



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE CUATRO  
PLANTAS DE LA AMAZONIA SOBRE *Plutella xylostella* L., A  
TRAVÉS DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**ALTAMIRANO ESPARZA GRECIA BELEN**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2016**

## CERTIFICACIÓN

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE CUATRO PLANTAS DE LA AMAZONIA SOBRE *Plutella xylostella* L., A TRAVÉS DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**, de responsabilidad de la señorita **GRECIA BELÉN ALTAMIRANO ESPARZA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

Tribunal de tesis

ING. CARLOS CARPIO

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN



---

DRA. HORTENCIA DÍAZ

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, GRECIA BELÉN ALTAMIRANO ESPARZA, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 09 de agosto 2016.



---

GRECIA BELÉN ALTAMIRANO ESPARZA

Cédula de Ciudadanía: 060394374-7

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar doy gracias a mi Dios y a la Virgen santísima quienes supieron guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar ante las adversidades. A mi familia por ser el pilar fundamental de mi vida, mis padres quienes con sus consejos supieron guiarme siempre, en especial mi madre Anita que estuvo a mi lado en las múltiples aventuras vividas.

A mis dos hermanos Kleber y Alex quienes siempre han sido mi ejemplo y mi orgullo. A mi cuñada Luz por ser una hermana más en este camino. Y a mis dos angelitos Danielita y Francisco por ser mi alegría y mi fuerza.

Agradezco principalmente al Ing. Carlos Carpio, director de mi trabajo de titulación, quien con sus consejos y guía fue fundamental para la culminación de este trabajo, a mi asesora la Dra. Hortencia Díaz, por la facilidad y apoyo brindado durante esta investigación.

Gracias al Dr. Hugo Cerda Prometeo ESPOCH, y a su esposa Carolina Ledezma, quien fue mi guía incondicional y amiga durante mi estancia en CEDETERRA. Al Dr. Mateo Chiurato por ser la persona que con su paciencia y dedicación me guio en los diferentes procesos químicos requeridos.

Mil gracias a mis amigos: Patty, Jessy, Lenin y Gabriel por ser mi apoyo incondicional en todos los momentos, durante ésta investigación y en las diferentes etapas de mi carrera universitaria.

Además agradezco a los todos y cada uno de los ingenieros quienes fueron participes en mi formación profesional, en especial al Ing. Marco Vivar e Ing. Edwin Pallo.

Grecia Belén Altamirano

## **DEDICATORIA**

Dedico este presente trabajo de investigación a mi madre Anita Esparza por ser mi amiga, confidente y siempre mi eterno orgullo y ejemplo de superación.

Grecia Belén Altamirano

## CONTENIDO

I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE CUATRO PLANTAS DE LA AMAZONIA SOBRE <i>Plutella xylostella</i> L., A TRAVÉS DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	1
A. JUSTIFICACIÓN .....	3
B. OBJETIVOS .....	4
1. General.....	4
2. Específicos .....	4
III. MARCO TEÓRICO .....	5
A. INSECTO PLAGA <i>Plutella xylostella</i> L. ....	5
1. Taxonomía .....	5
2. Distribución geográfica.....	5
3. Biología.....	5
4. Morfología .....	6
5. Comportamiento ovipositor y alimentario .....	8
6. Métodos de control.....	9
B. PLANTAS EN ESTUDIO PARA VER POSIBLE EFECTO INSECTICIDA SOBRE <i>Plutella xylostella</i> L. ....	12
1. <i>Clibadium</i> sp. (Kaklambi).....	12
2. <i>Cyclanthus bipartitus</i> Poit. ex A. Rich.....	12
3. <i>Dieffenbachia costata</i> H. Karst. Ex Schott (Lalu) .....	13
4. <i>Vismia</i> sp. ....	13
C. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE EXTRACTOS BOTÁNICOS PARA SU USO COMO INSECTICIDA.....	13
1. Extractos vegetales.....	13
2. Fundamentos de las técnicas de extracción de sustancias .....	15

3.	Métodos de extracción .....	15
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
A.	CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR .....	21
1.	Localización .....	21
2.	Ubicación geográfica .....	21
3.	Condiciones ambientales.....	21
B.	MATERIALES .....	22
1.	Material experimental .....	22
2.	Material de campo.....	22
3.	Material de laboratorio.....	22
4.	Material de oficina .....	23
C.	METODOLOGÍA .....	23
1.	Diseño experimental.....	23
2.	Especificaciones del experimento .....	23
3.	Colección del material vegetal .....	25
4.	Obtención de extractos botánicos por dos métodos de extracción.....	25
5.	Cultivo de la planta hospedera .....	27
6.	Crianza de <i>Plutella xylostella</i> en condiciones de laboratorio.....	28
7.	Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario.....	29
8.	Bioensayo para determinar el efecto larvicida .....	32
9.	Bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora .....	34
10.	Análisis estadístico.....	35
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
A.	RESULTADOS.....	37
1.	Efecto anti-alimentario.....	37
2.	Efecto larvicida .....	45
3.	Efecto de repelencia ovipositora .....	52

B.	DISCUSIÓN .....	59
1.	Efecto anti-alimentario.....	59
2.	Efecto larvicida .....	61
3.	Efecto de repelencia ovipositora.....	63
VI.	CONCLUSIONES .....	66
VII.	RECOMENDACIONES .....	67
VIII.	RESUMEN.....	68
IX.	SUMMARY .....	69
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
XI.	ANEXOS .....	81

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Plutella xylostella</i> L.....	6
<b>Figura 2.</b> Adultos de <i>Plutella xylostella</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Baño Ultrasonido.....	20
<b>Figura 5.</b> Análisis estadístico de datos empleado en cada bioensayo. ....	36
<b>Figura 6.</b> Porcentaje consumido de hojas de brócoli por <i>Plutella xylostella</i> para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de <i>Clibadium</i> sp.....	37
<b>Figura 7.</b> Porcentaje consumido de hojas de brócoli por <i>Plutella xylostella</i> para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	38
<b>Figura 8.</b> Porcentaje consumido de hojas de brócoli por <i>Plutella xylostella</i> para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	39
<b>Figura 9.</b> Porcentaje consumido de hojas de brócoli por <i>Plutella xylostella</i> para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de <i>Vismia</i> sp.....	40
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de actividad anti-alimentaria de <i>Plutella xylostella</i> en hojas de brócoli producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía.. ....	41
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de actividad anti-alimentaria de <i>Plutella xylostella</i> en hojas de brócoli producido por extractos obtenidos mediante ultrasonido, de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ....	42
<b>Figura 12.</b> Promedio del porcentaje de actividad anti-alimentaria de larvas de <i>Plutella xylostella</i> en hojas de brócoli producido por extractos botánicos y métodos de extracción. ....	44
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producidos por extractos de <i>Clibadium</i> sp.....	46
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producidos por extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> .....	47
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	48

<b>Figura 16.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos de <i>Vismia</i> sp.....	49
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ....	50
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos botánicos obtenidos mediante ultrasonido asistida de cuatro plantas amazónicas.....	51
<b>Figura 19.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> provocado por extractos de <i>Clibadium</i> sp. ....	52
<b>Figura 20.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> provocado por extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	53
<b>Figura 21.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> provocado por extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	54
<b>Figura 22.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> (efecto repelencia ovipositora) provocado por extractos de <i>Vismia</i> sp. ....	55
<b>Figura 23.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ....	56
<b>Figura 24.</b> Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de <i>Plutella xylostella</i> producido por extractos obtenidos mediante extracción con ultrasonido asistida de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ....	57
<b>Figura 25.</b> Promedio del índice de repelencia ovipositora a <i>Plutella xylostella</i> producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción .....	58

## Índice de Anexos

Anexo 1. Datos de temperatura y humedad relativas tomadas en el laboratorio del Grupo de Entomología del Centro de Desarrollo de Tecnologías para la Reducción y Racionalización de Agroquímicos (CEDETERRA). .....	81
Anexo 2. Estructura de protección anti-insectos. ....	81
Anexo 3. Caja de engorde para larvas de <i>P. xylostella</i> . ....	82
Anexo 4. Caja de cría para adultos de <i>P. xylostella</i> . ....	82
Anexo 5. Unidades experimentales para los bioensayos de efectos anti-alimentario y larvicida. ....	82
Anexo 6. Unidad experimental para el bioensayo de efecto de repelencia ovipositora. ....	83
Anexo 7. Especies vegetales de la Amazonía empleadas como posibles insecticidas. ....	83
Anexo 8. Proceso de secado del material vegetal. ....	84
Anexo 9. Extracción por método acuoso (Maceración). ....	85
Anexo 10. Extracción mediante método asistido por ultrasonido. ....	85
Anexo 11. Cultivo de plantas de brócoli como planta hospedera de <i>Plutella xylostella</i> . ....	86
Anexo 12. Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario. ....	87
Anexo 13. Proceso de desinfección para los discos foliares. ....	88
Anexo 14. Protocolo para análisis de imágenes. ....	88
Anexo 15. Modificaciones de imágenes de discos foliares. ....	90
Anexo 16. Bioensayo para determinar el efecto larvicida. Método de inmersión larval. ....	90
<b>Anexo 17.</b> Bioensayo para determinar el efecto larvicida. Método de inmersión foliar. ....	91
Anexo 18. Bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora. ....	92
Anexo 19. Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de <i>Clibadium</i> sp. ....	93
Anexo 20. Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de <i>Clibadium</i> sp. ....	94
Anexo 21. Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	95
Anexo 22. Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	96
Anexo 23. Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	97
Anexo 24. Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	98
Anexo 25. Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de <i>Vismia</i> sp. ....	99
Anexo 26. Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de <i>Vismia</i> sp. ....	100
Anexo 27. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por <i>Clibadium</i> sp. ....	101
Anexo 28. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	101

Anexo 29. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por <i>Dieffenbachia costata</i> . .....	102
Anexo 30. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por <i>Vismia</i> sp. ....	103
Anexo 31. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por extractos obtenidos mediante extracción acuosa. ....	103
Anexo 32. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido. ....	104
Anexo 33. Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción. ....	105
Anexo 34. Análisis estadístico para comparar metodologías empleadas para determinar el efecto larvicida.....	106
Anexo 35. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de <i>Clibadium</i> sp.....	108
Anexo 36. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	109
Anexo 37. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	109
Anexo 38. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de <i>Vismia</i> sp.....	110
Anexo 39. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos acuosos de plantas amazónicas. ....	110
Anexo 40. Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos obtenidos por ultrasonido asistida de plantas amazónicas.....	111
Anexo 41. Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de <i>Clibadium</i> sp. ....	111
Anexo 42. Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de <i>Cyclanthus bipartitus</i> . ....	112
Anexo 43. Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de <i>Dieffenbachia costata</i> . ....	112
Anexo 44. Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de <i>Vismia</i> sp. ....	113
Anexo 45. Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por extractos botánicos obtenidos mediante extracción acuosa. ....	113
Anexo 46. Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por extractos botánicos obtenidos mediante extracción por ultrasonido asistida. ....	114
Anexo 47. Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción. ....	115

# **I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE CUATRO PLANTAS DE LA AMAZONIA SOBRE *Plutella xylostella* L., A TRAVÉS DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

## **II. INTRODUCCIÓN**

La producción hortícola en el Ecuador es una actividad que genera importantes ingresos económicos para todos los agricultores dedicados a esta actividad. A nivel nacional se registró una producción de 455 433 T. En la región sierra se destaca principalmente la producción de hortalizas del género Brassica, de la familia Brassicaceas (Revista\_ElAgro, 2012). La calidad con la que son producidas estas hortalizas, ha permitido que ingresen a mercados selectos a nivel mundial. Una de las hortalizas más destacadas en el mercado internacional de la familia Brassicacea es el brócoli. La producción de esta verdura, entre el año 2000 al 2012, registró un crecimiento del 41,88%, pasando de 14 989 000 T producidas en el año 2000 a 21 266 789 T en el 2012 (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2013).

Uno de los principales riesgos que tiene el sector agrícola, de acuerdo a Trujillo, (2008), es la influencia de factores biológicos como plagas y enfermedades que inciden directamente en el rendimiento y calidad de los cultivos.

Dentro de las principales plagas de las brassicaceas, se destaca palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Este tipo de plaga se encuentra como una de las primeras que desarrolló resistencia al uso de insecticidas químicos (Perez & Shelton, 1997), se conoce que presenta resistencia a más de 50 ingredientes activos (Pedroso de Moraes & Amilton, 2012). Entre los mecanismos de resistencia que tiene la plaga se encuentra: mecanismos que implica la insensibilidad de acetil colinesterasa hasta mecanismos de desintoxicación metabólica (Abdulkadir, 2014).

El uso excesivos de insecticidas químicos para el control de *Plutella xylostella*, ha ocasionado adicionalmente una problemática ambiental, ya que este método de control emplea sustancias altamente tóxicas, que no solo afectan al organismo para el cual fueron

diseñados, sino a todos los demás organismos que se encuentren en ese medio ecológico, provocando intoxicaciones e inclusive en casos severos la muerte (CANNA, 2016).

Hoy en día se busca alternativas más ecológicas, con las que se logre el control de *Plutella xylostella*. Una de estas alternativas es el empleo de extractos vegetales. Es así que la presente investigación se basa en determinar algunos efectos en laboratorio como: anti-alimentario, larvicida y repelencia ovipositora sobre palomilla dorso de diamante, producida por acción de cuatro plantas provenientes de la Amazonía ecuatoriana. De acuerdo a Villacrés, (1995), señala que la cuenca amazónica posee una gran biodiversidad. En dónde, existe una considerable cantidad de especies vegetales con diversos potenciales, entre ellos, plantas con efectos de potenciales insecticidas.

Las plantas que presentan este efecto insecticida, poseen metabolitos secundarios responsables de afectar el desarrollo y el metabolismo energético de los insectos. Las fitotoxinas ejercen su efecto insecticida a través de diversos mecanismos como: acción anti-alimentaria, acción inhibidora de la pupación, simulación de hormonas de crecimiento en insectos, inhibición de la oviposición, inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, inhibición de la enzima tirosinasa, entre otros (Céspedes & Alarcon, 2011).

## A. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de un control más eficiente para *Plutella xylostella* es una necesidad imperante, ya que por estudios se ha comprobado que es una plaga altamente resistente a las diferentes técnicas dentro del control químico, debido a que ha desarrollado mecanismos que implica insensibilidad de acetil colinesterasa y mecanismos de desintoxicación metabólica (Abdulkadir, 2014). Adicionalmente hay que señalar que el inadecuado uso de las sustancias tóxicas empleadas en el control químico se ha constituido en una fuente de contaminación ambiental.

Por todo ello se vio la necesidad de buscar métodos de control, más eficientes y ecológicamente amigables con el ambiente. El uso de insecticidas de origen vegetal tiene la ventaja de degradarse más rápidamente que sus contrapartes sintéticas, son de disponibilidad inmediata, bajo costo, se pueden preparar mediante tratamientos caseros y pueden ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos costosos (Iannacone & Lamas, 2003).

Iannacone & Lamas, (2003) señala adicionalmente que un parámetro importante dentro del desarrollo tecnológico de un insecticida botánico es el método de extracción empleado, ya que éste garantiza la calidad, rendimiento y obtención de metabolitos secundarios (principios activos) que se encuentran dentro del material vegetal.

En este trabajo de titulación haciendo referencia a este aspecto, se analizó dos tipos de extracción, una por método tradicional (maceración – extracción acuosa), y otra por método no tradicional como es la extracción asistida por ultrasonido. En extractos acuosos solo se obtiene extractos con compuestos polares (Vásquez, 2003). Mientras que por el método de ultrasonido, de acuerdo a Rostagno et al., (2003), es un método con el que se obtiene un elevado número de compuestos, aumentando así el rendimiento de extracción.

El conocimiento de extractos botánicos empleados en el control de *Plutella xylostella* generaría pautas apropiadas que el agricultor puede adoptar como alternativas ecológicamente más amigable y de menor costo, incrementando las opciones de manejo del cultivo contribuyendo así, al cambio de la matriz productiva del país

## **B. OBJETIVOS**

### **1. General**

Determinar el efecto de los extractos de cuatro plantas de la Amazonía sobre *Plutella xylostella* L. a través de dos métodos de extracción.

### **2. Específicos**

- a. Obtener extractos de *Clibadium* sp, *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott y *Vismia* sp., por dos métodos físicos de extracción, uno acuoso y otro por ultrasonido.
- b. Analizar el efecto anti-alimentario de los extractos de *Clibadium* sp, *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott y *Vismia* sp., para el control de la plaga *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae)
- c. Analizar el efecto larvicida de los extractos de *Clibadium* sp, *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott y *Vismia* sp., para el control de la plaga *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae)
- d. Analizar el efecto de repelencia ovipositora de los extractos de *Clibadium* sp, *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott y *Vismia* sp., para el control de la plaga *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae)

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. INSECTO PLAGA *Plutella xylostella* L.

*Plutella xylostella* L. conocida como palomilla dorso de diamante o DBM (siglas en inglés Diamondback moth), es una plaga cosmopolita que afecta a los cultivos de la familia de las Brassicaceas en todo el mundo (Castelo & Gatehouse, 1997).

#### 1. Taxonomía

Arctos, (2013) señala que la clasificación taxonómica de la palomilla dorso de diamante es:

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Lepidoptera
Superfamilia:	Yponomeutoidea
Familia:	Plutellidae
Género:	Plutella
Especie:	<i>P. xylostella</i> (Linnaeus, 1758)

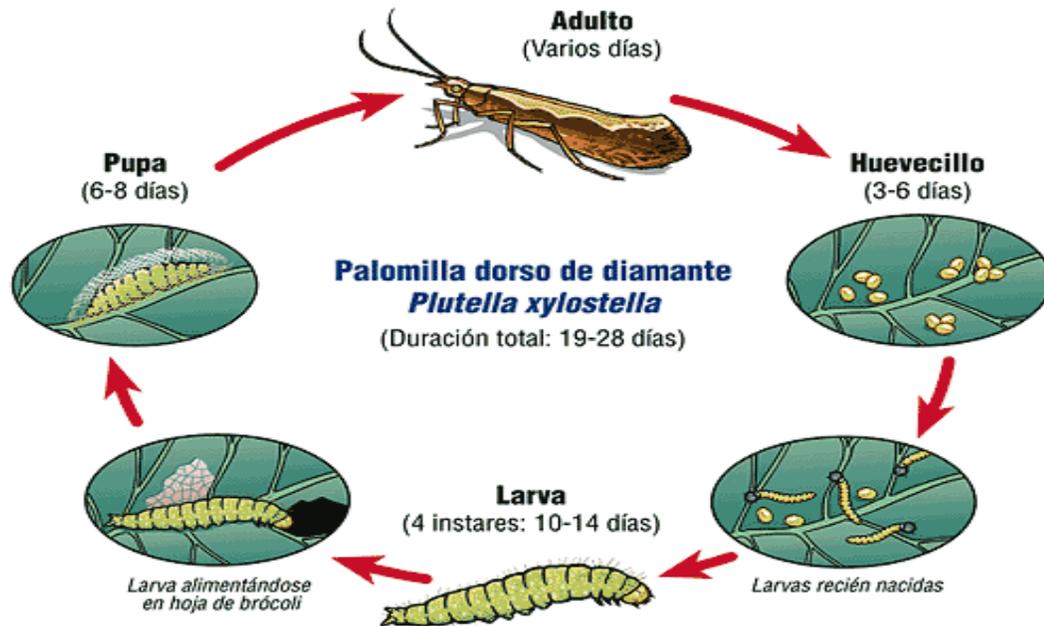
#### 2. Distribución geográfica

Se cree que el origen de *P. xylostella* L. es africano, en concreto, de Sudáfrica. Sin embargo hoy en día puede encontrarse a lo largo de toda América, Europa, Sudeste Asiático, Australia, Nueva Zelanda, India, y África. Esta plaga es más importante en tierras bajas de los trópicos y sub-trópicos. En Zonas templadas DBM no puede sobrevivir en el invierno (Rueda & Shelton, 1996)

#### 3. Biología

Estudios realizados sobre *Plutella xylostella* L., establece que el ciclo de vida de esta polilla en promedio es de 17,1 días, con un rango de 14 y 22 días, bajo las condiciones de temperatura de 19 a 22°C. Es una especie multivoltina con cuatro a 20 generaciones por año en regiones templadas y tropicales respectivamente. La duración promedio de las

diferentes fases de desarrollo del insecto es de: Huevo 2 – 3 días, larva de 7 – 8 días y pupa de 3 – 4 días. Presenta cuatro instares larvales. La longevidad de los adultos en promedio es de 21 - 23 días (Fernández & Alvarez, 1988) (Ochoa et. al, 1989).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Plutella xylostella* L.

Fuente: Cipactli Organización Ecológica y Sustentable, (2015)

#### 4. Morfología

A continuación se presenta la descripción de las fases del insecto *Plutella xylostella* L.:

##### a. Huevo

Presentan una forma óvalo-aplanada, de color amarillo claro recién colocados, cambiando de tonalidad hasta llegar a oscurecerse para el tiempo de eclosión. Tiene una longitud promedio de 0,48 mm de longitud y 0,28 mm de ancho (Fernández & Alvarez, 1988).

Las hembras de DBM ovipositan debajo de las hojas cerca de su vena central. Los huevos son puestos individualmente o en pequeño grupos (Rueda & Shelton, 1996).

## **b. Larva**

La larva recién emergida es de color blanco pálido, con la cabeza marrón oscuro. Al momento de emerger tiene una longitud promedio de 1,20 mm, esta larva se desplaza por la hoja y luego hace una pequeña “mina” superficial. Al iniciar su segundo instar la larva abandona la “mina” y se convierte en defoliador, causando perforaciones en el tejido foliar. Finalizando el último instar, el cuerpo tiene una coloración verde claro con la cabeza marrón y la longitud promedio del cuerpo es de 10,27 mm. La prepupa es de forma más contraída, especialmente en la región de la cabeza y tórax, cesa su alimentación y pierde movilidad (Fernández & Alvarez, 1988).

Turrialba, (1986) señala que los diferentes instares larvales tienen la siguiente duración a una temperatura constante de 20°C de: larva del primer instar dura entre 2,5 – 6 días, larva segundo instar de 2 – 5 días, tercer instar de 2 – 4 días y las larvas del cuarto instar de 1 – 6 días.

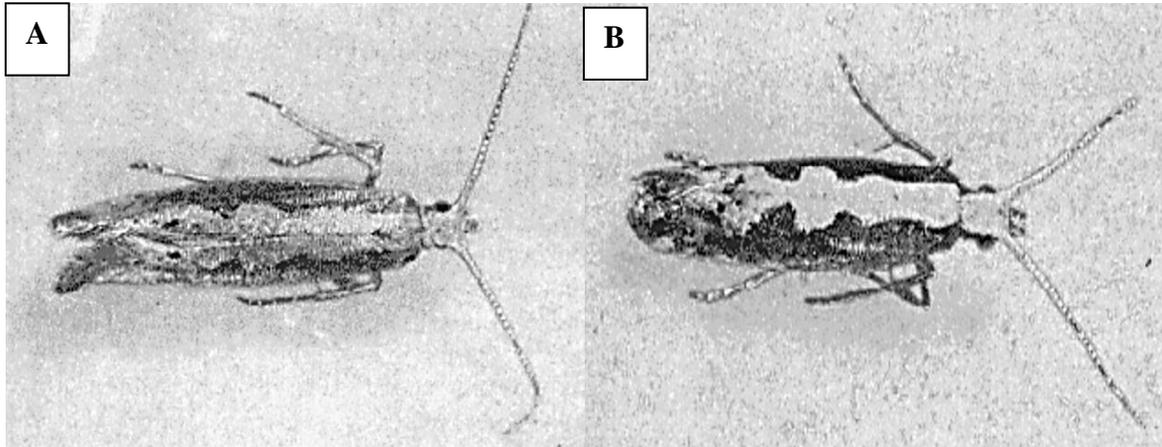
## **c. Pupa**

La pupa es obtecta con una longitud promedio de 6,83 mm. Al principio de su formación tiene un color verde brillante, más tarde se torna blanco crema y antes de emerger el adulto es de color marrón oscuro. La pupa se halla encerrada en un fino capullo de seda de color blanco. En esta fase es muy difícil diferenciar el sexo por presentar una morfología externa muy similar en esta especie (Fernández & Alvarez, 1988).

## **d. Adulto**

El adulto es una polilla cuya longitud promedio del cuerpo es de 10,56 mm, de color café grisáceo. Las alas anteriores son angostas con manchas pálidas en la parte media, semejando, cuando están en repose a un diamante en la parte dorsal del insecto. El adulto hembra se diferencia muy fácilmente del macho por su genitalia externa, pero además en la hembra se presenta la mancha dorsal con una coloración más clara y brillante (Fernández & Alvarez, 1988).

Las palomillas prefieren descansar debajo o dentro de las hojas para protegerse. Son más activas y visibles al atardecer (Rueda & Shelton, 1996).



**Figura 2.** Adultos de *Plutella xylostella*. A. Adulto macho. B. Adulto hembra.

Fuente: Fernández & Alvarez, (1988).

## 5. Comportamiento ovipositor y alimentario

Las larvas recién nacidas de *P. xylostella* L. son minadoras de hojas ya que se alimentan del tejido del mesófilo esponjoso (Harcourt, 1957). Las larvas mayores se alimentan de toda las partes de la planta (Talekar & Shelton, 1993). El segundo, tercer y cuarto instar larval se alimentan del tejido de la hoja, haciendo agujeros en la hoja a manera de ventana, si es una severa infestación, la hoja entera puede ser afectada. Las larvas de *Plutella xylostella* L. también se alimentan de tallos, puntos de crecimiento, flores y vainas de semillas (Ramachandran et al., 1998).

