población larval terminara su desarrollo con 780 ppm.

Cuadro 9. Duración y viabilidad larval y pupal y peso de pupa de *S. frugiperda* con los ácidos linoléico y palmítico incorporados a la dieta artificial.

<b>Ácido linoléico</b>					
Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
1,600	32.7 ±0.8	13.3 ±0.5	25±10.8**	50 ±11.5	124.8 ±9.2
960	29.2 ±0.8*	13.1 ±0.5*	54.2±8.0*	76.9 ±5.3*	201.7 ±8.4*
400	27.4 ±0.5*	12.8 ±0.3	62.5±14.2*	80 ±5.0*	222.5 ±6.3*
160	26.5 ±0.4*	12.7 ±0.3	70.8±8.0*	88.2 ±4.2	235.6 ±5.2
120	24.0 ±0.4	12.4 ±0.2	83.3±9.6	90.1 ±3.8	239.1 ±4.3
56	23.5 ±0.3	12.3 ±0.2	87.5±8.0	90.5 ±3.2	242.8 ±4.6
16	23.4 ±0.3	12.3 ±0.2	91.7±8.3	95.5 ±2.2	245.3 ±4.8
0	23.4 ±0.3	12.3 ±0.2	91.7±4.8	95.5 ±2.2	246.3 ±3.9
VL <sub>50</sub>			0.86×10 <sup>3</sup> ppm		
CV	11.6	8.8	21.3	10.4	8.1
<b>Ácido palmítico</b>					
1,600	33.3 ±0.7	13.5 ±0.5	29.2±12.5**	57.1 ±11.8	116.6 ±16.7
960	28.8 ±0.8*	13.1 ±0.3*	45.8±8.0*	63.6 ±5.0*	169.4 ±10.8*
400	26.9 ±0.4*	12.8 ±0.3	62.5±14.2*	73.3 ±5.3*	206.8 ±8.3*
160	25.2 ±0.3*	12.6 ±0.2	66.7±9.6*	84.3 ±5.8	232.6 ±5.0
120	23.3 ±0.3	12.4 ±0.3	75±10.8	88.3 ±3.4	234.1 ±4.6
56	22.8 ±0.2	12.4 ±0.2	91.7±8.3	90.9 ±3.1	238.9 ±3.0
16	22.8 ±0.2	12.2 ±0.2	91.7±4.8	95.8 ±2.2	241.2 ±4.2
0	22.6 ±0.2	12.2 ±0.2	91.7±4.8	95.8 ±2.2	243.0 ±4.3
VL <sub>50</sub>			0.78×10 <sup>3</sup> ppm		
CV	12.5	9.2	22.4	12.6	7.7

Los valores son promedio de 24 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\*valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \*diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variación.

Ambos ácidos inhibieron el crecimiento, y afectaron la viabilidad larval y pupal en la misma proporción, y provocaron que la mitad de las larvas no terminaran su fase con concentraciones entre 540 y 1,780 ppm.

Otros ácidos grasos han mostrado efecto contra insectos plaga. Los ácidos oléico y palmítico disuaden la alimentación en larvas de *H. zea*, *L. dispar*, *O. leucostigma* y *M. disstra* y actúan como larvicidas en *A. aegyptii* (Ramsewak *et al.*, 2001; Rahuma *et al.*, 2008), *A. stephensi* y *C. quinquefasciatus* (Rahuma *et al.*, 2008). De la misma manera los ácidos esteárico, oléico y palmítico disuaden la oviposición de *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Guo y Li, 2009).

Los ácidos linoléico y palmítico, que mostraron efecto insectistático e insecticida en esta investigación, contienen 18 y 16 átomos de carbono, lo cual está acorde con lo que enuncian Li e Ishikawa (2004 y 2005) y Guo y Li (2009): los ácidos grasos con 16 y 18 átomos de carbono presentan actividad contra insectos. Los ácidos linoléico y esteárico, con 18 átomos de carbono y con 47.76 y 1.73% del total de los componentes del EHH en esta investigación, probablemente tengan actividad insectistática e insecticida contra *S. frugiperda* entre las concentraciones de 16 y 1,600 ppm, sin embargo, no fue posible obtener el ácido linoléico para llevar a cabo las pruebas biológica.

#### 7.4 Contenido de ricinina en hoja y bagazo de semilla de *R. communis*, su efectividad en *S. frugiperda*.

Del extracto metanólico de hoja de *R. communis* se obtuvieron 0.00142% de cristales de color blanco y 0.02233% del extracto metanólico del bagazo de semillas de la misma planta. La pureza de estos cristales se llevó a cabo por HPLC, además se les determinó el punto de fusión, IR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR.

El punto de fusión observado fue de 203-204°C, el cual diverge al reportado por Melo *et al.* (2009) de 200-201°C para la ricinina, lo que puede atribuirse a diferente calibración del equipo.

IR (KBr)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C}\equiv\text{N}$  (2,217.17  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{N}-\text{C}$  (2,906.06  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\text{C}=\text{O}$  (1,631.95  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 3), lo cual concuerda con lo reportado por Sule y Sani (2008) para la ricinina.

$^{13}\text{C}$  NMR (Figura 4),  $\delta$  (ppm): 39.500 (NMe), 56.723 (OMe), 77.532 (C-3), 113.487 (CN), 144.140 (C-6), 160.483 (C-2) y 171.684 (C-4), lo que coincide con lo reportado por Cazal y colaboradores (2009) para la ricinina.

La prueba con  $^1\text{H}$  NMR (Figura 5),  $\delta$  (ppm): 7.76 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, H-6), 6.22 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, H-5), 4.017 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ) y d 3.532 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ), que son similares a los reportados por Skursky y colaboradores (1969) (Figura 6) y Cazal y colaboradores (2009) para este alcaloide.

En HPLC la ricinina comercial mostró un tiempo de retención de 5.088 min y la obtenida del extracto metanólico del bagazo de semillas de *R. communis* fue de 5.043 min (Figura 7); Olaifa y colaboradores (1991), reportaron para el alcaloide un tiempo de retención menor, sin embargo, esto se debió a que utilizaron una columna

preparativa, con un flujo  $10 \text{ mL min}^{-1}$ , mientras que en este trabajo se trabajó con columna analítica con  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ .

Por otro lado, al realizar la correlación de las áreas bajo la curva del EMH y cuatro concentraciones conocidas de ricinina comercial (Cuadro 10) se obtuvo la curva de calibración con una linealidad de 0.996, que permitió cuantificar el contenido de ricinina en el EMH;  $0.0463 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Cuadro 10. Area bajo la curva de cuatro concentraciones de ricinina comercial y del EMH.

Ricinina ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Área bajo la curva*
2.0	270,113,973.3
0.2	35,746,011.3
0.02	5,333,586.7
0.002	2,129,872.5
EMH	6,246,674

\* Valores promedio de tres inyecciones realizadas para cada concentración.

La cuantificación del contenido de ricinina en el EMH es posible, dada la particularidad y posibilidad de emplear este alcaloide como marcador, para poder realizar la determinación de un compuesto activo con un método analítico, lo cual es un requisito que marca la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), para insecticidas botánicos.



Figura 3. IR de los cristales obtenidos de hojas de *R. communis*.

Espectro IR Ricinina F5

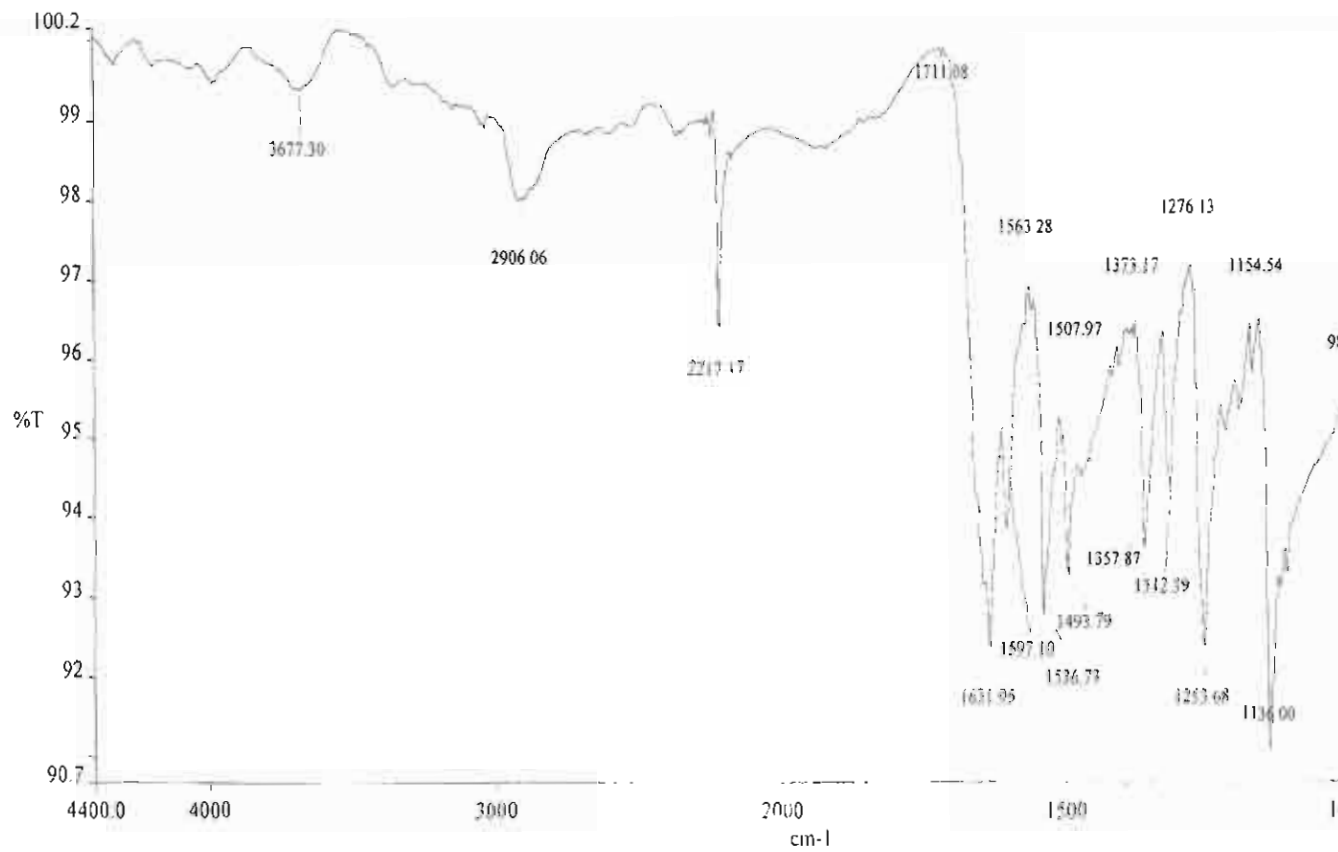


Figura 4.  $^{13}\text{C}$ RMN de los cristales obtenidos de hojas de *R. communis*.