Las hembras de *Plutella xylostella* en promedio colocan de 118 – 234 huevos. El período de preoviposición y oviposición dura en promedio de 3 y 11 días respectivamente. La mayor cantidad de huevos son puestos en el segundo día después de iniciado el proceso de oviposición. Las posturas de este insecto se realizaron en horas nocturnas. Colocan sus huevos ya sea en el haz o envés de la hoja (Fernández & Alvarez, 1988)

## **6. Métodos de control**

Existen algunos métodos de control para *Plutella xylostella* L. que se detallan a continuación:

### **a. Métodos culturales**

Entre los métodos culturales que se puede aplicar para contrarrestar la presencia de *P. xylostella* se encuentra la rotación de cultivos, riego por aspersión y el uso de plantas repelentes a insectos, sin embargo hay que denotar que dichas técnicas no son aconsejables en cultivos extensivos de brassicaceas (Abdulkadir, 2014).

Las fuertes lluvias provocan una alta mortalidad de *P. xylostella*, por lo que se puede señalar que es una plaga grave en la estación seca (Talekar & Shelthon, 1993). Debido a este hecho, una alternativa de control que se está usando, es el sistema de riego por aspersión, en especial en horas de la tarde y madrugada, estableciendo así una baja en la población de la plaga (Abdulkadir, 2014).

Otra método cultural empleado para contrarrestar la presencia de esta plaga es la rotación y asociación de cultivos con plantas que desarrollen un ambiente protector al cultivo y de esta manera proteger al cultivo y tener diversidad de productos, lo que significaría un ingreso económico adicional para el agricultor. Un ejemplo de este tipo de medida de control es el empleo de ajo entre hileras de col. Para este método cultural se debe tomar en cuenta que el cultivo trampa se planta antes de la cosecha comercial y de estar disponible durante todo el período de crecimiento del cultivo comercial (Talekar & Shelthon, 1993).

### **b. Control químico**

El control químico es el método principal para reducir el daño causado por las larvas de la polilla dorso de diamante; por lo general el número de aplicaciones de insecticidas puede alcanzar entre 15 o 20, independientemente de la presencia de las larvas en el campo. El uso excesivo de insecticidas ha provocado que la plaga genere resistencia, de hecho se ha establecido que, es una de las especies de lepidópteros con mayor número de registros de

resistencia a los ingredientes activos (50 insecticidas) (Pedroso de Moraes & Amilton, 2012).

*Plutella xylostella* L. ha desarrollado resistencia, especialmente a piretroides (Liu et al., 1982), organofosforados (Miyata et al., 1982) y reguladores del crecimiento de insectos (Lin et al., 1989).

Entre los mecanismos de resistencia que tiene la plaga se encuentra: mecanismos que implica la insensibilidad de acetil colinesterasa hasta mecanismos de desintoxicación metabólica (Abdulkadir, 2014).

### **c. Control biológico**

Dentro del control biológico se encuentra una gran variedad de organismos como parasitoides, hongos, bacterias, virus, cuya función es ser los enemigos naturales de *Plutella xylostella* L. (Abdulkadir, 2014).

Otra alternativa dentro de este tipo de control es el uso de bio-insecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* BERNILER, var. Kurstaki, que se producen comercialmente desde 1970 y en la actualidad representan más del 90% del mercado de los productos biológicos para el control de la plaga (Pedroso de Moraes & Amilton, 2012).

### **d. Control con extractos botánicos**

Una alternativa dentro del manejo integrado de plagas se encuentra el uso de extractos botánicos. En las plantas son frecuentes los metabolitos secundarios con funciones defensivas contra insectos, tales como los alcaloides, los aminoácidos no proteicos, los esteroides, fenoles, flavonoides, glicósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos y terpenoides (Valencia, 1995). Las características de estos metabolitos secundarios de acuerdo a Alfonso, (2002) son:

- **Terpenos:** Son los principales constituyentes de los aceites esenciales y actúan como repelentes e inhibidores de la alimentación y la oviposición.

- **Glicósidos cianogénicos:** Al hidrolizarse liberan cianuro, por lo que son tóxicos y repelentes.
- **Compuestos azufrados:** Entre los más importantes están los tiofenos, con acción insecticida y nematocida.
- **Flavonoides:** Son los compuestos que dan color a plantas y flores, a ellos pertenece la rotenona, y actúan como inhibidores enzimáticos y repelentes.
- **Alcaloides:** Son el grupo más diverso de metabolitos secundarios, con muy variados efectos tóxicos; a ellos pertenece la nicotina.

De acuerdo a Delgado, (2011) los bio-insecticidas obtenidos a partir de las plantas poseen varios efectos de acción sobre el insecto plaga, entre los más importantes: efecto repelente, efecto anti-alimentario, tóxico por contacto o ingestión.

Algunas especies botánicas para el control de *P. xylostella* son:

**Cuadro 1.** Especies botánicas para el control de *P. xylostella*.

Nombre Común	Nombre científico	Familia	Parte de la planta usada	Efecto insecticida
Achiote	<i>Bixia orellana</i> L.	Bixaceae	Semillas	Mortalidad, repelencia
Floripondio	<i>Brugmansia candida</i> Pers.	Solanaceae	Hojas	Mortalidad, repelencia
Sacha yoco	<i>Paulinia clavigera</i> Schltl.	Sapindaceae	Corteza y hojas	Mortalidad, repelencia
Yuquilla	<i>Euphorbia cotinifolia</i> L.	Euphorbiaceae	Hojas	Mortalidad

**Fuente:** (Auccahuasi, Bulnes, & Farfán, 2015)

## **B. PLANTAS EN ESTUDIO PARA VER POSIBLE EFECTO INSECTICIDA SOBRE *Plutella xylostella* L.**

### **1. Clibadium sp. (Kakllambi)**

El género *Clibadium* pertenece a la familia de las Asteráceas, comprende 29 especies en América Latina, desde México hasta Perú. El mayor número de especies se encuentra en Costa Rica, Colombia y Ecuador (Arriagada, 2003).

Este tipo de plantas se caracterizan por ser malezas agresivas, son utilizadas en la pesca ya que son plantas con propiedades ictiotóxicas, sus hojas y las partes aéreas de la planta son usadas como cebos (Costa et al., 2006), (Odonne et al., 2009). También se ha reportado usos como vermífugo para niños, o como un débil laxante, mediante decocciones de toda la planta (Sanz-Biset et al., 2009).

### **2. Cyclanthus bipartitus Poit. ex A. Rich.**

La familia Cyclanthaceae son plantas neotropicales que comprende 180 especies en 11 géneros, incluyendo *Aplundia*, *Carludovica*, *Dicranopygium* y *Cyclanthus*. El último incluye una sola especie *C. bipartitus* Poit. ex A.Rich, que es un arbusto perenne que crece principalmente en bosques tropicales húmedos o pantanosos de Centro y Sudamérica. Es una especie monoica, con flores estaminadas y pistiladas (Schultz K et al. 1999)

De acuerdo al Inventario Nacional de Plantas Medicinales realizado por el Instituto Nacional de Salud del Perú (s.f), señala que *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, sirve para la picadura de isula (hormiga que provoca un dolor muy fuerte y fiebre por dos días). Bourdy, et al., (2008), indica que es empleada en usos tradicionales, cuando una mujer está embarazada abre el botón floral de la planta y si en el extremo del ápice hay una raya, es indicativo que el sexo del bebé es femenino, otro uso es para elaborar chimpanadas, un plato que consiste en pescado envuelto en hojas de esta planta.

### 3. **Dieffenbachia costata H. Karst. Ex Schott (Lalu)**

*Dieffenbachia* es un género de la familia Araceae, se caracteriza por ser una planta ornamental muy popular. Son plantas que puede ser de 60 cm a 3 m de altura, sus hojas presentan manchas grandes ya sean blancas, amarillitas o verde. Aunque son plantas que crecen bien en interiores y en algunas zonas al aire libre, *Dieffenbachia* es uno de los géneros más tóxicos; cada año, niños, adultos y mascotas mueren al ser intoxicados por esta planta venenosa. Las cualidades tóxicas e irritantes de *Dieffenbachia* han sido conocidas y utilizadas durante años. En el Amazonas, los nativos usan para hacer flechas venenosas. Los habitantes de las Islas del Caribe en cambio usan estas plantas para conseguir la esterilidad masculina en un lapso de tiempo de 24 – 48 horas. Entre sus usos medicinales se destaca su uso para tratar la gota, hidropesía, impotencia sexual y frigidez (Arditti & Rodríguez, 1982).

### 4. **Vismia sp.**

*Vismia* es un género de la familia Clusiaceae, está distribuida en regiones tropicales y subtropicales. Varios triterpenoides, antraquinonas, benzofenoles y lignanos han caracterizado a este género. Algunos constituyentes de *Vismia* tienen actividad citotóxica y anti-alimentaria. Ciertas especies de este género se están estudiando por su potencial anticancerígeno (Hussein et al., 2003).

## C. **MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE EXTRACTOS BOTÁNICOS PARA SU USO COMO INSECTICIDA.**

### 1. **Extractos vegetales**

De acuerdo a Ruiz & Susunaga (2000), define a los extractos vegetales como concentrados obtenidos con solventes apropiados como agua, etanol o éter, que se encuentran constituidos por una mezcla de principios activos y de sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.

Rodríguez et al., (2000) establece que: “el empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa

promisoria, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente. Estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural (compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides). Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son anti-apetitivos, anti-virales, anti-microbianos o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción”.

Los extractos botánicos según Barreto, (1997), presentan algunas características específicas tales como:

- Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros, pero si éstos han sido preparados al vacío presentaran colores ligeramente más claros.
- Los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total.
- Los extractos deben conservarse en un lugar protegidos de la luz, en envases totalmente herméticos y en un ambiente seco.

## 2. Fundamentos de las técnicas de extracción de sustancias

Para obtener un extracto, primero se requiere identificar la planta deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles. Luego, se debe determinar la técnica precisa de cosecha y métodos de preservación de la planta (Azuola & Vargas, 2007).

El mecanismo de extracción involucra dos tipos de fenómenos físicos: difusión a través de las paredes celulares y lavado del contenido celular una vez que las paredes se han roto (Vinatoru, 2001).

## 3. Métodos de extracción

Según Arévalo & Enciso (1996), la elección del método de extracción depende de la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y el propósito de la investigación.

Guerra, (2005) menciona que los factores que influyen en el proceso de extracción son:

- **La cantidad de agua.** Cuanto mayor sea la cantidad de agua, más elevado será el agotamiento de los principios activos dentro de la planta.
- **La temperatura.** La infusión o el cocimiento a una temperatura cercana a los 100°C favorece la extracción. Sin embargo, a veces conviene hacer la extracción con agua fría, ya que puede interesar no extraer determinados principios activos que solamente pasarían al agua con ayuda de calor.
- **El tiempo.** La duración del contacto de la planta con el agua es determinante, a más tiempo de contacto mejor extracción.
- **Grado de pulverización de la planta.** Aumenta la extracción, cuanto más troceada esté la planta, pero hasta ciertos límites a partir de los cuales puede originarse una serie de procesos físicos que dificulten el proceso. Por otro lado, las plantas pulverizadas pueden traer otra serie de problemas (compactación, taponamiento, canalización).

- Otro factor que señala Arévalo & Enciso (1996) es el **tipo de solvente**. Es así que si se requiere encontrar sustancias con actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución disotónica (0,9% NaCl). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios.

**a. Extracción por métodos tradicionales**

1) Extracción por solventes

Este tipo de extracción se basa principalmente en la transferencia de masas en un sistema de dos fases líquidas. Se llama también intercambio iónico líquido y se fundamenta en el principio por el cual, un soluto o ion metálico puede distribuirse en cierta proporción entre dos solventes inmiscibles, uno de los cuales es usualmente acuoso y el otro un solvente orgánico (inmiscible al agua) (CODELCO, s/f)

2) Extracción por Soxhlet

Núñez, (2008) establece que la extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas:

- Colocación del solvente en un balón.
- Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
- El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
- Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón.
- Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente

### 3) Destilación

El método de destilación es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación (Ramírez de la Torre, 2010).

### 4) Percolación o lixiviación

La lixiviación, percolación o extracción sólido-líquido, es un proceso en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de uno o más de los componentes solubles del sólido (Wikipedia, s/f a)

### 5) Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer (Wikipedia, s/f b). Mediante este método de extracción se obtiene principalmente compuestos fenólicos, particularmente antocianos y taninos, entre otras sustancias (aromáticas, nitrogenadas, polisacáridos, minerales, etc) (Ribereau-Gayon, 1998).

Existe tres tipos de maceraciones de acuerdo al líquido extractante que se emplee, es así que, maceración acuosa (extractos acuosos), maceraciones aceitosas (extractos oleosos) y maceración alcohólica (extracto hidroalcohólico) (Botanical-Online SL., s/f).

La maceración acuosa se emplea cuando se quiere extraer los principios hidrosolubles de una planta, este proceso se la puede realizar con agua fría, especialmente cuando se macera flores u hojas, o se emplea agua caliente, preparado infusiones o decocciones para cortezas, raíces y algunas semillas (Sánchez, 2015)

El agua es conocido como “el solvente universal”, ya que en ella se disuelven muchos tipos de sustancias y en mayores cantidades que otro solvente. Su carácter polar hace que el agua sea un excelente solvente para solutos polares e iónicos, denominados hidrófilos, pero los compuestos no polares son virtualmente insolubles en ella (Vásquez, 2003)

De manera general el macerado en frío se hace al 10%, es decir, si se desea preparar 100 mL de extracto se requiere 10 g de material vegetal y 90 mL de agua fría (se emplea agua destilada o agua mineral) (Sánchez, 2015)

Existen varios procesos para la obtención de extractos acuosos usados como insecticidas botánicos, entre ellos se menciona los siguientes:

Según Lizarazo et al., (2008) después de la recolección de plantas, se procede con el secado durante 72 horas a 40°C, después el material es molido hasta conseguir su total pulverización. A continuación se procede a extraer los metabolitos con agua y se dejan en reposo y oscuridad por 96 horas para ser filtrados, para su aplicación se debe diluir el extracto.

En cambio Rangel et al., (2001) mencionan que una vez seco y molido el material vegetal, se lo macera con agua durante una noche, luego se somete el extracto a agitación durante 30 minutos a 60°C, y se filtra al vacío.

## **b. Extracción por métodos no tradicionales**

### 1) Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas es una técnica que permite la extracción de principios activos de matrices vegetales con base en el calentamiento selectivo obtenido de la fricción molecular debido a la alineación de iones y dipolos al campo eléctrico oscilante de las microondas. Se emplea un calentamiento efectivo sin inducir reacciones químicas (Alfaro et al., 2003).

### 2) Extracción por fluidos supercríticos

La extracción supercrítica es una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto supercrítico del solvente. Este tipo de extracción permite controlar y manipular propiedades tales como la difusividad, viscosidad y densidad del fluido (Gallego & Castañeda, 2004).

El proceso de extracción supercrítica se inicia cargando el material por extraer en el recipiente de extracción, luego se presuriza el solvente, que en la mayoría de los casos es CO<sub>2</sub> a una presión por encima de los 7,38 MPa, una vez que se encuentre presurizado el solvente se procede a calentarlo para que alcance una temperatura por encima del punto crítico. Al tener el solvente como fluido supercrítico, éste se pone en contacto con el soluto o matriz que posee el compuesto que se quiere extraer (Esquivel & Vargas, 2007).

### 3) Extracción turbo

Vinatoru, (2001), indica que la extracción turbo utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción, ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal y el solvente, incrementando de esta manera el proceso de difusión a través de las paredes celulares.

### 4) Extracción eléctrica

En este tipo de extracción se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación (Vinatoru, 2001).

### 5) Extracción asistida por ultrasonido

El método de ultrasonido o “Ultrasound assisted extraction (UAE)”, es un método eficaz para la extracción rápida y exhaustiva de un elevado número de compuestos (por ejemplo, alcaloides, polifenóles, antocianinas, compuestos aromáticos, polisacáridos y otros compuestos funcionales) con un aumento de rendimiento de extracción de los componentes extraídos y con una reducción en el tiempo de extracción (Rostagno et al., 2003)

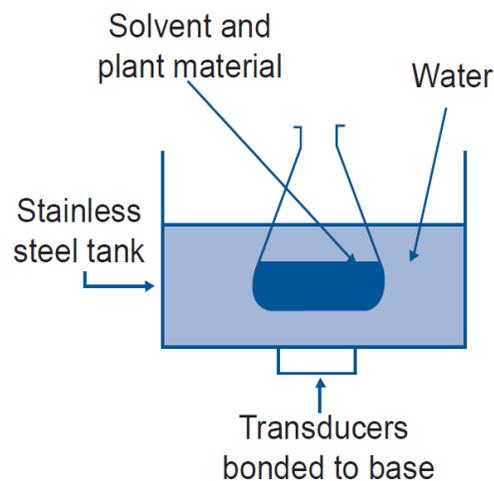
Los posibles beneficios de la extracción por ultrasonido son: intensificación de transferencia de masa, ruptura celular y aumento de penetración del solvente en el tejido celular. La proporción en la composición de los extractos y el rendimiento de éstos depende de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso y del disolvente, o mezcla de disolventes que se utilicen (Proestos & Komaitis, 2006). Según Rostagno et al., (2003) esta

técnica de extracción es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.

El ultrasonido son ondas con frecuencia que oscilan entre 16 kHz a 1 GHz, imperceptible para humanos (Śliwiński, 1993). Las ondas ultrasónicas rompen las células vegetales y liberan el contenido celular en el medio de extracción (Proestos & Komaitis, 2006); las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, y como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao & Liu, 2005).

El fenómeno más importante ocurrido durante la extracción por ultrasonido es la cavitación, la cual implica la formación de burbujas pulsantes en la solución de extracción, como resultado de fuerzas de estiramiento fuertes, procedentes de las caídas abruptas de presiones locales (Śliwiński, 1993).

Existen distintos equipos experimentales comúnmente empleados en la extracción de sustancias asistida por ultrasonido, pero entre el más ampliamente disponible, comúnmente utilizado y más barato es el baño de ultrasonidos. Este equipo está compuesto de un transductor (componente electromecánico encargado de generar los ultrasonidos), está fijado en la base de un baño lleno de agua. Los baños de ultrasonidos trabajan con frecuencias entre 30 y 50 kHz (Azuola & Vargas 2007).



**Figura 3.** Baño Ultrasonido.

Fuente: Azuola & Vargas (2007).

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **A. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR**

###### **1. Localización**

La investigación se realizó en las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

La preparación de extractos se realizó en el laboratorio de Fito farmacia de la Facultad de Ciencias. Mientras que la crianza de *Plutella xylostella* L., y la ejecución de los diferentes bioensayos se efectuó en el laboratorio del Grupo de Entomología del Centro de Desarrollo de Tecnologías para la Reducción y Racionalización de Agroquímicos (CEDETERRA).

###### **2. Ubicación geográfica**

Altitud: 2778 msnm

Latitud: 1° 41' 05'' S.

Longitud: 78° 40' 20'' W

###### **3. Condiciones ambientales**

Las condiciones ambientales de laboratorio del Grupo de Entomología del Centro de Desarrollo de Tecnologías para la Reducción y Racionalización de Agroquímicos (CEDETERRA) fueron (Anexo 1):

Temperatura media = 24,63 °C

Humedad relativa media = 51,6%

## **B. MATERIALES**

### **1. Material experimental**

Plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. Itálica cv. Avenger) de 35 días de edad, cría del *Plutella xylostella* L. en condiciones de laboratorio, plantas empleadas como insecticidas botánicos: *Clibadium* sp, (Kakllambi), *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich, *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott (Lalu) y *Vismia* sp.

### **2. Material de campo**

Plántulas y semillas de brócoli (*Brassica oleracea* L. var Itálica cv. Avenger), bandejas de germinación de poliestireno (Plastro S.A., Ecuador), turba BM2 (Berger, Canadá), estructuras de protección anti-insectos (alambre galvanizado + varillas lisas de 50 cm + tela crinolina) (Anexo 2), baldes plásticos de 10 L, sustrato (tierra, humus), micro-túnel (Tubos PVC de 1/2”+varillas lisas de 25 cm + cubierta anti-insectos (tela velo de novia), manguera x 17m.

### **3. Material de laboratorio**

Cajas de engorde plásticas de 7x28x17 cm. (Consuplast, Repostero rectangular, Ecuador; Anexo 3), cajas de cría de 3,7 L (PIKA, Pomo cristal, Ecuador; Anexo 4), alcohol, toallas lisas (Toalla Scott Singiefold, Hoja Sencilla AIRFLEX \* 175, Kimberly-Clark, Estados Unidos), pinceles de pelo de malta Kolinsky N° 6, cajas Petri plásticas (100 mm de diámetro x 15 mm de profundidad), algodón, miel de abeja artesanal, agua destilada, jeringuillas de 10 mL, guantes de nitrilo, papel filtro, lupa, probeta de vidrio de 100 mL, barras de silicón, pinzas entomológicas, vasos de precipitación de 100 mL, pinzas de laboratorio, papel de aluminio, botella de laboratorio autoclavable de 250 mL (BOECO, Alemania), gafas protectoras de laboratorio, gotero plástico, plástico stretch, cajas Petri plásticas (55 mm de diámetro x15 mm de profundidad), parafilm, masking, cortador de discos de 4 cm de diámetro, cloro (hipoclorito de sodio al 0,5%), malla metálica, frascos rociadores de 100 mL, soporte universal, balanza, estufa de laboratorio, molino de laboratorio, embudo Bushner (Albus, España), bomba de succión (Vacuubrand, Estados Unidos), etanol, baño ultrasonido (Modelo Bransonic 220 Ultrasonic Cleaner, EEUU).

#### **4. Material de oficina**

Resma de papel bond (Copylaser, Ecuador), marcadores permanentes, computadora, escáner-impresora (HP, Deskjet Ink Advantage 1515, EEUU), cuaderno de laboratorio. Software libre R (Ihaka, R., & Gentleman, R., Nueva Zelanda), Software libre Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), Software libre GIMP 2.8.16 (Spencer Kimball, Peter Mattis and the GIMP Development Team, EEUU), Software libre Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation, EEUU).

### **C. METODOLOGÍA**

#### **1. Diseño experimental**

Para determinar los efectos anti-alimentario y larvicida se empleó un Diseño de Bloques Completamente Aleatorizados unifactorial (DBCA). Mientras que para determinar el efecto de repelencia ovipositora se trabajó con un Diseño Completamente al Azar (DCA).

#### **2. Especificaciones del experimento**

Número de tratamientos: 8

Número de repeticiones: 10

Número de unidades experimentales: 80

Se usaron controles negativos que estaban constituidos por: agua destilada para los extractos acuosos (CAc), y etanol - agua en una proporción 9:1 para los extractos por ultrasonido (CUI).

##### **a. Unidad experimental**

1) Bioensayos de efectos anti-alimentario y larvicida

La unidad experimental de los ensayos para determinar los efectos anti-alimentario y larvicida fue una caja Petri plástica (55 mm de diámetro y 15 mm de profundidad), en cuyo

interior se colocó un disco de brócoli de 5 cm de diámetro y 5 larvas de *Plutella xylostella* del tercer instar (Anexo 5).

## 2) Bioensayo de efecto de repelencia ovipositora

La unidad experimental en el bioensayo para determinar la repelencia ovipositora de *Plutella xylostella*, fue una caja de cría de adultos, en cuyo interior se colocó 40 adultos (20 hembras y 20 machos) y dos discos de hoja de brócoli (5 cm de diámetro), uno de tratamiento y otro de control (Anexo 6).

### **b. Tratamientos**

#### 1) Factor A: Extractos botánicos

Cl: Extracto de *Clibadium* sp.

Cy: Extracto de *Cyclanthus bipartitus*

Di: Extracto de *Dieffenbachia costata*

Vi: Extracto de *Vismia* sp.

#### 2) Factor B: Métodos de extracción

Ac: Método Acuoso

Ul: Método Ultrasonido

### 3) Análisis combinatorio

#### **Cuadro 2.** Factor A por Factor B.

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Descripción</b>
T1	CIAc	Extracto de <i>Clibadium</i> sp./Método acuoso
T2	CIUI	Extracto de <i>Clibadium</i> sp./Método ultrasonido
T3	CyAc	Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> /Método acuoso
T4	CyUI	Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> /Método ultrasonido
T5	DiAc	Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> /Método acuoso
T6	DiUI	Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> /Método ultrasonido
T7	ViAc	Extracto de <i>Vismia</i> sp./Método acuoso
T8	ViUI	Extracto de <i>Vismia</i> sp./Método ultrasonido

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

### **3. Colección del material vegetal**

En este estudio se empleó cuatro especies de plantas recolectadas en la Amazonía como posibles insecticidas: *Clibadium* sp, (Kakllambi), *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* (Lalu) y *Vismia* sp (Anexo 7). Este material fue recolectado a 2 km del Centro de Investigación de Posgrado y Conservación Amazónica (CIPCA) de la Universidad Estatal Amazónica (S 1°14'18.85'', W 77°53'4.30''), en Pastaza, Ecuador, en los meses de agosto y septiembre de 2015. Se debe señalar que las partes de las plantas utilizadas fueron hojas apicales.

### **4. Obtención de extractos botánicos por dos métodos de extracción**

Entre los métodos de extracción que se emplearon se encuentran: el método de extracción acuoso (maceración) y el método de extracción asistida por ultrasonido.

Para los dos casos, primero se procedió a secar y moler el material vegetal (Anexo 8), de la siguiente forma:

- 1) Se pesó 1,5 kg de material fresco de cada planta.
- 2) Se secó el material vegetal a una temperatura de 40°C por un período de tiempo de 48 horas, para ello se empleó una estufa de laboratorio (Anexo 8, A).

- 3) Una vez seco el material vegetal, se lo molió usando un molino de laboratorio, donde el tamaño de partícula de los productos fueron aproximadamente de 1 mm (Anexo 8, B).

**a. Extractos botánicos por método acuoso (Maceración acuosa)**

Se trabajó con extractos cuya concentración fue de 0,12 g/mL, a los cuales se aplicó estándares de maceración que propuso Cerda et al., (2015) (Anexo 9).