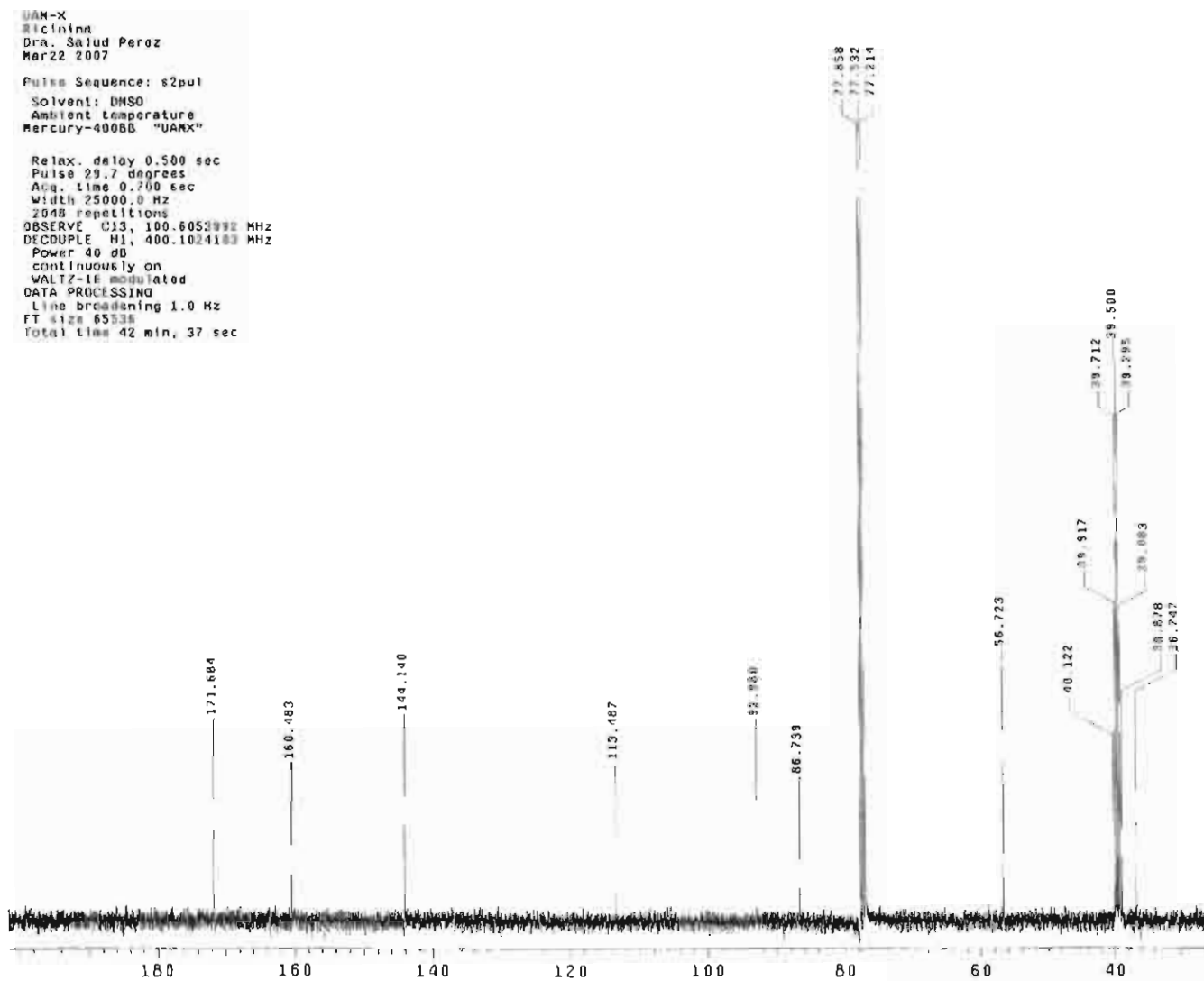


Figura 5. <sup>1</sup>HRMN de los cristales obtenidos de hojas de *R. communis*.

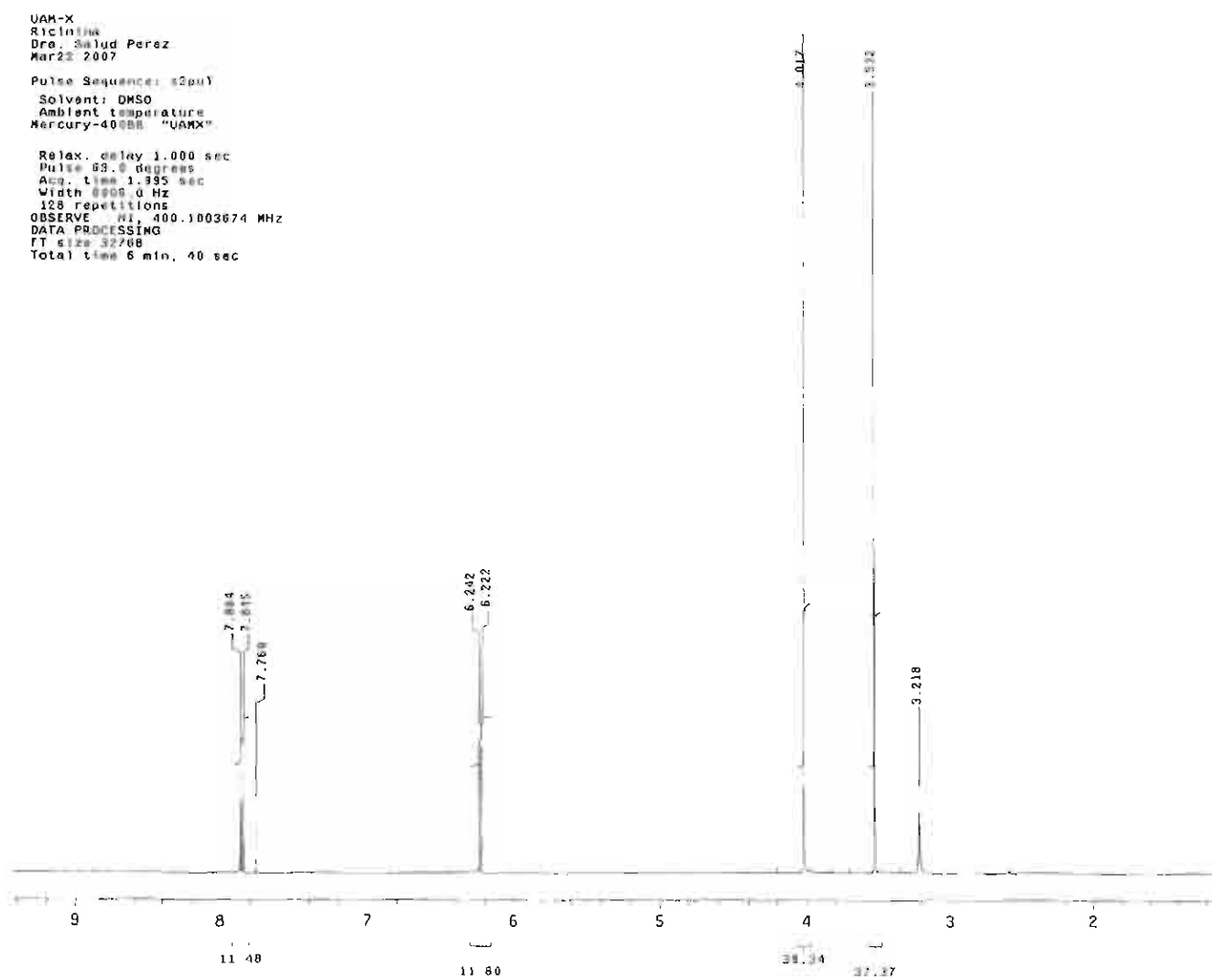
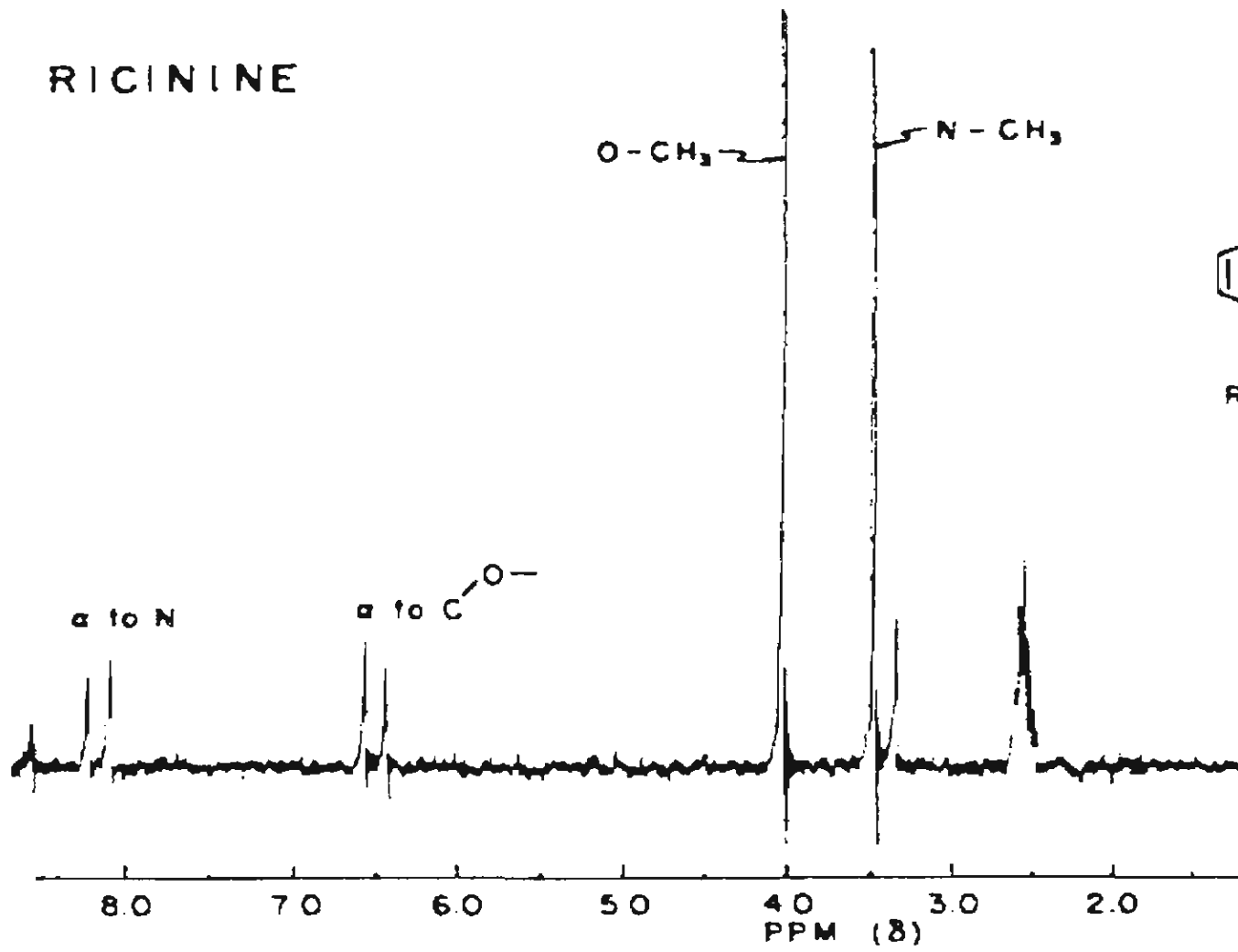


Figura 6. <sup>1</sup>HRMN de ricinina aislada por Skursky y colaboradores (1969).



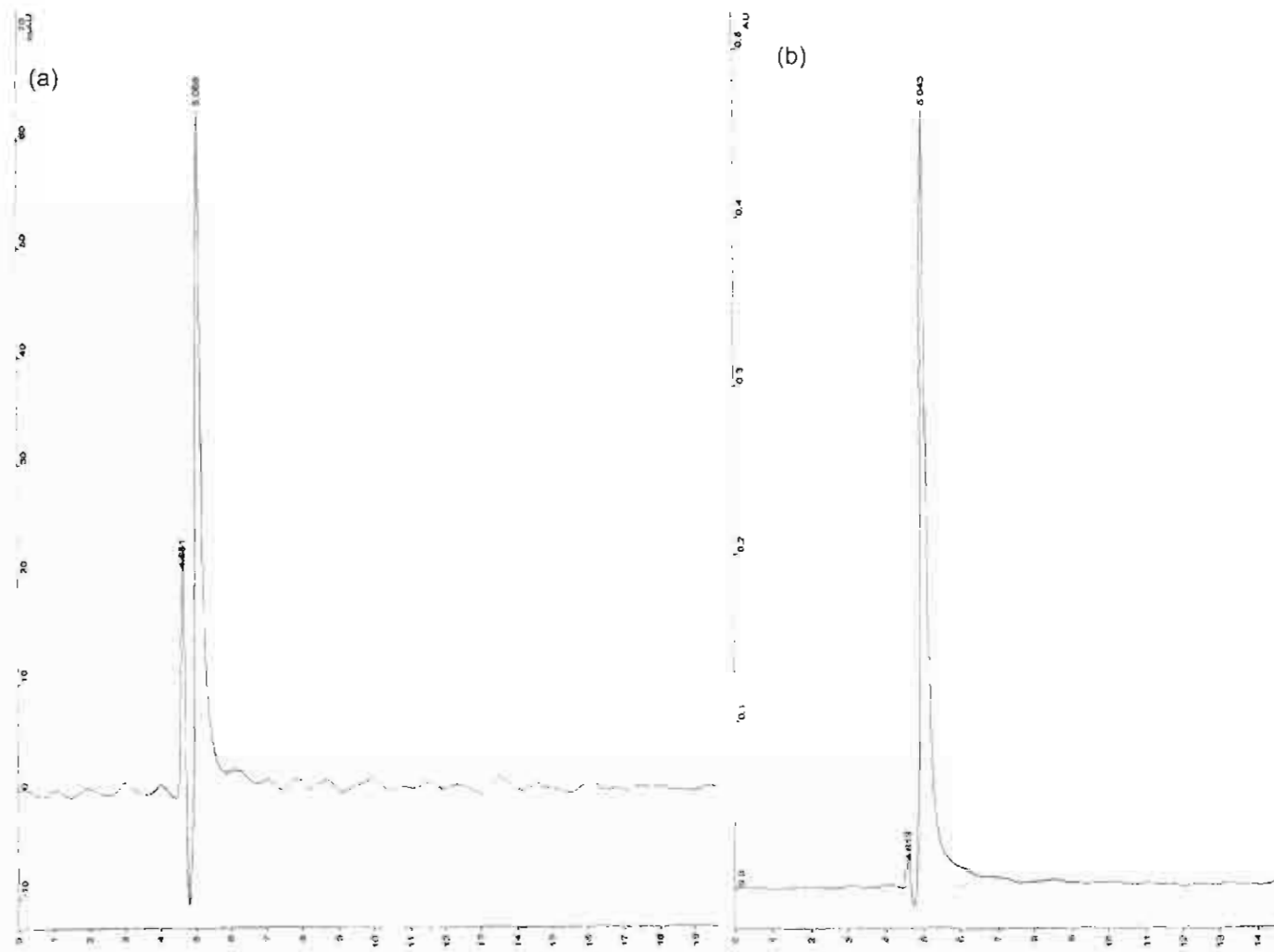


Figura 7. Cromatogramas de los cristales aislados del bagazo de semilla de *R. communis* y de ricinina comercial (b).