- 1) Se pesó 12 gramos de material vegetal seco y molido (Anexo 9, A).
- 2) Se añadió 100 mL de agua destilada (Anexo 9, B).
- 3) Se colocó en una botella de vidrio y se la cubrió con papel aluminio.
- 4) Se dejó macerar por 24 horas, luego de ello se procedió a filtrar empleado un embudo Bushner, papel filtro y una bomba de succión (Anexo 9, C).
- 5) La solución filtrada se la colocó en botellas de laboratorio autoclavable de 250 mL (BOECO), para luego ser utilizada en los diferentes bioensayos (Anexo 9, D).

**b. Extractos botánicos por método de extracción asistida por ultrasonido**

Se trabajó con extractos cuya concentración fue de 0,13 g/mL, a los cuales se aplicó estándares propuestos por Chiurato, M., (2015) (Anexo 10).

- 1) Se pesó 100 gramos de material vegetal seco y molido.
- 2) Se añadió 800 mL de una solución de etanol - agua, en una proporción de 9:1, es decir, 720 mL de etanol y 80 mL de agua destilada (Anexo 10, A).
- 3) La solución se colocó en un matraz.
- 4) El matraz con la solución fue colocado en un baño ultrasonido (Modelo Bransonic 220 Ultrasonic Cleaner, SmithKline company, USA, 50 Hz, 220 v), durante 60 minutos a una temperatura de 35-40 °C, agitándolo contantemente (Anexo 10, B).

- 5) El extracto obtenido se filtró empleado un embudo Bushner, papel filtro y una bomba de succión (Anexo 10, C).
- 6) La solución filtrada se la colocó en botellas de laboratorio autoclavable de 250 mL (BOECO), para luego ser utilizada en los diferentes bioensayos (Anexo 10, D).

## **5. Cultivo de la planta hospedera**

La planta hospedera empleada en esta investigación fue brócoli (*Brassica oleracea* L. var Italica cv. Avenger).

Las semillas de brócoli (*Brassica oleracea* L. var Italica cv. Avenger) fueron sembradas en bandejas de germinación con turba BM2 en el Departamento de Horticultura (Anexo 11, A).

### **a. Plantas de brócoli para alimentación de la población de *Plutella xylostella***

Para la alimentación de la población se *Plutella xylostella* se empleó hojas de brócoli, las cuales eran cosechadas de un pequeña parcela (comidero) ubicada en un microtunel en el invernadero del Departamento de Horticultura.

El comidero tuvo una dimensión de 1,20 m x 5,7 m, se trasplantó 54 plántulas de brócoli, las cuales se encontraban protegidas con un microtunel con tela velo de novia (Anexo 11, B). Los riegos se realizaron pasando un día usando una manguera de jardín. Una vez a la semana se removía el suelo para evitar su compactación y se procedía a limpiar las malezas en caso de existir.

Las hojas de brócoli empleadas en la alimentación primero se las limpiaba con un paño húmedo antes de utilizarlas (Anexo 11, C).

### **a. Plantas de brócoli para bioensayo**

En 5 baldes plásticos que tenían una mezcla de tierra y humus en proporciones aproximadas de 1:1, se trasplantó dos plántulas de 25 días después de la siembra en cada balde (Anexo 11, D).

Luego del trasplante en cada balde se colocó la estructura de protección anti-insectos; en su base se puso una banda elástica para asegurar su hermetismo (Anexo 11, E). Los riegos se realizaron pasando un día. Una vez a la semana se removía el suelo para evitar su compactación.

A los 35 días luego del trasplante se cosechaban las hojas 7, 8 y 9, para posteriormente utilizarlas en los bioensayos.

## **6. Crianza de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio**

Inicialmente se colectó pupas y larvas de *P. xylostella* en un campo de col morada infestado con esta plaga. La colecta se realizó cerca de la Escuela de Formación de Soldados ESFORSE, sector El Pisque, Parroquia Atahualpa, Cantón Ambato (Tungurahua), las coordenadas geográficas fueron: 1° 12' 25,14'' S y 78° 35' 25,71''. Se recolectó doscientas cuarenta y tres pupas y doscientas diez larvas.

### **a. Larvas**

- 1) Se preparó cajas de engorde (Anexo 3) colocando papel toalla liso y hojas de brócoli en su interior. Las hojas de brócoli se colectaban del comedero diseñado en el invernadero del Departamento de Horticultura de Facultad de Recursos Naturales.
- 2) Se colocó 70 larvas como máximo en cada caja de engorde.
- 3) Pasando un día se realizaba la limpieza de cada caja de engorde, para evitar que las larvas se enfermen o contaminen.
- 4) Cuando las larvas alcanzaban el estadio IV, se procedía a separar machos de hembras. Los especímenes machos eran identificados por poseer un anillo amarillo en la parte terminal del cuerpo mientras que las hembras son completamente verdes (CHEN et al., (2011).
- 5) Aproximadamente al transcurrir 3 semanas, las larvas comenzaban a empupar. Se colectaban las pupas de la caja de engorde con una pinza entomológica

cuidadosamente y se las llevaba a cajas Petri (50 x 60), posteriormente éstas eran llevadas a las cajas de cría (Anexo 4).

#### **b. Adultos**

- 1) Las pupas se colocaron en cajas de cría en una cantidad de 40 pupas por cajas (20 machos y 20 hembras).
- 2) Una vez emergido los adultos, se los alimentó con una solución de agua destilada y miel de abeja artesanal en una proporción (9:1). Se sumergían pequeñas bolas de algodón en la solución alimenticia.
- 3) Las bolas de algodón empapadas de la solución se las colocaba en la parte superior de la caja de cría, en donde se hallaba una compuerta para este fin. Se alimentaba a los adultos pasando un día.
- 4) Se cortó discos de hojas de brócoli de un diámetro de 4 cm, estos discos se colocaban en el interior de las cajas de cría, para que las hembras adultas de *Plutella xylostella* ovipositen. Se colocaron de 4 a 6 discos de hojas por cada caja.

#### **7. Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario**

Para este experimento se empleó larvas de *P. xylostella* del segundo y tercer instar larval, ya que en este estadio se registra su más alta tasa de consumo (Ramachandran et al., 1998), lo que permitió un mejor análisis del comportamiento anti-alimentario.

Por cada planta de estudio se realizó un bioensayo. En cada bioensayo se probaron los dos extractos obtenidos por los dos métodos de extracción y sus respectivos controles.

En este bioensayo el procedimiento que se siguió fue el propuesto por (Rimoldi, 2015) con algunas modificaciones, que a continuación se detalla:

- 1) Se cortó las hojas número 7, 8 y 9 de las plantas de brócoli de bioensayo de una edad de 35 días desde su trasplante (Anexo 12, A)

- 2) Se realizaron cortes en forma circular de las hojas de brócoli empleando un disco metálico de 4 cm de diámetro. (Anexo 12, B) Se empleó en cada bioensayo un total de 40 discos de hojas de brócoli, 10 por cada uno de los dos tratamientos y 10 por cada uno de los dos controles respectivos
- 3) Todos los discos fueron previamente desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, con dos posteriores enjuagues en agua destilada y un secado a temperatura ambiente por 20 minutos (Anexo 13).
- 4) A cada grupo de discos ya sea de tratamientos o de controles se les asignó una nomenclatura (Código, Cuadro 2) y orden específicos (del 1 al 10).
- 5) Los discos fueron colocados en hojas de papel bond (Copylaser, Ecuador) en un número de cinco discos por hoja, en total se tuvo dos hojas de papel bond por tratamiento y por control. En cada hoja de papel bond se colocaron 5 marcas de 1 cm en cada espacio donde se ubicaron los discos foliares que se digitalizaron (Anexo 12, C).
- 6) Las hojas con los discos fueron digitalizados en un escáner-impresora (HP, Deskjet Ink Advantage 1515, EEUU) y la imagen obtenida se la guardó en carpetas con la nomenclatura asignada previamente y en formato .jpg.
- 7) Con el mismo orden de digitalización se procedió a colocar un disco en una caja Petri plástica (55x15 mm), que estaba debidamente etiquetada. En el fondo de la caja Petri se colocó papel filtro con 3 gotas de agua destilada, para evitar que las hojas de brócoli se deshidraten durante el proceso de experimentación.
- 8) Los discos foliares fueron sumergidos durante 10 segundos, en los diferentes tratamientos y controles (Anexo 12, D).
- 9) Se los dejó secar a temperatura ambiente, en una malla metálica, por media hora (Anexo 12, E).
- 10) Posteriormente en cada caja Petri se colocó 5 larvas de *Plutella xylostella* L., para ello se utilizó un pincel de malta Kolinsky N° 6 (Anexo 12, F).

- 11) Cada caja Petri fue sellada herméticamente con parafilm.
- 12) Las cajas Petri fueron agrupadas en bloques de tratamientos completamente al azar. Se estableció 10 bloques y en cada bloque una repetición de cada tratamiento y control. El factor de bloqueo fue la posición que ocupaba la pila de cajas Petri en la repisa de laboratorio. (Anexo 12, G).
- 13) Al cabo de cinco días, los discos foliares fueron digitalizados nuevamente, según los pasos 6 y 7 (Anexo 12, H).
- 14) Las imágenes obtenidas de los discos foliares tanto al inicio como al final del experimento fueron analizadas con softwares de libre acceso para edición de imágenes GIMP (Spencer Kimball, Peter Mattis and the GIMP Development Team, EEUU) y SCION Image 4.0.2 (Scion Corporation, EEUU). Se empleó el protocolo según Carpio *et al.* (2010) (Anexo 14). Se realizaron las siguientes modificaciones, al protocolo mencionado:

Al exportar las imágenes a una computadora, se cortó a cada una, dejando un disco foliar por imagen en formato .jpg. Con ayuda del programa de libre acceso GIMP 2.8.16, se estandarizó el brillo y contraste de las imágenes cortadas. El contraste se estandarizó de la siguiente manera: se coloreó con verde las áreas sin daño, blanco para las partes consumidos o con daño provocado por la plaga. Alrededor se pintó de color negro para evitar interferencias, este procedimiento se realizó tanto en discos foliares iniciales y finales.

Con las imágenes obtenidas en Gimp, se procedió a trabajar en Scion Image 4.0.2, el cual generó dos versiones de imagen, la una a color y la otra en escala de grises. Se trabajó únicamente con la imagen en color, a ésta, se bajó el contraste de Threshold; para el caso de residuos de discos foliares el rango de lumbral fue de 150 – 250. Con ello se buscó un óptimo contraste entre las zonas dañadas (zonas blancas) y las zonas sanas (zonas oscuras). Para las imágenes iniciales de discos foliares (los discos antes de ser expuestos a los tratamientos), se trabajó con valores de umbral entre 100-150. En este caso la zona blanca es el área total del disco (Anexo 15).

- 15) Para evaluar el efecto anti-alimentario se procedió a calcular el porcentaje consumido (Muñoz, 2016), y la actividad anti-alimentaria (Baskar et al., 2011).

$$\% \text{ consumido} = \frac{\text{área comida del disco}}{\text{área del disco al inicio del bioensayo}} * 100$$

Ecuación 01. Porcentaje consumido

El porcentaje consumido evalúa la porción de la hoja de brócoli consumida por larvas de *Plutella xylostella*. Un alto porcentaje consumido indica que las larvas consideran una fuente propicia de alimento, disminuyendo o inhibiendo un efecto anti-alimentario.

$$\text{Actividad anti-alimentaria (\%)} = \frac{ACC - ACT}{ACC} * 100$$

Donde:

ACC = Área de hoja consumida en control

ACT = Área de hoja consumida en tratamiento

Ecuación 02. Actividad anti-alimentaria

El porcentaje de actividad anti-alimentaria evalúa el potencial de una sustancia para inhibir el deseo de alimentación en la larva de *Plutella xylostella*, existiendo alimento.

## 8. **Bioensayo para determinar el efecto larvicida**

Para este bioensayo se empleó dos metodologías, una para determinar la toxicidad por contacto de los extractos en larvas de *Plutella xylostella*, (método de inmersión larval), mientras que la segunda metodología evaluó el efecto de toxicidad por digestión (método de inmersión foliar) en las larvas. Ambas metodologías empleadas fueron propuestas por (Hill & Foster, 2000) con ciertas modificaciones.

En los dos casos se empleó larvas de *P. xylostella* del segundo y tercer instar larval los discos foliares empleados se los obtuvo de similar manera a lo señalado en el bioensayo para evaluar el efecto anti-alimentario.

**a. Método de inmersión larval**

Para el método de inmersión larval (Anexo 16), se procedió de la siguiente manera:

- 1) Se colocó 50 ml de solución de cada tratamiento y control en frascos rociadores.
- 2) En una caja Petri (55 mm x 5mm) se colocó en el interior papel filtro y 5 larvas de *Plutella xylostella*, empleando un pincel de malta Kolinsky N° 6.
- 3) Para realizar la aplicación del tratamiento sobre las larvas de *P. xylostella*, el frasco rociador se colocó en un soporte universal a una altura de 25 cm desde la base de dicho soporte.
- 4) Las larvas fueron rociadas tres veces y luego se las dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 5) Se colocó las larvas tratadas en otra caja Petri del mismo tamaño, para lo cual se utilizó otro pincel de pelo de malta para evitar contaminación. Previamente en esta segunda caja Petri se colocó un disco foliar de 4 cm de diámetro. Luego se selló la caja Petri herméticamente con parafilm.

**b. Método de inmersión foliar**

El método de inmersión foliar (Anexo 17), consistió en:

- 1) Los discos foliares fueron sumergidos durante 10 segundos, en los diferentes tratamientos y controles.
- 2) Se los dejó secar a temperatura ambiente, en una malla metálica, por media hora.
- 3) Sobre el disco se situó 5 larvas de *Plutella xylostella*. Se selló la caja Petri herméticamente con parafilm.

Al culminar los dos procedimientos todas las cajas Petri del experimento fueron colocadas en bloques de tratamientos completamente al azar, un grupo para cada método empleado para evaluar mortalidad.

Después de 5 días, en ambos experimentos se contó las larvas muertas en cada caja mediante identificación por pérdida de movimiento, este procedimiento se lo realizó moviendo a la larva con el pincel, hasta observar que el espécimen no presentaba reacción alguna ante tal estímulo. Finalmente se calculó el porcentaje de mortalidad empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\text{individuos muertos}}{\text{total de individuos colocados}} * 100$$

Ecuación 03. Porcentaje de mortalidad

## 9. **Bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora**

En este bioensayo se empleó la metodología denominada prueba de elección ovipositora propuesta por Chen et al., (1996) (Anexo 18).

- 1) Se colocó 40 adultos de *Plutella xylostella*: 20 hembras y 20 machos, de tres días de emergencia del estado pupal, en una caja de cría.
- 2) Se cortaron discos foliares de brócoli (*Brassica oleracea* L. var Italica cv. Avenger) variedad Avenger) de 4 cm de diámetro (Anexo 18, A).
- 3) Los discos foliares fueron sumergidos durante 10 segundos, en los diferentes tratamientos y controles (Anexo 18, B).
- 4) Se los dejó secar a temperatura ambiente, en una malla metálica, por media hora. (Anexo 18, C).
- 5) Se empleó 20 cajas de cría por cada bioensayo, estas cajas se dividieron en dos grupos, cada grupo representa un tratamiento (extracto botánico y control) y cada caja una repetición.
- 6) En cada caja de cría se colocó al lado derecho un disco sumergido en tratamiento y a lado izquierdo un disco de control. (Anexo 18, D).
- 7) Las cajas de cría se colocaron en un orden completamente aleatorio. (Anexo 18, E).

- 8) Se retiraron los discos transcurrido 24 horas.
- 9) Se procedió al conteo de los huevos ovipositados en cada disco, con la ayuda de una lupa y una pinza entomológica (Anexo 18, F).
- 10) El efecto de repelencia ovipositora se evaluó mediante el empleo del Índice de Repelencia Ovipositora, cuya sigas en inglés es ODI (Oviposition Deterrent Index) (Zhang et al., 2004).

$$ODI = \frac{c-T}{c} * 100$$

Donde:

C = Número de huevos del control

T = Número de huevos del tratamiento

Ecuación 04. Índice de repelencia ovipositora.

## 10. Análisis estadístico

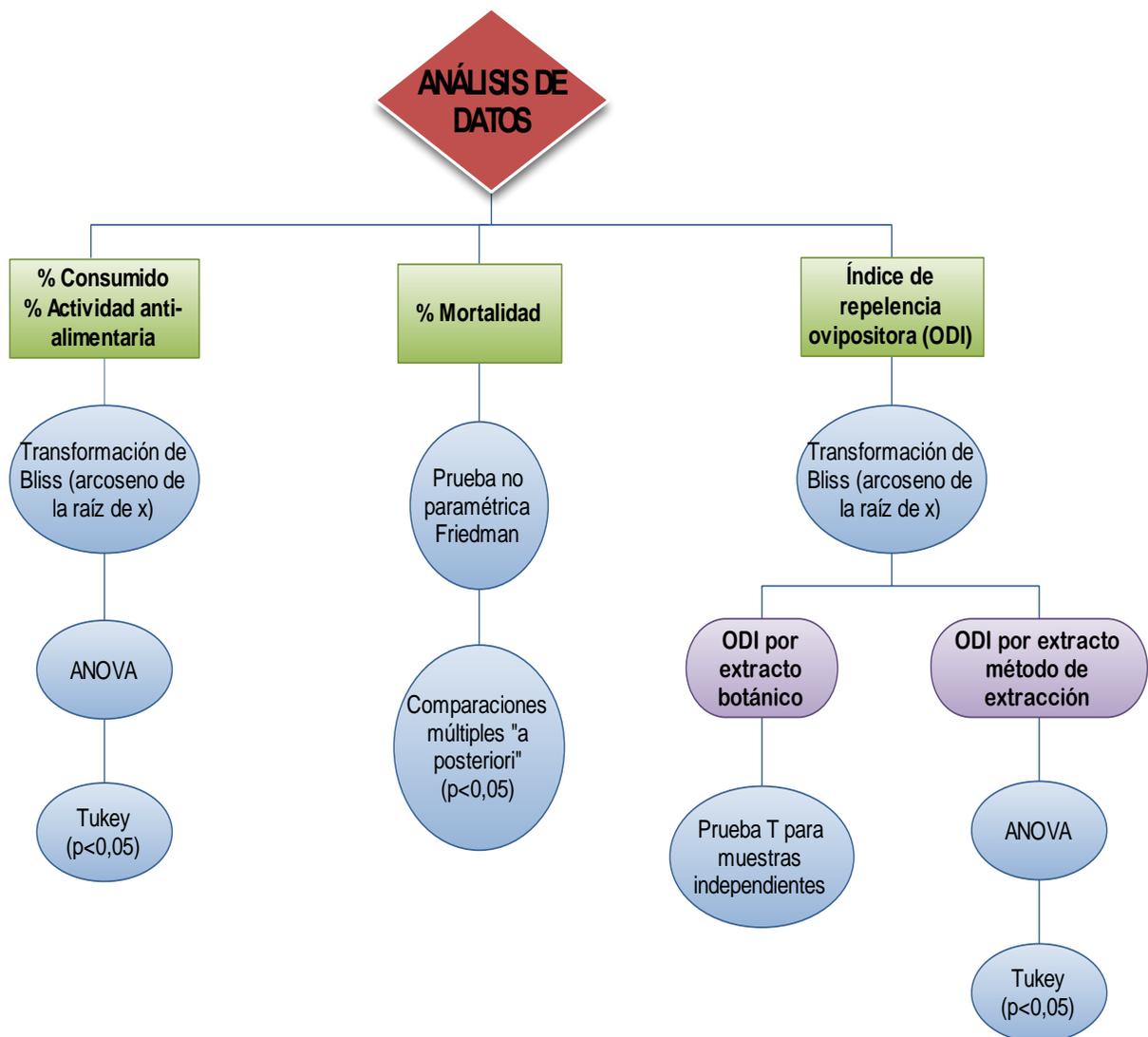
Para el análisis de los datos obtenidos en los diferentes bioensayos, se procedió a realizar análisis estadístico paramétrico y en otros casos no paramétrico, dependiendo de la naturaleza de los datos.

En el bioensayo que evaluó el efecto anti-alimentario, primero al estar los datos en porcentaje (% Consumido y % Actividad Anti-alimentaria), se procedió a aplicar la transformación de Bliss (arcoseno de la raíz de x) para normalizar los datos. Luego se aplicó análisis de varianza (ANOVA), y test de Tukey ( $p < 0,05$ ) para establecer diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora, primero se aplicó la transformación de Bliss (arcoseno de la raíz de x) para normalizar los datos. Luego para el conjunto de datos provenientes de índice de repelencia ovipositora por extracto botánico (extracto botánico vs control) se aplicó Prueba T para muestras independientes; mientras que para el conjunto de datos del índice de repelencia ovipositora por método de extracción

se empleó análisis de varianza (ANOVA), y test de Tukey ( $p < 0,05$ ) para establecer diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En datos de porcentaje de mortalidad del bioensayo para determinar el efecto larvicida, se aplicó la prueba no paramétrica Friedman, ya que no fue posible mediante transformaciones parametrizarlos. Para determinar si existen diferencias estadísticas entre los tratamientos se utilizaron comparaciones múltiples “a posteriori” (Conover, 1999) con un nivel de significancia de 0,05.



**Figura 4.** Análisis estadístico de datos empleado en cada bioensayo.

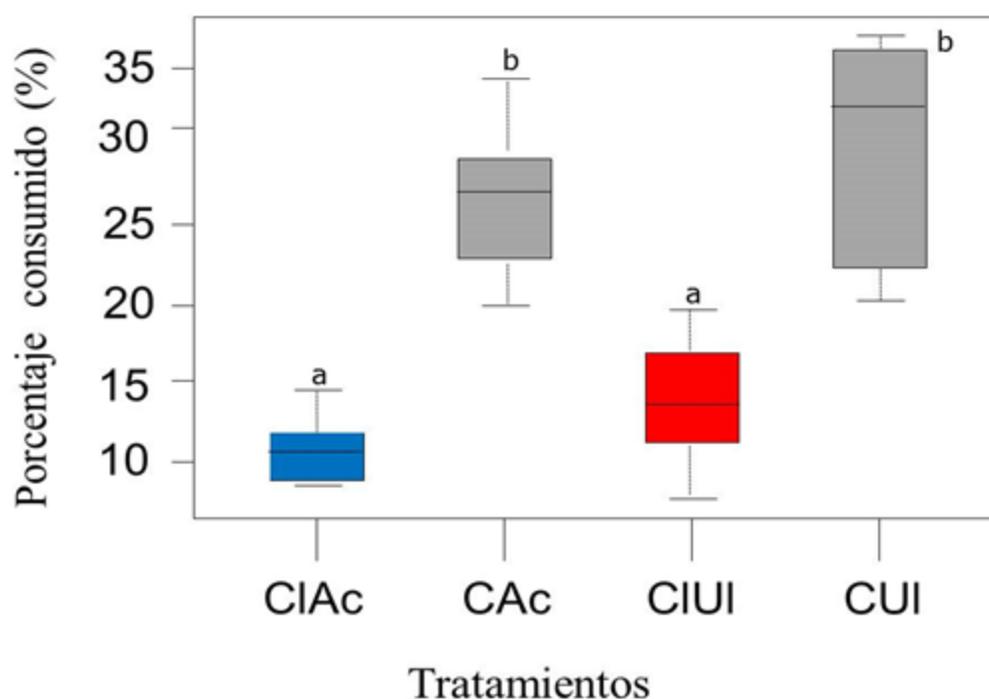
## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. RESULTADOS

#### 1. Efecto anti-alimentario

##### a. Resultados del método de extracción en cada planta estudiada sobre el efecto anti-alimentario

##### 1) *Clibadium* sp.



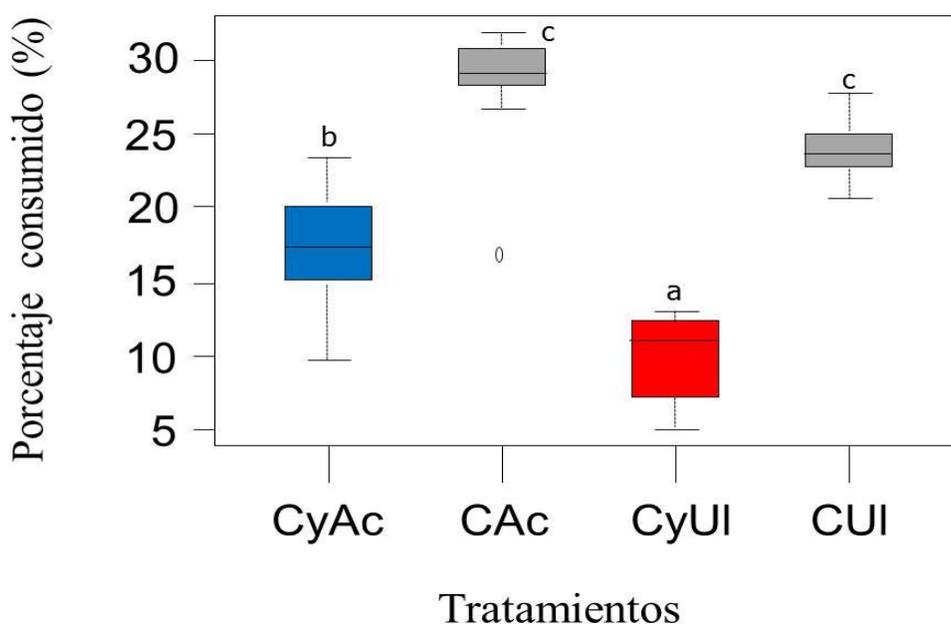
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 5.** Porcentaje consumido de hojas de brócoli por *Plutella xylostella* para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de *Clibadium* sp. ClAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); CIUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 5, indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de extracción vs controles de *Clibadium* sp., (Anexo 27). De acuerdo al porcentaje consumido por larvas de *Plutella xylostella*, se estableció que existe dos rangos

estadísticos; en el primer rango se ubicaron a los dos extractos de *Clibadium* sp., como los mejores tratamientos cuyo porcentaje consumido fueron de: 10,45% para el extracto acuoso y 13,71% para el extracto por ultrasonido. En este caso no existió diferencia entre los tipos de métodos de extracción estudiados. En el segundo rango se ubicaron los controles, cuyos porcentajes consumidos medios fueron superiores al 26%.

2) *Cyclanthus bipartitus*



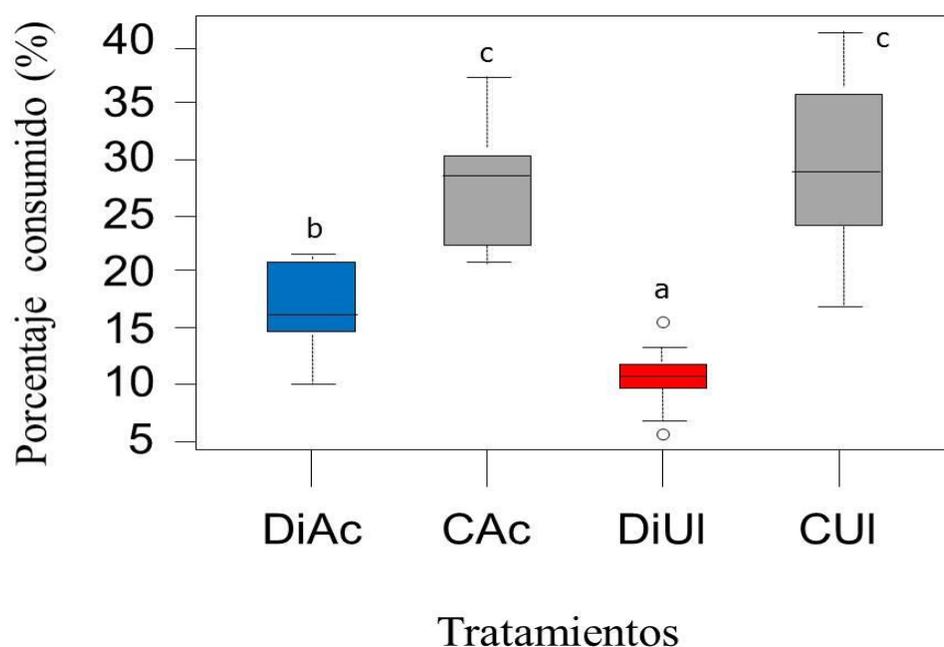
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 6.** Porcentaje consumido de hojas de brócoli por *Plutella xylostella* para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de *Cyclanthus bipartitus*. CyAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); CyUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 6 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de *Cyclanthus bipartitus* y sus controles (Anexo 28). De acuerdo al porcentaje consumido por larvas de *Plutella xylostella*, se estableció tres rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó al mejor tratamiento, el cual fue el extracto obtenido mediante ultrasonido. Su media del porcentaje consumido fue de 10,04%. Los

controles presentaron un mayor porcentaje de consumo (>23%), es decir, un bajo efecto anti-alimentario, por lo cual se ubicaron en un tercer rango estadístico. En el segundo rango estadístico se ubicó al tratamiento del extracto acuoso de *Cyclanthus bipartitus*, con una media de porcentaje consumido de 17,32%. En este caso existió diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

### 3) *Dieffenbachia costata*



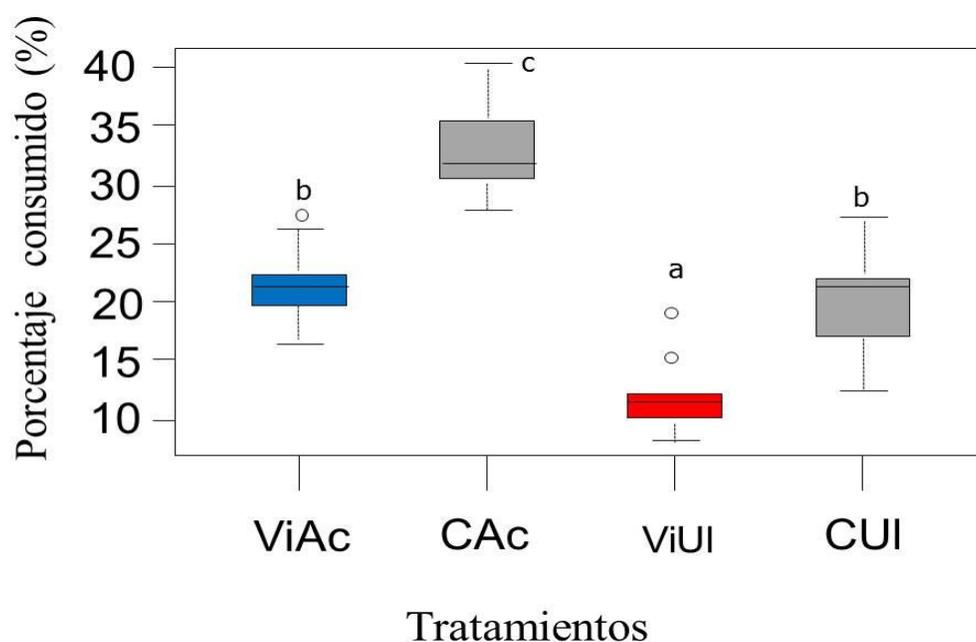
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 7.** Porcentaje consumido de hojas de brócoli por *Plutella xylostella* para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de *Dieffenbachia costata*. DiAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); DiUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 7 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de *Dieffenbachia costata* y sus controles (Anexo 29). De acuerdo al porcentaje consumido por larvas de *Plutella xylostella*, se estableció que existen tres rangos estadísticos; en el primer rango se ubicó al tratamiento del extracto de *D. costata* obtenido mediante método de extracción asistida por ultrasonido. La media del

porcentaje consumido fue de 10,61%. Los controles presentaron un mayor porcentaje de consumo (>27%), es decir, un bajo efecto anti-alimentario, por lo que se ubicaron en un tercer rango estadístico. En el segundo rango se ubicó al tratamiento del extracto de *D. costata* obtenido mediante método acuoso, con una media de porcentaje de consumo de 16,79%. En este caso existió diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

4) *Vismia* sp.



\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

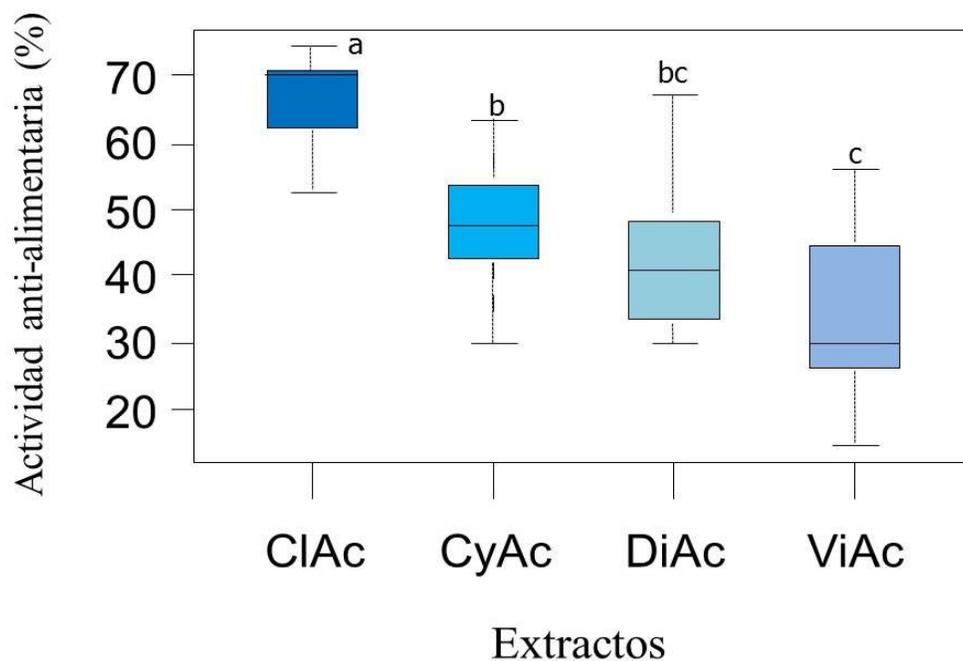
**Figura 8.** Porcentaje consumido de hojas de brócoli por *Plutella xylostella* para evaluar el efecto anti-alimentario producido por extractos de *Vismia* sp. ViAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); ViUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 8 indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de extracción de *Vismia* sp. y sus controles (Anexo 30). De acuerdo al porcentaje consumido por larvas de *Plutella xylostella* se estableció que existen tres rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó al tratamiento del extracto de *Vismia* sp. obtenido mediante método de extracción asistida con ultrasonido. La media del porcentaje

consumido fue de 12,09%. El control acuoso presentó un mayor porcentaje de consumo (32,74%) por lo cual se lo ubicó en un tercer rango estadístico. En el segundo rango se situó al tratamiento del extracto de *Vismia* sp obtenido mediante método acuoso y al control del método de ultrasonido. En este caso existió diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

**b. Resultados de las plantas estudiadas con cada método de extracción sobre el efecto anti-alimentario**

1) Método de extracción acuosa



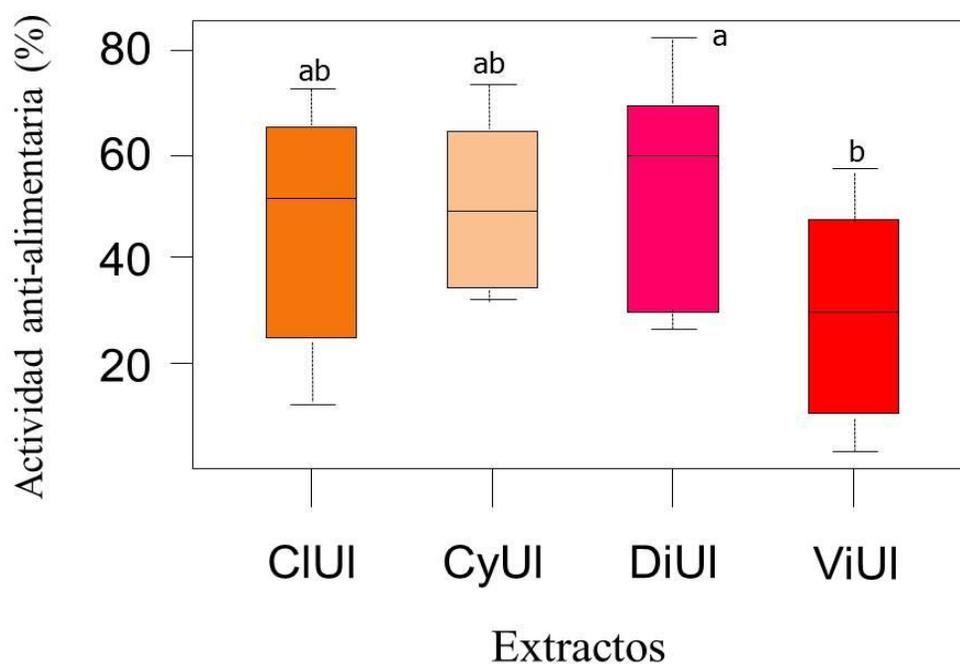
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 9.** Porcentaje de actividad anti-alimentaria de *Plutella xylostella* en hojas de brócoli producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ClAc: (*Clibadium* sp); CyAc: (*Cyclanthus bipartitus*); DiAc: (*Dieffenbachia costata*); ViAc: (*Vismia* sp).

Los resultados mostrados en la Figura 9 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de los extractos obtenidos por método acuoso de las cuatro

plantas en estudio (Anexo 31). De acuerdo al porcentaje de actividad anti-alimentaria de larvas de *Plutella xylostella* se estableció que existen tres rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó al tratamiento del extracto de *Clibadium* sp., con el que se obtuvo el mayor porcentaje anti-alimentario. La media del porcentaje anti-alimentario que se obtuvo fue de 67,10%. En el segundo rango estadístico se ubicó al extracto de *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costa*; sus medias de actividad anti-alimentaria fueron de 47,66% y 42,96% respectivamente. Mientras que el extracto que menor efecto anti-alimentario presentó, fue el extracto de *Vismia* sp., este tratamiento se situó en un tercer rango con una media de 34,23%. El extracto de *Dieffenbachia costata* comparte rangos estadístico con *C. bipartitus* y *Vismia* sp.

2) Método de extracción asistida por ultrasonido

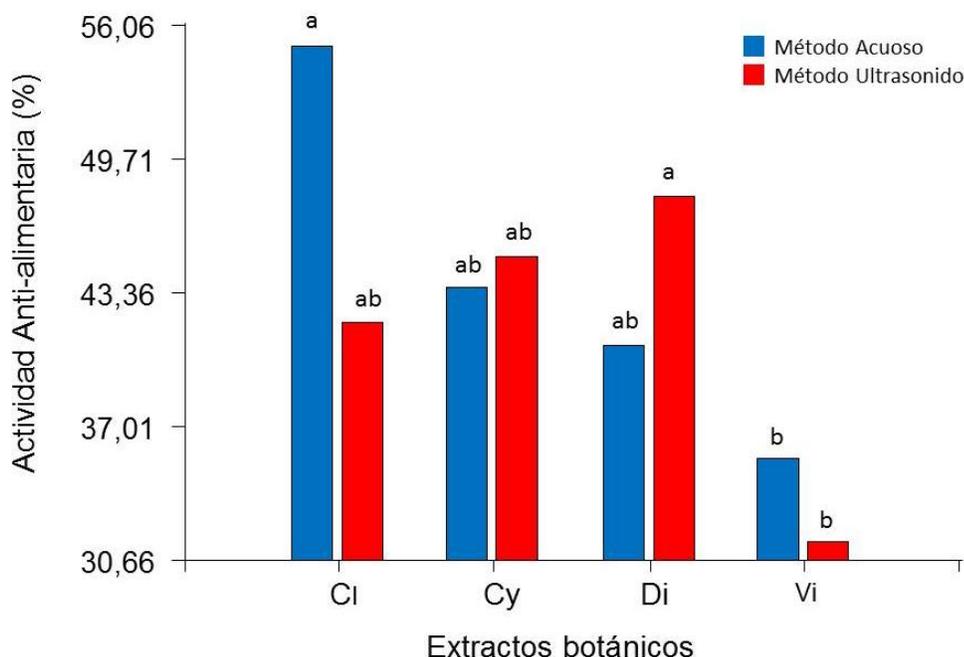


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 10.** Porcentaje de actividad anti-alimentaria de *Plutella xylostella* en hojas de brócoli producido por extractos obtenidos mediante ultrasonido, de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. CIUI: (*Clibadium* sp); CyUI: (*Cyclanthus bipartitus*); DiUI: (*Dieffenbachia costata*); ViUI: (*Vismia* sp).

Los resultados mostrados en la Figura 10 indican que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los extractos obtenidos mediante el método de extracción asistido por ultrasonido de las cuatro plantas recolectadas en la Amazonía (Anexo 32). De acuerdo al porcentaje de actividad anti-alimentaria de larvas de *Plutella xylostella*, se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó los extractos de *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costata*. Se destaca que con el extracto de *Dieffenbachia costata* se obtuvo el mayor porcentaje de actividad anti-alimentaria, con una media de 54,95%. En el segundo rango se ubicaron los extractos de *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp. Se obtuvo el menor porcentaje de actividad anti-alimentaria con el extracto de *Vismia* sp., su media fue 29,92%. Sin embargo se debe señalar que los extractos de *Clibadium* sp. y de *Cyclanthus bipartitus* comparten rango estadísticamente.

c. Cuadro combinado de los dos efectos: plantas y métodos de extracción sobre el parámetro anti-alimentario de *Plutella xylostella*



\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 11.** Promedio del porcentaje de actividad anti-alimentaria de larvas de *Plutella xylostella* en hojas de brócoli producido por extractos botánicos y métodos de extracción. Cl: (*Clibadium* sp.); Cy: (*Cyclanthus bipartitus*); Di: (*Dieffenbachia costata*); Vi: (*Vismia* sp.).

Los resultados mostrados en la Figura 11 indican que la interacción de los efectos provocados por los extractos botánicos y los métodos de extracción es estadísticamente significativa, por lo que se establecieron dos rangos estadísticos (Ver Anexo 33). En el primer rango se ubicó los extractos ya sean acuosos o por ultrasonido de: *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costata*. Sus porcentajes anti-alimentario medios estuvieron en un rango de 40,90% - 55,08%.

En el segundo rango se ubicó los extractos ya sean acuosos o por ultrasonido de: *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp., adicionalmente a ellos se ubicaron los extractos de

*Clibadium* sp. (método ultrasonido), y extracto acuoso de *Dieffenbachia costata*. Sus porcentajes anti-alimentario estuvieron en un rango de 31,49% - 45,07%.

Hay que señalar que los dos extractos de *Cyclanthus bipartitus*, el extracto por ultrasonido de *Clibadium* sp., y el extracto acuoso de *Dieffenbachia costata* comparten rango estadísticamente.

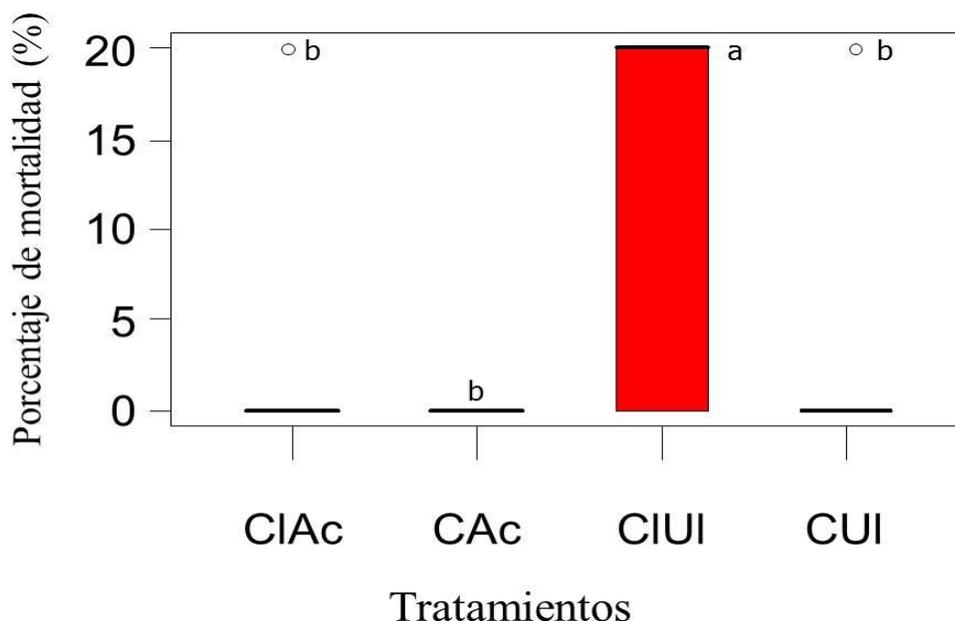
Se debe destacar que con el extracto acuoso de *Clibadium* sp. se obtuvo el más alto porcentaje de actividad anti-alimentaria, 55,08%; mientras que el menor porcentaje se lo obtuvo con el extracto de *Vismia* sp. por ultrasonido asistida, con una media de actividad anti-alimentaria de 31,49%.

## **2. Efecto larvicida**

Como se señaló anteriormente en metodología, para evaluar el efecto larvicida se empleó dos métodos, método de inmersión foliar y el método de inmersión larval, los cuales fueron comparados. De acuerdo al análisis estadístico realizado por prueba no paramétrica de Friedman y mediante comparaciones múltiples “a posteriori” (Anexo 34), se estableció que el mejor método fue el método de inmersión foliar. En esta sección de resultados se muestra los resultados usando el método de inmersión foliar.

a. **Resultados del método de extracción en cada planta estudiada sobre el efecto larvicida**

1) *Clibadium* sp.

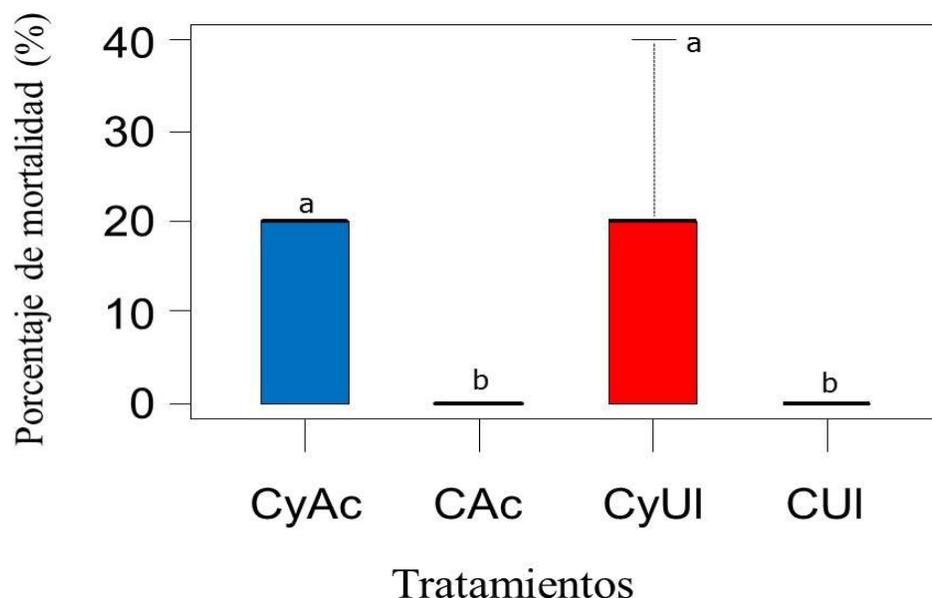


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes.  
(Comparaciones múltiples “a posteriori”;  $p > 0,05$ ).

**Figura 12.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producidos por extractos de *Clibadium* sp. ClAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); CIUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 12 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de *Clibadium* sp. y sus controles (Anexo 35). Para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad, se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó al tratamiento del extracto obtenido por método ultrasonido con un mayor porcentaje de mortalidad. La mediana de porcentaje de mortalidad obtenida fue de 20%. En cambio el extracto acuoso y los dos controles se ubicaron en un segundo rango, el cual se observó un 0% de mortalidad. En este caso existió diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

2) *Cyclanthus bipartitus*

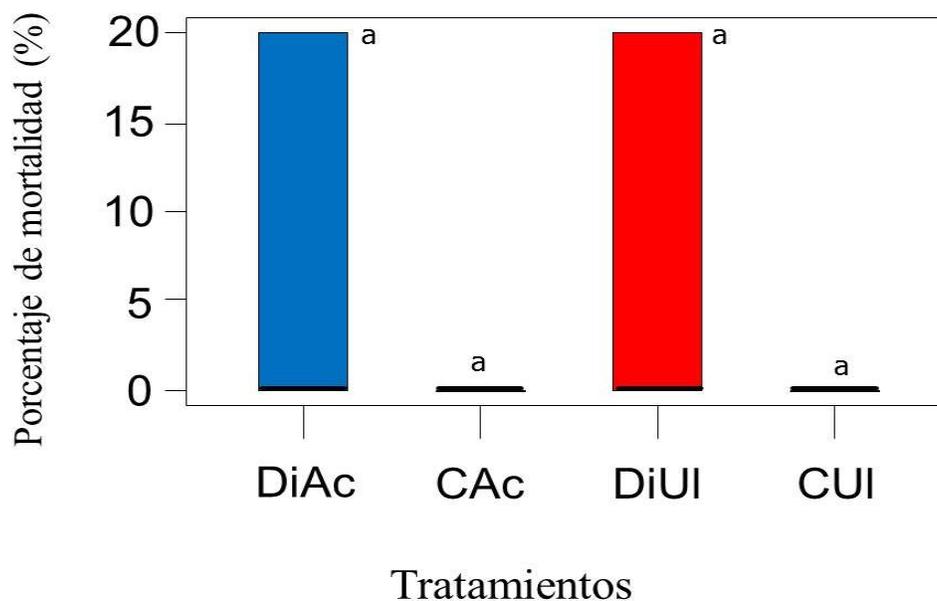


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes.  
(Comparaciones múltiples “a posteriori”;  $p > 0,05$ ).

**Figura 13.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producidos por extractos de *Cyclanthus bipartitus*. CyAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); CyUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 13 indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de extracción de *Cyclanthus bipartitus* y sus controles (Anexo 36). Para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad, se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó a los dos extractos de *C. bipartitus* como los mejores tratamientos, con los dos tratamientos se obtuvo una mediana de porcentaje de mortalidad de 20%. En el segundo rango estadístico se ubicaron los controles. En este caso no existió diferencia entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

3) *Dieffenbachia costata*

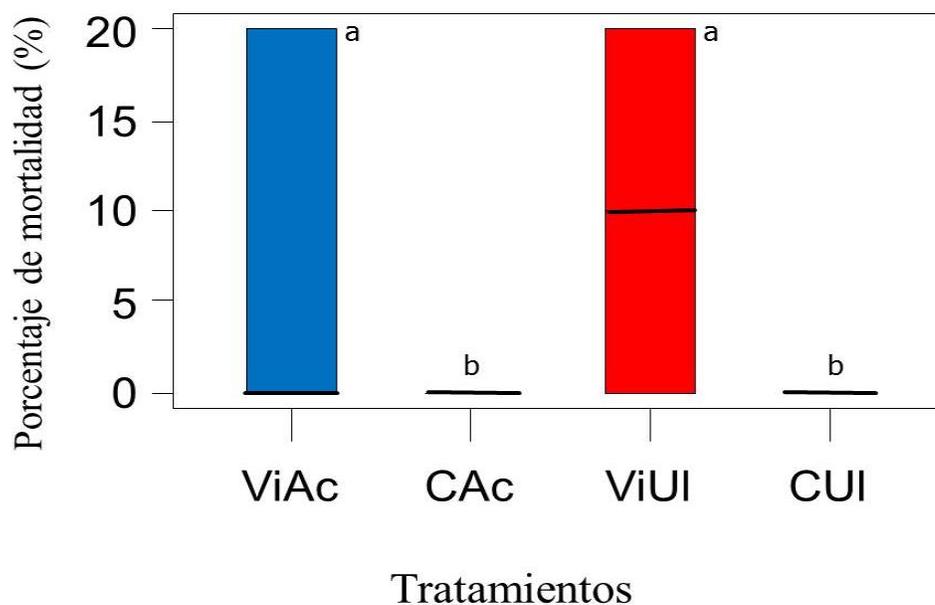


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Comparaciones múltiples “a posteriori”;  $p > 0,05$ ).