La COFEPRIS (2010) pide en su formato COFEPRIS-06-007, indicar el contenido mínimo y máximo de ingrediente activo expresado en porcentaje masa-masa y su equivalente  $\text{g Kg}^{-1}$  ó  $\text{g L}^{-1}$ . En este extracto el contenido de ricinina fue de 0.000059 y 0.000463% ó  $0.0059 \text{ g Kg}^{-1}$  ó  $0.0463 \text{ g Kg}^{-1}$ .

Respecto a la efectividad de este alcaloide en el desarrollo de larva y pupa de gusano cogollero *S. frugiperda* los resultados, obtenidos tanto en la fase preliminar (Apéndice, 10.1.4) como en la segunda evaluación (Cuadro 11) que correlaciona de manera más directa concentración y efectividad, muestran que a partir de 16 ó 112 ppm se inhibió el crecimiento y a 160 ppm se inhibió el desarrollo (pupal) y la alimentación, y además se disminuyeron las viabilidades larval y pupal.

Cuadro 11. Duración y viabilidad larval y pupal y peso de pupa de *S. frugiperda* con ricinina incorporada a la dieta artificial.

Concen (ppm)	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	-	-	0**	-	-
9,600	-	-	0**	-	-
1,600	-	-	0**	-	-
560	37.7 ±1.4*	14.3 ±0.5*	45.8 ±4.0*	54.5 ±8.3*	195.6 ±8.3*
160	30.2 ±0.7*	13.1 ±0.3*	62.5 ±6.3*	60 ±11.1*	222.3 ±5.0*
112	26.7 ±0.7*	12.8 ±0.2	79.2 ±4.0	78.9 ±8.1	241.4 ±4.5
16	23.9 ±0.5	12.3 ±0.2	87.5 ±4.0	85.7 ±5.8	248.2 ±4.7
0	23.6 ±0.4	12.2 ±0.2	91.7 ±4.9	90.1 ±4.9	249.6 ±4.4
VL <sub>50</sub>	0.38×10 <sup>3</sup> ppm				
CV	20.0	11.7	27.3	28.0	8.3

Los valores son promedio de 24 repeticiones ± error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en consideración en el análisis estadístico; \* diferencias significativas respecto al testigo  $P < 0.001$ ; CV= Coeficiente de Variación.

En general, cuando las larvas ingirieron 9,600; 1,600 ó 380 ppm de ricinina en la dieta sobrevivieron 0, 0-12.5 y 50% al término de su período.

En otras investigaciones, la ricinina adicionada a la dieta artificial inhibe el crecimiento y actúa como larvicida contra el gusano soldado *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (Rizwan *et al.*, 2009), y también actúa como insecticida en *M. persicae* (Olaifa *et al.*, 1991), *T. vaporariorum* (Ramos-López, 2006) y *A. sexdens rubropilosa* (Bigi *et al.*, 2004).

### 7.5 Toxicidad oral en ratones del EMH.

Las DL<sub>50</sub>, obtenidas en las pruebas de toxicidad aguda oral, del EMH de *R. communis*, son de 1,077.5 y 1,546 mg Kg<sup>-1</sup> para machos y hembras suizos de la cepa CD 1, con peso entre 20-26 g (Cuadro 12), con promedio de toxicidad de 1,311.75 mg Kg<sup>-1</sup> en ambos sexos.

Cuadro 12. Mortalidad y DL<sub>50</sub> para ratón macho y hembra con el EMH de *R. communis*.

Dosis (mg Kg <sup>-1</sup> )	Mortalidad en machos (%)	Mortalidad en hembras (%)
200	0	0
400	0	0
800	30	0
1600	70	60
2000	100	80
Control	0	0
DL <sub>50</sub>	1,077.5 mg Kg <sup>-1</sup>	1,546 mg Kg <sup>-1</sup>

Sin embargo, este valor es inferior al que reporta Ferraz y colaboradores (1999), que es de 3,000 mg del extracto de pericarpio por 1 Kg de ratones machos suizos con peso de 20 a 30 g, valor que varió probablemente porque se utilizaron cepas diferentes y a la diferencia de peso de los ratones entre uno y otro experimento; así como a la concentración de ricinina que se encontró en cada variable agronómica utilizada de *R. communis*, así como de las condiciones ambientales en que se encontró la planta e incluso de la época del año.

Acorde a la SEMARNAT (2004), una sustancia sólida con actividad insecticida es ligeramente tóxica si presenta valor superior a 500 mg Kg<sup>-1</sup>, esta categoría de clasificación es la menos tóxica, y con base en ésta el EMH de *R. communis*, es ligeramente tóxico al ratón suizo de la cepa CD 1, por ende a mamíferos, por lo que puede emplearse como alternativa para el control de *S. frugiperda*.



## 8 CONCLUSIONES.

- Los extractos de hojas y semillas de *R. communis* presentaron actividad insectistática e insecticida en el desarrollo de larvas y pupas de *S. frugiperda*.
- La mayor actividad insecticida de los extractos evaluados, la presentó el extracto metanólico de semillas de *R. communis*.
- El efecto insecticida más evidente de todos los tratamientos evaluados, lo presentó la ricinina.
- El aceite de ricino, ácido linoléico, ácido palmítico y ricinina son responsables de la actividad insecticida e insectistática de *R. communis* contra *S. frugiperda*.
- Es factible el uso de la ricinina como marcador para realizar la cuantificación para una estandarización del extracto metanólico de hojas de *R. communis*.
- El extracto metanólico de hojas de *R. communis* es ligeramente tóxico y puede emplearse como alternativa para el manejo de *S. frugiperda*.

## 9 LITERATURA CITADA.

- Achaya KT, Craig BM, and Youngs CG. 1964. The component fatty acids and glycerides of castor oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 41: 783-784.
- Andrews KL. 1988. Latin american research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Flor. Entomol.* 71. 630-53.
- AOAC. 1990. Association of Official Agricultural Chemists AOAC. Official methods of analysis (963.33), 15th ed., Vol. 2. AOAC. 1p.
- Aouinty B, Outara S, Mellouki F, and Mahari S. 2006. Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*R. communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2): 67-71.
- Arana E, Sánchez J, Peferoen M, Güereca L, and Bravo A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Araya-González JA, Sánchez-Arroyo H, Lagunes-Tejeda A, y Mota-Sánchez D. 1996. Control de plagas de maíz y frijol almacenado mediante polvos minerales y vegetales. *Agrociencia (México)* 30(2):223-31.
- Atsmon D. 1989. Castor. *In: Robbelen G, and Downey K. (eds) Oil crops of the world.* McGraw-Hill. Nueva York. 544 p.

- Babarinde SA, Pitan OOR, and Lyiola FA. 2008. A prescreen of termicidal potentials of aerial parts of castor *Ricinus communis*, (Euphorbiaceae). *J. Entomol.* 5: 218-23.
- Bafor M, Smith MA, Jonsson L, Stobart K, and Stymne S. 1991. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *J. Biochem.* 280: 507-14.
- Batabyal L, Sharma P, Mohan L, Maurya P, and Srivastava CN. 2007. Larvicidal efficiency of certain seed extracts against *Anopheles stephensi*, with reference to *Azadirachta indica*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 10: 251-5
- Bergvinson DJ, y Kumar H. 1997. Cría masiva de insectos en el laboratorio de entomología del CIMMYT (*Diatrea grandiosella*, SWCB; *D. saccharalis*, SBC; *Spodoptera frugiperda*, FAW y *Helicoverpa zea*, CEW). In: Annual Research Progress Report 1996, Maize Entomology. CIMMYT. México. Appendice 7.
- Bigi M, Torkomian V, de Groote S, Hebling M, Bueno O, Pagnocca F, Fernandes J, Vieira P, and Silva F. 2004. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gogylophorus*. *Pest. Manag. Sci.* 60: 933-8.
- Broun P, and Somerville C. 1997. Accumulation of ricinoleic, lesquerolic, and densipolic acids in seeds of transgenic arabidopsis plants that express a fatty acyl hydroxylase cDNA from castor bean. *Plant. Physiol.* 113: 933-42.

- Bugguide. 2010. Bugguide.net. 2010. Iowa State University: <http://bugguide.net/node/view/15740>. 15/01/2010
- Caffarini P, Carrizo P, Pelicano A, Roggero P, and Pacheco J. 2008. Efectos de extractos acetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (Ricino), *Melia azedarach* (Paraíso) y *Trichillia glauca* (Trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundí*). IDIESA. 26: 59-64.
- Cazal CM, Batalhao VC, Domingues VC, Bueno OC, Filho ER, Forim MR, Silva MFGF, Vieira PC, and Fernandes. 2009. High-speed countercurrent chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. J. Chromatogr A. 1216(19): 4290-4.
- COFEPRIS. 2010. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. <http://201.147.97.103/work/sites/cfp/resources/LocalContent/1467/2/PLAFEST.pdf> 03/07/2010.
- Collavino M, Pelicano A, y Giménez RA. 2005. Actividad insecticida de *Ricinus communis* L. sobre *Plodia interpunctella* HBN. (Lepidoptera: Phycitinae). Rev. FCA. XXXVIII: 13-8.
- Coto AD. 1997. Lepidoptera en cultivos anuales perenes: Manual de reconocimiento. CATIE, San José, Costa Rica. 43 p.
- Cuadra VD. 1981. *Ricinus communis* L. Ariperspectos. investigación en química aplicada (Folleto). Saltillo, Coahuila, México. 4p.
- Darby SM, Miller ML, and Allen RO. 2001. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. J. Forensic. Sci. 46: 1033-42.

- Delwiche LD, and Slaughter SJ. 2002. The little SAS book: A primer. 2<sup>nd</sup> ed. SAS, Institute, Inc., Cary NC. USA.
- Dhawan AK, Mohindru B, and Singh K. 2008. Impact of castor as a trap crop in relation to major insect pest in cotton agroecosystem. Indian J. Ecol. 35: 70-2.
- DLE. 2001. Diccionario de la Lengua Española DEL. Real Academia Española. 22<sup>a</sup> Edición.
- Elimam AM, Elmalik KH, and Ali FS. 2009. Larvicidal, adult emergence inhibition and oviposition deterrent effects of foliage extract from *Ricinus communis* L against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in Sudan. Tropical Biomed. 26: 130-9.
- Essery J, Juby P, Marion L, and Trumbull E. 1963. The origin of carbon atoms 4, 5, and 6, of ricinine. Can. J. Chem. 41: 1142-50.
- Fernández JL. 2002. Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 17: 467-74.
- Ferraz AC, Angelucci MEM, Costa ML, Batista IR, Oliveira B, and Cunha C. 1999. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. Pharm. Biochem. Beha. 63: 367-75.
- García-Mateos R, Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, y Soto-Hernández M. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. Rev. Fitotec. Mex. 27: 297-303.

- González-Coloma A, Reina M, Medinaveitia A, Guadaño A, Alva A, Grandez M, Díaz R, Gavín JA, and de la Fuente G. 2004. Structural diversity and defensive properties of norditerpenoid alkaloids. *J. Chem. Ecol.* 30(7): 1393-408.
- Gottlieb O, Borin RMB, and Brito NR. 2002. Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality? *Phytochemistry* 60: 145-52
- Guo L, and Li GQ. 2009. Olfactory perception of oviposition deterring fatty acids and their methyl esters by the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *J. Insect. Sci.* 9: 67-75.
- Harborne B, and Baxter H. 1995. *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* Taylor y Francis.
- Herrera OJ. 1997. Estrategia de manejo integrado para el control de *Trialeurodes vaporariorum* West. (Homoptera: Aleyrodidae) en calabacita (*Cucurbita pepo*) en Morelos. Informe general de Servicio Social de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México. 74p.
- Hsuan C, and Koh C. 1978. Crystalline ricin D, a toxic anti-tumor lectin from seeds of *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.* 253: 2061-66.
- Isman MB. 1997. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica* 25: 339-44.
- Kang S, Cordell G, Soejarto D, and Fong H. 1985. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. *J. Nat. Prod.* 155-6.
- Kim BK. 1995. Quantification of castor bean allergen in castor meal by rocket immunoelectrophoresis. *Food. Sci. Biotechnol.* 4: 98-100.