**Figura 14.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producido por extractos de *Dieffenbachia costata*. DiAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); DiUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 14 indican que no existe diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de *Dieffenbachia costata* y sus controles (Anexo 37). Hay que indicar que en los tratamientos de *Dieffenbachia costata* se evidenció una gran dispersión de datos (Anexo 23).

4) *Vismia* sp.



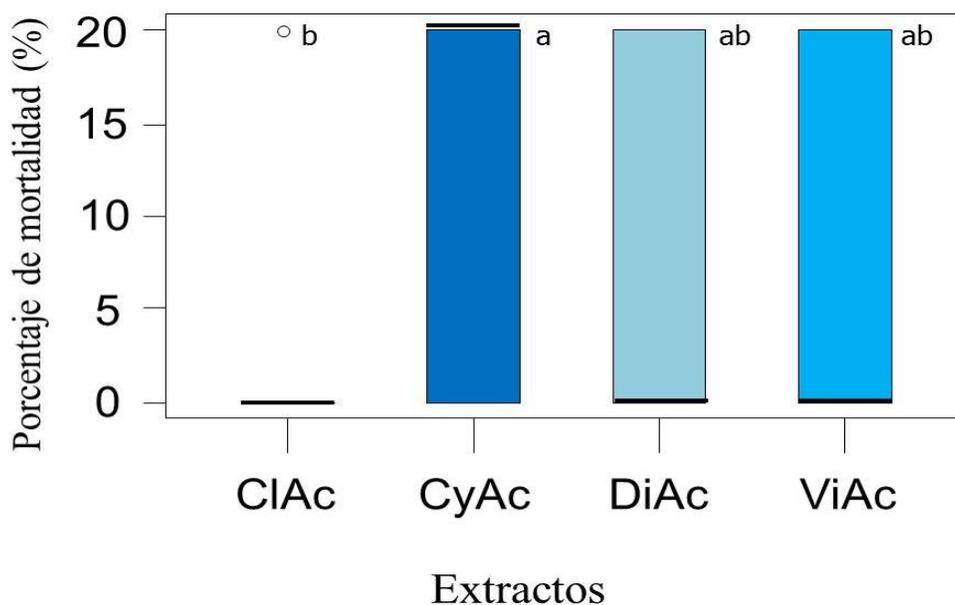
\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes.  
(Comparaciones múltiples “a posteriori”;  $p > 0,05$ ).

**Figura 15.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producido por extractos de *Vismia* sp. ViAc: (Extracto acuoso); CAc: (Control acuoso); ViUI: (Extracto mediante ultrasonido); CUI: (Control ultrasonido).

En Figura 15, los resultados obtenidos indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de extracción de *Vismia* sp. y sus controles (Anexo 38). Para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad, se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó a los dos extractos botánicos. En el segundo rango estadístico se ubicaron los controles. En este caso no existió diferencia entre los tipos de métodos de extracción estudiados.

**b. Resultados de las plantas estudiadas con cada método de extracción sobre el efecto larvicida**

1) Método de extracción acuosa

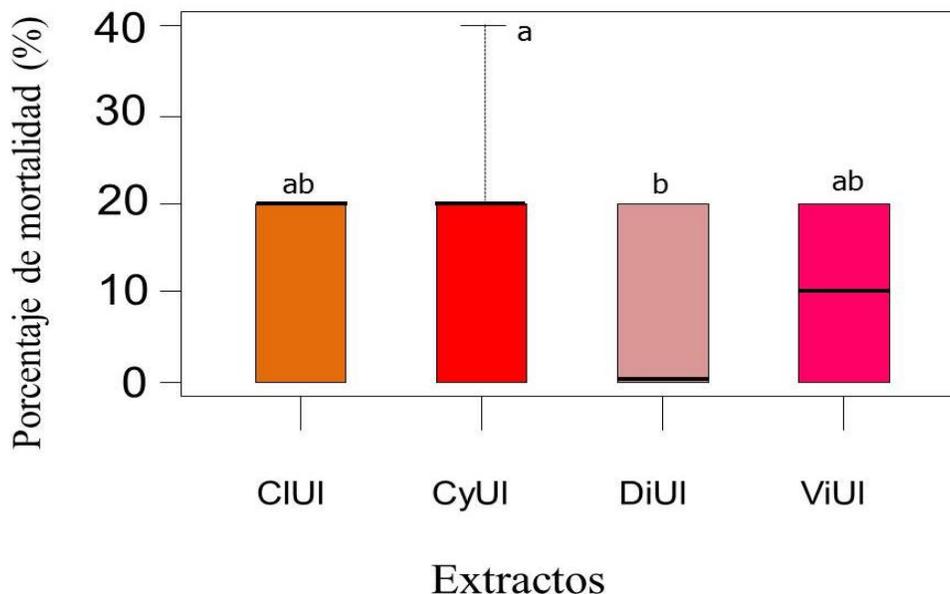


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ ).

**Figura 16.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ClAc: (*Clibadium* sp.); CyAc: (*Cyclanthus bipartitus*); DiAc: (*Dieffenbachia costata*); ViAc: (*Vismia* sp.).

Los resultados mostrados en la Figura 16 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de los extractos acuosos de las cuatro plantas en estudio. Para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella*, se estableció que existen dos rangos estadísticos (Anexo 39). En el primer rango se ubicaron los extractos de *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp. En el segundo rango se ubicaron los tratamientos con los que se obtuvo 0% de mortalidad, estos fueron: *Clibadium* sp., *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp. Sin embargo se debe señalar que los extractos de *D. costata* y *Vismia* sp. comparten rango estadísticamente.

2) Método de extracción asistida por ultrasonido



\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes. (Tukey;  $p > 0,05$ )

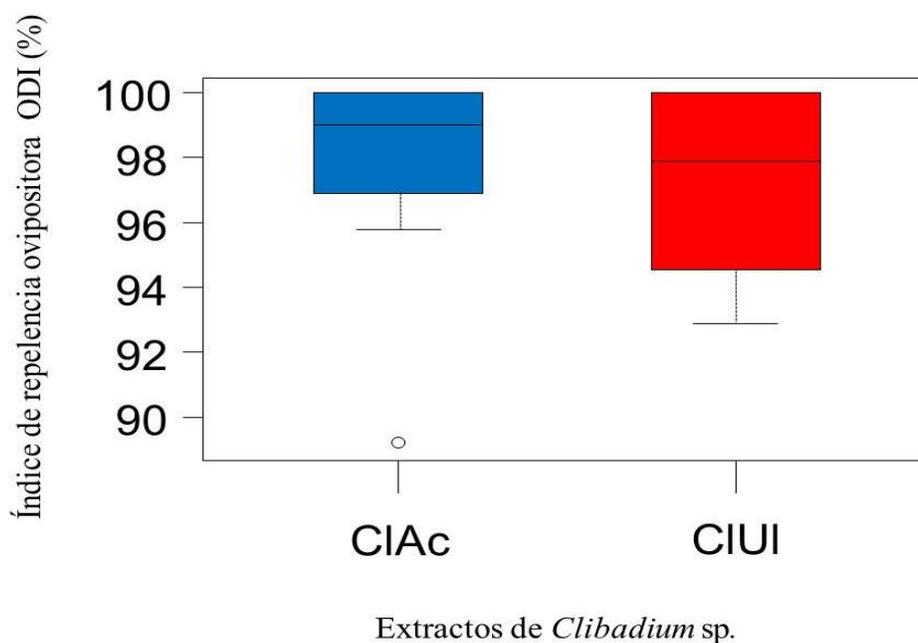
**Figura 17.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* producido por extractos botánicos obtenidos mediante ultrasonido asistida de cuatro plantas amazónicas. CIUI: (*Clibadium* sp.); CyUI: (*Cyclanthus bipartitus*); DiUI: (*Dieffenbachia costata*); ViUI: (*Vismia* sp.).

Los resultados mostrados en la Figura 17 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de extracción de los extractos obtenidos mediante el método de extracción asistido por ultrasonido de las cuatro plantas recolectadas en la Amazonía (Anexo 40). De acuerdo al porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella*, se estableció que existe dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó los tratamientos de *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp. El porcentaje de mortalidad para estos casos se encontró en un rango de 10 – 20%. En el segundo rango se ubicó los tratamientos de *Clibadium* sp., *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp.; siendo el extracto de *D. costata* el tratamiento con el que menor porcentaje de mortalidad se obtuvo, 0%. Hay que señalar que los extractos de *Clibadium* sp. y *Vismia* sp. comparten rango estadístico.

### 3. Efecto de repelencia ovipositora

#### a. Resultados del método de extracción en cada planta estudiada sobre el efecto de repelencia ovipositora

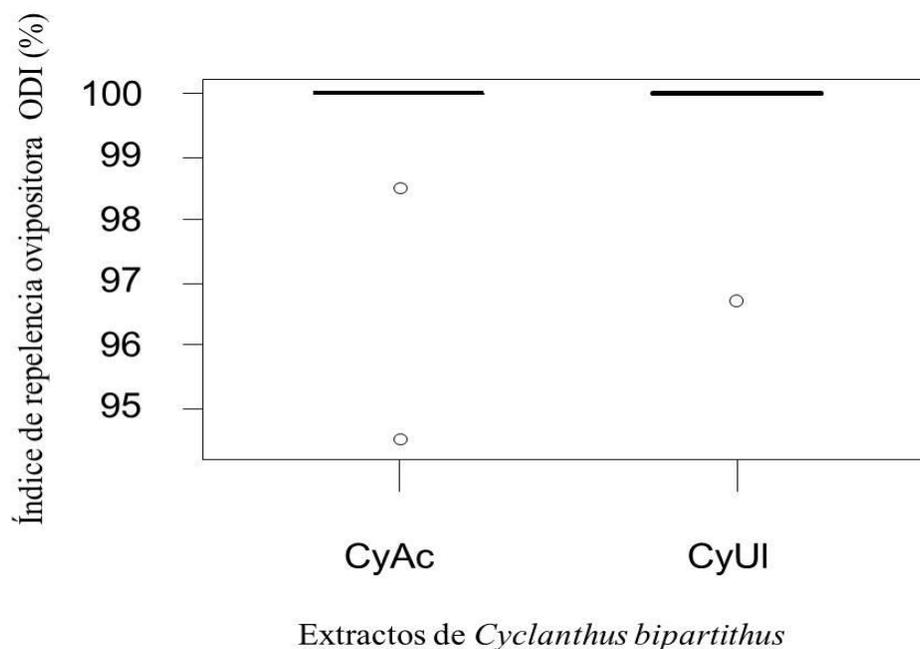
##### 1) *Clibadium* sp.



**Figura 18.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* provocado por extractos de *Clibadium* sp. CIAc: (Extracto acuoso); CIUI: (Extracto mediante ultrasonido).

En la Figura 18 se observa que la repelencia ovipositora en los extractos de *Clibadium* sp. ya sea acuoso o por ultrasonido, no presentan diferencia estadística (Anexo 41). En este caso se obtuvo índices de repelencia ovipositora medios entre 97,84 – 97,32%.

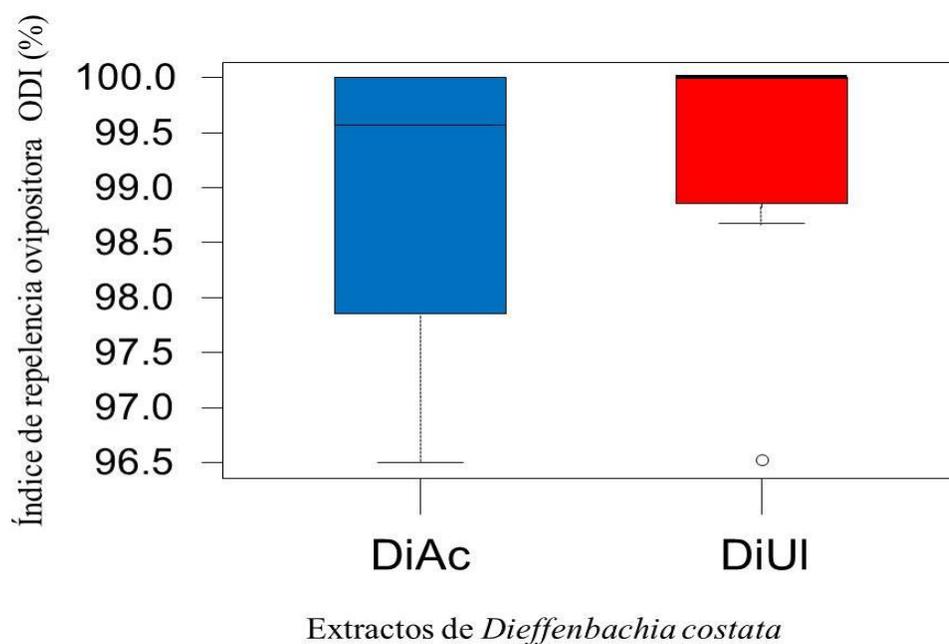
2) *Cyclanthus bipartitus*



**Figura 19.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* provocado por extractos de *Cyclanthus bipartitus*. CyAc: (Extracto acuoso); CyUI: (Extracto mediante ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 19, indican que no existen diferencias significativas entre los diferentes extractos de *Cyclanthus bipartitus*, ya sea acuoso o por ultrasonido (Anexo 32). En este caso se observa un índice de repelencia ovipositora medio de 99,30% - 99,68%.

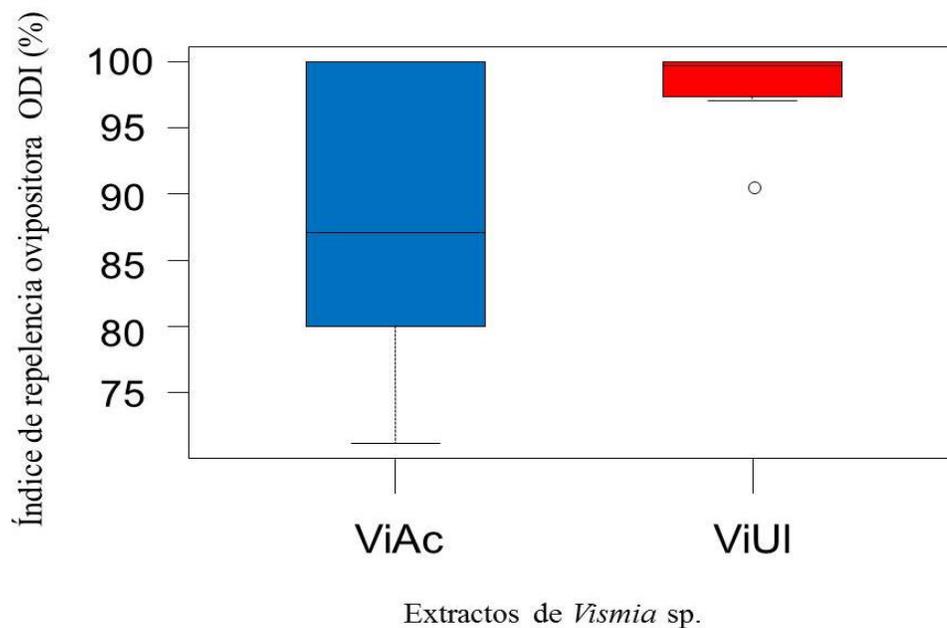
3) *Dieffenbachia costata*



**Figura 20.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* provocado por extractos de *Dieffenbachia costata*. DiAc: (Extracto acuoso); DiUI: (Extracto mediante ultrasonido).

En la Figura 19 se observa que la repelencia ovipositora en los extractos de *Dieffenbachia costata*, ya sea acuoso o por ultrasonido, no presentan diferencia estadística (Anexo 43). En este caso se observa índices de repelencia ovipositora medios de 98,97 – 99,41%.

4) *Vismia* sp.

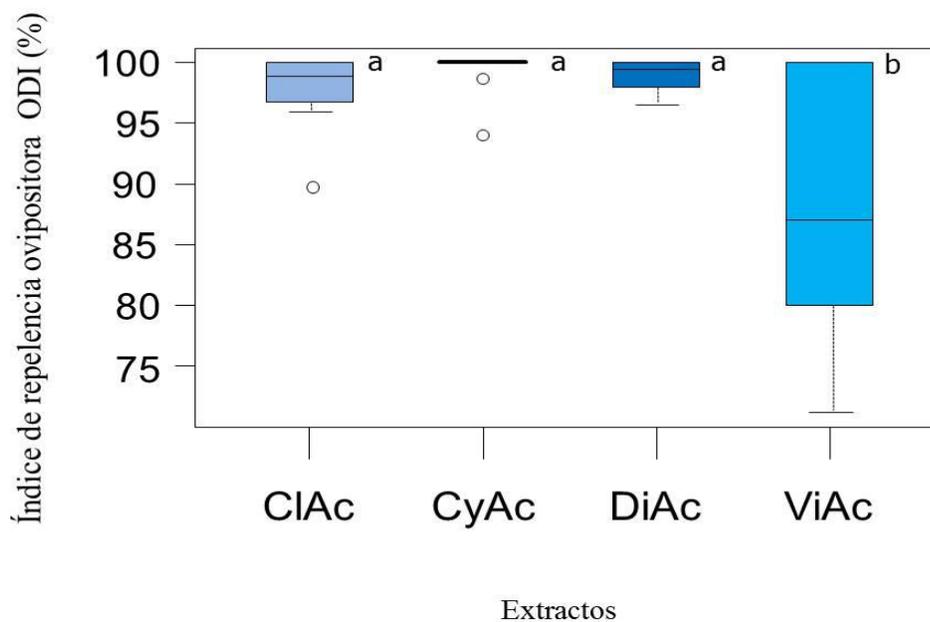


**Figura 21.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* (efecto repelencia ovipositora) provocado por extractos de *Vismia* sp. ViAc: (Extracto acuoso); ViUI: (Extracto mediante ultrasonido).

Los resultados mostrados en la Figura 21, indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de extracción de *Vismia* sp. (Anexo 44). Se observa que el índice de repelencia ovipositora es mayor en el tratamiento del extracto obtenido por ultrasonido, el valor medio en este caso es 98,34%, mientras que con el extracto acuoso se obtuvo un índice de repelencia ovipositora medio de 87,77%, aunque se debe destacar que ambos extractos producen un efecto de repelencia ovipositora, ya que su índice es cercano a 100%.

**b. Resultados de las plantas estudiadas con cada método de extracción sobre el efecto de repelencia ovipositora**

1) Método de extracción acuosa

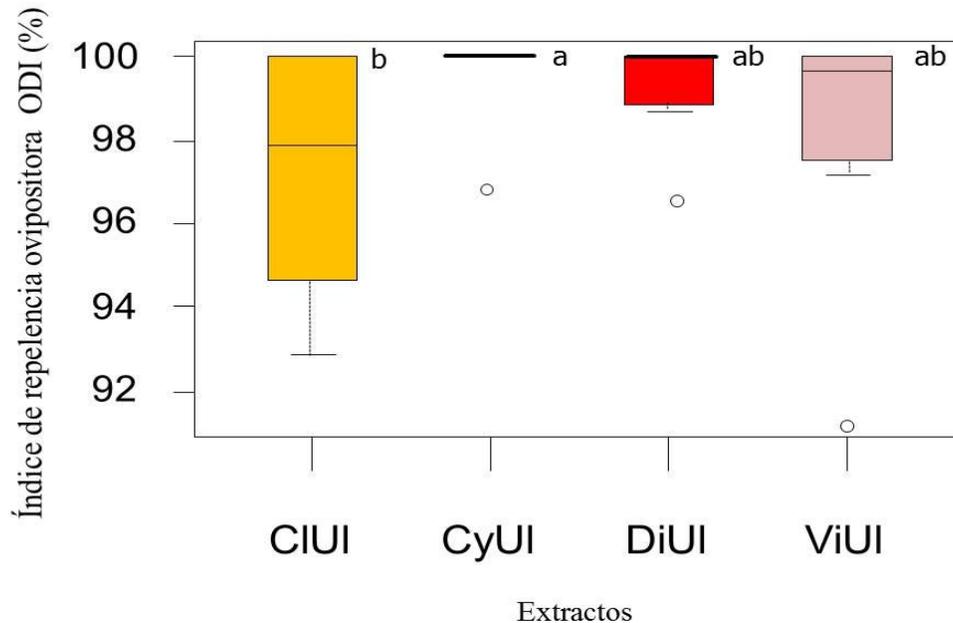


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 22.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* producido por extractos acuosos de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. ClAc: (*Clibadium* sp.); CyAc: (*Cyclanthus bipartitus*); DiAc: (*Dieffenbachia costata*); ViAc: (*Vismia* sp.).

Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de los extractos acuosos de las cuatro plantas en estudio (Anexo 45). De acuerdo al índice de repelencia ovipositora se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó a todos los tratamientos que produjeron el mayor índice de repelencia ovipositora, entre ellos se encontraron los extractos de *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costata*. Las medias de índice de repelencia ovipositora fueron 97,84%, 99,30% y 98,97% respectivamente. Mientras que el extracto de *Vismia* sp., con un índice de repelencia medio de 87,77% se lo ubicó en un segundo rango.

2) Método de extracción asistida por ultrasonido

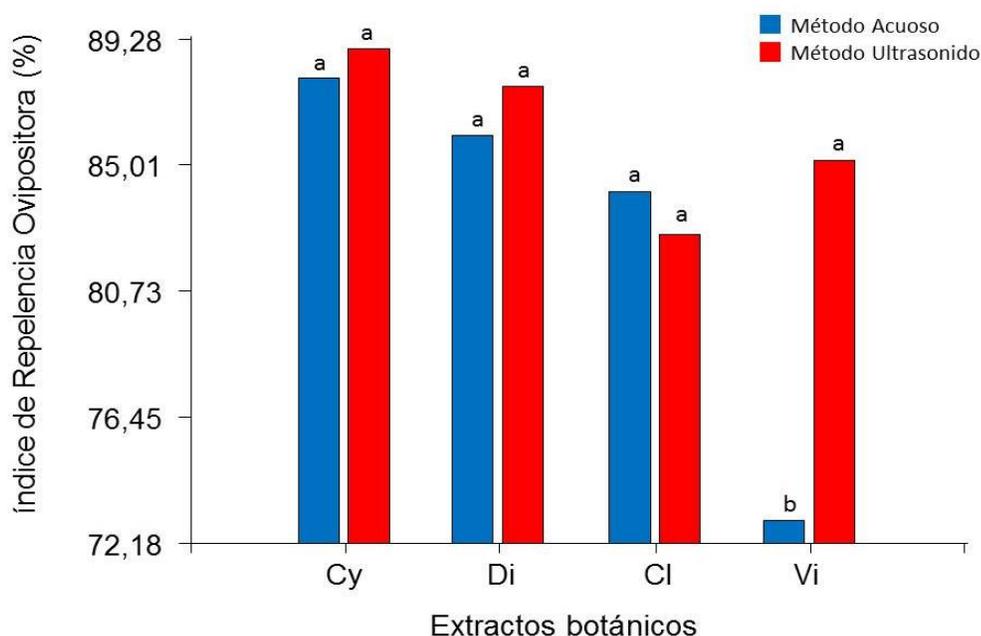


\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Tukey;  $p > 0,05$ )

**Figura 23.** Porcentaje del índice de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella* producido por extractos obtenidos mediante extracción con ultrasonido asistida de cuatro plantas recolectadas en la Amazonía. CIUI: (*Clibadium* sp.); CyUI: (*Cyclanthus bipartitus*); DiUI: (*Dieffenbachia costata*); ViUI: (*Vismia* sp.).

Los resultados mostrados en la Figura 23 indican que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de los extractos obtenidos mediante el método de extracción asistida por ultrasonido de las cuatro plantas recolectadas en la Amazonía (Anexo 46). De acuerdo al índice de repelencia ovipositora, se estableció que existen dos rangos estadísticos. En el primer rango se ubicó a los extractos de *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp.; con los cuales se obtuvo un ODI de 98,34 – 99,68%. En el segundo rango se ubicaron los tratamientos de *Clibadium* sp., *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp. Se debe señalar que con el extracto de *Clibadium* sp. se obtuvo el menor índice de repelencia ovipositora de 97,32%. Los extractos de *Dieffenbachia costata* y de *Vismia* sp. comparte rango estadístico.

c. Cuadro resumen del efecto de las plantas y los métodos de extracción sobre el parámetro de repelencia ovipositora de *Plutella xylostella*



\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 24.** Promedio del índice de repelencia ovipositora a *Plutella xylostella* producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción. Cl: (*Clibadium* sp); Cy: (*Cyclanthus bipartitus*); Di: (*Dieffenbachia costata*); Vi: (*Vismia* sp).

Los resultados mostrados en la Figura 24 indican que la interacción de los efectos provocados por los extractos botánicos y los métodos de extracción es estadísticamente significativa, por lo que se establecieron dos rangos estadísticos (Ver Anexo 33). En el primer rango se ubicó los extractos ya sean acuosos o por ultrasonido de: *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata*, *Clibadium* sp., y extracto por ultrasonido de *Vismia* sp. Sus índices de repelencia ovipositora estuvieron en un rango de 82,62% - 88,97%.

En el segundo rango se ubicó únicamente al extracto acuoso de *Vismia* sp., su índice medio de repelencia ovipositora fue de 72,93%, siendo éste tratamiento con el que menor índice de repelencia se consiguió.

## **B. DISCUSIÓN**

A continuación se detalla los efectos ocasionados por los extractos obtenidos por dos métodos de extracción de las cuatro plantas estudiadas:

### **1. Efecto anti-alimentario**

En el bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario mediante el porcentaje consumido por larvas de *Plutella xylostella* en hojas de brócoli se observó que los tratamientos con los que se obtuvo resultados significativos fueron con los extractos de las cuatro plantas en estudio obtenidos mediante método de extracción asistido por ultrasonido. Las medias de porcentajes consumidos que se encontraron fueron de 10,04% - 13,71%.

Se ha realizado varios estudios en los que se analiza la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido con respecto a métodos tradicionales. Azuola & Vargas, (2007) señalan que el método de ultrasonido es más eficiente que la extracción por métodos tradicionales y además puede asistir a métodos de extracción no convencionales. Gao & Liu, (2005) indican que el ultrasonido tiene una eficiencia 70 veces mayor que la extracción por solventes, 11 veces mayor que la extracción por destilación y 35 veces mayor que la extracción por soxhlet. Rostagno et al., (2003) encontró que mediante el método de ultrasonido se obtiene 6,4% a 25% más isoflavonas que por método tradicional por solventes. La eficiencia de extracción que posee este método se debe a que permite la ruptura de las células vegetales liberando así más principios activos al medio de extracción (Proestos & Komaitis, 2006). Coincidiendo de esta manera con lo obtenido en los resultados de extracción por ultrasonido al comparar con el método acuoso, obtenidos en la presente investigación.

Sin embargo en el caso de *Clibadium* sp., no existió diferencia significativa entre los dos tipos de extracción empleadas (Figura 5). Es posible que los metabolitos responsables del efecto anti-alimentario de larvas de *Plutella xylostella* sean compuestos polares, por lo que fueron extraídos por el agua fácilmente. Según Vásquez, (2003) el agua es un excelente solvente para solutos polares e iónicos, denominados hidrófilos. Ribereau-Gayon, (1998) indica que el método de maceración es un método con el que se puede obtener únicamente

compuestos solubles en agua, tales como: compuesto fenólicos, particularmente antocianos y taninos, entre otras sustancias (aromáticas, nitrogenadas, polisacáridos, minerales, etc).

En relación con la actividad de las plantas sobre el efecto anti-alimentario se estableció que el extracto acuoso de *Clibadium sp.* y el extracto por ultrasonido de *Dieffenbachia costata* fueron con los que mayor porcentaje anti-alimentario se consiguió, 67,1% para *Clibadium sp.* (Figura 9) y 54,97% para *D. costata* (Figura 10). Adicionalmente el porcentaje anti-alimentario del extracto mediante ultrasonido de *Cyclanthus bipartitus* presentó similar comportamiento al el extracto de *D. costata*, su media fue de 50,07%.

Las referencias bibliográficas sobre el efecto anti-alimentario provocado por estas plantas son escasas, sin embargo Regnault-Roger et al., (2004), sugiere que las moléculas que presentan actividad anti-alimentaria en insectos con frecuencia son compuestos poliaromáticos (polifenoles, taninos, flavonoides, etc), alcaloides y compuestos terpénicos y polihidroxilados (azadiractina, drimanos del tipo poligodial), por lo que es posible que al menos uno de estos metabolitos secundarios puedan estar contenidos en *Clibadium sp.*, *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costata*.

Resumiendo los dos efectos: plantas y métodos de extracción sobre el parámetro anti-alimentario de *Plutella xylostella* se determinó que existe un rango de los valores más altos de porcentaje anti-alimentario que fueron de 47,99% - 55,08% (Figura 11). Huang *et al.*, (2008) en su investigación de actividad anti-alimentaria de metabolitos secundarios de *Ajuga nipponesis*<sup>1</sup> contra *Plutella xylostella*, encontró que los mejores porcentajes de actividad anti-alimentaria fueron de 87,46% y 91,74%. Mientras que el porcentaje de actividad anti-alimentaria más alto encontrado por Lingathurai et al., (2011) con extractos crudos de *Acalypha fruticosa* Forssk.<sup>2</sup> fue de 92,8%. En ambos casos, el porcentaje anti-alimentario fue mayor a los encontrados en el presente estudio.

---

<sup>1</sup> Género de planta cosmopolita conocida por sus ecdisteroides (hormonas de muda y sexuales presentes en los insectos) tiene más de 150 variedades y subespecies con más abundancia en China, Japón , Corea, así como en Europa ( Darvas , 1991) .

<sup>2</sup> Planta medicinal empleada para curar dolor de estómago, desórdenes digestivos, cólicos y diarreas. (Sripathi & Uma, 2010).

Una posible explicación a esta diferencia en el porcentaje anti-alimentario es el tipo de solvente empleado en los extractos botánicos: en ésta investigación se utilizó extractos acuosos e hidro-alcohólicos mientras que Huang et al., (2008) y Lingathurai et al., (2011) emplearon extractos obtenidos con solventes orgánicos, ya sea cloroformo y acetato de etilo.

Arévalo & Enciso (1996), indica que la elección del método de extracción depende de la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y el propósito de la investigación, es así que la estructura química de *Ajua nipponesis* y *Acalypha fruticosa* estuvo definida previamente, lo cual permitió que hayan elegido con más certeza el tipo de extracción para conseguir de mejor manera los metabolitos responsables del efecto anti-alimentario alcanzado porcentajes más altos que los encontrados; en cambio las plantas con las que se trabajó no se conocía su composición química o en alguna casos dicha composición era muy generalizada.

## **2. Efecto larvicida**

En el bioensayo para determinar el efecto larvicida mediante los resultados del porcentaje de mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* se estableció que de las cuatro plantas, en *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp. se destacó el método de extracción por ultrasonido con porcentajes de mortalidad más altos de 10 – 20% (Figura 16). Para el caso de *Cyclanthus bipartitus* se señala que el tipo de método de extracción no difiere al momento de obtener efecto larvicida, con los dos extractos se obtuvo un 20% (Figura 13).

Rostagno *et al.*, (2003) señala que con el método de extracción asistida por ultrasonido, se puede obtener un elevado número de compuesto como: alcaloides, polifenóles, antocianinas, compuestos aromáticos, polisacáridos y otros compuestos funcionales. Razón por la cual alguno o varios de estos compuestos responsables del efecto larvicida encontrado pueden estar contenidos en *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp. Por su parte Isman, (2006), propone que los extractos vegetales pueden presentar acción tóxica si contienen compuestos como alcaloides, fenoles y terpenos.

En un estudio de Sernaqué et al., (2014) que evaluó la mortalidad y repelencia larval de *P. xylostella* empleando diez extractos de plantas posibles insecticidas, encontró que con extractos de *Paulinia clavigera* Schltl., *Euphorbia cotinifolia* L., y *Bixia orellana* L. se obtuvo porcentajes de mortalidad entre 48,3% - 63,3%. El porcentaje de mortalidad obtenido por *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp., se encuentra muy alejado de lo encontrado por Sernaqué et al., (2014). Aunque hay que tener en cuenta que la naturaleza química de las sustancias presentes en las diferentes plantas y las partes vegetales que se emplearon fueron causas por las cuales se evidenció la diferencia de porcentaje de mortalidad, estos factores determinan la calidad y cantidad de metabolitos secundarios (Azuola & Vargas, 2007).

No obstante Sepúlveda et al., (2003) señala que los metabolitos secundarios presentan variabilidad constitutiva y específica ya sea entre miembros de una población y/o entre diferentes órganos de la planta; Sernaqué et al., (2014) empleó semillas, corteza y hojas por lo cual la eficiencia de los metabolitos secundarios aumentó considerablemente. En cambio para *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus* y *Vismia* sp., se empleó únicamente hojas apicales de cada planta.

La población de *Plutella xylostella* que se usó en este experimento, fue una población peculiar, ya que presentó polimorfismo de color en el estadio larval; las larvas tuvieron coloración negra y roja lo que posiblemente indica que es una población genéticamente distinta a las poblaciones que existe de *P. xylostella*, donde que las larvas son de coloración verde claro. Esta característica única de la población posiblemente le atribuya resistencia los larvicidas botánicos. No se ha encontrado literatura relacionada al tema.

Sin embargo Silva et al., (2002), indica que la mayoría de los extractos de especies vegetales que se utilizan como insecticida no eliminan al insecto por intoxicación sino que generalmente inhiben el desarrollo normal de éstos, al actuar como repelente o disuasivos de alimentación u oviposición.

### 3. Efecto de repelencia ovipositora.

En el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora el rango de ODI fue en la mayoría de los casos 82,62% - 88,97%. En este bioensayo no difirió el método de extracción al momento de obtener el efecto sobre *Plutella xylostella*. El extracto acuoso de *Vismia* sp. fue el único que difirió significativamente, ya que su índice de repelencia ovipositora fue menor, 72,93% (Figura 24). Los resultados encontrados del índice de repelencia ovipositora fueron próximos a los encontrados por Medeiros et al., (2005), con extractos de *Enterolobium contortisilliquum* (Vell.), *Sapindus saponaria* L. y *Trichilia pallida* Sw, en donde su ODI fue de 100%.

Spencer et al., (1999) y Hamilton et al., (2005) indican que la oviposición de todos los insectos está asociada a una gran cantidad de estímulos provenientes de la planta: visuales, físicos y químicos. Ciertos compuestos secundarios volátiles, los glucosinolatos en las Brassicaceae, las ceras, la calidad nutricional de las plantas, la morfología y el color de las hojas o una combinación de todos estos factores, pueden afectar las actividades reproductivas y de alimentación de *P. xylostella* (Sarfraz et al., 2006). Al analizar el efecto de repelencia ovipositora con los diferentes extractos de las cuatro plantas amazónicas, los discos de hojas de brócoli empleados, luego de ser tratados, adquirieron un olor y color diferentes a los discos foliares de control, particular que repelió a la hembra a que oviposité en los discos de tratamiento.

En resumen de los tres efectos: anti-alimentario, larvicida y de repelencia ovipositora, se determina que las plantas que más efectos provocaron sobre *Plutella xylostella* fueron *Clibadium* sp. y *Cyclanthus bipartitus*.

Fuertes et al., (2010) indica que *Clibadium* sp. posee metabolitos secundarios como polifenoles, pequeñas cantidades de flavonoides y trazas de alcaloides. Taiz & Zeiger, (2006) señala que los polifenoles poseen propiedades insecticidas y fungicidas, adicionalmente Alfonso (2002), indica que los flavonoides y alcaloides presentan efectos tóxicos y repelentes para insectos.

De acuerdo a Vázquez et al., (2007), *Clibadium* sp. presenta compuestos que contienen átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario en su estructura. Este tipo de compuestos evitan la interacción planta-insecto, ya que otorgan a la planta características poco agradables para el paladar del insecto, razón por la cual con esta planta se logró obtener efecto anti-alimentario.

Para el caso de *Cyclanthus bipartitus* no se conoce exacta el tipo de compuestos o metabolitos secundarios presentes, aunque hay que señalar que en una investigación realizada por Chiurato, M., (2015), se estableció por pruebas cualitativas que posee terpenos y grupos fácilmente oxidables, que posiblemente serían fenoles. Silva et al., (2010), indica que la actividad repelente de una planta se debe principalmente a sus componentes, tales como: fenoles, terpenos o alcaloides, razón por la cual los extractos de *Cyclanthus bipartitus* al poseer este tipo de compuestos en su estructura ejercieron los diferentes efectos sobre *Plutella xylostella* encontrados en este estudio. No existe referencia bibliográfica del uso potencial como insecticida, pero de acuerdo al Instituto Nacional de Salud del Perú su uso es medicinal empleado en la picadura de isula<sup>3</sup>.

Los efectos provocados sobre *Plutella xylostella* por extractos de *Dieffenbachia costata* fueron: efecto de repelencia ovipositora con los dos extractos y efecto anti-alimentario pero solo con su extracto obtenido mediante ultrasonido. Aunque se debe tener especial cuidado con el manejo de este material vegetal ya que, Arditti & Rodríguez, (1982) señalaron que es el género *Dieffenbachia* es uno de los más tóxicos que existe para personas y animales, parámetro por el cual su uso no sería el más aconsejable.

*Vismia* sp. fue una de las plantas con las que se obtuvo los efectos insecticidas propuestos, sin embargo estos índices fueron los más bajos en relación a los demás tratamientos. Destacándose así, que para el efecto larvicida se obtuvo solo un 10% de mortalidad con su extracto por ultrasonido (Figura 17). En el efecto de repelencia ovipositora se consiguió mejores resultados con el extracto por ultrasonido, su índice de repelencia fue de 85,15%, mientras que para el extracto acuoso fue de 72,93% (Figura 24); aunque se debe especificar

---

<sup>3</sup> Isula es el nombre vulgar de *Paraponera clavata*, hormiga grande, extendida por América Central y del Sur. El dolor de su picadura es 30 veces mayor al de una abeja o avispa (Wikipedia. s/f c).

que con estos tratamientos las características físicas de la hoja de brócoli considerablemente en relación a los demás extractos, adquirieron una elasticidad inusual y una coloración obscura anormal. Thuler et al., (2007) indica que el color de las hojas es el carácter morfológico más importante, que influye en la selección de la planta huésped para la oviposición de hembras de *Plutella xylostella*.

## VI. CONCLUSIONES

- A. En el presente estudio al analizar el efecto anti-alimentario de las plantas *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* y *Vismia* sp. se observó mayor eficiencia con extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido que con los extractos acuosos, excepto en el caso de *Clibadium* sp. en el cual los métodos de extracción fueron estadísticamente iguales.
- B. Para el efecto anti-alimentario se determinó que los mejores tratamientos fueron: extracto acuoso de *Clibadium* sp., y extractos obtenidos por ultrasonido de *Cyclanthus bipartitus* y *Dieffenbachia costata*.
- C. Al analizar el efecto larvicida con extractos de *Clibadium* sp. y *Vismia* sp fueron mejores los extractos por ultrasonido. Para *Cyclanthus bipartitus* los dos métodos de extracción fueron estadísticamente iguales. En el caso de *Dieffenbachia costata* no se observó efecto larvicida en ninguno de los dos métodos de extracción.
- D. Todos los extractos de las plantas estudiadas mostraron efecto de repelencia ovipositora con los dos métodos de extracción, sin mostrar diferencia significativa entre ellos; excepto que, el extracto acuoso de *Vismia* sp. que fue estadísticamente menor
- E. Tomando en cuenta los efectos: anti-alimentario, larvicida y de repelencia ovipositora se señala que las plantas que tuvieron más efectos sobre *Plutella xylostella* fueron *Clibadium* sp. y *Cyclanthus bipartitus*.

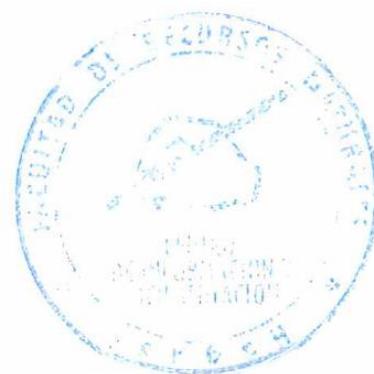
## VII. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda realizar estudios que permitan determinar exactamente los compuestos contenidos en las plantas, principalmente en los extractos de *Cyclanthus bipartitus* y de *Clibadium* sp. ya que particularmente estas plantas rindieron más efectos sobre *Plutella xylostella*.
- B. Probar los efectos: anti-alimentario, larvicida y de repelencia ovipositora pero con un mayor tiempo de maceración, lo que puede producir una mayor concentración de metabolitos secundarios en los extractos acuosos.
- C. Determinar las mínimas y máximas concentraciones de los extractos botánicos en cada método de extracción para los efectos: anti-alimentario, larvicida y de repelencia ovipositora estudiados.
- D. Estudiar los extractos botánicos que más efectos produjeron sobre *Plutella xylostella* encontrados en esta investigación pero bajo condiciones de campo, para determinar si aún persiste su actividad.

## VIII. RESUMEN

La presente investigación determina los efectos: anti-alimentario, larvicida y de repelencia ovipositora de extractos las plantas de *Clibadium sp*, *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* y *Vismia sp* provenientes de la Amazonía ecuatoriana sobre *Plutella xylostella*, obtenidos a través de dos métodos de extracción: maceración acuosa y extracción asistida por ultrasonido bajo condiciones de laboratorio. Para determinar los efectos anti-alimentario y larvicida se empleó un Diseño de Bloques Completamente Aleatorizados unifactorial. Para el efecto de repelencia ovipositora se trabajó con un Diseño Completamente al Azar. El análisis estadístico de los datos se procedió a realizar análisis estadísticos paramétricos o no paramétricos dependiendo de la naturaleza de los datos. Los resultados mostraron que, para el efecto anti-alimentario de las plantas *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* y *Vismia sp*. se observó mayor eficiencia con extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido comparado con los extractos acuosos, similar comportamiento se observó en el efecto larvicida pero con extractos de *Clibadium sp*. y *Vismia sp*. Se consiguió efecto de repelencia ovipositora con todos los extractos de las plantas estudiadas. Tomando en cuenta los tres efectos analizados se observó que las plantas que tuvieron más efectos sobre *Plutella xylostella* fueron *Clibadium sp*. y *Cyclanthus bipartitus*. Se recomienda realizar estudios que permitan determinar los compuestos químicos contenidos en las plantas, principalmente de *Cyclanthus bipartitus* y de *Clibadium sp*.; además se sugiere continuar la fase de investigación de los tres efectos evaluados: anti-alimentario, larvicida y repelencia ovipositora pero en condiciones de campo.

**Palabras Claves:** extractos botánicos, maceración, extracción por ultrasonido.



## IX. SUMMARY

The current research aims to determine the effects obtained from anti-alimentary, larvicide and the ovipositor repellent of plant extracts like *Clibadium* sp., *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata*, and *Vismia* sp. from the Ecuadorian Amazon on *Plutella xylostella* through two extraction methods: aqueous maceration and extraction assisted by ultrasound under lab conditions of the Center of Technology Development for Reduction and Rationalization of Agrochemical (CEDETERRA) at Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. To determine the effects obtained from anti-alimentary and larvicide, it was used a completely unifactorial randomized block design. For the ovipositor repellency effect, it was applied a completely randomized design. With the statistical analysis of the data, the parametric and non-parametric statistical analysis was carried out based on the data. The results for the anti-alimentary of the *Cyclanthus bipartitus*, *Dieffenbachia costata* and *Vismia* sp. effect plants, greater efficiency was observed with extracts obtained through assisted extracts by ultrasound compared with aqueous extracts, same result was observed in the larvicida effect but now, with *Clibadium* sp. and *Vismia* sp. extracts. The effect of ovipositor repellency with all extracts of the studied plants was obtained. Taking into account the three analyzed effects, it was observed the plants with greater effects on *Plutella xylostella* was *Clibadium* sp. and *Cyclanthus bipartitus*. It is recommended to carry out studies which allow determining the chemical compounds, mainly in *Cyclanthus bipartitus* and *Clibadium* sp. plants. Furthermore, it is suggested to continue the research phase of the three evaluated effects: anti-alimentary, larvicida and ovipositor repellency but now, in field conditions.

**KEY WORD:** Botanical extracts, aqueous maceration, ultrasound extraction.



## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkadir, F. (2014). Genetic and biological characterization of a novel South African *Plutella xylostella* granulovirus (*PlxyGV*) insolate. Rhodes University.
- Alfaro, R. (s/f). Teoría de extracción por solventes. Recuperado el 10 de mayo de 2016, a partir de <https://es.scribd.com/doc/109754743/1-TEORIA-DE-EXTRACCION-POR-SOLVENTES>
- Alfaro, MJ., Bélanger, JMR., Padilla, FC., Jocelyn, Paré JR. (2003). Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP(TM)) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Food Res Int.* 36 (5): 499-504.
- Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)*, 27.
- Arctos. (2013). Taxonomy Details: *Plutella*. Recuperado el 12 de junio de 2016, a partir de <http://arctos.database.museum/name/Plutella>
- Arditti, J & Rodríguez, E. (1982). *Dieffenbachia*: Uses, abuses and toxic constituents: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 5: 293-302
- Arriagada, J. E. (2003). Revision of the genus *Clibadium* (Asteraceae, Heliantheae). *Brittonia* 55: 277-280.
- Auccahuasi, F. S., Bulnes, J. L., & Farfán, R. E. (2015). *Plutella xylostella*. *REVISTA CIENTÍFICA INGETECNO*, 3(2), 64.
- Arévalo A., M. y A. Enciso R. (1996). *Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de Espeletias encontradas en el páramo de Guasca*. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregado. Bogotá, D.C. Pág. 14,16-18, 21-25

- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*, 20(4).
- Barreto, J. (1997). Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. p. 9 – 29.
- Baskar, K., Maheshwaran, R., Kingsley, S., & Ignacimuthu, S. (2011). Bioefficacy of plant extracts against Asian army worm *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural Technology*, 7(1), 123–131.
- Botanical-Online SL. (s/f). Maceraciones. Recuperado el 24 de junio de 2016, a partir de [www.botanical-online.com/maceraciones.htm#](http://www.botanical-online.com/maceraciones.htm#)
- Bourdy, G., Valadeay, C., Albán, J. (2008). Plantas Medicinales Yanasha. Remanso Ediciones E.I.R.L. Lima – Perú.
- CANNA. (2016). ¿Cómo controlar plagas y enfermedades? Lo biológico frente a lo químico. Recuperado el 27 de mayo de 2016, a partir de [http://www.canna.es/como\\_controlar\\_plagas\\_y\\_enfermedades\\_lo\\_biologico\\_frente\\_lo\\_quimico](http://www.canna.es/como_controlar_plagas_y_enfermedades_lo_biologico_frente_lo_quimico)
- Castelo, M., & Gatehouse, A. G. (1997). Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(1), 75–79.
- Cerda, H., Ledezma-Carrizalez, A., Andino, M., Chiurato, M.A., Carpio, C. (2015). “Insecticidal activity of twelve common Amazon Ecuadorian plants against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): Laboratory results”. Proceedings of the Seventh International Workshop on Management of the Diamondback Moth and Other Crucifer Insect Pest. Aceptado para publicación.

- Céspedes, C. L., & Alarcon, J. (2011). Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3).
- CHEN, Yi-xin, TIAN, Hou-jon, WEI, Hui, ZHAN, Zhi-xiong, HUANG, Yu-qing. (2011). A simple method for identifying sex of *Plutella xylostella* (Linnaeus) larva, pupa and adult. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 26(4): 611 - 614.
- Chiurato, M. (2015). Ensayos realizados en Universidad Estatal Amazónica. Entrevistado por Belén Altamirano.
- Cipactli Organización Ecológica y Sustentable. (2015). Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella*) plaga modificada genéticamente para autodestruirse. Recuperado el 12 de junio de 2015, a partir de <http://cipactli-es-culturasustentable.blogspot.com/2015/09/alerta-contrapalomilla-dorso-de.html>
- CODELCO. (s/f). Extracción por solventes (SX). Recuperado el 14 de mayo de 2016, a partir de [https://www.codelcoeduca.cl/procesos\\_productivos/tecnicos\\_lixiviacion\\_extraccion.asp](https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_lixiviacion_extraccion.asp)
- Carpio, C., Zeddám, J.-L., Barragán, Á., Nuñez, G., Patiño, M., & Dangles, O. (2010). Un método cuantitativo para medir el área de tubérculo dañado por larvas de *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) a través de análisis de imágenes digitales. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 1(2), 69–78.
- Chen, C., Chang, S., Cheng, L., & Hou, R. F. (1996). Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Yponomeutidae). *Blackwell Wissenschafts-Verlag*, 120, 165–169.
- Costa, E., Rocha, F., Torres, M., Souccar, C., C.M. De Lima, T., Lapa, A., & Lima-Landman, M. (2006). Behavioral effects of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamense* L (Asteraceae). Recuperado el 12 de octubre de 2015, a partir de

[http://www.researchgate.net/publication/7164694\\_Behavioral\\_effects\\_of\\_a\\_neurotoxic\\_compound\\_isolated\\_from\\_Clibadium\\_surinamense\\_L\\_%28Asteraceae%29](http://www.researchgate.net/publication/7164694_Behavioral_effects_of_a_neurotoxic_compound_isolated_from_Clibadium_surinamense_L_%28Asteraceae%29)

- Darvas, B. (1991). Phytoecdysteroids of *Ajuga* spp., as insect growth regulator-type botanical insecticides. *Novenyvedelem Budapest*, 27: 481-489.
- Delgado, E. (2011). *Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de Azadirachta indica, Piper auritum y Petiveria alliacea para el control de Spodoptera exigua*. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. Recuperado a partir de <http://www.chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISMCA2011071108126255.pdf>
- Esquivel, A., & Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en marcha*, 20(4).
- Fernández, S., & Alvarez, C. (1988). Biología de *Plutella xylostella* (L.) (LEPIDOPTERA: YPONOMEUTIDAE) polilla del repollo (*Brassica oleraceae* L.) en condiciones de laboratorio. Recuperado el 15 de julio de 2015, a partir de [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at3846/Arti/fernandez\\_s.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3846/Arti/fernandez_s.htm)
- Gallego, I., & Castañeda, D. (2004). *Diseño conceptual de un sistema de extracción supercrítica, a escala banco, utilizando dióxido de carbono como solvente*. Universidad de EAFIT. Resumen de los trabajos de grado desarrollados en ingeniería de procesos durante el año 2003. Medellín. pp. 46-53.
- Gao, M., & Liu, C.-Z. (2005). Comparison of Techniques for the Extraction of Flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1461–1463.
- Guerra, A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del*

*rizoma y de la fronda de calahuala (Phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado a partir de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0951\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf)

- Harcourt DG (1957) Biology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepidoptera:Plutellidae), in Eastern Ontario. II. Life-history, behaviour, and host relationship. *The Canadian Entomologist* 12:554 -564
- Hill, T. A., & Foster, R. E. (2000). Effect of insecticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 763–768.
- Huang, Z., Zhou, F. C., Xu, D., Afzal, M., Bashir, M. H., Ali, S., & Freed, S. (2008). Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against *Plutella xylostella*. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 1983–1992.
- Hussein A, Bozzi B, Correa M, Capson T, Kursar T, Coley P, Solis P & Gupta M. (2003). Bioactive Constituents from Three *Vismia* Species. *J. Nat. Prod.* 66, 858-860.
- Iannacone, J., & Lamas, G. (2003). Efectos toxicológicos de extractos de molle (*Schinus molle*) y lantana (*Lantana camara*) sobre *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pintoii* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae) en el Perú. *Agricultura Técnica*, 63(4).
- Instituto Nacional de Salud Perú (s.f). Inventario Nacional de Plantas Medicinales. Recuperado a partir de [www.ins.gob.pe/plantas/VerCenci.aspx?id=2235](http://www.ins.gob.pe/plantas/VerCenci.aspx?id=2235)
- Isman, M. B. (2006). The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 51-66.
- Liu MY, Y. Tzeng YJ & Sun CM (1982) Diamondback Moth resistance to several synthetic pyrethroids. *Journal of Economic Entomology* 74:393-39

- Lin JG, Hung CH & Siin CN (1989) Teflubenzuron resistance and microsomal monooxygenases in larvae of the Diamondback Moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 35:20-25.
- Lingathurai, S., Vendan, S. E., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2011). Antifeedant and larvicidal activities of *Acalypha fruticosa* Forssk. (Euphorbiaceae) against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) larvae. *Journal of King Saud University - Science*, 23(1), 11–16.
- Lizarazo, K., Mendoza, C., & Carrero, R. (2008). Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). *Agronomía Colombiana*, 26(3), 427–434.
- Medeiros, C. A. M.; Boica Junior, A. L E Torres, A. L. (2005). Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. *Bragantia*.Campinas,SP.Brasil. 64(2), 227-232
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). Brócoli. Coordinación General del Sistema de Información Nacional. Recuperado a partir de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2013/brocoli.pdf>
- Miyata T, Kawai H & Saito T (1982) Insecticide resistance in the diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Applied Entomology and Zoology* 17:539-542
- Muñoz, C. (2016). *Evaluación del proceso de obtención de insecticidas botánicos con la aplicación de secado y filtración para controlar Plutella xylostella en brócoli*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.
- Núñez, C. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet. Recuperado a partir de <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- Ochoa, R., Carballo, M., & Rutilio, J. (1989). Algunos aspectos de la biología y comportamiento de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y de su parasitoides

- Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (11), 21–30.
- Odonne, G., Bourdy, G., Castillo, D., Estevez, Y., Lancha-Tango, A., Alban-Castillo, J., Sauvain, M. (2009). Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 149–158.
- Pedroso de Moraes, C., & Amilton, L. (2012). Toxicity and residual control of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) with *Bacillus thuringiensis* Berliner and insecticides. *Cienc. Rural*, 42(8).
- Pérez, C.J. & Shelton, A.M. (1997). Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *Journal of economic entomology*, 90(1), 87–93.
- Proestos, C., & Komaitis, M. (2006). Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *Journal of food quality*, 29(5), 567–582.
- Ramachandran S, Butin GD, All JN & Raymer PL (1998). Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance of *Brassica napus* and *B. oleracea* lines with differing leaf characteristics. *Journal of Economic Entomology* 91: 987-992.
- Ramírez de la Torre, N. (2010). Destilación. Teoría y tipos de destilación. Recuperado el 24 de abril de 2016, a partir de: [http://www.alambiques.com/tecnicas\\_destilacion.htm](http://www.alambiques.com/tecnicas_destilacion.htm)
- Rangel, D., Garcia, I., Velasco, J., Buitrago, D., & Velazco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 42, 43–46.
- Regnault-Roger C.; J.R. Philogene, B.; Vincent, C. (2004). Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 337 pp.