- Kim BK. 2001. Effects of oil milling steps on residual toxin and antigen activities of castor bean meal. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 305-10.
- Koul O, Isman M, and Ketkar C. 1990. Properties and uses of neem *Azadiracta indica*. *Can. J. Bot.* 68: 1-11.
- Kumar H, and Mihm JA. 2002. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), Southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage and grain yield of four maize hybrids in relation to four tillage system. *Crop. Protec.* 21: 121-8.
- Lagarto A, Tillán J, Bueno V, Chávez I, Vega Y, Valdés O, y Gabilondo T. 2005. Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Toxicol.* 22: 175-9.
- Leite AC, Cabral EC, Santos DA, Fernandes J, Vieira PC, y Silva MF. 2005. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente. *Quim. Nova.* 28: 983-5.
- Levinson HZ, and Levinson AR. 1973. Insectistatic action of the lipidantagonist ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate. *Naturwissenschaften.* 60: 156.
- Li GQ, and Ishikawa Y. 2004. Oviposition deterrents in larval frass of four *Ostrinia* species fed on an artificial diet. *J. Chem. Ecol.* 30: 1445-56.
- Li GQ, and Ishikawa Y. 2005. Oviposition deterrents from the egg masses of adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* and Asian corn borer, *O. furnacalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 115: 401-7.

- López-Olguín JF, Aragón A, y Lagunes TA. 1994. Ensayos en laboratorio con extractos acuosos vegetales contra *S. frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Boletín de la ARIFF 1: 11-19.
- Marenco J, Foster E, and Sanchez A. 1992. Sweet corn response to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) damage during vegetative growth. J. Econ. Entomol. 85:1285-92.
- Mareggiani G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. Man. Inte. Plag. 60: 22-30.
- Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. 1ª reimpresión. Fondo de Cultura Económica. México.
- Melo CC, Raquel BJ, Cássia DV, Corrêa BO, Rodrigues FE, Forim MR, Fernandes SMFG, Vieira PC and Batista FJ. 2009. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. J. Chroma. 1216: 4290-4.
- Merck Index. 1981. Enciclopedia of Chemicals and Drugs. Merck and Company, 11ª Ed. Nueva York. 1901 p.
- Mise T, Funatsu G, Ishiguro M, and Funatsu M. 1977. Isolation and characterization of ricin E from castor beans. Agric. Biol. Chem. 41: 2041-46.
- Molina J, Carpenter J, Heinrichs E, and Foster J. 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an inventory. Flor. Entomol. 86: 254-89.



- Murua MG, Virla EG, y Defagó V. 2003. Evaluación de cuatro dietas para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Bol. San. Veg. Plagas. 29: 43-51.
- Mushobozy DM, Nganilevanu G, Ruheza S, and Swella GB. 2009. Plant oils as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed protectants against infestations by the mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). J. Plant Protection Res. 49: 35-40.
- Olaifa J, Matsumura F, Zeevaart J, Mullin C, and Charalambous P. 1991. Lethal amounts of ricinine in green peach aphids (*Myzus persicae*) (Suzler) fed on castor bean plants. Plant. Scien. 73: 253-6.
- Ortega CAA. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía práctica para su identificación en el campo. CIMMYT. Texcoco. Estado de México. 106 p.
- Pacheco I, Castro F, Paula D, Lourenção A, Bolonhezi S, and Barbieri M. 1995. Efficacy of soybean and castor oils in the control of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus phaseoli* (Gyllenhal) in stored chick-peas (*Cicer arietinum* L.). J. Stored Prod. Res. 31: 221-8.
- Pascual VM. 1995. El ricino (*Ricinus communis* L.) un cultivo oleaginoso de utilización no alimentaria, estudios agronómicos y varietales. Invest. Agri. Produc. Protec. Veg. 10: 385-99.
- Rahuma AA, Venkatesa P, and Gopalakrishnem G. 2008. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. Parasitol. Res. 103: 1383-90.

- Rajapakse RSH, and Senanayake SGJN. 1997. Effectiveness of seven vegetable oils against *Callosobruchus chinensis* L. in pigeon pea *Cajanus cajan* L. Entomon 22: 179-83.
- Ramos-López MA. 2006. Actividad de *Ricinus communis* L. frente a mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae), Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 87p.
- Ramsewak RS, Nair MG, Murugesan S, Mattson WJ, and Zasada J. 2001. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. J. Agric. Food. Chem. 49: 5852-6.
- Raymond M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit por micro-ordinateur. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol. 23: 117-21.
- Reddy VS, Babu TR, Husaini SH, and Reddy BM. 1994. Effect of edible and no-edible oils on the development of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. and on viability of mungbean seeds. Pest Manag. Econ. Zool. 2: 15-17.
- Reyes M. 1991. Estudio fitoquímico del alcaloide ricinina, otros usos del aceite de ricino y del bagazo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 106p.
- Rizwan HM, Bo HQ, Ying HM, Shen LQ, and Li ZW. 2009. Biological impact of harmaline, ricinina and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest Sci. 82: 327-34.

- Rodríguez-Hernández C. 2005. Plantas contra plagas 2: epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuierilla y sabadilla. CP, RAPAM, RAPAAL, SOMAS e ITAT. 1ª ed. Texcoco, México. 209 p.
- Rodríguez-Hernández C. 2001. Plantas contra plagas. Potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. RAPAM. UAM-X. Texcoco, México. 133 p
- Rodríguez-Hernández C, y Vendramim JD. 1996. Toxicidad de extractos de meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Man. Integ. Plag. 42: 14-22.
- Rodríguez-Hernández C, y Vendramim JD. 1998. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de extractos de meliaceas sobre *Spodoptera frugiperda*. Man. Integ. Plag. 48: 11-8.
- Ruíz-Mesia L, García-Sánchez RN, Ruíz-Mesia W, Rengifo-Salgado E, Reina M, Martínez R, Inés C, Guadaño A, and González-Coloma A. 2005. Bioactive cinchona alkaloids from *Remijia peruviana*. *J. Agri. Food. Chem.* 53: 1921-6.
- Salas J, y Hernández G. 1985. Protección de semillas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) contra el ataque de *Acanthoscelides obtectus* y *Callosobruchus maculatus* a través del uso de aceites vegetales. *Agro. Trop.* 35: 19-27.
- Saxena RC. 1986. Antifeedants in Tropical Pest Management. *Insect Sci. Applic.* 8: 731-6.
- SCFI. 1993. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial SCFI. NOM-008-SCFI-1993. Sistema General de Unidades de Medida. Diario Oficial de la Federación. 14-10-1993. <http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/SistemadeunidadesSI>.

NORMAOFICIALMEX.008\_164.pdf 20/02/2010.

SEMARNAT. 2004. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales

SEMARNAT. Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. Diario Oficial de la Federación 28 de diciembre de 2004.

Serratos J. 1993. Análisis genético de algunas características bioquímicas y estructurales del grano de maíz (*Zea mays*) y su relación con la resistencia a la infestación de *Sitophilus zeamais* (Motssch). Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, México. 134p.

Singh VN, Pandey ND, y Singh YP. 1994. Effectiveness of vegetable oils on the development of *Callosobruchus chinensis* Linn. Infesting stored gram. Indian J. Entomol. 56: 216:9

Skursky L, Burleson D, and Waller G. 1969. Interconversion of ricinine and N-demethylricinine in senescent and green castor plant leaves. J. Biol. Chem. 244: 3238-42.

Smith M, Moon H, Chowrira G, and Kunst L. 2003. Heterologous expression of a fatty acid hydroxylase gene in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. Planta. 217: 507-16.

Sparks A. 1979. A review of the biology of the fall armyworm. Flor. Entomol. 62: 82-7.

- Sule MI, and Sani UM. 2008. Isolation of ricinine from methanol extracts of three different seed varieties of *Ricinus communis* Linn (Euphorbiaceae). Nig. J. Pharm. Sci. 7: 114-8.
- Tinzaara W, Tushemereirwe W, Nankinga CK, Gold CS, and Kashaija I. 2006. The potential of using botanical insecticides for the control of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). Afr. J. Biotechnol. 5: 1994-8.
- Tropicos. 2010. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org>. SaintLouis, Missouri, USA. 22/01/2010.
- Upanasi SM, Kotkar HM, Mendki PS, and Maheshwari VL. 2003. Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids. Pest Manag. Sci. 59: 1349-54.
- Vasant RA, and Narasimhacharya AVR. 2008. An investigation of the termiticidal effects of certain weed plants. J. Pure Applied. Sci. 16: 1-8.
- Villa CMM, y Catalán VEA. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de construcción. Folia Entomol. Mexic. 43: 307-12
- Waller G, y Henderson L. 1961. Biosynthesis of the pyridine ring of ricinine. J. Biol. Chem. 236: 1186-91.
- Waller G, y Skursky L. 1972. Translocation and metabolism of ricinine in the castor bean plant, *Ricinus communis* L. Plant. Physiol. 50: 622-6.

Ware W, and Whitaker M. 2004. An introduction to insecticides (4th edition), *In*: Ware G, y Whitaker M. (eds). *The Pesticide Book*. 6 Ed. Thomson Publications, Fresno, California.

Willink E, Osorio VM, y Costilla MA. 1993. Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. *Rev. Ind. y Agric. Tucumán* 70: 49-52.

Yuldashev P. 2001. Ricinine and its transformations. *Chem. Nat. Comp.* 37: 274-5.

## 10 APÉNDICE 1.

### 10.1.1. Efecto preliminar de ocho extractos de *R. communis* contra *S. frugiperda*.

Cuadro 13. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EAH y EAS de *R. communis*.

EAH					
Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	29.5 ±0.5*	12.4 ±0.2	49 ±2.5*	71.3 ±2.5*	228.1 ±2.3*
1,600	24.1 ±0.5*	12.4 ±0.2	82 ±3.4*	78.7 ±3.7*	237.3 ±2.9*
160	21.8 ±0.2	12.4 ±0.1	96 ±2.5	88.3 ±2.5	248.0 ±2.1
16	21.5 ±0.2	12.3 ±0.1	96 ±2.5	95.7 ±4.5	248.1 ±2.2
1.6	21.5 ±0.2	12.3 ±0.1	97 ±2.5	95.7 ±3.2	249.3 ±2.4
0.16	21.3 ±0.2	12.2 ±0.1	97 ±3.7	95.7 ±7.1	250.5 ±2.6
0.016	21.3 ±0.2	12.2 ±0.1	97 ±3.7	96.8 ±3.7	252.1 ±2.5
0	21.3 ±0.1	12.2 ±0.1	98 ±2.0	96.8 ±3.7	252.1 ±2.9
CV	15.8	9.4	24.1	30.6	10.1
EAS					
16,000	32.7 ±0.8*	14.1 ±0.3*	45 ±3.7*	35.8 ±3.7*	211.6 ±6.4*
1,600	29.7 ±0.5*	13.1 ±0.1*	68 ±2.5*	61.1 ±4.0*	228.7 ±4.6*
160	27.6 ±0.4*	12.4 ±0.1	79 ±3.7*	75.8 ±3.7*	240.9 ±4.0
16	25.3 ±0.3*	12.2 ±0.1	92 ±2.5	90.5 ±3.7	242.5 ±4.0
1.6	24.9 ±0.2*	12.1 ±0.1	95 ±3.2	94.7 ±5.5	242.8 ±4.1
0.16	23.9 ±0.2	12.1 ±0.1	95 ±4.5	94.7 ±4.5	243.0 ±3.1
0.016	23.4 ±0.2	12.0 ±0.1	95 ±4.5	95.8 ±3.7	244.0 ±3.0
0	23.3 ±0.2	12.0 ±0.1	95 ±4.5	95.8 ±3.2	244.8 ±3.8
CV	15.1	10.9	21.0	26.4	15.4

Los valores son el promedio de 100 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \* diferencias significativas respecto al testigo  $P < 0.001$ ; CV= Coeficiente de Variabilidad.

Cuadro 14. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EMH y EMS de *R. communis*.

<b>EMH</b>					
Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	29.2 ±0.9*	13.2 ±0.2*	49 ±3.7*	77.6 ±3.0*	198.6 ±6.9*
1,600	26.8 ±0.4*	12.5 ±0.1*	82 ±4.0*	90.2 ±5.8*	221.1 ±3.8*
160	22.6 ±0.3*	12.3 ±0.1	96 ±4.0	98.9 ±4.5	246.7 ±2.7
16	21.6 ±0.2	12.2 ±0.1	96 ±3.7	98.9 ±4.5	248.7 ±2.4
1.6	21.4 ±0.3	12.2 ±0.1	97 ±3.0	98.9 ±4.0	249.2 ±3.3
0.16	21.3 ±0.2	12.2 ±0.1	97 ±2.5	98.9 ±3.7	249.5 ±2.9
0.016	21.2 ±0.2	12.0 ±0.1	97 ±2.5	98.9 ±3.7	249.7 ±3.0
0	21.0 ±0.2	11.8 ±0.1	98 ±2.4	98.9 ±2.5	250.1 ±3.0
CV	12.5	9.2	18.4	23.4	12.8
<b>EMS</b>					
16,000	-	-	0**	-	-
1,600	35.6 ±0.9	13.6 ±0.3	18 ±2.5**	38.9 ±5.1	177.9 ±3.9
160	28.0 ±0.3*	12.5 ±0.2*	81 ±3.7*	65.4 ±5.1*	226.6 ±3.42*
16	24.4 ±0.3*	12.1 ±0.1	88 ±4.0*	90.9 ±4.5	253.4 ±2.9
1.6	23.5 ±0.2	11.9 ±0.1	92 ±3.0	93.5 ±5.8	254.1 ±3.0
0.16	23.4 ±0.2	11.9 ±0.1	93 ±4.0	94.6 ±3.7	255.5 ±2.9
0.016	23.0 ±0.3	11.8 ±0.1	97 ±2.5	94.8 ±9.3	256.4 ±2.9
0	22.7 ±0.2	11.8 ±0.1	97 ±2.5	94.8 ±8.1	256.6 ±2.6
CV	12.5	9.9	7.6	17.3	11.8

Los valores son el promedio de 100 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en cuenta en el análisis; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.



Cuadro 15. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EAEH y EAES de *R. communis*.

<b>EAEH</b>					
Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	31.9 ±0.9	13.0 ±0.2	29 ±4.0 **	69.0 ±4.5	204.7 ±2.9
1,600	26.1 ±0.5*	12.5 ±0.2	59 ±3.7*	81.4 ±4.0*	217.5 ±4.8*
160	25.5 ±0.3*	12.0 ±0.1	88 ±4.0	94.3 ±4.0	236.8 ±2.7*
16	24.4 ±0.3	12.0 ±0.1	94 ±4.9	96.8 ±5.8	244.1 ±2.6
1.6	24.0 ±0.4	11.9 ±0.1	97 ±2.5	96.9 ±4.9	247.2 ±2.4
0.16	23.4 ±0.3	11.9 ±0.1	97 ±3.0	97.9 ±4.5	248.0 ±2.6
0.016	23.3 ±0.3	11.9 ±0.1	97 ±4.0	96.9 ±4.9	248.6 ±2.5
0	23.3 ±0.3	11.9 ±0.1	97 ±3.0	97.9 ±4.5	248.8 ±2.4
CV	13.0	8.9	14.9	19.5	11.3
<b>EAES</b>					
16,000	37.1 ±0.9	13.5 ±0.43	12 ±5.5**	50.0 ±7.1	177.3 ±5.5
1,600	28.7 ±0.5*	12.4 ±0.2	65 ±3.0*	76.9 ±2.0*	230.0 ±2.4*
160	26.6 ±0.3*	12.2 ±0.1	83 ±3.7*	92.8 ±5.1	245.6 ±2.3
16	26.0 ±0.3*	12.0 ±0.1	89 ±4.0	95.5 ±7.1	249.3 ±2.3
1.6	24.4 ±0.2*	12.0 ±0.1	94 ±3.7	95.7 ±5.5	251.0 ±2.9
0.16	24.4 ±0.3*	12.0 ±0.1	95 ±4.5	96.8 ±6.8	251.9 ±2.6
0.016	23.1 ±0.2	11.9 ±0.1	95 ±3.7	97.9 ±2.0	253.1 ±2.7
0	23.1 ±0.3	11.9 ±0.1	95 ±4.0	97.9 ±3.7	253.3 ±2.9
CV	12.6	8.8	12.7	18.1	10.2

Los valores son el promedio de 100 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en cuenta en el análisis; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.

Cuadro 16. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa de *S. frugiperda* con EHH y EHS de *R. communis*.

<b>EHH</b>					
Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	27.2 ±0.4*	12.9 ±0.1*	54 ±2.0*	83.3 ±4.5*	212.9 ±3.7*
1,600	25.5 ±0.4*	12.5 ±0.1	83 ±2.5*	91.6 ±4.9	224.9 ±3.5*
160	22.2 ±0.3	12.2 ±0.1	96 ±2.0	98.9 ±3.2	242.4 ±3.6
16	22.1 ±0.3	12.2 ±0.1	98 ±3.0	98.9 ±2.5	243.5 ±3.1
1.6	21.9 ±0.3	12.1 ±0.1	98 ±2.5	98.9 ±3.0	244.0 ±2.8
0.16	21.7 ±0.2	12.1 ±0.1	98 ±2.5	98.9 ±3.0	245.2 ±3.4
0.016	21.5 ±0.2	12.1 ±0.1	98 ±2.5	98.9 ±2.5	245.5 ±2.4
0	21.3 ±0.2	12.1 ±0.1	99 ±2.0	98.9 ±2.0	246.2 ±2.7
CV	11.8	8.5	16.6	20.5	12.4
<b>EHS</b>					
16 000	32.3 ±0.6*	12.6 ±0.3*	46 ±4.0*	71.7 ±3.0*	211.8 ±3.8*
1 600	26.9 ±0.3*	12.4 ±0.2	79 ±4.0*	87.3 ±4.0*	234.1 ±3.3*
160	25.1 ±0.2*	11.8 ±0.1	86 ±3.7*	95.3 ±3.0	246.3 ±2.7
16	24.2 ±0.2*	11.6 ±0.1	90 ±4.5	96.7 ±3.0	249.3 ±3.7
1.6	23.4 ±0.2*	11.6 ±0.1	93 ±3.0	96.8 ±3.2	250.5 ±3.4
0.16	23.1 ±0.3	11.6 ±0.1	95 ±4.5	96.8 ±3.0	251.5 ±3.7
0.016	22.3 ±0.2	11.6 ±0.1	96 ±5.0	96.9 ±2.5	252.3 ±2.7
0	22.2 ±0.2	11.6 ±0.1	96 ±5.0	96.9 ±3.0	252.3 ±3.8
CV	14.6	10.4	19.4	24.7	13.5

Los valores son el promedio de 100 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.

10.1.2. Efecto preliminar del aceite de ricino contra *S. frugiperda*.

Cuadro 17. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con aceite de ricino.

Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	33.7 ±0.7	-	10.0±4.5**	0	133.0 ±8.3
1,600	27.3 ±0.2*	13.0 ±0.3*	64 ±4.0*	59.1 ±5.0*	221.1 ±3.7*
160	24.7 ±0.2*	12.6 ±0.2	75 ±3.2*	74.2 ±4.0*	241.4 ±3.4
16	23.5 ±0.2*	12.2 ±0.2	90 ±3.2	92.5 ±3.7	243.5 ±3.5
1.6	22.7 ±0.2	12.1 ±0.2	93 ±3.0	95.7 ±3.7	243.6 ±3.7
0.16	22.4 ±0.2	12.1 ±0.1	93 ±6.0	95.7 ±2.0	244.1 ±3.1
0.016	22.3 ±0.2	12.0 ±0.1	93 ±2.5	96.8 ±3.2	244.4 ±3.2
0	22.1 ±0.2	12.0 ±0.1	93 ±4.0	96.8 ±5.0	244.7 ±3.2
CV	10.4	11.6	13.4	16.6	13.4

Los valores son el promedio de 100 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en cuenta en el análisis; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.

### 10.1.3. Efecto preliminar de los ácidos linoléico y palmítico contra *S. frugiperda*.

Cuadro 18. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con los ácidos linoléico y palmítico.

<b>Ácido linoléico</b>					
Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
1,600	31.1 ±0.9*	13.0 ±0.3*	45.8 ±7.8*	72.7 ±5.2*	148.6 ±8.3*
160	29.8 ±0.7*	12.6 ±0.3	62.5 ±5.6*	80 ±4.3*	221.2 ±6.4*
16	24.8 ±0.4*	12.4 ±0.3	83.3 ±11.8	90 ±3.0	248.7 ±4.3
1.6	23.6 ±0.3	12.4 ±0.2	83.3 ±11.5	90 ±2.2	252.5 ±3.5
0.16	23.4 ±0.3	12.2 ±0.2	91.7 ±5.2	90.1 ±2.8	255.4 ±4.1
0.016	23.2 ±0.2	12.1 ±0.2	91.7 ±4.8	90.1 ±2.8	256.9 ±4.6
0.0016	23.1 ±0.2	12.1 ±0.2	91.7 ±4.8	95.5 ±2.0	258.3 ±3.8
0	23.1 ±0.2	12.1 ±0.1	91.7 ±5.2	95.5 ±2.0	259.6 ±3.7
CV	29.2	18.1	21.3	22.6	24.7
<b>Ácido palmítico</b>					
1,600	35.3 ±1.1*	13.2 ±0.4*	33.3 ±10.6*	62.5 ±8.3*	129.3 ±12.8*
160	30.7 ±0.6*	12.8 ±0.3*	54.2 ±6.7*	76.9 ±5.0*	216.2 ±6.7*
16	25.1 ±0.3*	12.5 ±0.2	70.8 ±14.2	88.2 ±3.7	236.3 ±3.4*
1.6	24.0 ±0.3	12.4 ±0.2	83.3 ±8.8	90 ±2.2	241.5 ±3.5
0.16	23.7 ±0.3	12.2 ±0.2	83.3 ±11.5	90 ±3.0	244.1 ±3.7
0.016	23.5 ±0.2	12.2 ±0.2	83.3 ±11.8	95 ±2.2	248.6 ±3.1
0.0016	23.3 ±0.2	12.1 ±0.1	91.7 ±4.8	95.5 ±2.0	249.4 ±3.4
0	23.3 ±0.3	12.0 ±0.1	91.7 ±5.2	95.5 ±2.0	250.5 ±3.2
CV	32.9	19.5	27.7	24.6	27.1

Los valores son el promedio de 24 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.

10.1.4. Efecto preliminar de ricinina contra *S. frugiperda*.

Cuadro 19. Resultados preliminares de la duración y viabilidad de larva y pupa, y peso de pupa con ricinina.

Concen ppm	Duración (d)		Viabilidad (%)		Peso pupal (mg)
	Larval	Pupal	Larval	Pupal	
16,000	-	-	0**	-	-
1,600	40.7 ±2.9	15	12.5 ±4.2**	33.3	135.0 ±4.2
160	33.5 ±1.5*	14.0 ±0.2*	54.2 ±10.5*	69.2 ±14.0*	215.3 ±1.6*
16	25.6 ±0.3*	13.1 ±0.2	87.5 ±4.2	85.7 ±4.8	234.7 ±4.0
1.6	24.1 ±0.9	12.9 ±0.2	87.5 ±8.0	90.5 ±5.3	237.1 ±2.5
0.16	23.0 ±0.5	12.7 ±0.1	91.7 ±4.8	90.9 ±5.3	241.5 ±2.7
0.016	22.5 ±0.6	12.4 ±0.1	91.7 ±4.8	95.5 ±4.2	243.6 ±3.4
0	22.5 ±0.3	12.3 ±0.2	91.7 ±4.8	95.5 ±4.2	244.0 ±4.5
CV	17.0	5.0	4.5	21.5	17.7

Los valores son el promedio de 24 replicas ±error estándar; Concen= Concentración; \*\* valor no tomado en cuenta en el análisis; \* diferencias significativas respecto al testigo P< 0.001; CV= Coeficiente de Variabilidad.

Full Length Research Paper

## Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

M. A. Ramos-López<sup>1\*</sup>, S. Pérez G.<sup>2</sup>, C. Rodríguez-Hernández<sup>3</sup>, P. Guevara-Fefer<sup>4</sup> and M. A. Zavala-Sánchez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Edificio A, II piso, Area de posgrados de CBS, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D.F., CP. 04960.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D.F., CP. 04960.

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillos Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Edo. Mex, CP 56230.

<sup>4</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Universidad 3000, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D. F., CP 04510.

Accepted 19 January, 2010

One of the most studied plant species with insecticidal properties is the castor bean *Ricinus communis*. However, its activity against *Spodoptera frugiperda* is unclear. Therefore, to determine the insecticidal and insectistatic activities of methanol, hexane and ethyl acetate extracts of the seeds and leaves of *R. communis*, castor oil and ricinine were tested at different concentrations against *S. frugiperda*. This study demonstrated for the first time, that the castor oil and ricinine are active ingredients of *R. communis* that acts against *S. frugiperda* and that each of the seed extracts exhibited better insecticidal and insectistatic activity than the leaf extracts. The half maximum larvae viability concentration (LVC<sub>50</sub>) were  $0.38 \times 10^3$  ppm for the ricinine,  $0.75 \times 10^3$  ppm for a methanol extract of seeds,  $1.97 \times 10^3$  ppm for an ethyl acetate seed extract,  $2.69 \times 10^3$  ppm for the castor oil,  $4.83 \times 10^3$  ppm for a methanol extract of leaves,  $5.07 \times 10^3$  ppm for an ethyl acetate extract of leaves,  $9.95 \times 10^3$  ppm for a hexane extract of seeds and  $10.01 \times 10^3$  ppm for a hexane extract of leaves.

**Key words:** *Ricinus communis*, *Spodoptera frugiperda*, insecticidal, insectistatic, castor oil, ricinine.

### INTRODUCTION

Insects represent one of the major causes of crop and grain loss worldwide (Ferry et al., 2004). Synthetic chemical pesticides have been the most widely adopted method for field and post-harvest protection of crops against insect pests; however, there are many problems associated with the extensive use of these compounds, such as build-up of pesticide resistance, negative impact on natural enemies,

in addition to negative environmental and health impacts. These facts, combined with consumer demand for residue-free food and the increasingly stringent environmental regulations governing pesticide use (Isman, 2000), have resulted in renewed interest by agrochemical companies in the development and use of plants and their natural products for pest management.

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) has been identified as a polyphagous insect and several pest of many crops (Sparks, 1979) especially maize in Latin America (Andrews, 1988); yield reductions in maize due to feeding of the *S. frugiperda* have been reported as high as 34% (Cruz et al., 1996).

*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), the castor bean, has been used to control insect pests in several crops. Aqueous castor bean leaf extract has been shown

\*Corresponding author. E-mail: [agronyke@yahoo.com](mailto:agronyke@yahoo.com). Tel/Fax: +52 (55) 54 83 74 10.

Abbreviations: MeOH, Methanol; Hx, hexane; AcoEt, ethylacetate; Sd, seed extract; Lf, leaf extract; CO, castor oil; Ric, ricinine; VC, variability coefficient; LVC<sub>50</sub>, half maximum larvae viability concentration; ANOVA, analysis of variance.

1360 Afr. J. Biotechnol.

to possess insecticidal activity against *Glossobrochus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) (Upasani et al., 2003), *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) (Tinzaara et al., 2006), *Culex pipiens*, *Aedes caspius*, *Culiseta longiareolata* and *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) (Aouinty et al., 2006); whereas amethanolic leaf extract had insecticidal activity against *C. chinensis* (Upasani et al., 2003). In addition, both aqueous and acetone leaf extracts had different activity against *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae) (Caffarini et al., 2008). Castor oil had insecticidal activity against *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Mushobozy et al., 2009). Furthermore, Rodríguez-Hernández (2005) found that the aerial parts also had insecticidal activity against the same insect in a corn crop and because *S. frugiperda* represents a pest of many crops (Kumar and Mihm 2002; Molina et al., 2003), it has been used as a model species for testing for the insecticidal and insectistatic activities of many plants (Céspedes et al., 2005).

Earlier studies of aerial parts of this plant have reported the presence of ricinine (Kang et al., 1985; Leite et al., 2005), N-demefilricinine (Skursky et al., 1969; Kang et al., 1985), six flavonoids: glycosides kaempferol-3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercetin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O- $\beta$ -rutinoside, quercetin-3-O- $\beta$ -rutinoside (Kang et al., 1985), as well as gallic acid, gentistic acid and rutin (Chen et al., 2008). Also, it was found that the seeds contain castor oil (Achaya et al., 1964; Kim, 2001), ricin (Achaya et al., 1964; Darby et al., 2001), the protein allergens Ric c 1 and Ric c 3 (Bashir et al., 1998; Pantoja-Uceda et al., 2003) and ricinine (Bashir et al., 1998; Yudalshev, 2001). In the present study, the activity of methanol (MeOH), hexane (Hx), ethyl acetate (AcoEt) extracts of seeds (MeOH-Sd; Hx-Sd; AcoEt-Sd respectively) and leaves (MeOH-Lf; Hx-Lf; AcoEt-Lf, respectively) of *R. communis*, as well as castor oil (CO) and ricinine (Ric) were evaluated against *S. frugiperda*.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Seeds and leaves of *R. communis* were collected in Ecatepec de Morelos, State of México, México, in December, 2007. Species identity was authenticated by Stephen D. Koch (Ph.D) and a voucher (CHAPA-001) was deposited in the Herbario-Hortorio of Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Leaves and seeds of the plant were dried in the shade.

### Extracts preparation

Dried and powdered leaves or seeds (1 kg) were extracted with hexane (3.0 L) under reflux for 4 h. The extracts were then filtered. The leaf or seed were extracted with methanol or ethyl acetate (3.0 L). The extracts were filtered and the solvents removed under reduced pressure using a rotary evaporator. The yields of the

extracts were: Hx-Sd, 373.1 g; Hx-Lf, 21.1 g; MeOH-Sd, 233.8 g; MeOH-Lf, 98.2 g; AcoEt-Sd, 286.2 g; AcoEt-Lf, 83.3 g.

### Isolation of ricinine

Dried and powdered leaves or seeds of *R. communis* (4 kg) were extracted with Hx (12 L), then was filtered and extracted with MeOH (12 L). The solvent was evaporated and the residue was chromatographed on silica gel (70-230 mesh) and eluted with chloroform, increasing the polarity with methanol. Fourteen (14) fractions were obtained according to the technique of Kang et al. (1985). Fractions 7, 8 and 9 produced a white solid (0.0013% to leaves and 0.022% to seeds), which was chromatographed again.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (ppm) 7.76 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, H-6), 6.22 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz, H-5), 4.02 (s, 3H, 230 CH3O) and d 3.53 (s, 3H, CH3N).

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (ppm): 36.75 (NMe), 56.72 (OMe), 86.74 (C-3), 113.49 (CN), 144.14 (C-6), 160.48 (C-2), 171.68 (C-4).

### Insects

First instar larvae of *S. frugiperda* were obtained from the Entomology Laboratory of International Maize and Wheat Improvement Center, "El Batán", Texcoco, State of México, México.

### Artificial diet

1 Kg of artificial diet were prepared with: yeast 40 g, lepidopteran diet (Product # F0635S.W. Corn Borer, Bio-Serv, Canada) 60 g, powdered maize 100 g, sterile maize ear 20 g, neomycin sulphate 6 g, vitamin mix fortification lepidoptera, Bio-Serv 10 g, sorbic acid 1.7 g, methyl p-hydroxybenzoate 1.7 g, agar 10 g, formaldehyde 2.5 ml, ethanol 17 ml, distilled water 800 ml. All the components were mixed (Bergvinson and Kumar, 1997).

### Bioassay

Groups of 100 larvae were randomly selected for bioassays to each concentration. Preliminary screening of MeOH, Hx, AcoEt extracts from seeds and leaves, CO and Ric were carried out at seven concentrations ranging from 0.016 to 24,000 ppm; each extract was mixed with the larval diet ingredients during preparation. Based on preliminary screening results, all of the extracts were subjected to concentration-response bioassays for insecticidal or insectistatic activities against *S. frugiperda*. Samples of seven concentrations ranging from 16 to 16,000 ppm were used for CO, Ric, MeOH-Sd, AcoEt-Sd and AcoEt-Lf; whereas concentrations ranging from 160 to 24,000 ppm were used for MeOH-Lf, Hx-Sd and Hx-Lf. Each treatment utilized a negative control diet; media were poured into 100 acrylic glasses (Bio-Serv N° 9051) that were left solidify at room temperature for 24 h. First instar *S. frugiperda* larvae were then transferred individually and the glasses were closed with a top (Bio-Serv N° 9049). All samples were maintained at  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  relative humidity and 14/10 h light/dark. The pupae were weighed 24 h after pupation and then moved to another glass for development to the adult stage. The following parameters were evaluated: the length of the larval and pupal period; the larval and pupal viability, as well as the pupal weights at 24 h. According to Rodríguez-Hernández and Vendramim (1996), extension of the larval phase by a treatment is termed "growing inhibition", extension of the pupae phase duration is termed "developing inhibition" and reduction of pupal weight (relative to the control) is termed "feeding inhibition". The half maximum viability larvae concentration (VLC<sub>50</sub>) represents the concentration at which 50% of the larvae lived during all larvae phase.

**Table 1.** Mean ( $\pm$  SE) larvae and pupae duration, larvae and pupae viability and pupae weight of *S. frugiperda* with methanol extract of the seeds and leaves (MeOH-Sd; MeOH-Lf) of *R. communis*.

Concentration (ppm)	Duration (d)		Viability (%)		Pupae weight (mg)
	Larvae	Pupae	larvae	Pupae	
<b>MeOH-Sd</b>					
Control	22.6 $\pm$ 0.20 d	12.1 $\pm$ 0.09 b	94 $\pm$ 1.87 a	95.7 $\pm$ 1.08 a	235.0 $\pm$ 2.63 a
16	22.7 $\pm$ 0.21 d	12.3 $\pm$ 0.08 b	94 $\pm$ 1.87 a	95.7 $\pm$ 1.97 a	234.4 $\pm$ 2.63 a
112	23.1 $\pm$ 0.22 cd	12.3 $\pm$ 0.09 b	93 $\pm$ 1.23 a	95.7 $\pm$ 2.06 a	233.0 $\pm$ 3.10 a
160	23.9 $\pm$ 0.23 bc	12.3 $\pm$ 0.10 b	90 $\pm$ 1.58 a	95.6 $\pm$ 2.08 a	228.7 $\pm$ 2.61 a
560	24.7 $\pm$ 0.27 b	12.5 $\pm$ 0.12 ab	75 $\pm$ 2.74 b	94.1 $\pm$ 2.11 a	226.8 $\pm$ 2.67 a
1 600	27.4 $\pm$ 0.55 a	12.9 $\pm$ 0.23 a	36 $\pm$ 1.87 c	76.9 $\pm$ 2.21 b	209.5 $\pm$ 3.75 b
9 600	&	#	0*	0*	#
16 000	&	#	0*	0*	#
**LVC <sub>50</sub>			0.75 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	10.8	7.5	26.9	6.5	11.5
<b>MeOH-Lf</b>					
Control	20.5 $\pm$ 0.38 d	11.5 $\pm$ 0.12 b	96 $\pm$ 1.87 d	96.9 $\pm$ 1.30 a	233.0 $\pm$ 3.13 a
160	22.0 $\pm$ 0.41 cd	11.5 $\pm$ 0.11 b	96 $\pm$ 1.87 d	96.9 $\pm$ 2.09 a	227.4 $\pm$ 2.80 ab
560	22.2 $\pm$ 0.48 c	11.6 $\pm$ 0.12 b	94 $\pm$ 1.87 d	95.7 $\pm$ 1.07 a	225.9 $\pm$ 2.77 ab
1 600	27.0 $\pm$ 0.47 b	11.7 $\pm$ 0.16 ab	79 $\pm$ 1.87 c	83.5 $\pm$ 2.58 b	219.2 $\pm$ 2.75 bc
4 000	29.2 $\pm$ 0.44 a	11.8 $\pm$ 0.16 ab	70 $\pm$ 1.58 b	81.4 $\pm$ 1.53 b	217.7 $\pm$ 2.99 bc
8 000	30.0 $\pm$ 0.44 a	12.3 $\pm$ 0.19 a	54 $\pm$ 1.87 a	59.3 $\pm$ 2.50 c	211.3 $\pm$ 3.16 c
16 000	32.7 $\pm$ 0.80	13.3 $\pm$ 0.34	37 $\pm$ 2.00 *	40.0 $\pm$ 1.51	198.0 $\pm$ 4.49
24 000	&	#	0*	0*	#
**LVC <sub>50</sub>			4.83 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	21.9	9.9	20.1	16.9	12.3

\*Values were not used in statistical analysis; & = Not one of the individuals completed its larval stage; # = There were no pupae; VC = Variability coefficient; \*\*LVC<sub>50</sub> was calculated with the larvae mortality; different letters represent statistically significant differences; SE = standard error of mean.

### Statistical analysis

For statistical analyses, one way ANOVA analysis and (0.05%) TUKEY test with SAS software (Dehniche and Slaughter, 2002). The half maximum viability larvae concentration (LVC<sub>50</sub>) was calculated using Probit program (Raymond, 1985).

### RESULTS

In the experiments of insecticidal activity, the activity of the methanol seeds and leaves extracts are summarized in Table 1. The MeOH-Sd produced 0% larvae viability at concentrations ranging from 16,000 and 9,600 ppm; at concentrations of 1,600 and 560 ppm, larval viability rates were 36 and 75%. With this extract, pupal viability was 76.9% at 1,600 ppm. A larval viability rate of 0% was achieved with MeOH-Lf at a concentration of 24,000 ppm. At concentrations of 16,000, 8,000 and 4,000 ppm, the larval viability rates were 37, 54 and 70%, respectively; whereas the pupal viability rates at 16,000, 8,000, 4,000 and 1,600 ppm were 40, 59.3, 81.4 and 83.5%, respectively. Hx-Sd caused 11, 43, 65, 73 and 79% larval viability at concentrations of 24,000, 16,000, 9,600, 4,000 and 1,600 ppm, respectively; whereas at concentrations

of 24,000 and 16,000 ppm, were observed 54.5 and 88.4% pupal viability. With Hx-Lf, the larval viability rates were 19, 46 and 76% at concentration of 24,000, 16,000 and 9,600 ppm, respectively; whereas the pupal viability was 68.4% at a concentration of 24,000 ppm (Table 2). The rates of larval viability with AcoEt-Sd were 11, 19 and 60% at 16,000, 9,600 and 1,600 ppm, respectively; the pupal viability rates were 54.5 and 78.9% at concentrations of 16,000 and 9,600 ppm, respectively. AcoEt-Lf caused 34, 50 and 64% larval viability at concentrations of 16,000, 9,600 and 1,600 ppm, respectively, and 16,000 ppm resulted in 85.3% pupal viability (Table 3). A larval viability rate of 0% was achieved with CO at a concentration of 16,000 ppm and at concentrations of 9,600, 1,600 and 560 ppm, the larval viability rates were 45, 69 and 80%, respectively; whereas the pupal viability rates at 9,600 ppm was 88.9%. The Ric caused 0% larvae viability at concentrations ranging from 1,600 to 16,000 ppm; at concentrations of 560 and 160 ppm, larval viability rates were 44 and 60%, and pupal viability was 54.5% at 560 ppm (Table 4).

In the experiment of insectistatic activity, the MeOH-Sd treatment at 1,600 ppm showed growing inhibition and developing inhibition of *S. frugiperda*: it prolonged the



**Table 2.** Mean ( $\pm$  SE) larvae and pupae duration, and viability and pupae weight of *S. frugiperda* with hexane extract of the seeds and leaves (Hx-Sd; Hx-Lf) of *R. communis*.

Concentration (ppm)	Duration (d)		Viability (%)		Pupae weight (mg)
	Larvae	Pupae	Larvae	Pupae	
<b>Hx-Sd</b>					
Control	22.8 $\pm$ 0.23 f	12.1 $\pm$ 0.11 b	92 $\pm$ 2.55 a	97.8 $\pm$ 1.26 a	230.1 $\pm$ 2.30 a
160	23.6 $\pm$ 0.22 ef	12.1 $\pm$ 0.10 b	90 $\pm$ 2.74 ab	96.7 $\pm$ 2.03 a	230.1 $\pm$ 2.30 a
560	24.6 $\pm$ 0.30 de	12.2 $\pm$ 0.11 ab	85 $\pm$ 2.24 ab	96.5 $\pm$ 1.48 a	229.0 $\pm$ 2.40 a
1 600	25.7 $\pm$ 0.34 cd	12.2 $\pm$ 0.12 ab	79 $\pm$ 4.00 bc	94.9 $\pm$ 1.45 ab	225.3 $\pm$ 2.50 ab
4 000	26.5 $\pm$ 0.43 c	12.3 $\pm$ 0.14 ab	73 $\pm$ 2.55 cd	94.5 $\pm$ 0.25 abc	222.7 $\pm$ 2.80 ab
9 600	28.1 $\pm$ 0.43 b	12.4 $\pm$ 0.14 ab	65 $\pm$ 3.54 d	92.3 $\pm$ 1.33 bc	217.8 $\pm$ 2.79 b
16 000	30.1 $\pm$ 0.51 a	12.7 $\pm$ 0.17 a	43 $\pm$ 2.00 e	88.4 $\pm$ 3.21 c	214.2 $\pm$ 4.00 b
24 000	31.6 $\pm$ 0.86*	13.2 $\pm$ 0.48*	11 $\pm$ 1.00 *	54.5 $\pm$ 3.33*	210.5 $\pm$ 3.00*
**LVC <sub>50</sub>			9.95 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	14.2	8.6	22.7	16.9	10.3
<b>Hx-Lf</b>					
Control	21.6 $\pm$ 0.18 e	12.1 $\pm$ 0.12 a	93 $\pm$ 3.00 a	97.8 $\pm$ 1.23 a	238.4 $\pm$ 3.06 a
160	21.9 $\pm$ 0.25 de	12.1 $\pm$ 0.15 a	92 $\pm$ 2.55 a	97.8 $\pm$ 1.30 a	237.8 $\pm$ 2.87 a
560	22.1 $\pm$ 0.21 de	12.2 $\pm$ 0.14 a	92 $\pm$ 3.00 a	97.8 $\pm$ 1.34 a	234.4 $\pm$ 3.16 ab
1 600	22.6 $\pm$ 0.24 cd	12.3 $\pm$ 0.13 a	88 $\pm$ 2.55 ab	97.7 $\pm$ 2.11 a	229.3 $\pm$ 3.53 ab
4 000	23.1 $\pm$ 0.25 c	12.3 $\pm$ 0.13 a	88 $\pm$ 2.55 ab	96.6 $\pm$ 2.12 a	226.6 $\pm$ 3.02 ab
9 600	24.5 $\pm$ 0.27 ab	12.4 $\pm$ 0.12 a	76 $\pm$ 2.45 b	96.1 $\pm$ 2.50 a	223.1 $\pm$ 3.02 bc
16 000	25.6 $\pm$ 0.41 a	12.5 $\pm$ 0.15 a	46 $\pm$ 2.92 c	89.1 $\pm$ 3.22 a	219.1 $\pm$ 4.14 bc
24 000	27.1 $\pm$ 0.51*	13.1 $\pm$ 0.24*	19 $\pm$ 1.87 *	68.4 $\pm$ 2.86*	211.3 $\pm$ 6.43*
**LVC <sub>50</sub>			10.01 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	11.1	10.0	20.5	5.3	12.9

\*Values were not used in statistical analysis; VC = Variability coefficient; \*\*LVC<sub>50</sub> was calculated with the larvae mortality; different letters represent statistically significant differences; SE = standard error of mean.

larval and pupal phases to 4.8 d and 0.8 d, at the same concentration; the treatment also resulted in feeding inhibition because the pupae weighed was only 89.1% of the control group. MeOH-Lf caused growing inhibition (in the larval phase) to increase to 12.2, 9.5, 8.7, 6.5 and 1.7 d at 16,000, 8,000, 4,000, 1,600 and 560 ppm, respectively, and developing inhibition increased the pupal phase to 1.8 and 0.8 d at 16,000 and 8,000 ppm. The weights were inhibited by 15, 9.3, 6.6 and 5.9% compared to the control at 16,000, 8,000, 4,000 and 1,600 ppm, respectively (Table 1). Hx-Sd resulted in growing inhibition at 24,000, 16,000, 9,600, 4,000, 1,600 and 560 ppm, prolonging the larval phase to 8.8, 7.3, 5.3, 3.7, 2.9 and 1.8 d, respectively. Development inhibition increased the pupal phase to 1.1 and 0.6 d and feeding inhibition because the weight reached 91.5, 93.1 and 94.7% compared with the control weight at 24,000, 16,000 and 9,600 ppm, respectively. Hx-Lf increased the larval phase to 5.5, 4.0, 2.9, 1.5 and 1 d at 24,000, 16,000, 9,600, 4,000 and 1,600 ppm, respectively, and the pupal phase was extended 1 d at 24,000 ppm. Hx-Lf caused feeding inhibition to reach 88.6, 91.9 and 93.6% of the weight compared with the control at 24,000, 16,000 and 9,600 ppm, respectively (Table 2). AcoEt-Sd increased the larval phase to 11.1, 8.4, 4.1, 1.9 and 1.5 d

at 16,000, 9,600, 1,600, 560 and 160 ppm, respectively; the extract increased the pupal phase to 1.5 and 0.8 d at 16,000 and 9,600 ppm. The pupal weights were 76.9, 89.7 and 95% at 16,000, 9,600 and 1,600 ppm, respectively. AcoEt-Lf increased the larval phase to 7.5, 5.4, 3.9, 2.5 and 1.9 d at 16 000, 9 600, 1 600, 560 and 160 ppm, respectively; whereas the pupal phase was increased to 0.9 d at 16,000 ppm and the pupal weights were 88.6, 91.1 and 95.9% of the control (Table 3). CO resulted in growing inhibition at 9,600, 1,600 and 560 ppm, prolonging the larval phase to 3.8, 2.8 and 1.7 d, respectively. Development inhibition increased the pupal phase to 0.8 d at 9,600 ppm and weight was 89.9 and 91% of the control weight at 9,600 and 1,600 ppm. Ric increased the larval phase to 14.1, 6.6 and 3.1 d at 560, 160 and 112 ppm, respectively and the pupal phase was extended 2.1 d at 560 ppm. It caused feeding inhibition because the weight was only 78.4 and 89.1% of the control weight at 560 and 160 ppm (Table 4).

## DISCUSSION

Mushobozy et al. (2009) demonstrated that castor oil had

**Table 3.** Mean ( $\pm$  SE) larvae and pupae duration, larvae and pupae viability and pupae weight of *S. frugiperda* with ethyl acetate extract of the seeds and leaves (AcoEt-Sd; AcoEt-Lf) of *R. communis*.

Concentration (ppm)	Duration (d)		Viability (%)		Pupae weight (mg)
	Larvae	Pupae	Larvae	Pupae	
<b>AcoEt-Sd</b>					
Control	22.4 $\pm$ 0.21 c	12.0 $\pm$ 0.10 a	93 $\pm$ 1.26 a	97.8 $\pm$ 1.33 a	249.4 $\pm$ 2.73 a
16	22.6 $\pm$ 0.21 c	12.1 $\pm$ 0.09 a	93 $\pm$ 2.00 a	96.7 $\pm$ 1.32 a	248.0 $\pm$ 2.42 ab
112	22.8 $\pm$ 0.23 c	12.1 $\pm$ 0.09 a	90 $\pm$ 3.54 a	96.7 $\pm$ 1.35 a	246.9 $\pm$ 2.80 ab
160	23.9 $\pm$ 0.31 b	12.2 $\pm$ 0.10 a	86 $\pm$ 1.87 a	95.3 $\pm$ 1.17 a	244.0 $\pm$ 2.72 ab
560	24.3 $\pm$ 0.27 b	12.2 $\pm$ 0.11 a	85 $\pm$ 2.24 a	95.3 $\pm$ 2.21 a	242.1 $\pm$ 2.59 ab
1 600	26.5 $\pm$ 0.27 a	12.5 $\pm$ 0.12 a	60 $\pm$ 3.54 b	91.7 $\pm$ 2.46 a	237.0 $\pm$ 2.44 b
9 600	30.8 $\pm$ 0.61*	12.8 $\pm$ 0.18*	19 $\pm$ 1.87*	78.9 $\pm$ 5.59*	223.7 $\pm$ 4.15*
16 000	33.5 $\pm$ 0.99*	13.5 $\pm$ 0.43*	11 $\pm$ 1.0*	54.5 $\pm$ 3.33*	191.7 $\pm$ 3.26*
**LVC <sub>50</sub>			1.97 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	11.1	7.5	15.0	4.1	9.8
<b>AcoEt-Lf</b>					
Control	23.0 $\pm$ 0.22 f	12.1 $\pm$ 0.12 b	94 $\pm$ 1.87 a	97.9 $\pm$ 1.33 a	238.7 $\pm$ 2.32 a
16	23.4 $\pm$ 0.23 f	12.1 $\pm$ 0.11 b	93 $\pm$ 2.55 a	96.8 $\pm$ 1.33 a	238.7 $\pm$ 2.44 a
112	23.9 $\pm$ 0.23 ef	12.1 $\pm$ 0.11 b	93 $\pm$ 2.92 a	96.8 $\pm$ 2.01 a	238.1 $\pm$ 2.54 a
160	24.9 $\pm$ 0.36 de	12.2 $\pm$ 0.13 b	89 $\pm$ 1.87 a	96.6 $\pm$ 1.40 a	235.5 $\pm$ 2.80 a
560	25.5 $\pm$ 0.40 cd	12.2 $\pm$ 0.11 b	88 $\pm$ 2.00 a	96.6 $\pm$ 1.42 a	233.6 $\pm$ 2.17 a
1 600	26.9 $\pm$ 0.46 bc	12.3 $\pm$ 0.13 ab	64 $\pm$ 1.87 b	93.8 $\pm$ 2.73 a	228.8 $\pm$ 3.48 ab
9 600	28.4 $\pm$ 0.54 b	12.6 $\pm$ 0.14 ab	50 $\pm$ 3.16 c	92.0 $\pm$ 2.42 a	217.4 $\pm$ 2.82 bc
16 000	30.5 $\pm$ 0.55 a	13.0 $\pm$ 0.20 a	34 $\pm$ 2.92 d	85.3 $\pm$ 2.22 b	211.6 $\pm$ 3.96 c
**LVC <sub>50</sub>			5.07 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	14.5	8.9	30.0	6.6	10.7

\*Not taken values to statistical analysis; VC = Variability coefficient; \*\*LVC<sub>50</sub> was calculated with the larvae mortality; different letters represent statistically significant differences; SE = standard error of mean.

insecticidal activity against *Z. subfasciatus*; moreover, ricinine had insecticidal activity against *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) (Olaifa et al., 1991) and *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) (Bigi et al., 2004).

Then the MeOH-Sd induced 0% larval viability at 16,000 and 9,600 ppm (LVC<sub>50</sub> 0.75  $\times$  10<sup>3</sup> ppm) and the insectistatic activity was evident beginning at 160 ppm. These facts suggest that the insecticidal and insectistatic activity of MeOH-Sd could be due to the castor oil and ricinine present on the seeds of *R. communis*. The insecticidal activity of Hx-Sd was low (LVC<sub>50</sub> 9.95  $\times$  10<sup>3</sup> ppm); it was shown only at concentrations of 560 ppm or higher and this activity might be due to castor oil, because ricinine is not soluble in hexane. AcoEt-Sd had an activity intermediate between MeOH-Sd and Hx-Sd (LVC<sub>50</sub> 1.97  $\times$  10<sup>3</sup> ppm); its insectistatic activity was detectable beginning from 160 ppm. This result might be due to the solubility of ricinine in AcoEt is lower than in MeOH and also that castor oil is present in this extract, so that this is the reason, the insecticidal effect of AcoEt-Sd is lower than MeOH-Sd.

The MeOH-Lf extract achieved 0% viability rate against larvae at 24,000 ppm (LVC<sub>50</sub> 4.83  $\times$  10<sup>3</sup> ppm) and it had

insectistatic activity beginning at 560 ppm, which suggests that ricinine is the compound responsible for this activity; ricinine is also present in the leaf (Kang et al., 1985; Upanasi et al., 2003), but in minor concentration than in seed. Hx-Lf exhibited the lowest insecticidal activity (LVC<sub>50</sub> 10.01  $\times$  10<sup>3</sup> ppm), but had insectistatic activity beginning at 1,600 ppm. These results suggest that a compound other than ricinine is responsible for the observed insectistatic activity of these extracts because this alkaloid is not soluble in hexane. AcoEt-Lf had lower activity than MeOH-Lf (LVC<sub>50</sub> 5.07  $\times$  10<sup>3</sup> ppm) and its insectistatic activity was detectable beginning from 160 ppm; it is possible that this activity is due to ricinine because the solubility of the compound is lower in AcoEt than in MeOH. Thus, AcoEt-Lf had less ricinine than MeOH-Lf. When included in the diet of *S. frugiperda*, ricinine induced 0% larval viability at 16,000; 9,600 and 1,600 ppm (LVC<sub>50</sub> 0.38  $\times$  10<sup>3</sup> ppm) and the insectistatic activity was evident beginning at 112 ppm, then when the castor oil included, it induced 0% larval viability at 16,000 ppm (LVC<sub>50</sub> 2.69  $\times$  10<sup>3</sup> ppm) and the insectistatic activity was detectable at 560 ppm.

From our results we demonstrated for the first time, that the castor oil and ricinine are active ingredients of *R.*

1364 Afr. J. Biotechnol.

**Table 4.** Mean ( $\pm$  SE) larvae and pupae duration, larvae and pupae viability and pupae weight of *S. frugiperda* with castor oil (CO) and ricinine (Ric).

Concentration (ppm)	Duration (d)		Viability (%)		Pupae weight (mg)
	Larvae	Pupae	Larvae	Pupae	
<b>CO</b>					
Control	22.2 $\pm$ 0.14 d	12.1 $\pm$ 0.11 b	94 $\pm$ 2.45 a	97.8 $\pm$ 1.30 a	247.6 $\pm$ 2.78 a
16	22.4 $\pm$ 0.14 cd	12.1 $\pm$ 0.11 b	94 $\pm$ 1.87 a	97.8 $\pm$ 1.30 a	246.7 $\pm$ 2.37 a
112	22.8 $\pm$ 0.17 cd	12.2 $\pm$ 0.11 b	93 $\pm$ 2.00 a	97.8 $\pm$ 1.36 a	245.5 $\pm$ 2.68 a
160	23.3 $\pm$ 0.21 bc	12.3 $\pm$ 0.11 ab	88 $\pm$ 1.23 ab	97.7 $\pm$ 1.40 a	242.7 $\pm$ 3.04 a
560	23.9 $\pm$ 0.27 b	12.3 $\pm$ 0.10 ab	80 $\pm$ 3.16 b	96.3 $\pm$ 1.48 ab	238.2 $\pm$ 2.70 a
1 600	25.0 $\pm$ 0.31 a	12.6 $\pm$ 0.15 ab	69 $\pm$ 1.00 c	95.7 $\pm$ 1.75 ab	225.3 $\pm$ 2.83 b
9 600	26.0 $\pm$ 0.37 a	12.9 $\pm$ 0.18 a	45 $\pm$ 1.58 d	88.9 $\pm$ 3.20 b	222.7 $\pm$ 3.32 b
16 000	&	‡	0*	0*	‡
**LVC <sub>50</sub>			2.69 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	9.7	8.8	21.8	6.0	11.0
<b>Ric</b>					
Control	23.6 $\pm$ 0.44 d	12.2 $\pm$ 0.21 b	88 $\pm$ 4.90 a	90.1 $\pm$ 4.90 b	249.6 $\pm$ 4.43 a
16	23.9 $\pm$ 0.46 d	12.3 $\pm$ 0.20 b	84 $\pm$ 4.00 a	85.7 $\pm$ 5.79 b	248.2 $\pm$ 4.69 a
112	26.7 $\pm$ 0.74 c	12.8 $\pm$ 0.20 b	76 $\pm$ 4.00 ab	78.9 $\pm$ 8.08 ab	241.4 $\pm$ 4.46 ab
160	30.2 $\pm$ 0.74 b	13.1 $\pm$ 0.26 ab	60 $\pm$ 6.33 bc	60 $\pm$ 11.06 ab	222.3 $\pm$ 4.95 b
560	37.7 $\pm$ 1.42 a	14.3 $\pm$ 0.49 a	44 $\pm$ 4.00 c	54.5 $\pm$ 3.34 a	195.6 $\pm$ 8.29 c
1 600	&	‡	0*	0*	‡
9 600	&	‡	0*	0*	‡
16 000	&	‡	0*	0*	‡
**LVC <sub>50</sub>			0.38 $\times$ 10 <sup>3</sup>	ppm	
VC	20.0	11.7	27.3	28.0	8.3

\*Not taken values to statistical analysis; & = Not one of the individuals completed its larval stage; ‡ = There were no pupae  
VC = Variability coefficient; \*\*LVC<sub>50</sub> was calculated with the larvae mortality; different letters represent statistically significant differences; SE = standard error of mean.

*communis* that acts against *S. frugiperda* and that each of the seed extracts exhibited better insecticidal and insectistatic activity than the leaf extracts and corroborate that the insectistatic activity is the principal mode of action of *R. communis* against *S. frugiperda*, in accordance with Rodríguez-Hernández (2005). Continuity of this research is important and thus recommended, because the hexane extract of the leaves showed insecticidal and insectistatic activity against *S. frugiperda*; and the next step would be to isolate the active compounds from this extract, and thereafter standardize the extract with the highest activity.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the financial support of this research by the agreement PFP-200-93. We also thank the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) and especially Dr. Kevin Pixey for his support and facilitation of the research and Tec. Emiliano Gutiérrez reared the *S. frugiperda* used for this research.

**REFERENCES**

Achaya KT, Craig BM, Youngs CG (1984). The component fatty acids and glycerides of castor oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41: 783-784.  
 Andrews KL (1988). Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomol.* 71(4): 630-653.  
 Aouinty B, Outara S, Mellouki F, Mahari S (2006). Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetracis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés. *Culex pipiens* (Linne), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2): 67-71.  
 Bashir MEH, Hubatsch I, Leinenbach HP, Zeppezauer M, Parzani RC, Hussein IH (1998). Ricin c 1 and Ricin c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationship. *Int Arch. Allergy Immunol.* 115(1): 73-82.  
 Bergvinson DJ, Kumar H (1997). Cria masiva de insectos en el laboratorio de entomología del CIMMYT (*Diatrea grandiosella*, SWCB; *D. saccharalis*, SBC; *Spodoptera frugiperda*, FAW y *Helicoverpa zea*, CEW). In: Annual Research Progress Report 1996. Maize Entomology. Appendix 7. CIMMYT, Texcoco, México.  
 Bigi MF, Torkomian LV, Groote TCS, Hebling MJ, Bueno OC, Pagnocca FC, Fernandes BJ, Vieira CP, Silva MF (2004). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gogylophorus*. *Pest. Manage. Sci.* 60: 933-938.

- Caffarini P, Carrizo P, Pelicano A, Roggero P, Pacheco J (2008). Effects of acetonic and water extracts of *Ricinus communis*, *Melia azedarach* and *Trichilia glauca* on black common cutting ant (*Acromyrmex lundii*). IDESIA 26(1): 59-64.
- Céspedes CL, Salazar JR, Martínez M, Aranda E (2005). Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. Phytochemistry, 66: 2481-2493.
- Chen Z, Zhang J, Chen G (2008). Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. by capillary electrophoresis with amperometric detection. J. Chromatogr. 863(1): 101-106.
- Cruz I, Oliveira LJ, Oliveira AC, Vasconcelos CA (1996). Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (Smith JE) em milho. An. Soc. Entomol. Brasil. 25: 293-297.
- Darby SM, Miller MI, Allen RO (2001). Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. J. Forensic. Sci. 46(5): 1033-1042.
- Detwiche LD, Slaughter SJ (2002). The little SAS book: A primer. 2<sup>nd</sup> ed. The SAS Institute, Cary NC, USA.
- Fery N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2004). Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. Curr. Opin. Biotechnol. 15(2): 155-161.
- Isman MB (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot. 19: 603-608.
- Kang S, Cordell G, Socjanto D, Fong H (1985). Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. J. Nat. Prod. 48(1): 155-156.
- Kim KB (2001). Effects of oil milling steps on residual toxin and antigen activities of castor bean meal. Food Sci. Biotechnol. 10(3): 305-310.
- Kumar H, Mihm JA (2002). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), Southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) damage and grain yield of four maize hybrids in relation to four tillage system. Crop Prot. 21(2): 121-128.
- Leite AC, Cabral EC, Santos DA, Fernandes J, Vieira PC, Silva MF (2005). Isolamento do alcaloide ricinine das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente. Quim. Nova. 28(6): 983-985.
- Molina J, Carpenter J, Heinrichs E, Foster J (2003). Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an inventory. Florida Entomol. 86(3): 254-289.
- Mushobozy DMK, Nganilevanu G, Ruheza S, Swella GB (2009). Plant oils as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed protectants against infestations by the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). J. Plant Prot. Res. 49(1): 35-39.
- Olaifa JI, Matsumura F, Zeevaart JAD, Muffin CA, Charalambous P (1991). Lethal amounts of ricinine in green peach aphids (*Myzus persicae*) (Sulzer) fed on castor bean plants. Plant Sci. 73: 253-256.
- Pantoja-Uceda D, Bruux M, Giménez-Gallego G, Rico M, Santoro J (2003). Solution structure of RicinC3, a S2 albumin storage protein from *Ricinus communis*. Biochemistry, 42: 13839-13847.
- Raymond M (1985). Presentation d'un programme d'analyse log-probit por micro-ordinateur. Cah. ORSTOM. Ser. Entomol. Med. Parasitol. 23: 117-121.
- Rodríguez-Hernández C, Vendramim DJ (1996). Toxicidad de extractos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Manejo Integrado de Plagas 42: 14-22.
- Rodríguez-Hernández C (2005). Plantas contra plagas 2: Epazote, hierba de la cucaracha, paraiso, higuera y sabadilla. Colegio de Postgraduados, Red de Acción sobre Plaguicidas y sus Alternativas en México, Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina, Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, México.
- Skursky L, Burtson D, Waller G (1969). Interconversion of ricinine and N-demethylricinine in senescent and green castor plant leaves. J. Biol. Chem. 244(12): 3238-3242.
- Sparks A (1979). A review of the biology of the fall armyworm. Florida. Entomol. 62(2): 82-87.
- Tinzaara W, Tushemerehwe W, Nankunga CK, Gold CS, Kashaifa I (2006). The potential of using botanical insecticides for the control of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). Afr. J. Biotechnol. 5(20): 1994-1998.
- Upasani SM, Kotkar HM, Mendki PS, Maheshwari VL (2003). Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids. Pest Manage. Sci. 59: 1349-1354.
- Yudalshhev P (2001). Ricinine and its transformations. Chem. Nat. Comp. 37(3): 274-275.