- Revista\_ElAgro. (2012). Aumenta producción y consumo de hortalizas. Recuperado el 27 de mayo de 2016, a partir de [www.revistaelagro.com/2015/06/08/aumenta-produccion-y-consumo-de-hortalizas/](http://www.revistaelagro.com/2015/06/08/aumenta-produccion-y-consumo-de-hortalizas/)
- Ribereau-Gayon, P. (1998). *Traité d'Oenologie. 1-Microbiologie du Vin. Vinifications.* Editions La Vigne. Paris.1998.
- Rimoldi, F., Fogel, M. N., Schneider, M. I., & Ronco, A. (2015). Efectos indirectos de insecticidas convencionales y biorracionales sobre la alimentación de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(1), 41–47.
- Rodríguez, A. T., Morales, D., & Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos tropicales*, 21(2), 79–83.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119–128.
- Rueda, A., & Shelton, A. M. (1996). Palomilla Dorso de Diamante (DDM). Recuperado el 12 de junio de 2016, a partir de <http://web.entomology.cornell.edu/shelton/veg-insects-global/spanish/dbm.html>
- Ruiz-G. M. C., C. M. Susunaga-S. (2000). *Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens (Burseraceae) frente a microorganismos como Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum, Trichoderma viride y Botrytis cinerea.* Carrera Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo Pregrado. Bogotá, D.C. Pág. 40.
- Sánchez, L. (2015). Preparación de extractos vegetales II: macerados acuosos. Recuperado el 24 de junio de 2016, a partir de <http://www.aquiconmiscosas.es/2015/01/preparacion-extractos-vegetales-acuosos.html>

- Sanz-Biset, J., Campos de la Cruz, J., Epiqueñ, M. A., & Cañigüeral, S. (2009). A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 333–362.
- Schultz K, Kaiser R & T. Knudsen J (1999) Cyclanthon and derivatices, new natural products in flower scent of *Cyclanthus bipartitus* Point. *Flavour Fragr. J.*, 14, 185-190
- Sernaqué, F. S., López, J., & Espinoza, E. (2014). Mortalidad y repelencia en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), plaga de la “col”, Brassica oleracea var. Gemmifera por efecto de diez extractos botánicos. *Ingetecno*, 3(2), 64.
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.*, 21(3), 356.
- Silva, L., Heldwein, C., Reetz, L., Hörner, R., Mallmann, C., & Heinzmann, B. (2010). Chemical composition, antibacterial activity in vitro and brine-shrimp toxicity of the essential oil from inflorescences of *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5).
- Śliwiński, A. (1993). *Ultradźwięki i ich zastosowania*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
- Sripathi, S.K., Uma, S. (2010). Ethnobotanical documentation of a few medicinal plants in the Agasthiyamalai region of Tirunelveli district India. *Ethnobot. Leaflet*. 14, 173–181.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Recuperado el 10 de junio de 2016, a partir de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=7QIbYg-OC5AC&oi=fnd&pg=PR50&dq=taiz+2006&ots=nisO0Y4zBi&sig=DEUeXtFg2t1Gf8BHN26kwwm0psM#v=onepage&q=taiz%202006&f=false>
- Talekar NS & AM Shelton (1993). Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annual Review Entomology* 38: 275-301.

- Thuler, R., D' Bortoli, S., & Hoffmann-Campo, E. (2007). Classificacao de cultivares de brássieas com relacao a resistencia á traca-das-cruclferas e á prescna de glucosinolatos. *Pesq. agropec. bras.* 42(4): 467-474.
- Trujillo, C. (2008). Estimación de las pérdidas agrícolas en condiciones de riesgo. Recuperado el 27 de mayo de 2016, a partir de <http://www.gestiopolis.com/estimacion-de-las-perdidas-agricolas-en-condiciones-de-riesgo/>
- Turrialba. (1986). Ecología de la polilla del repollo, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). II, Ciclo de vida, 36, 130–13
- Valencia, C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas. México DF. MX.235 p.
- Vásquez, E. (2003). El agua como solvente: Recuperado el 12 de septiembre de 2015, a partir de <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/agua%20como%20solvente.html>
- Vásquez, A., Pérez, L., & Díaz, R. (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria.* 5(4), 303 – 316.
- Villacrés, V. (1995). *Bioactividad de plantas amazónicas (ABYA-YALA)*. Cayambe-Ecuador.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303–313.
- Wikipedia. (s/f a). Lixiviación. Recuperado el 24 de junio de 2016, a partir de <https://es.wikipedia.org/wiki/Lixiviaci%C3%B3n>
- Wikipedia. (s/f b). Maceración. Recuperado el 24 de junio de 2016, a partir de <https://es.wikipedia.org/wiki/Maceraci%C3%B3n>

Wikipedia. (s/f c). *Paraponera clavata*. Recuperado el 24 de junio de 2016, a partir de [https://es.wikipedia.org/wiki/Paraponera\\_clavata](https://es.wikipedia.org/wiki/Paraponera_clavata)

Zhang, M., Ling, B., Chen, S., Liang, G., & Pang, X. (2004). Repellent and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. *ENTOMOLOGIA SINICA*, 11(1), 37–45.

## **XI. ANEXOS**

**Anexo 1.** Datos de temperatura y humedad relativas tomadas en el laboratorio del Grupo de Entomología del Centro de Desarrollo de Tecnologías para la Reducción y Racionalización de Agroquímicos (CEDETERRA).

<b>TEMPERATURA (°C)</b>			<b>HUMEDAD RELATIVA (%)</b>		
<b>T Máx.</b>	<b>T Min.</b>	<b>T m</b>	<b>HR Máx.</b>	<b>HR Min.</b>	<b>HR m</b>
31,5	26,1	28,8	67	37	52
31,5	15,6	23,55	67	36	51,5
32,0	16,4	24,2	67	36	51,5
31,4	15,4	23,4	67	36	51,5
30,2	16,2	23,2	67	36	51,5
<b>PROMEDIO</b>		<b>24,63</b>			<b>51,6</b>

**Anexo 2.** Estructura de protección anti-insectos.



**Anexo 3.** Caja de engorde para larvas de *P. xylostella*.



**Anexo 4.** Caja de cría para adultos de *P. xylostella*.



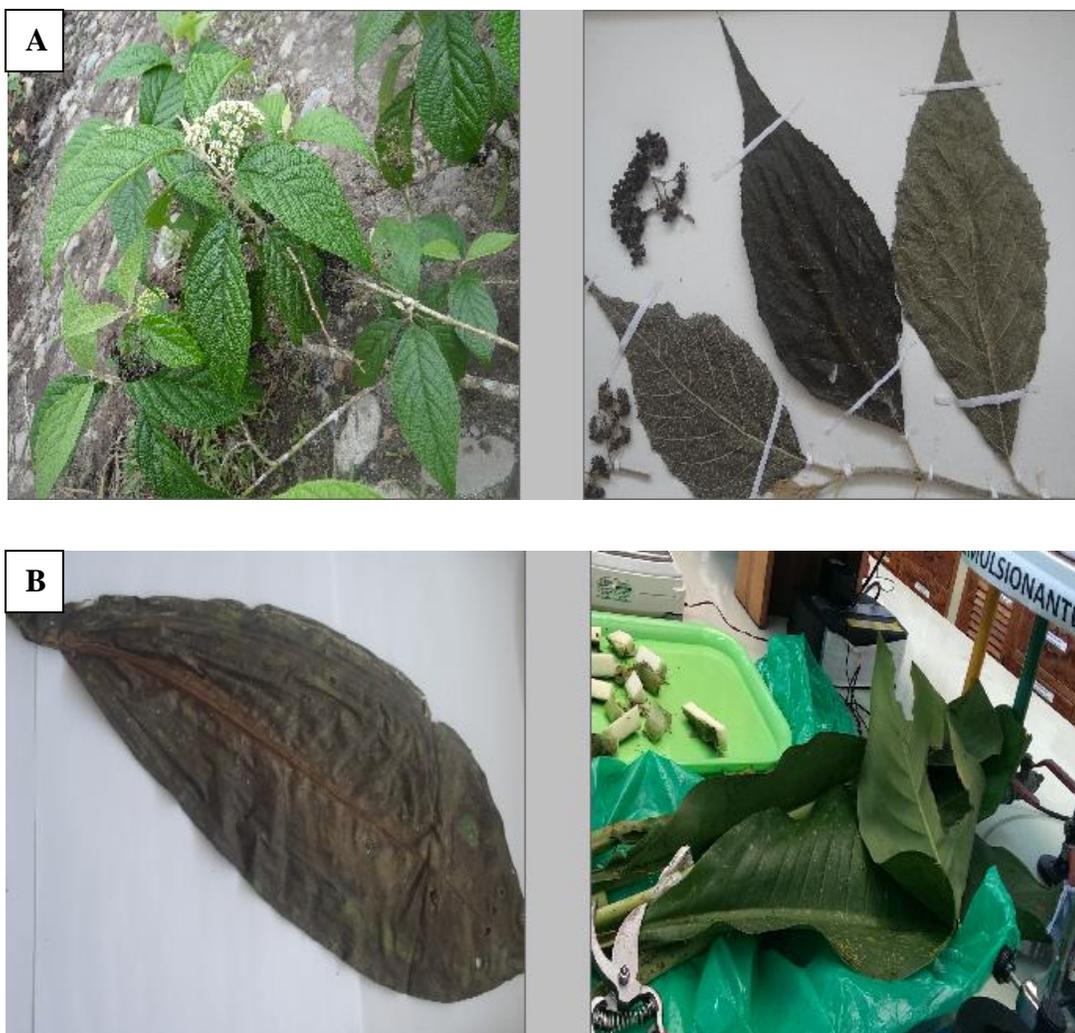
**Anexo 5.** Unidades experimentales para los bioensayos de efectos anti-alimentario y larvicida.



**Anexo 6.** Unidad experimental para el bioensayo de efecto de repelencia ovipositora.



**Anexo 7.** Especies vegetales de la Amazonía empleadas como posibles insecticidas.





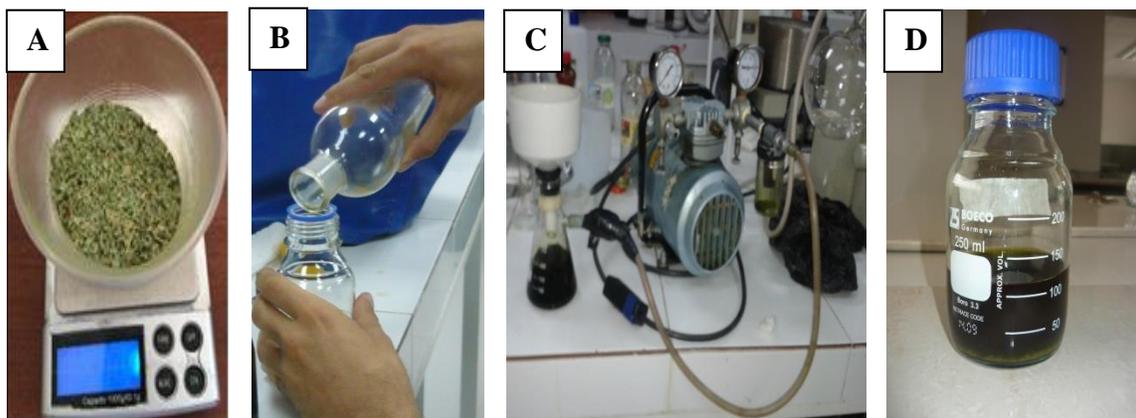
**A.** *Clibadium* sp. **B.** *Dieffenbachia costata* H. Karst. ex Schott. **C.** *Cyclanthus bipartitus* Poit. ex A.Rich. **D.** *Vismia* sp

**Anexo 8.** Proceso de secado del material vegetal.



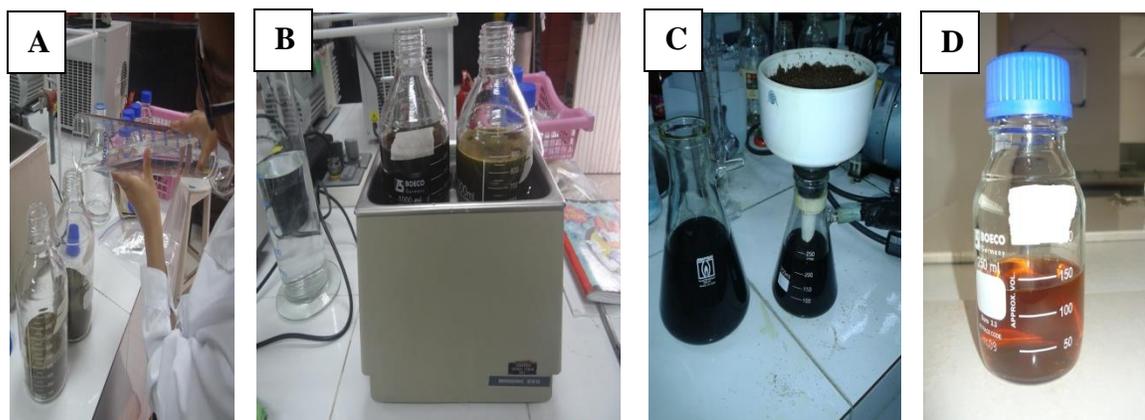
**A.** Secado de material vegetal en una estufa de laboratorio. **B.** Molida del material vegetal seco.

**Anexo 9.** Extracción por método acuoso (Maceración).



**A.** Pesaje del material molido. **B.** Agua destilada agregada al material vegetal. **C.** Filtrado de extracto luego de 24 horas de maceración. **D.** Extracto botánico acuoso.

**Anexo 10.** Extracción mediante método asistido por ultrasonido



**A.** Adición de la solución etanol-agua (9:1) sobre el material vegetal seco y molido. **B.** Extracción empleado un baño ultrasonido. **C.** Filtrado del extracto. **D.** Extracto botánico obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido.

**Anexo 11.** Cultivo de plantas de brócoli como planta hospedera de *Plutella xylostella*.



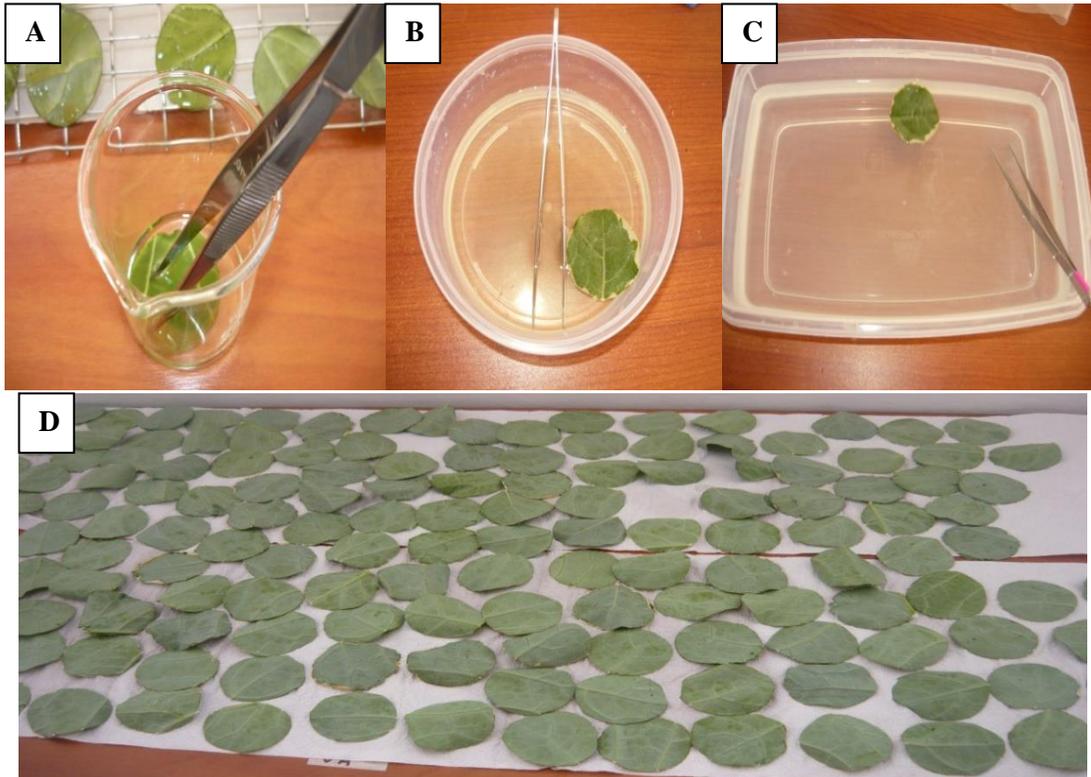
**A.** Semillero de plántulas de brócoli. **B.** Microtunel comidero. **C.** Limpieza de hojas de brócoli empleadas en la alimentación de larvas *P. xylostella*. **D.** Siembra de plántulas de brócoli para bioensayos. **E.** Baldes con estructura de protección ant-insectos.

**Anexo 12.** Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario.



**A.** Corte de hojas número 7, 8 y 9 de las plantas de brócoli. **B.** Corte de discos de hojas de brócoli. **C.** Digitalización de los discos foliares. **D.** Inmersión de discos foliares en tratamientos. **E.** Secado de discos foliares a temperatura ambiente. **F.** Caja Petri con papel filtro, disco foliar y larvas de *P. xylostella*. **G.** Tratamientos agrupados en bloques completamente al azar. **H.** Disco foliares con daño de *P. xylostella* luego de 5 días de experimentación.

**Anexo 13.** Proceso de desinfección para los discos foliares.



**A.** Disco sumergido en solución de hipoclorito de sodio por 10 min. **B.** Primer enjuague con agua destilada. **C.** Segundo enjuague con agua destilada. **D.** Secado de discos de hojas.

**Anexo 14.** Protocolo para análisis de imágenes.

**PROTOCOLO POR ANÁLISIS DE IMÁGENES**

Con el GIMP

- Abrir archivo TIF
- Con la varita mágica seleccionar el borde del recuadro.
- Con el gotero absorber el color negro
- Luego con la cubeta negrear todo el área circundante a la hoja y que fue anteriormente seleccionada con la varita.
- Terminar con la función de la varita
- Luego con el lápiz pasar el borde de la hoja y aquellas secciones del área circundante que no estén completamente negras.

- Exportar como documento TIF sin compresión. Guardar en escritorio.

#### Con el SCION

- Abrir el archivo tif modificado previamente con el GIMP
- Seguir las recomendaciones del artículo
- Ir a Analize > Set scale y colocar las medidas en cm. Y luego salir
- Ir al menú lateral y escoger la línea con dos puntos, ubicarse en la imagen de color y trazar una línea en dos cuadros que sabemos que corresponden a 1cm. Observar en la cuadrícula izquierda a cuántos pixeles corresponde 1 cm.
- Analize > Set scale y se ingresa la equivalencia de 1 cm en pixeles.
- Posteriormente ir al menú: Analize > options > Area > Ok

Para análisis de hoja total:

- Ir a Opciones y escoger Threshold
- Luego ir a : Analize > Analyze particles y el programa procede a señalar las áreas que se van a calcular
- Finalmente ir a : Analize > Show results

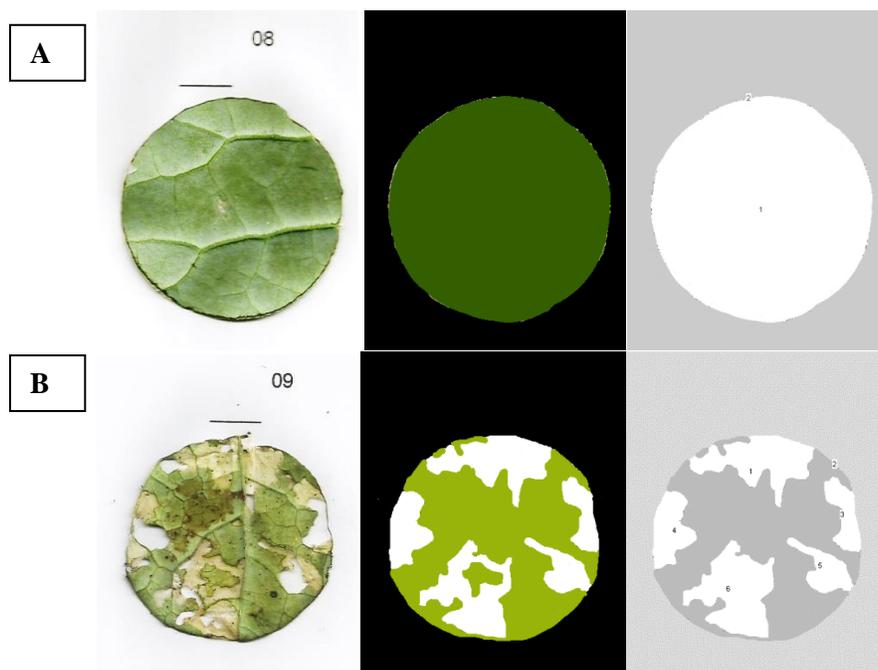
Para análisis de hoja comida:

- Antes del Threshold, ir a edición y escoger invertir.
- Luego ir a Opciones y escoger Threshold
- Luego ir a : Analize > Analyze particles y el programa procede a señalar las áreas que se van a calcular
- Finalmente ir a : Analize > Show results

Excel

Pasar los resultados a excel

**Anexo 15.** Modificaciones de imágenes de discos foliares.



Análisis de imágenes empleando GIMP y Scion. **A.** Disco foliar inicial. **B.** Disco foliar final. De izquierda a derecha. Imagen jpg estandarizado brillo y contraste. Imagen vuelta a colorear. Imagen obtenida en el cálculo de área.

**Anexo 16.** Bioensayo para determinar el efecto larvicida. Método de inmersión larval.



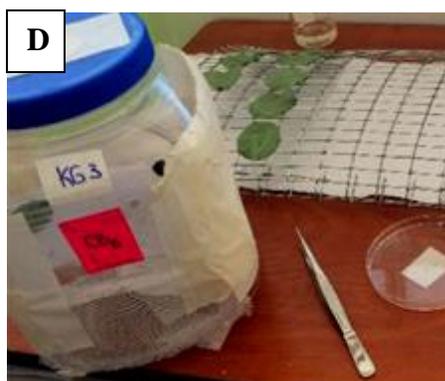
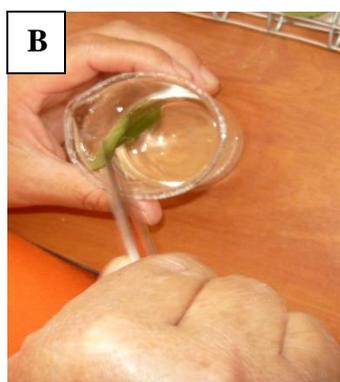
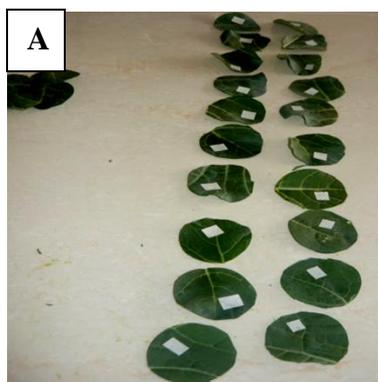
**A.** Materiales empleados. **B.** Rociadores con extractos y controles. **C.** Larvas rociadas y secadas a temperatura ambiente.

**Anexo 17.** Bioensayo para determinar el efecto larvicida. Método de inmersión foliar.



**A.** Discos foliares. **B.** Inmersión y secado de discos foliares. **C.** Sellado de cajas Petri. **D.** Tratamientos agrupados en bloques completamente al azar. **E.** Evaluación de larvas *P. xylostella* luego de 5 días de experimentación.

**Anexo 18.** Bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora.



**A.** Discos foliares de hojas de brócoli. **B.** Inmersión de discos de hojas de brócoli en los diferentes tratamientos y controles. **C.** Discos dejados a secar a temperatura ambiente. **D.** Colocación de discos foliares en cajas de cría en tratamientos. **E.** Cajas de cría en repisas en orden completamente al azar. **F.** Conteo de huevos en discos foliares luego de 24 horas de experimentación.

**Anexo 19.** Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de *Clibadium* sp.

Tratamiento	Repetición	Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario		Bioensayo para determinar el efecto larvicida	
		% Consumido	Actividad anti-alimentaria (%)	Método de inmersión larval	Método de inmersión foliar
				% Mortalidad	% Mortalidad
Extracto de <i>Clibadium</i> sp. método acuoso	1	8,21	72,54	20,00	0,00
	2	11,09	70,57	0,00	0,00
	3	10,23	70,42	0,00	0,00
	4	8,29	69,97	0,00	0,00
	5	12,51	52,49	0,00	20,00
	6	14,41	62,24	0,00	0,00
	7	8,68	68,59	0,00	0,00
	8	11,57	59,31	0,00	20,00
	9	10,52	74,29	0,00	0,00
	10	8,97	70,55	20,00	0,00
Control Acuoso	1	27,55		0,00	0,00
	2	29,11		0,00	0,00
	3	31,14		0,00	0,00
	4	22,20		0,00	0,00
	5	19,80		0,00	0,00
	6	29,24		0,00	0,00
	7	26,67		20,00	0,00
	8	22,97		0,00	0,00
	9	34,36		0,00	0,00
	10	24,48		0,00	0,00
Extracto de <i>Clibadium</i> sp. método ultrasonido	1	11,17	64,15	20,00	0,00
	2	13,72	15,38	0,00	0,00
	3	11,04	67,77	0,00	20,00
	4	15,11	25,42	0,00	20,00
	5	13,17	58,87	20,00	20,00
	6	7,54	72,60	0,00	20,00
	7	11,73	65,40	20,00	20,00
	8	19,70	43,80	0,00	0,00
	9	16,73	12,29	0,00	20,00
	10	17,23	30,54	20,00	20,00
Control Ultrasonido	1	34,97		0,00	0,00
	2	20,20		0,00	0,00
	3	36,40		0,00	0,00
	4	22,38		0,00	0,00
	5	36,04		0,00	0,00
	6	30,59		0,00	20,00
	7	37,17		0,00	0,00
	8	36,67		0,00	0,00
	9	21,42		0,00	0,00
	10	28,68		0,00	0,00

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 20.** Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de *Clibadium* sp.

<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Índice de repelencia ovipositora (ODI) (%)</b>
Extracto de <i>Clibadium</i> sp. método acuoso	1	100,00
	2	89,19
	3	100,00
	4	98,51
	5	95,84
	6	98,61
	7	100,00
	8	100,00
	9	96,88
	10	99,36
Extracto de <i>Clibadium</i> sp. método ultrasonido	1	92,92
	2	97,07
	3	93,17
	4	97,55
	5	94,63
	6	99,69
	7	100,00
	8	100,00
	9	100,00
	10	98,19

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 21.** Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de *Cyclanthus bipartitus*.

Tratamiento	Repetición	Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario		Bioensayo para determinar el efecto larvicida	
		% Consumido	Actividad anti-alimentaria (%)	Método de inmersión larval	Método de inmersión foliar
				% Mortalidad	% Mortalidad
Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> método acuoso	1	17,00	53,51	0,00	0,00
	2	20,21	42,42	20,00	20,00
	3	9,82	40,71	20,00	20,00
	4	15,20	58,08	0,00	20,00
	5	18,52	49,28	0,00	20,00
	6	23,48	44,14	0,00	0,00
	7	17,45	46,46	0,00	20,00
	8	22,55	30,08	0,00	20,00
	9	11,39	63,28	0,00	20,00
	10	17,61	48,62	0,00	0,00
Control Acuoso	1	31,01		0,00	0,00
	2	30,69		0,00	0,00
	3	16,77		0,00	0,00
	4	28,20		0,00	0,00
	5	28,49		0,00	0,00
	6	31,82		0,00	0,00
	7	28,29		0,00	0,00
	8	26,75		0,00	0,00
	9	29,68		0,00	0,00
	10	30,19		0,00	0,00
Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> método ultrasonido	1	12,68	38,51	0,00	20,00
	2	5,22	73,38	0,00	0,00
	3	8,00	58,41	20,00	40,00
	4	10,15	52,25	0,00	20,00
	5	12,57	34,52	20,00	40,00
	6	7,37	64,74	0,00	0,00
	7	12,63	32,25	0,00	0,00
	8	6,66	66,24	0,00	20,00
	9	13,04	34,59	0,00	20,00
	10	12,05	45,79	20,00	20,00
Control Ultrasonido	1	23,82		0,00	0,00
	2	22,99		0,00	0,00
	3	22,79		0,00	0,00
	4	24,91		0,00	0,00
	5	20,65		0,00	0,00
	6	25,91		0,00	0,00
	7	21,92		0,00	0,00
	8	23,42		0,00	0,00
	9	25,00		0,00	0,00
	10	27,70		0,00	0,00

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 22.** Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de *Cyclanthus bipartitus*.

<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Índice de repelencia ovipositora (ODI) (%)</b>
Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> método acuoso	1	100,00
	2	98,53
	3	100,00
	4	100,00
	5	100,00
	6	100,00
	7	100,00
	8	100,00
	9	94,44
	10	100,00
Extracto de <i>Cyclanthus bipartitus</i> método ultrasonido	1	100,00
	2	100,00
	3	100,00
	4	100,00
	5	100,00
	6	100,00
	7	100,00
	8	100,00
	9	100,00
	10	96,77

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 23.** Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de *Dieffenbachia costata*.

Tratamiento	Repetición	Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario		Bioensayo para determinar el efecto larvicida	
		% Consumido	Actividad anti-alimentaria (%)	Método de inmersión larval	Método de inmersión foliar
				% Mortalidad	% Mortalidad
Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> método acuoso	1	17,49	47,08	20,00	20,00
	2	21,02	33,87	0,00	0,00
	3	14,86	36,00	0,00	0,00
	4	15,46	53,19	0,00	0,00
	5	14,29	44,48	0,00	0,00
	6	16,98	30,18	0,00	0,00
	7	21,64	32,24	0,00	20,00
	8	15,26	37,28	0,00	0,00
	9	20,97	47,99	0,00	0,00
	10	9,90	67,28	0,00	20,00
Control Acuoso	1	32,70		0,00	0,00
	2	28,45		0,00	0,00
	3	20,73		0,00	0,00
	4	29,72		0,00	0,00
	5	23,82		0,00	0,00
	6	22,36		0,00	0,00
	7	30,38		0,00	0,00
	8	21,90		0,00	0,00
	9	37,28		0,00	0,00
	10	28,54		0,00	0,00
Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> método ultrasonido	1	10,20	29,58	20,00	0,00
	2	10,35	61,50	0,00	0,00
	3	9,73	58,20	20,00	0,00
	4	15,80	27,80	20,00	20,00
	5	5,73	82,28	0,00	20,00
	6	13,24	26,48	20,00	0,00
	7	11,68	69,26	0,00	20,00
	8	6,88	75,51	0,00	0,00
	9	11,23	52,56	20,00	0,00
	10	11,25	66,31	0,00	0,00
Control Ultrasonido	1	16,91		0,00	0,00
	2	29,52		0,00	0,00
	3	28,21		0,00	0,00
	4	24,22		20,00	0,00
	5	35,65		0,00	0,00
	6	19,52		0,00	0,00
	7	41,23		0,00	0,00
	8	34,98		0,00	0,00
	9	26,71		0,00	0,00
	10	36,59		0,00	0,00

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 24.** Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de *Dieffenbachia costata*.

<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Índice de repelencia ovipositora (ODI) (%)</b>
Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> método acuoso	1	97,30
	2	96,52
	3	100,00
	4	100,00
	5	100,00
	6	98,84
	7	100,00
	8	97,87
	9	100,00
	10	99,17
Extracto de <i>Dieffenbachia costata</i> método ultrasonido	1	98,88
	2	96,52
	3	100,00
	4	100,00
	5	100,00
	6	98,68
	7	100,00
	8	100,00
	9	100,00
	10	100,00

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 25.** Base de datos obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto anti-alimentario y el efecto larvicida empleado extractos de *Vismia* sp.

Tratamiento	Repetición	Bioensayo para determinar el efecto anti-alimentario		Bioensayo para determinar el efecto larvicida	
		% Consumido	Actividad anti-alimentaria (%)	Método de inmersión larval	Método de inmersión foliar
				% Mortalidad	% Mortalidad
Extracto de <i>Vismia</i> sp. método acuoso	1	20,71	26,30	0,00	0,00
	2	26,11	21,68	0,00	0,00
	3	20,84	53,80	0,00	0,00
	4	22,39	29,04	20,00	20,00
	5	19,71	38,28	0,00	20,00
	6	26,78	14,92	0,00	0,00
	7	17,13	56,02	0,00	0,00
	8	16,56	44,33	0,00	0,00
	9	21,89	26,55	20,00	0,00
	10	22,18	31,42	0,00	20,00
Control Acuoso	1	30,37		0,00	0,00
	2	27,86		0,00	0,00
	3	35,49		0,00	0,00
	4	31,94		0,00	0,00
	5	30,71		0,00	0,00
	6	33,78		0,00	0,00
	7	40,27		0,00	0,00
	8	28,54		0,00	0,00
	9	31,68		0,00	0,00
	10	36,79		0,00	0,00
Extracto de <i>Vismia</i> sp. método ultrasonido	1	8,34	57,62	0,00	0,00
	2	10,14	10,23	0,00	0,00
	3	19,00	3,53	0,00	20,00
	4	11,69	54,74	0,00	20,00
	5	11,98	21,12	20,00	20,00
	6	12,03	38,56	0,00	0,00
	7	8,62	47,27	20,00	0,00
	8	10,43	47,27	0,00	0,00
	9	11,65	11,06	20,00	20,00
	10	17,06	7,84	0,00	20,00
Control Ultrasonido	1	21,24		0,00	0,00
	2	12,59		0,00	0,00
	3	23,15		0,00	0,00
	4	27,15		0,00	0,00
	5	17,11		0,00	0,00
	6	21,24		0,00	0,00
	7	19,01		0,00	0,00
	8	21,95		0,00	0,00
	9	13,35		0,00	0,00
	10	21,19		0,00	0,00

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 26.** Base de datos obtenidos en el bioensayo para determinar el efecto de repelencia ovipositora empleado extractos de *Vismia* sp.

<b>Tratamiento</b>	<b>Repetición</b>	<b>Índice de repelencia ovipositora (ODI) (%)</b>
Extracto de <i>Vismia</i> sp. método acuoso	1	71,4
	2	80,0
	3	85,2
	4	100,0
	5	100,0
	6	100,0
	7	81,1
	8	80,0
	9	89,1
	10	90,9
Extracto de <i>Vismia</i> sp. método ultrasonido	1	100,0
	2	100,0
	3	99,3
	4	97,2
	5	97,5
	6	91,3
	7	100,0
	8	100,0
	9	98,1
	10	100,0

Elaboración: Altamirano, G., 2015.

**Anexo 27.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por *Clibadium* sp.

**1. Análisis de varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	1556,59	12	129,72	10,99	<0,0001
<i>Clibadium</i> sp.	1513,05	3	504,35	42,75	<0,0001
Error	318,57	27	11,80		
Total	1875,16	39			

**2. Prueba de significación de Tukey al 5%.**

Error: 11,7990 gl: 27

<i>Clibadium</i> sp.	Medias	n	E.E.	
CIAc	18,79	10	1,09	A
CIUI	21,58	10	1,09	A
CAc	31,08	10	1,09	B
CUI	33,36	10	1,09	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 28.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por *Cyclanthus bipartitus*.

**1. Análisis de varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	1178,92	12	98,24	14,46	<0,0001
<i>Cyclanthus bipartitus</i>	1085,56	3	361,85	53,28	<0,0001
Error	183,39	27	6,79		
Total	1362,30	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 6,7921 gl: 27

Cyclanthus bipartitus Medias n E.E.

CyUI	18,28	10	0,82	A	
CyAc	24,43	10	0,82		B
CUI	29,26	10	0,82		C
CAc	31,99	10	0,82		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 29.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por *Dieffenbachia costata*.

### 1. Análisis de varianza

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	1388,43	12	115,70	8,67	<0,0001
<i>Dieffenbachia costata</i>	1273,81	3	424,60	31,81	<0,0001
Error	360,38	27	13,35		
Total	1748,81	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 13,3475 gl: 27

Dieffenbachia costata Medias n E.E.

DiUI	18,86	10	1,16	A	
DiAc	24,07	10	1,16		B
CAc	31,59	10	1,16		C
CUI	32,62	10	1,16		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 30.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por porcentaje consumido producido por *Vismia* sp.

**1. Análisis de varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	1179,68	12	98,31	14,91	<0,0001
<i>Vismia</i> sp.	1088,08	3	362,69	55,00	<0,0001
Error	178,05	27	6,59		
Total	1357,73	39			

**2. Prueba de significación de Tukey al 5%.**

Error: 6,5945 gl: 27

<i>Vismia</i> sp.	Medias	n	E.E.	
ViUI	20,20	10	0,81	A
CUI	26,29	10	0,81	B
ViAc	27,52	10	0,81	B
CAc	34,87	10	0,81	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 31.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por extractos obtenidos mediante extracción acuosa.

**1. Análisis de varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	2451,34	12	204,28	5,24	0,0002
Extracto Acuoso	2052,08	3	684,03	17,55	<0,0001
Error	1052,39	27	38,98		
Total	3503,73	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 38,9772 gl: 27

Extracto Acuoso	Medias	n	E.E.		
CIAc	55,08	10	1,97	A	
CyAc	43,63	10	1,97	B	
DiAc	40,90	10	1,97	B	C
ViAc	35,47	10	1,97		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 32.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.

### 1. Análisis de varianza

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2711,05	12	225,92	1,32	0,2630
Extracto Ultrasonido	1552,64	3	517,55	3,03	0,0466
Error	4613,83	27	170,88		
Total	7324,88	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 170,8826 gl: 27

Extracto Ultrasonido	Medias	n	E.E.		
DiUI	47,99	10	4,13	A	
CyUI	45,07	10	4,13	A	B
CIUI	42,00	10	4,13	A	B
ViUI	31,49	10	4,13		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 33.** Análisis estadístico para determinar el efecto anti-alimentario por actividad anti-alimentaria producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción.

**1. Análisis de varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	4126,16	16	257,89	2,39	0,0073
Extracto	2499,63	3	833,21	7,73	0,0002
Métodos	91,02	1	91,02	0,84	0,3617
Extracto*Métodos	1105,08	3	368,36	3,42	0,0226
Error	6793,46	63	107,83		
Total	10919,62	79			

**2. Prueba de significación de Tukey al 5%.**

*Error: 107,8327 gl: 63*

<u>Extracto</u>	<u>Métodos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>		
Cl	Ac	55,08	10	3,28	A	
Di	Ul	47,99	10	3,28	A	
Cy	Ul	45,07	10	3,28	A	B
Cy	Ac	43,63	10	3,28	A	B
Cl	Ul	42,00	10	3,28	A	B
Di	Ac	40,90	10	3,28	A	B
Vi	Ac	35,47	10	3,28		B
Vi	Ul	31,49	10	3,28		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Anexo 34.** Análisis estadístico para comparar metodologías empleadas para determinar el efecto larvicida.

**1. Método de inmersión larval y de inmersión foliar para determinar el efecto larvicida provocado por el efecto de extractos de *Clibadium* sp.**

**a. Prueba de Friedman**

CIAc	CAc	CIAc	CAc	CIUI	CUI	CIUI	CUI	T <sup>2</sup>	p
IF	IF	IL	IL	IF	IF	IL	IL		
4,70	3,90	3,90	3,90	6,70	4,30	4,70	3,90	6,86	<0,0001

**b. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
CIUI IF	67,00	6,70	10	A
CIUI IL	47,00	4,70	10	B
CIAc IF	47,00	4,70	10	B
CUI IF	43,00	4,30	10	B
CAc IF	39,00	3,90	10	B
CIAc IL	39,00	3,90	10	B
CAc IL	39,00	3,90	10	B
CUI IL	39,00	3,90	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)*

**2. Método de inmersión larval y de inmersión foliar para determinar el efecto larvicida provocado por el efecto de extractos de *Cyclanthus bipartitus***

**a. Prueba de Friedman**

CyAc	CAc	CyAc	CAc	CyUI	CUI	CyUI	CUI	T <sup>2</sup>	p
IF	IF	IL	IL	IF	IF	IL	IL		
6,50	3,80	3,80	3,80	6,70	3,80	3,80	3,80	17,91	<0,0001

**b. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
CyUI IF	67,00	6,70	10	A
CyAc IF	65,00	6,50	10	A
CyAc IL	38,00	3,80	10	B
CAC IF	38,00	3,80	10	B
CAC IL	38,00	3,80	10	B
CUI IL	38,00	3,80	10	B
CyUI IL	38,00	3,80	10	B
CUI IF	38,00	3,80	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**3. Método de inmersión larval y de inmersión foliar para determinar el efecto larvicida provocado por el efecto de extractos de *Dieffenbachia costata*.**

**a. Prueba de Friedman**

DiAc IF	CAC IF	DiAc IL	CAC IL	DiUI IF	CUI IF	DiUI IL	CUI IL	T <sup>2</sup>	P
5,40	4,20	4,20	4,20	5,40	4,20	4,20	4,20	3,33	0,0044

**b. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
DiAc IF	54,00	5,40	10	A
DiUI IF	54,00	5,40	10	A
DiAc IL	42,00	4,20	10	B
CAC IF	42,00	4,20	10	B
CAC IL	42,00	4,20	10	B
CUI IL	42,00	4,20	10	B
DiUI IL	42,00	4,20	10	B
CUI IF	42,00	4,20	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**4. Método de inmersión larval y de inmersión foliar para determinar el efecto larvicida provocado por el efecto de extractos de *Vismia* sp.**

**a. Prueba de Friedman**

ViAc	CAC	ViAc	CAC	ViUI	CUI	ViUI	CUI	T <sup>2</sup>	p
IF	IF	IL	IL	IF	IF	IL	IL		
5,30	4,10	4,10	4,10	6,10	4,10	4,10	4,10	6,41	<0,0001

**b. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N		
ViUI IF	61,00	6,10	10	A	
ViAc IF	53,00	5,30	10	A	
ViAc IL	41,00	4,10	10		B
CAC IF	41,00	4,10	10		B
CAC IL	41,00	4,10	10		B
CUI IL	41,00	4,10	10		B
ViUI IL	41,00	4,10	10		B
CUI IF	41,00	4,10	10		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**Anexo 35.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de *Clibadium* sp.

**1. Prueba de Friedman**

CAC	CIAC	CUI	CIUI	T <sup>2</sup>	p
2,00	2,40	2,20	3,40	7,25	0,0010

**2. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N		
CIUI	34,00	3,40	10	A	
CIAC	24,00	2,40	10		B
CUI	22,00	2,20	10		B
CAC	20,00	2,00	10		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**Anexo 36.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de *Cyclanthus bipartitus*.

**1. Prueba de Friedman**

CAc	CyAc	CUI	CyUI	T <sup>2</sup>	P
1,80	3,10	1,80	3,30	13,50	<0,0001

**2. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
CyUI	33,00	3,30	10	A
CyAc	31,00	3,10	10	A
CUI	18,00	1,80	10	B
CAc	18,00	1,80	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)*

**Anexo 37.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de *Dieffenbachia costata*.

**1. Prueba de Friedman**

CAc	DiAc	CUI	DiUI	T <sup>2</sup>	P
2,20	2,80	2,20	2,80	2,61	0,0717

**2. Prueba de Conover**

3. Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
DiAc	28,00	2,80	10	A
DiUI	28,00	2,80	10	A
CUI	22,00	2,20	10	A
CAc	22,00	2,20	10	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)*

**Anexo 38.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos de *Vismia* sp.

**1. Prueba de Friedman**

CAc	ViAc	CUI	ViUI	T <sup>2</sup>	P
2,10	2,70	2,10	3,10	6,00	0,0029

**2. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
ViUI	31,00	3,10	10	A
ViAc	27,00	2,70	10	A
CUI	21,00	2,10	10	B
CAc	21,00	2,10	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**Anexo 39.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos acuosos de plantas amazónicas.

**1. Prueba de Friedman**

ClAc	CyAc	DiAc	ViAc	T <sup>2</sup>	P
2,15	3,15	2,35	2,35	2,12	0,1216

**2. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N	
CyAc	31,50	3,15	10	A
ViAc	23,50	2,35	10	A B
DiAc	23,50	2,35	10	A B
ClAc	21,50	2,15	10	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**Anexo 40.** Prueba de Friedman para determinar el efecto larvicida por medio del porcentaje de mortalidad provocado por acción de diferentes extractos obtenidos por ultrasonido asistida de plantas amazónicas.

**1. Prueba de Friedman**

CIUI	CyUI	DiUI	ViUI	T <sup>2</sup>	P
2,70	3,05	1,95	2,30	3,14	0,0417

**2. Prueba de Conover**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N		
CyUI	30,50	3,05	10	A	
CIUI	27,00	2,70	10	A	B
ViUI	23,00	2,30	10	A	B
DiUI	19,50	1,95	10		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,050$ )*

**Anexo 41.** Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de *Clibadium* sp.

Variable: ODI – Clasific: Métodos - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	CIAc	CIUI
N	10	10
Media	84,05	82,62
Media (1) – Media (2)	1,43	
LI (95)	-4,53	
LS (95)	7,38	
pHomVar	0,9318	
T	0,50	
Gl	18	
p-valor	0,6211	

**Anexo 42.** Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de *Cyclanthus bipartitus*.

Variable: ODI – Clasific: Métodos - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	DiAc	DiUI
N	10	10
Media	87,94	88,97
Media (1) – Media (2)	-1,03	
LI (95)	-4,79	
LS (95)	2,74	
pHomVar	0,3197	
T	-0,57	
Gl	18	
p-valor	0,5740	

**Anexo 43.** Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de *Dieffenbachia costata*.

Variable: ODI – Clasific: Métodos - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	DiAc	DiUI
N	10	10
Media	86,00	87,66
Media (1) – Media (2)	-1,66	
LI (95)	-5,64	
LS (95)	2,31	
pHomVar	0,7169	
T	-0,88	
Gl	18	
p-valor	0,3915	

**Anexo 44.** Prueba T para muestras independientes para determinar el efecto de repelencia ovipositora provocado por acción de dos tipos de extractos, uno acuoso y otro por ultrasonido asistida de *Vismia* sp.

Variable: ODI – Clasific: Métodos - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	ViAc	ViUI
N	10	10
Media	72,93	85,15
Media (1) – Media (2)	-12,22	
LI (95)	-21,66	
LS (95)	-2,78	
pHomVar	0,0382	
T	-2,80	
Gl	13	
p-valor	0,0151	

**Anexo 45.** Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por extractos botánicos obtenidos mediante extracción acuosa.

**1. Análisis de la varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	2026,28	12	168,86	3,09	0,0072
Extracto Acuoso	1356,76	3	452,25	8,28	0,0005
Error	1474,94	27	54,63		
Total	3501,22	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 54,6274 gl: 27

<u>Extracto Acuoso</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
CyAc	87,94	10	2,34	A
DiAc	86,00	10	2,34	A
CIAc	84,05	10	2,34	A
ViAc	72,93	10	2,34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 46.** Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por extractos botánicos obtenidos mediante extracción por ultrasonido asistida.

### 1. Análisis de la varianza

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	440,46	12	36,70	1,41	0,2217
Extracto Ultrasonido	236,37	3	78,79	3,02	0,0468
Error	703,35	27	26,05		
Total	1143,80	39			

## 2. Prueba de significación de Tukey al 5%.

Error: 26,0499 gl: 27

<u>Extracto Ultrasonido</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
CyUI	88,97	10	1,61	A
DiUI	87,66	10	1,61	A B
ViUI	85,15	10	1,61	A B
CIUI	82,62	10	1,61	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 47.** Análisis estadístico para determinar el efecto de repelencia ovipositora producido por interacción entre extractos botánicos y métodos de extracción.

**1. Análisis de la varianza**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	2181,69	16	136,36	3,19	0,0005
Extracto	1044,50	3	348,17	8,15	0,0001
Métodos	227,10	1	227,10	5,32	0,0244
Extracto*Métodos	548,63	3	182,88	4,28	0,0082
Error	2690,44	63	42,71		
Total	4872,13	79			

**2. Prueba de significación de Tukey al 5%.**

Error: 42,7055 gl: 63

Extracto	Métodos	Medias	n	E.E.	
Cy	Ul	88,97	10	2,07	A
Cy	Ac	87,94	10	2,07	A
Di	Ul	87,66	10	2,07	A
Di	Ac	86,00	10	2,07	A
Vi	Ul	85,15	10	2,07	A
Cl	Ac	84,05	10	2,07	A
Cl	Ul	82,62	10	2,07	A
Vi	Ac	72,93	10	2,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )