



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR – OAXACA**

**TOXICOLOGÍA DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES
ESENCIALES SOBRE MOSQUITOS *Culex quinquefasciatus*
(Say) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Carlos Alejandro Granados Echegoyen

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

**Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca
2015**



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 19 del mes de marzo del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: "Toxicología de extractos vegetales y aceites esenciales sobre mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: culicidae)".


Presentada por el alumno:

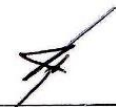
Granados Apellido paterno	Echegoyen materno	Carlos Alejandro nombre(s)
Con registro:		
A	1	1 0 3 2 2


aspirante al grado de: **DOCTOR EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
Director de tesis


Dr. Rafael Pérez Pacheco



Dr. Jaime Ruiz Vega


Dr. Alfonso Vásquez López


Dra. Lucila Lagúnez Rivera


Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD - OAXACA

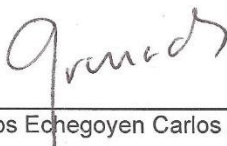


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 19 del mes marzo del año 2015, el (la) que suscribe Granados Echegoyen Carlos Alejandro alumno (a) del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A110322, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Rafael Pérez Pacheco y cede los derechos del trabajo titulado: "Toxicología de extractos vegetales y aceites esenciales sobre mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: culicidae)". Al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó granados.echegoyen@yahoo.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Granados Echegoyen Carlos Alejandro



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

AGRADECIMIENTO

Esta tesis se realizó en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAX) dependencia del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del compañero y amigo Dr. Rafael Pérez Pacheco.

Para el fortalecimiento de la investigación se realizaron estancias de investigación nacional con el apoyo económico de becas institucionales del IPN en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Campus Montecillo bajo la coordinación del Dr. Néstor Bautista Martínez, y en la Universidad Veracruzana Campus Veracruz con el apoyo del Dr. Alfonso Alexander Aguilera.

Agradezco por sus comentarios y revisiones del documento y artículos publicados a los miembros del comité tutorial Dr. Rafael Pérez Pacheco, Dr. Jaime Ruiz Vega, Dr. Alfonso Vasquez Lopez, Dr. José Antonio Sánchez García, Dr. Teodulfo Aquino Bolaños y Dra. Luicita Lagunez.

Se realizó una estancia de investigación internacional en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” en la Ciudad de la Habana, Cuba, bajo la dirección del Dr. René Gato Armas.

Durante el desarrollo de este estudio se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con beca mixta para estancias en el extranjero y beca nacional para estudios de doctorado con el registro (CVU/Becario): 297476/226078, y con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN que posteriormente se denominó Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI), como parte del proyecto SIP 2011-2015 de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi hija Fáttyma Alexandra y a mi gorda Nancy Alonso por todo su apoyo durante esta jornada de trabajo.

A mis padres y hermanos que aunque estén lejos siempre han estado cerca.

A todas las personas que estuvieron involucradas en la realización de este trabajo, en especial a los consejeros de estudios, a los compañeros cubanos del IPK y al personal de trabajo del CIIDIR-OAX que sin ellos no hubiera sido posible la culminación de esta tesis de investigación.

RESUMEN

Los productos sintéticos que se utilizan para el control de diversas plagas en salud y la agricultura cumplen con tres características fundamentales para su comercialización, la composición química del producto, el modo de acción sobre el organismo y los niveles toxicológicos que puedan afectar la salud humana. Estas tres características impulsaron el desarrollo sistemático del presente trabajo. Se determinó la toxicología de extractos vegetales y aceites esenciales sobre mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae), además de la inhibición del crecimiento y desarrollo de larvas del mosquito tratados con derivados de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae) y el efecto del extracto acuoso y etanólico de *P. alliaceum* sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos de ratas Wistar, así mismo la actividad larvívica y caracterización química del aceite esencial de hojas de *Persea americana* (Lauraceae) sobre el insecto. Se demuestra el potencial de extractos metanólicos de *Acacia farnesiana*, *Comocladia engleriana*, *Pluchea sagittalis* y *Schinus molle*; el potencial de *Matricaria chamomilla* como extracto acuoso y de extractos etanólicos de *Pseudocalymma alliaceum* y *Schinus molle*. Con aceites esenciales el mayor rango de toxicidad se logró con *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Persea americana*, *Rosmarinus officinalis* y *Schinus molle*, al igual que los subproductos de *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum basilicum* y *Piper auritum*. Se logró observar que aunque muchas larvas logran alcanzar el estado de pupa muchas de estas no alcanzan la fase adulta debido a la acción que ejercen los metabolitos secundarios sobre el crecimiento y desarrollo del insecto. Los volátiles del aceite esencial de *Persea americana* y *Pseudocalymma alliaceum* fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS). El compuesto mayoritario en *P. alliaceum* fue disulfuro de dialilo (50.05%) y en *P. americana* fue estragol (61.86%). El aceite esencial de *P. alliaceum* aplicado a 800 ppm mostró actividad larvívica a las 24h. A las 48h la concentración de 400 ppm ocasionó más del 92% de mortalidad. El hidrolato a concentraciones de 20 y 10% sobre larvas de segundo estadio presentó 100% de efectividad a las 24h. Los extractos vegetales inhiben el crecimiento del mosquito, el extracto acuoso al 10% presentó 0.58 de índice relativo de crecimiento (IRC), con el extracto metanólico y etanólico se obtuvo 0.76 y 0.70 en comparación con el testigo sin aplicación que presentó 0.99. El extracto acuoso prolonga en 0.85 y 2.45 días la duración larval al emplear concentraciones al 0.1 y 0.01% y la reduce en 1.18 días al ser tratadas con 1.0%. Las pupas tratadas con concentraciones de 0.01% del extracto de etanol y agua presentaron una prolongación en la durabilidad de 3.73 y 2.33 días respectivamente. El aceite de *P. americana* a 800 ppm inhibe el crecimiento de las larvas mosquito a 26.73% (0.74) y 50 ppm a 16.83% (0.84). La viabilidad de larva a pupa disminuyó en 53.25% con 800 ppm causando una prolongación del desarrollo en 14.14 días, mientras que el control tuvo una durabilidad en su desarrollo de 12 días. La mortalidad al final del experimento registró 57.50% con 800 ppm, disminuyendo gradualmente a 40.00% con 50 ppm del aceite esencial de aguacate. Se evaluaron extractos acuosos y etanólicos de hojas secas de *P. alliaceum*, administrando 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal a ratas

wistar vía oral por 14 días, se aleatorizaron cuatro grupos con tres repeticiones. No se registraron muertes después de la administración oral de los extractos, ni se observaron signos físicos de toxicidad ni efectos adversos al tratamiento. Los índices hematológicos eritrocitos, hemoglobina y hemoglobina corpuscular media no mostraron anomalía significativa, en cambio se mostró una disminución en los niveles de la serie blanca presentando una leucopenia y un aumento plaquetario y de linfocitos, la ingesta de *Pseudocalymma* no produce toxicidad aguda a 50 mg/kg que pudieran ser interpretadas como signos tóxicos o de daño biológico, pero altera la función hepática y renal a dosificaciones de 100 y 200 mg/kg.

Palabras clave: productos naturales, control de mosquitos, inhibición de crecimiento, desarrollo, toxicidad, ratas wistar.

ABSTRACT

The synthetic products that are used for the control of various pests in health and agriculture met with three key features for its marketing, the chemical composition of the product, the mode of action on the agency and the toxicological levels that may affect human health. These three characteristics prompted the systematic development of the present work. It was determined the toxicology of botanical extracts and essential oils on mosquitoes *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae), in addition the inhibition of growth and development of mosquito larvae treated with derivatives from dry leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae) and the effect of the aqueous and ethanolic extract of *P. alliaceum* on haematological and biochemical parameters of Wistar rats, likewise the larvicidal activity and chemical characterization of the essential oil of leave of *Persea americana* (Lauraceae) on the insect. It demonstrates the potential of methanolic extracts of *Acacia farnesiana*, *Comocladia engleriana*, *Pluchea sagittalis* and *Schinus molle*; the potential of *Matricaria chamomilla* as aqueous extract and ethanolic extracts of *Pseudocalymma alliaceum* and *Schinus molle*. Essential oils with largest range of toxicity was achieved with *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Persea americana*, *Rosmarinus officinalis* and *Schinus molle*, as by-products of *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum basilicum* and *Piper auritum*. It was noted that although many larvae reach the pupae stage, but many of these do not reach the adult stage due to the action exerted by the secondary metabolites on the growth and development of the insect. The volatile essential oil of *Persea americana* and *Pseudocalymma alliaceum* were analyzed by gas chromatography (GC-MS). The most abundant compound in *P. alliaceum* was diallyl disulfide (50.05%) and in *P. americana* was estragole (61.86%). The essential oil of *P. alliaceum* applied to 800 ppm showed larvicidal activity at 24 h. At 48 h the concentration of 400 ppm caused over 92% of mortality. Hydrolate at concentrations of 20 and 10% on larvae of second stage presented 100% of effectiveness to the 24h. The plant extracts inhibit the growth of the mosquito, the aqueous extract on 10% presented 0.58 of relative index of growth (IRC), with the methanolic extract and ethanolic was obtained 0.76 and 0.70 in comparison with the control without application that presented 0.99. The aqueous extract prolongs in 0.85 and 2.45 days the larval duration to use concentrations to 0.1 and 0.01% and reduces in 1.18 days to be treated with 1.0%. The pupae treated with concentrations of 0.01% of the extract of ethanol and water presented an extension in the durability of 3.73 and 2.33 days respectively. The oil of *P. americana* to 800 ppm inhibits the growth of the larvae to 26.73% (0.74) and 50 ppm to 16.83% (0.84). The feasibility of larvae to pupae declined by 53.25% with 800 ppm causing an extension of the development in 14.14 days, while the control had a durability in his development of 12 days. The mortality rate at the end of the experiment record 57.50% with 800 ppm, gradually decreasing to 40.00% with 50 ppm of the essential oil of avocado. Aqueous and ethanolic extracts of dry leaves of *P. alliaceum* were evaluated, managing 50, 100 and 200 mg/kg of body weight to wistar rats orally for 14 days, were randomised four groups with three replications. No deaths were recorded after the oral administration

of the extracts, or observed physical signs of toxicity or adverse effects to the treatment. The haematological indices erythrocytes, hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin showed no significant abnormality, showed a decrease in levels of white series presenting an leukopenia and an increase of lymphocytes and platelets, the intake of *Pseudocalymma* does not produce acute toxicity to 50 mg/kg, which could be interpreted as toxic signs or of biological damage, but alters the function of the liver and kidneys to dosages of 100 and 200 mg/kg.

Key words: natural products, mosquito control, inhibition of growth, development, toxicity, wistar rats.

Contenido

AGRADECIMIENTO	4
DEDICATORIA	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCION GENERAL.....	13
CAPÍTULO 1.....	14
Toxicología de extractos vegetales y aceites esenciales sobre mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say) (Diptera: Culicidae)	
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
<i>Cría de mosquitos</i>	17
<i>Obtención del material vegetal para extracción con disolventes y aceites esenciales</i>	17
<i>Preparación de extractos crudos</i>	18
<i>Obtención de especies aromáticas para extracción de aceites esenciales</i>	19
<i>Obtención de hidrolatos y aceite esencial</i>	20
<i>Preparación de concentraciones de aplicación de hidrolatos y aceite esencial</i>	20
<i>Diseño experimental y analisis estadístico</i>	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
<i>Efecto biológico de la extracción con disolventes sobre mosquitos</i>	21
<i>Bioensayos con aceites esenciales sobre larvas de segundo y cuarto instar</i>	29
<i>Efectividad biológica de hidrolatos derivados de aceites esenciales</i>	37
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
CAPÍTULO 2.....	48
Inhibición del crecimiento y desarrollo de larvas de mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae) tratados con derivados de hojas secas de <i>Pseudocalymma alliaceum</i> (Bignoniaceae)	
RESUMEN.....	48
ABSTRACT.....	49

INTRODUCCIÓN	49
MATERIALES Y MÉTODOS	50
<i>Colecta de huevos de mosquitos y cuidado de larvas</i>	50
<i>Cuidado de pupas y adultos del mosquito</i>	51
<i>Obtención del material vegetal</i>	51
<i>Obtención de hidrolato y aceite esencial</i>	51
<i>Análisis cromatográfico e identificación de compuestos volátiles</i>	51
<i>Concentraciones de aplicación de aceite esencial e hidrolato</i>	52
<i>Preparación de extractos crudos</i>	52
<i>Bioensayos de acción larvívica</i>	52
<i>Inhibición de crecimiento</i>	53
<i>Viabilidad y durabilidad larval y pupal</i>	53
<i>Análisis estadístico</i>	54
RESULTADOS.....	54
<i>Identificación de compuestos volátiles</i>	54
<i>Acción larvívica</i>	54
<i>Inhibición de crecimiento</i>	55
<i>Viabilidad y durabilidad larval y pupal</i>	56
DISCUSIÓN	57
LITERATURA CITADA	60
CAPÍTULO 3.....	64
Actividad larvívica y caracterización química del aceite esencial de hojas de <i>Persea americana</i> (Lauraceae) contra <i>Culex quinquefasciatus</i>(Say)	
RESUMEN.....	64
ABSTRACT.....	64
INTRODUCCIÓN	65
MATERIALES Y METODOS	66
<i>Poblacion de larvas de mosquito</i>	66
<i>Preparacion del material vegetal</i>	66
<i>Extraccion del aceite esencial</i>	66
<i>Cromatografía de gases (GC-MS) e identificación de compuestos volátiles</i>	66
<i>Preparación de las concentraciones de aceites esenciales</i>	67
<i>Actividad larvicida y bioensayos de inhibición de crecimiento</i>	67
<i>Viabilidad y duración de larva y pupa</i>	67

<i>Análisis estadístico</i>	68
RESULTADOS.....	68
<i>Identificación de compuestos volátiles</i>	68
<i>Actividad larvicida e inhibición del crecimiento</i>	68
<i>Durabilidad y la viabilidad de larva y pupa</i>	69
DISCUSIÓN	69
LITERATURA CITADA	71
CAPÍTULO 4	75
Efectos del extracto acuoso y etanólico de hojas secas de <i>Pseudocalymma alliaceum</i> (Bignonaceae) sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos de ratas Wistar	
RESUMEN.....	75
ABSTRACT.....	75
INTRODUCCIÓN	76
MATERIALES Y MÉTODOS	77
<i>Obtención del material vegetal</i>	77
<i>Preparación de los extractos crudos</i>	77
<i>Animales de experimentación</i>	78
<i>Administración de extractos y grupo de animales</i>	78
<i>Muestras de sangre y preparación del suero</i>	78
<i>Determinación de los parámetros bioquímicos</i>	78
<i>Análisis estadístico</i>	78
RESULTADOS.....	79
<i>Parámetros hematológicos</i>	79
<i>Parámetros bioquímicos de la sangre</i>	80
DISCUSIÓN	82
LITERATURA CITADA	84

INTRODUCCION GENERAL

Este trabajo de tesis se desarrolló partiendo de la idea y pregunta de investigación de conocer cuáles eran las técnicas y métodos adecuados para realizar la formulación de productos de origen vegetal, que puedan integrarse como estrategia de prevención, manejo y control de mosquitos vectores de enfermedades de importancia en salud pública. Los productos sintéticos que se utilizan para el control de diversas plagas en salud y la agricultura cumplen con tres características fundamentales para su comercialización, la composición química del producto, el modo de acción sobre el organismo y los niveles toxicológicos que puedan afectar la salud humana. Estas tres características impulsaron el desarrollo sistemático del presente trabajo y es por estas razones que se estructuró en forma de capítulos científicos que se describen a continuación.

El *Capítulo 1* integra la síntesis metodológica de obtención de extractos vegetales con solventes de variada polaridad y de aceites esenciales de plantas aromáticas medicinales de uso etnobotánico en las diversas localidades del estado de Oaxaca. Se muestran los resultados del potencial de 34 especies botánicas, de las cuales el 52.94% se trabajaron con extracción por solventes y 16 plantas aromáticas por hidrodestilación asistida con microondas. El *Capítulo 2* es un artículo publicado en el *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (JCR) con el que se contribuye información de la composición química de *Pseudocalymma alliaceum* (Lam.) (Bignoniaceae) una de las 34 plantas evaluadas y en donde se cuantifican variables de inhibición del crecimiento, mortalidad parcial, total, desarrollo de larvas y pupas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) tratados con el extracto, aceite esencial e hidrolato de hojas secas de esta especie vegetal; el trabajo experimental tuvo como objetivo dar respuesta a las dos primeras características mencionadas que un producto botánico comercial debe cumplir.

El *Capítulo 3* lo conforma un artículo enviado al *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* (JCR) en el que se muestra la evaluación tóxica del aceite esencial de *Persea americana* L. (Lauraceae) sobre larvas del mosquito y la determinación de los compuestos secundarios por microextracción de la fase sólida en un cromatógrafo de gases acoplado a masas. El *Capítulo 4* es un documento publicado en el *Asian Pacific Journal of Reproduction* (JCR) y detalla la evaluación toxicológica de *P. alliaceum* en un modelo animal conformado por grupos de ratas “Wistar”, en el cual se determinaron las variaciones que causa la administración oral “*ad libitum*” del extracto vegetal sobre parámetros hematológicos y bioquímicos del organismo, para dar cumplimiento a la tercera característica de un producto comercial.

Con la presente tesis doctoral se logró fortalecer y adquirir habilidades de investigación para realizar la formulación de productos botánicos y proponer alternativas no químicas de control de insectos de importancia en salud pública.

CAPÍTULO 1

Toxicología de extractos vegetales y aceites esenciales sobre mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae)

Toxicology of botanical extracts and essential oils on mosquitoes *Culex quinquefasciatus* (Say)
(Diptera: Culicidae)

RESUMEN

El trabajo se planteó como objetivo determinar el efecto insectistático de extracciones botánicas, aceites esenciales e hidrolatos sobre larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus*. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones, cada unidad experimental consistió en un vaso de plástico de 150 mL de capacidad el que contenía 99 mL de agua y 1 mL de cada tratamiento. Cada vaso contenida 20 larvas de segundo instar tardío. Se realizó el registro de estados de desarrollo vivos y muertos diariamente hasta que el control presentara más de 98% de emergencia de adultos. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias Tukey ($p < 0.05$). No fue necesario aplicar corrección a los datos obtenidos debido a que el control no presentó mortalidad larval. Se demuestra el potencial larvícida de *Acacia farnesiana*, *Comocladia engleriana*, *Pluchea sagittalis* y *Schinus molle* cuando se extraen sus propiedades secundarias con metanol y el potencial de *Matricaria chamomilla* como extracto acuoso y de los extractos etanólicos de *Pseudocalymma alliaceum* y *Schinus molle* para ser considerados como alternativas de manejo y control en las estrategias de combate contra mosquitos. En la aplicación de aceites esenciales sobre larvas del mosquito el mayor rango de toxicidad se logró observar con *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Persea americana*, *Rosmarinus officinalis* y *Schinus molle*, al igual que el subproducto adquirido de la hidrodestilación asistida por microondas de *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum basilicum* y *Piper auritum*. El efecto ejercido sobre larvas del total de las plantas evaluadas demuestra que estas contienen elementos secundarios de diversos grupos químicos que pueden utilizarse como medidas de manejo y combate de este mosquito. Se logró observar que aunque muchas larvas logran alcanzar el estado de pupa muchas de estas no alcanzan la fase adulta debido a la acción que ejercen los metabolitos secundarios sobre el crecimiento y desarrollo del insecto.

Palabras clave: productos naturales botánicos, capacidad larvícida, mosquitos.

ABSTRACT

The work was presented as objective to determine the insecticide effect of botanical extractions, essential oils and hydrolats on mosquito larvae *Cx. quinquefasciatus*. Experimental design was completely randomized with 4 replications, each experimental unit consisted of a plastic cup 150 ml capacity which contained 99 mL of water and 1 mL of each treatment. Each vessel contained 20 late

second instar larvae. Developmental live and dead stage was register daily until the control will present more than 98% of adult emergence. Experimental data to an analysis of variance and Tukey mean comparison ($p < 0.05$) were submitted. It was not necessary to apply correction to the data because the control does not present larval mortality. The larvicidal potential of *Acacia farnesiana*, *Comocladia engleriana*, *Pluchea saggitalis*, and *Schinus molle* when their child properties are extracted with methanol and the potential of *Matricaria chamomilla* as aqueous extract and the ethanol extracts of *Pseudocalymma alliaceum* and *Schinus molle* is demostarted to be considered as alternatives management and control strategies to fight against mosquitoes. In the application of essential oils on mosquito larvae the widest range of toxicity was successfully observed with *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Persea americana*, *Rosmarinus officinalis* and *Schinus molle*, like the product purchased assisted hydrodistillation microwave *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum basilicum* and *Piper auritum*. The effect exerted on larvae of all tested plants shows that they contain child elements of various chemical groups that can be used as management measures and combat this mosquito. It was possible to observe that although many larvae manage to reach the pupal stage many of these do not reach adulthood due to the action exerted by secondary metabolites on growth and development of the insect.

Keywords: Natural botanical products, larvicide capacity, mosquitoes

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son artrópodos de importancia en salud pública ya que muchas especies son vectores de enfermedades. Las enfermedades transmitidas por mosquitos causan morbilidad, mortalidad y una significativa carga económica para la humanidad (Massebo et al. 2009). Las picaduras de mosquitos pueden causar reacciones alérgicas, incluyendo reacciones cutáneas locales y reacciones sistémicas como urticaria y angioedema (Peng et al. 2004). Recientemente se han incrementado los estudios de agentes naturales de especies vegetales en los que se evidencia la actividad insectistática de aceites esenciales sobre mosquitos (Cantrell et al. 2011; Autran et al. 2009; Coria et al. 2008; Jaenson et al. 2006; Prajapati et al. 2005). La naturaleza lipofílica de los aceites esenciales facilita el interferir con el metabolismo basal, las funciones bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento de los insectos (Nishimura, 2001), ya que están conformadas por mezclas de sustancias orgánicas olorosas y volátiles, que químicamente están constituidos por terpenos, asociado a diversos grupos funcionales (Bittner et al. 2001). La propiedad repelente de los aceites esenciales está asociada con la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos; el β -cariofileno es el sesquiterpeno más citado como repelente contra mosquitos (Trongtokit et al. 2005; Sukumar et al. 1991). Los aceites son compuestos complejos, naturales y volátiles caracterizados por un fuerte olor y son producidos por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios, tienen un papel importante en la protección de las plantas como antibacteriales, antivirales,

antifúngicos, insecticidas y también contra herbívoros para reducir su apetito por algunas plantas, aunque también pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión de polen o semillas (Bakkali, 2008). Pueden ser sintetizados en todos los órganos de la planta, flores, hojas, semillas, frutos, raíces y almacenados en tejidos finos secretorios especializados (Svoboda & Greenaway, 2003). También los extractos vegetales son una alternativa ecológica a los insecticidas químicos, siendo sustancias naturales de acción específica, biodegradables, activos a pequeñas dosis y con nula o baja toxicidad, por lo tanto no constituyen peligro de contaminación al ambiente (Camarillo, 2009) la mayoría son de baja toxicidad a mamíferos (López-Olguín et al. 2001), se encuentran al alcance de la mayoría de personas y la preparación es accesible (Sutherland et al. 2002), son generalmente más preferidos debido a su naturaleza de ser menos perjudiciales para organismos secundarios (Rahuman et al. 2008). La mayoría de las especies vegetales que se utilizan como insecticidas no eliminan al insecto por intoxicación, sino que generalmente inhiben el desarrollo normal de estos, lo cual hace que muchas veces se mal interpreten los efectos que ocasionan (Silva et al. 2003). Isman (2006) señala que cuando los extractos vegetales contienen compuestos como alcaloides, fenoles y terpenoides, presentan acción tóxica al bloquear algún proceso vital del insecto. Para la extracción de los principios activos se han utilizado diversos disolventes como: agua, etanol, acetona, metanol, cloroformo, benceno, éter de petróleo, hexano, éter, etc., lo que indica que existen metabolitos secundarios que juegan un papel importante en esta actividad, desde los muy polares que se extraen con agua hasta los no polares que se extraen con éter (Dipanwita & Goutam, 2012; Rodríguez & Nieto, 1997). Se han realizado estudios en donde se evidencia la efectividad biológica de principios activos de especies vegetales sobre mosquitos (Warikoo et al. 2012; Bagavan & Rahuman, 2011; Rahuman et al. 2009; Lucia et al. 2007; Chaithong et al. 2006; Sakthivadivel & Thilagavathy, 2003) estas investigaciones han demostrado el potencial de las plantas como fuente de compuestos con actividad insecticida que pueden ser útiles en el control de mosquitos transmisores de enfermedades, sin embargo, muchos de ellos, se limitan a cuantificar una sola variable como mortalidad, y repelencia en bioensayos separados o bien a realizar extracciones con un solo disolvente, descartando la posibilidad de estudio y comparación con otro tipo de sustancias. La búsqueda de nuevos principios activos se ha centrado en los metabolitos secundarios de plantas que están estructuralmente relacionados con importantes compuestos insecticidas, por ejemplo la nicotina, piretrinas, limonoides, rotenoides y triterpenos modificados como los cuasinoides, entre otros (Wrigley et al. 2000). El contenido y cantidad de compuestos depende del lugar y sitio de crecimiento de la planta, de la etapa fenológica, de la parte de la cual se extraen los compuestos, la composición del suelo y la fertilización mineral, entre otros (Marotti et al. 2004).

Culex (Diptera: Culicidae) es un género que está presente en regiones tropicales y subtropicales. Algunas especies de este insecto, como *Cx. quinquefasciatus* (Say) son transmisores de *Wuchereria bancrofti* un nematodo parásito, causante de la parasitosis humana llamada filariasis linfática (Cavalca

et al. 2011), de *Plasmodium relictum* Grassi & Feletti que provoca malaria aviar y mixomatosis (Goddard et al. 2002; Banko et al. 2001). La filaríasis es un problema mundial de salud pública, 120 millones de personas están actualmente infectadas y alrededor de 1,3 billones se encuentran en riesgo de infección (WHO, 2009). La forma tradicional de controlar este culícido ha sido con insecticidas sintéticos y debido al empleo irracional que se les ha dado, ha provocado el surgimiento de resistencia a las alternativas utilizadas (Cherry & Nagata, 2005; Rawlins, 1998), así como la contaminación del agua, aire y suelo, acumulación de residuos tóxicos e intoxicación de usuarios (Aragón et al. 2002). *Cx. quinquefasciatus* es resistente a una amplia gama de insecticidas (Corbel et al. 2007; Chandre et al. 1998), lo que limita la elección de los productos químicos que pueden ser utilizados para su control. Estas preocupaciones han contribuido a la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente, entre los que se encuentran los extractos de especies vegetales; los plaguicidas fitoquímicos más destacados han sido los basados en productos naturales (Mulla & Su, 1999). Con base a lo anterior el presente trabajo se planteó como objetivo determinar el efecto insectistático de extracciones botánicas, aceites esenciales e hidrolatos sobre larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus* y determinar los efectos de extractos vegetales sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos de ratas Wistar para conocer los niveles de tóxicos y beneficios que estas plantas tienen en el hombre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de mosquitos

Las balsas de huevos fueron recolectadas en agua estancada en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-OAX) localizado en Santa Cruz Xoxocotlán; Oaxaca, México (17°02'N, 96°44'O), las balsas se trasladaron al laboratorio y se colocaron individualmente en bandejas de plástico de 47 x 35 x 12 cm que contenían 300 mL de agua suavizada para que cumplieran con su desarrollo. La cría se mantuvo a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 60 – 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Las larvas se alimentaron con un producto pulverizado para peces Atilapia-1. Las pupas formadas se transfirieron a recipientes de 30 x 20 x 6 cm y se introdujeron a jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos fueron provistos con una solución azucarada al 10% en un frasco con una mecha de algodón y semanalmente se introducía una gallina inmovilizada como material hematofágico para las hembras (Rauman et al. 2008).

Obtención del material vegetal para extracción con disolventes y aceites esenciales

Se recolectó 500 g de material vegetal fresco en diversas regiones del estado de Oaxaca. Las especies vegetales fueron seleccionadas por el uso etnofarmacológico y estudio etnobotánico empleado en otros estudios, por presentar un característico aroma, sabor amargo y resistencia a los daños

ocasionados por insectos plaga (Cuadro 1, 2). La identificación taxonómica fue realizada por el curador del Herbario del CIIDIR-OAX y se depositó un ejemplar de muestra en el laboratorio de investigación para futuras consultas. Las plantas se lavaron con agua de grifo, se colocaron sobre papel periódico en sombra para su secado durante 16 - 20 días dependiendo de la naturaleza de cada especie vegetal, luego se pulverizó cada muestra con un molino mecánico para obtener un polvo que fue posteriormente hidratado (Govindarajan et al. 2011; Pérez-Pacheco et al. 2004).

Cuadro 1. Descripción de estudios realizados con las especies vegetales seleccionadas para la investigación sobre mosquitos vectores de enfermedades.

#	NOMBRE CIENTÍFICO	VARIABLES			GENERO MOSQUITO			AUTOR
		AL	IC		<i>Culex</i>	<i>Aedes</i>	<i>Anopheles</i>	
1	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	-	-	-	-	-	-	No Reportado
2	<i>Argemone mexicana</i> L.	X	-	-	-	-	X	Elango et al. 2011
		X	X	-	X	-	-	Sakthivadivel & Thilagavathy (2003)
		X	-	-	-	-	-	Mandal (2011)
3	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	-	-	-	-	-	-	No Reportado
4	<i>Cestrum nocturnum</i> L.	X	-	-	-	-	-	Jawale et al. (2010)
5	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	X	-	-	X	-	-	Leyva et al. (2009)
6	<i>Comocladia engleriana</i> Loes	-	-	-	-	-	-	No Reportado
7	<i>Datura stramonium</i> (L.)	X	-	X	-	-	-	Pérez-Pacheco et al. 2004
		X	-	X	-	-	X	Olofintoye et al. 2011
		X	-	X	X	-	-	Pérez-Pacheco et al. 2004
8	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	X	-	X	-	-	-	Pérez-Pacheco et al. 2004
9	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Steudel	X	-	X	X	X	X	Sharma et al. (1998)
10	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	-	-	-	-	-	-	No Reportado
11	<i>Mentha spicata</i> Crantz	-	-	-	-	-	-	No Reportado
12	<i>Momordica charantia</i> L.	X	-	X	X	-	-	Rahuman & Venkatesan (2008)
		X	-	X	-	-	X	Maurya et al. (2009)
		X	-	X	X	X	X	Singh et al. (2006)
13	<i>Piper auritum</i> Kunth	X	-	X	-	-	-	Pérez-Pacheco et al. 2004
14	<i>Pluchea sagittalis</i> (Lamb)	-	-	-	-	-	-	No Reportado
15	<i>Pseudocalymma alliaceum</i> (Lam.)	X	-	X	-	-	-	Shrankhla et al. (2011)
16	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	-	-	-	-	-	-	No Reportado
17	<i>Schinus molle</i> L.	-	-	-	-	-	-	No Reportado
18	<i>Tribulus terrestris</i> L.	X	-	X	X	X	X	Singh et al. (2008)

*AL= Acción larvívica, IC= inhibición de crecimiento

Preparación de extractos crudos

Se agregaron 100 g de planta molida en 300 mL de disolvente contenidos en un matraz y se dejó reposar por 24h para la extracción acuosa y 72h para los disolventes de menor polaridad (Cuadro 3), se separó el sólido del líquido utilizando papel filtro whatman N°1 y el remanente se descartó; se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador, obteniendo el extracto crudo para cada disolvente. Se almacena el extracto crudo a 4°C. Del extracto crudo se tomó 1 g y diluyó en 9 mL de agua destilada con polisorbato 20 (tween) al 0.01% utilizado como emulsificante, posteriormente se centrifugó por 10 min y se filtró utilizando tela tricot para evitar grumos, obteniendo el tratamiento al 10 % y a través de dilución volumétrica en serie se elaboraron los tratamientos 1, 0.1 y 0.01 %.

Cuadro 2. Detalle de especies vegetales recolectadas en diversas regiones del estado de Oaxaca seleccionadas para evaluación insectistática sobre *Cx. quinquefasciatus*.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE LOCAL	FAMILIA BOTÁNICA	LOCALIDAD DE COLECTA
<i>A. farnesiana</i>	Huizache	Leguminosaeae	Santa Cruz Xoxocotlán
<i>A. mexicana</i>	Chicalote	Papaveraceae	Santa Cruz Xoxocotlán
<i>B. simaruba</i>	Palo mulato	Burseraceae	San Bartolo, Tuxtepec
<i>C. nocturnum</i>	Huele de noche	Solanaceae	San Bartolo, Tuxtepec
<i>C. ambrosioides</i>	Epazote	Amaranthaceae	Ocotlán de Morelos
<i>C. engleriana</i>	Hincha huevo	Anacardiaceae	Puerto Escondido
<i>D. stramonium</i>	Toloache	Solanaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
<i>E. globulus</i>	Eucalipto	Myrtaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
<i>G. sepium</i>	Cocuite	Fabaceae	San Bartolo, Tuxtepec
<i>M. chamomilla</i>	Manzanilla	Asteraceae	Ocotlán de Morelos
<i>M. spicata</i>	Hierba buena	Lamiaceae	Ocotlán de Morelos
<i>M. charantia</i>	Cundeamor	Cucurbitaceae	San Bartolo, Tuxtepec
<i>P. auritum</i>	Hierba Santa	Piperaceae	Villa de Zaachila
<i>P. alliaceum</i>	Bejuco de ajo	Bignonaceae	San Pedro Comitancillo
<i>P. sagittalis</i>	Tres lomos	Asteraceae	San Bartolo, Tuxtepec
<i>R. officinalis</i>	Romero	Lamiaceae	Villa de Zaachila
<i>S. molle</i>	Pirul	Anacardiaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
<i>T. terrestris</i>	Abrojo	Zygophyllaceae	Santa Cruz Xoxocotlán

Cuadro 3. Disolventes utilizados para la extracción de propiedades secundarias de hojas secas de especies vegetales.

NOMBRE CIENTÍFICO	DISOLVENTES				
	H ₂ O	C ₂ H ₆ O	CH ₄ O	C ₃ H ₆ O	C ₄ H ₈ O ₂
<i>A. farnesiana</i>		X	X		
<i>A. mexicana</i>			X		
<i>B. simaruba</i>		X	X		
<i>C. nocturnum</i>		X	X		
<i>C. ambrosioides</i>	X	X	X		
<i>C. engleriana</i>			X		
<i>D. stramonium</i>			X		X
<i>E. globulus</i>	X	X	X		
<i>G. sepium</i>		X	X		
<i>M. chamomilla</i>	X	X	X		
<i>M. spicata</i>	X	X	X		
<i>M. charantia</i>			X		X
<i>P. auritum</i>	X	X	X		
<i>P. alliaceu</i>	X	X	X		
<i>P. sagittales</i>		X	X		
<i>R. officinalis</i>			X		
<i>S. molle</i>		X	X		
<i>T. terrestris</i>			X		X

H₂O: Agua; C₂H₆O: Etanol; CH₄O: Metanol; C₃H₆O: Acetona; C₄H₈O₂: Acetato de etilo

Obtención de especies aromáticas para extracción de aceites esenciales

Se recolectó 1000 g de material vegetal fresco en diversas regiones del estado de Oaxaca (Cuadro 4). Se considero únicamente partes aéreas de las plantas, que fueran de uso etnobotánico y que presentaran aromas.

Obtención de hidrolatos y aceite esencial

Los aceites esenciales se obtuvieron sometiendo 500 g de material vegetal seco a hidrodestilación asistida con microondas durante 3 h. Se utilizó un microondas con salida de frecuencia de 2450 MHz. La capa de aceite se separó de la fase acuosa utilizando un embudo de separación. El aceite esencial resultante se secó aplicando sulfato de sodio anhidro y se almacenó en botellas color ámbar a 8 °C hasta ser utilizado. El hidrolato impregnado con las moléculas aromáticas de la planta se almacenó para ser evaluado en los bioensayos.

Cuadro 4. Detalle de especies vegetales aromáticas recolectadas en diversas regiones del estado de Oaxaca seleccionadas para evaluación insectistática sobre *Cx. quinquefasciatus*.

#	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE LOCAL	FAMILIA BOTÁNICA	LOCALIDAD DE COLECTA
1	<i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.)	Cedrón	Verbenaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
2	<i>Bursera linanoe</i> (La Llave)	Linaloe	Burseraceae	San Bartolo Tuxtepec
3	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto	Myrtaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
4	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg	Clavo de Olor	Myrtaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
5	<i>Lantana cámara</i> L.	Lantana	Verbenaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
6	<i>Litsea glaucescens</i> Kunth	Laurel	Lauraceae	Ixtlán de Juárez
7	<i>Mentha pulegium</i> (L.) Griseb	Menta Poleo	Lamiaceae	Ocotlán de Morelos
8	<i>Mentha spicata</i> Cantz.	Hierba Buena	Lamiaceae	Ocotlán de Morelos
9	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	Lamiaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
10	<i>Persea americana</i> Mill	Aguacatillo	Lauraceae	Santa María Huitepec
11	<i>Piper auritum</i> Kunth	Hierba Santa	Piperaceae	Villa de Zaachila
12	<i>Porophyllum tagetoides</i> (Kunth)	Pepicha	Asteraceae	San Antonino Castillo
13	<i>Pseudocalymma alliaceum</i> Sandwith	Bejuco de Ajo	Bignoniaceae	San Pedro Comitancillo
14	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	Lamiaceae	San Antonino Castillo
15	<i>Schinus molle</i> L.	Pirúl	Anacardiaceae	Santa Cruz Xoxocotlán
16	<i>Tagetes lucida</i> Cav.	Pericón	Asteraceae	Sta. Catarina Ixtepeji

Preparación de concentraciones de aplicación de hidrolatos y aceite esencial

De la solución almacenada de aceite esencial se tomaron 0.008 mL y se diluyó en 10 mL de agua destilada con polisorbato 20 al 0.01% que sirvió como emulsificante para la solución, obteniendo así la concentración de 0.08 % (800 ppm), posteriormente por dilución volumétrica en serie se elaboraron las concentraciones de 400, 200, 100, 50 y 25 ppm. Para preparar las concentraciones de aplicación del hidrolato se tomaron 2 mL del material almacenado y se diluyó en 10 mL de agua destilada para obtener la concentración al 20%, a partir de esta se elaboraron las concentraciones al 10, 5, 2.5 y 1.25%. Para determinar el efecto de mortalidad sobre larvas de 2do instar temprano se utilizaron concentraciones de 20 a 1.25% del hidrolato y de 800 a 50 ppm de los aceites, para larvas de 4to instar temprano se utilizaron concentraciones de 200 a 25 ppm de los aceites.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones, cada unidad experimental consistió en un vaso de plástico de 150 mL de capacidad el que contenía 99 mL de agua y 1 mL de cada tratamiento. Cada vaso contenida 20 larvas de segundo instar tardío. Se realizó el registro de estados de desarrollo

vivos y muertos diariamente hasta que el control presentara más de 98% de emergencia de adultos. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias Tukey ($p < 0.05$). No fue necesario aplicar corrección a los datos obtenidos debido a que el control no presentó mortalidad larval.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto biológico de la extracción con disolventes sobre mosquitos

En el cuadro 5 se muestra el potencial para el control de mosquitos con *A. farnesiana*, donde se puede observar que la extracción realizada con metanol presentó 64.58% mayor efectividad que lo alcanzado con la extracción etanólica a 10% de concentración, y así mismo para 1, 0.1 y 0.01%.

Cuadro 5. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Acacia farnesiana* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentración (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C ₂ H ₆ O)	10	0.00 a	20.00 a	38.75 a	41.25 c	0.00 b	41.25 c	0.00 a
	1	0.00 a	12.50 b	31.25 a	56.25 b	8.75 a	47.50 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	7.50 b	30.00 a	62.50 b	3.75 ab	58.75 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	7.50 b	32.50 a	60.00 b	3.75 ab	56.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 c	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH ₄ O)	10	0.00 a	8.75 a	60.00 a	31.25 cd	3.75 b	27.50 bc	0.00 a
	1	0.00 a	15.00 a	60.00 a	25.00 d	2.50 b	22.50 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	1.25 b	58.75 a	40.00 bc	11.25 a	28.75 bc	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 b	50.00 a	50.00 b	12.50 a	37.50 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Se reporta la capacidad antiinflamatoria y antimicrobiana de *A. farnesiana* (Bukhari et al. 2010; Rojas-Hernández et al. 2009), pero no su actividad sobre mosquitos por lo que en este trabajo se documenta por primera vez su potencial larvicida sobre *Cx. quinquefasciatus*.

Cuadro 6. Efectividad biológica (%) del extracto de metanol de hojas secas de *Argemone mexicana* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentración (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
10	10.00 a	2.50 a	20.00 a	67.50 b	11.25 a	56.25 c	0.00 a
1	2.50 b	5.00 a	15.00 ab	77.50 b	10.00 a	67.50 bc	0.00 a
0.1	2.50 b	3.75 a	15.00 ab	78.75 b	5.00 a	73.75 b	0.00 a
0.01	1.25 b	3.75 a	12.50 ab	82.50 b	11.25 a	71.25 bc	0.00 a
Control	0.00 b	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Elango et al. (2011) al evaluar extracto acetónico de hojas de *A. mexicana* encontraron 47 y 89% de mortalidad a las 24 y 48h respectivamente sobre larvas de cuarto instar de *Cx. quinquefasciatus* lo que no es congruente con los resultados obtenidos en el estudio (Cuadro 6). Sakthivadivel & Thilagavathy

(2003) observaron que la fracción de acetona del extracto de éter de petróleo de las semillas de *A. mexicana* mostraron actividad inhibidora del crecimiento y acción larvívica sobre larvas de segundo instar de *Aedes aegypti*. Se reporta actividad antiinflamatoria con extractos de hojas de *B. simaruba* (Noguera et al. 2009), pero al igual que *A. farnesiana* no se ha documentado su estudio sobre larvas de mosquitos (Cuadro 7). Junor et al. (2008) han realizado estudios de la composición química de *B. simaruba*, pero no se documentan trabajos de extractos o fracciones vegetales sobre algún género de mosquitos. Camporese et al. (2003) han evaluado la actividad antibacteriana de extractos de *B. simaruba* sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Cuadro 7. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Bursera simaruba* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C₂H₆O)	10	0.00 a	0.00 a	33.75 a	66.25 b	18.75 a	47.50 b	0.00 a
	1	0.00 a	0.00 a	32.50 a	67.50 b	3.75 ab	63.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	0.00 a	25.00 a	75.00 b	12.50 ab	62.50 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	3.75 a	18.75 ab	77.50 b	16.25 a	61.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	1.25 ab	15.00 a	32.50 a	51.25 c	11.25 ab	40.00 c	0.00 a
	1	1.25 ab	16.25 a	21.25 a	61.25 bc	11.25 ab	50.00 bc	0.00 a
	0.1	1.25 ab	11.25 a	18.75 ab	68.75 b	15.00 a	53.75 bc	0.00 a
	0.01	0.00 b	7.50 ab	16.25 ab	76.25 b	10.00 ab	66.25 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Cuadro 8. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Cestrum nocturnum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C₂H₆O)	10	0.00 a	87.50 a	1.25 c	11.25 d	1.25 b	10.00 d	0.00 a
	1	0.00 a	26.25 b	30.00 a	43.75 c	2.50 ab	41.25 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	15.00 c	16.25 b	68.75 b	6.25 ab	62.50 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	8.75 cd	18.75 ab	72.50 b	10.00 a	62.50 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 d	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	3.75 a	37.50 a	22.50 a	36.25 d	0.00 a	36.25 d	0.00 a
	1	0.00 a	32.50 ab	21.25 a	46.25 cd	3.75 a	42.50 cd	0.00 a
	0.1	0.00 a	22.50 bc	23.75 a	53.75 bc	6.25 a	47.50 bc	0.00 a
	0.01	0.00 a	13.75 c	23.75 a	62.50 b	8.75 a	53.75 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 d	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Jawale et al. (2010) destacan la actividad larvívica de extractos metanólicos a partir de hojas de *C. nocturnum*, logrando un 100% de mortalidad en 24h con concentraciones de 45 µgml⁻¹ y 25 µgml⁻¹. Se han aislado ocho glucósidos esteroidales de las hojas de *C. nocturnum* (Mimaki et al. 2002). Se ha evaluado la actividad larvívica de especies de *Cestrum*, donde han encontrado algunos compuestos bioactivos esteroidales responsables de la actividad mosquitocida (Ghosh & Chandra, 2006; Ghosh et al. 2008) (Cuadro 8).

Leyva et al. (2009) evaluaron aceite esencial de *C. ambrosioides* presentando alta actividad insecticida contra *Ae. aegypti*, determinando CL₅₀ de 0.0035 ppm. Masebo et al. (2009) registraron actividad larvícida del aceite esencial de *C. ambrosioides* determinando CL₅₀ de 17.5 y 9.1 ppm sobre *Anopheles arabiensis* y *Ae. aegypti* respectivamente. Sharma et al. (2006) evaluaron extractos de éter de petróleo, tetracloruro de carbono y metanol de *C. album* contra el vector de malaria *An. stephensi* observando actividad larvícida con los extractos de tetracloruro de carbono y éter de petróleo.

Cuadro 9. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Chenopodium ambrosioides* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H ₂ O)	10	0.00 a	0.00 a	26.25 a	73.75 b	17.50 a	56.25 b	0.00 a
	1	0.00 a	0.00 a	20.00 a	80.00 b	11.25 ab	68.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	0.00 a	15.00 a	85.00 b	17.50 a	67.50 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 a	15.00 a	85.00 b	18.75 a	66.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Etanol (C ₂ H ₆ O)	10	25.00 a	5.00 a	16.25 a	53.75 b	1.25 a	51.25 c	1.25 a
	1	0.00 b	0.00 a	10.00 ab	90.00 a	2.50 a	86.25 ab	1.25 a
	0.1	0.00 b	0.00 a	7.50 abc	92.50 a	8.75 a	81.25 b	2.50 a
	0.01	0.00 b	0.00 a	5.00 bc	95.00 a	7.50 a	87.50 ab	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH ₄ O)	10	40.00 a	5.00 a	15.00 a	40.00 c	1.25 ab	38.75 c	0.00 a
	1	5.00 b	3.75 a	16.25 a	75.00 b	8.75 a	66.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 c	1.25 a	18.75 a	80.00 b	6.25 ab	73.75 b	0.00 a
	0.01	0.00 c	2.50 a	16.25 a	81.25 b	8.75 a	72.50 b	0.00 a
	Control	0.00 c	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

C. engleriana es una especie vegetal que tiene antecedentes tóxicos (Aguilar-Ortigoza et al. 2003, Monroy-Ortíz & Castillo, 2000), pero no se han evaluado sus propiedades secundarias sobre artrópodos. Siendo el primer reporte los datos de este trabajo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efectividad biológica (%) del extracto de metanol de hojas secas de *Comocladia engleriana* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
10	2.50 a	1.25 a	41.25 a	55.00 b	8.75 a	46.25 b	0.00 a
1	0.00 a	5.00 a	32.50 ab	62.50 b	5.00 a	57.50 b	0.00 a
0.1	0.00 a	8.75 a	28.75 ab	62.50 b	6.25 a	56.25 b	0.00 a
0.01	0.00 a	6.25 a	21.25 b	72.50 b	11.25 a	61.25 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Olofintoye et al. (2011) evaluaron la raíz de *D. stramonium* mediante extracción acuosa, obteniendo mortalidades de 100 y 90% sobre larvas de *Culex* y *Anopheles* en las primeras 24h respectivamente. Pérez-Pacheco et al. (2004) investigó la susceptibilidad de larvas de *Cx. quinquefasciatus* utilizando

extractos acuosos de hojas, fruto y semillas de *D. stramonium* a concentraciones de 5 y 15% donde no observo efectividad biológica. Congruente a la baja efectividad encontrada en el estudio (Cuadro 11).

Se han realizado estudios del potencial de *E. globulus*, pero todas estas investigaciones evalúan aceites esenciales sobre larvas y adultos de géneros de mosquitos como *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Amer & Mehlhorn, 2006; Zhu et al. 2008; Cheng et al. 2009; Mandal, 2011), a excepción de Pérez-Pacheco et al. (2004) que reportan el uso de extractos acuosos de hojas de *E. globulus* pero sin resultados significativos, al igual que en la presente investigación con extracto acuoso y metanol (Cuadro 12).

Cuadro 11. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Datura stramonium* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Metanol (CH₄O)	10	0.00 a	2.50 a	27.50 a	70.00 b	7.50 ab	62.50 b	0.00 a
	1	0.00 a	7.50 a	25.00 a	67.50 b	13.75 a	53.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	6.25 a	30.00 a	63.75 b	2.50 b	61.25 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	8.75 a	12.50 ab	78.75 ab	8.75 ab	70.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Acetato de Etilo (C₄H₈O₂)	10	0.00 a	6.25 a	16.25 a	77.50 b	0.00 b	77.50 b	0.00 a
	1	3.75 a	5.00 a	13.75 a	77.50 b	6.25 ab	71.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	7.50 a	13.75 a	78.75 b	3.75 b	75.00 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	2.50 a	12.50 ab	85.00 ab	12.50 a	72.50 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Cuadro 12. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Eucalyptus globulus* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H₂O)	10	0.00 a	0.00 b	15.00 a	85.00 ab	17.50 a	67.50 b	0.00 a
	1	0.00 a	6.25 a	12.50 a	81.25 b	18.75 a	62.50 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	0.00 b	12.50 a	87.50 ab	12.50 ab	75.00 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	3.75 ab	16.25 a	80.00 b	13.75 ab	66.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 a	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Etanol (C₂H₆O)	10	12.50 a	15.00 a	40.00 a	32.50 c	1.25 b	31.25 c	0.00 a
	1	0.00 b	0.00 b	12.50 b	87.50 b	1.25 b	86.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 b	0.00 b	11.25 b	88.75 b	2.50 b	86.25 b	0.00 a
	0.01	0.00 b	0.00 b	2.50 c	97.50 a	15.00 a	82.50 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	72.50 a	27.50 a	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 d	0.00 a
	1	0.00 b	0.00 b	13.75 ab	86.25 b	7.50 a	78.75 bc	0.00 a
	0.1	0.00 b	1.25 b	16.25 a	82.50 b	8.75 a	73.75 c	0.00 a
	0.01	1.25 b	1.25 b	8.75 b	88.75 b	3.75 ab	85.00 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Cuadro 13. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Gliricidia sepium* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C₂H₆O)	10	6.25 a	63.75 a	8.75 b	21.25 d	0.00 a	21.25 c	0.00 a
	1	2.50 ab	38.75 b	26.25 a	32.50 cd	5.00 a	27.50 c	0.00 a
	0.1	0.00 b	25.00 b	30.00 a	45.00 c	7.50 a	37.50 bc	0.00 a
	0.01	0.00 b	2.50 c	36.25 a	61.25 b	7.50 a	53.75 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 c	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	0.00 a	23.75 a	35.00 a	41.25 b	0.00 b	41.25 c	0.00 a
	1	0.00 a	16.25 ab	35.00 a	48.75 b	12.50 a	36.25 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	20.00 a	37.50 a	42.50 b	5.00 ab	37.50 c	0.00 a
	0.01	0.00 a	17.50 ab	26.25 a	56.25 b	1.25 b	55.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Sharma et al. (1998) estudiaron las propiedades tóxicas de extractos etanólicos de hojas secas, hojas frescas, pecíolos secos y corteza del tallo de *G. sepium* sobre larvas de *An. stephansi*, *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Los resultados indican que todos los extractos evaluados son tóxicos para las tres especies, causando 100% mortalidad con dosis menores a 16000 ppm. Lo que no coincide con el porcentaje de efectividad encontrado en nuestro estudio (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Matricaria chamomilla* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H₂O)	10	0.00 a	0.00 a	41.25 a	58.75 c	15.00 a	43.75 c	0.00 a
	1	0.00 a	0.00 a	30.00 ab	70.00 bc	13.75 a	56.25 bc	0.00 a
	0.1	0.00 a	1.25 a	31.25 ab	67.50 bc	13.75 a	53.75 bc	0.00 a
	0.01	1.25 a	0.00 a	17.50 b	81.25 b	8.75 ab	72.50 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Etanol (C₂H₆O)	10	7.50 a	10.00 a	35.00 a	47.50 c	15.00 a	32.50 c	0.00 a
	1	0.00 a	1.25 b	8.75 b	90.00 ab	8.75 abc	80.00 b	1.25 a
	0.1	0.00 a	1.25 b	10.00 b	88.75 b	10.00 ab	77.50 b	1.25 a
	0.01	0.00 a	1.25 b	6.25 bc	92.50 ab	3.75 bc	86.25 b	2.50 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	8.75 a	35.00 a	46.25 a	10.00 c	2.50 a	7.50 c	0.00 a
	1	1.25 b	0.00 b	35.00 ab	63.75 b	3.75 a	58.75 b	1.25 a
	0.1	0.00 b	0.00 b	33.75 ab	66.25 b	1.25 a	65.00 b	0.00 a
	0.01	0.00 b	5.00 b	23.75 b	71.25 b	5.00 a	66.25 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

M. chamomilla es una especie vegetal aromática que se ha estudiado sobre artrópodos (Pérez et al. 2010), pero no se ha documentado su uso como una alternativa potencial en el control de mosquitos.

Cuadro 15. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Mentha spicata* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H₂O)	10	0.00 a	3.75 a	17.50 a	78.75 b	20.00 a	58.75 b	0.00 a
	1	0.00 a	0.00 b	15.00 a	85.00 b	16.25 a	68.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	0.00 b	16.25 a	83.75 b	20.00 a	63.75 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 b	15.00 a	85.00 b	16.25 a	68.75 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Etanol (C₂H₆O)	10	5.00 a	2.50 a	26.25 a	66.25 c	3.75 ab	62.50 b	0.00 a
	1	2.50 a	1.25 a	22.50 a	73.75 c	7.50 ab	65.00 b	1.25 a
	0.1	0.00 a	0.00 a	21.25 a	78.75 bc	17.50 a	61.25 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 a	6.25 b	93.75 ab	15.00 a	77.50 ab	1.25 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	13.75 a	8.75 a	15.00 a	62.50 c	21.25 a	41.25 c	0.00 a
	1	0.00 b	2.50 b	17.50 a	78.75 b	10.00 b	68.75 b	1.25 a
	0.1	0.00 b	3.75 ab	15.00 a	81.25 b	11.25 b	70.00 b	0.00 a
	0.01	1.25 b	1.25 b	12.50 a	85.00 b	8.75 b	76.25 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Existe poca información del uso de extractos de *M. spicata* para el control de mosquitos, las investigaciones se han realizado más que todo con aceites esenciales como el trabajo realizado por Ansari et al. (2000) que estudiaron el efecto de *M. piperita* obteniendo datos significativos de protección sobre *An. annularis* (100%), *An. culicifacies* (92%) and *Cx. quinquefasciatus* (84%). Yang et al. (2005) investigaron la acción adulticida del aceite de *M. piperita* contra *Cx. pipiens quinquefasciatus* observando un 97% de mortalidad a las 24h con bioensayos de fumigación.

Cuadro 16. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Momordica charantia* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Metanol (CH₄O)	10	23.75 a	58.75 a	17.50 a	0.00 c	3.75 b	0.00 c	0.00 a
	1	0.00 b	2.50 b	16.25 a	81.25 b	2.50 b	70.00 b	0.00 a
	0.1	1.25 b	0.00 b	17.50 a	81.25 b	1.25 b	77.50 b	0.00 a
	0.01	6.25 b	1.25 b	12.50 a	80.00 b	17.50 a	75.00 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Acetato de Etilo (C₄H₈O₂)	10	62.50 a	37.50 a	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 d	0.00 a
	1	3.75 b	0.00 b	30.00 a	66.25 bc	11.25 a	55.00 c	0.00 a
	0.1	3.75 b	5.00 b	28.75 a	62.50 b	5.00 ab	57.50 c	0.00 a
	0.01	0.00 b	3.75 b	7.50 ab	88.75 a	10.00 ab	78.75 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Maurya et al. (2009) evaluaron el potencial larvícida de extractos de la corteza del fruto de *M. charantia* sobre dos especies de mosquitos *An. stephensi* y *Cx. quinquefasciatus*. Entre los extractos probados, el extracto de éter de petróleo se encontró más eficaz con CL₅₀ = 27,60; 17.22 ppm y 41.36; 15.62 ppm que el de tetracloruro de carbono con CL₅₀ = 49.58; 16,15 ppm y 80.61; 27.64 ppm y metanol

con $CL_{50} = 142,82; 95,98 \text{ ppm y } 1,057.49; 579,93 \text{ ppm}$ para larvas de anofelinos y culícidos después de 24 y 48h respectivamente.

Rahuman & Venkatesan (2008) investigaron la actividad larvícida de extractos crudos de hojas de *M. charantia* con hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, acetona y metanol. La mortalidad la registraron 24h después de la aplicación identificando que el extracto metanólico fue el más efectivo con $CL_{50} = 199.14$ y 207.61 ppm sobre *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* respectivamente. Singh et al. (2006) estudiaron las propiedades larvicidas de *M. charantia* sobre larvas de *An. stephensi*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* determinando $CL_{50} = 66.05, 96.11$ y 122.45 ppm para cada especie de mosquito.

Pérez-Pacheco et al. (2004) evaluó extractos acuosos al 5 y 15% de *P. auritum* sin encontrar efectos significativos. Chaithong et al. (2006) evaluaron extractos etanólicos derivados de tres especies de Piperaceae contra larvas de *Ae. aegypti*, la mayor eficacia larvícida se estableció con *P. longum*, seguido por *P. sarmentosum* y *P. ribesoides*, con valores de CL_{50} de 2.23, 4.06 y 8.13 ppm, respectivamente. A su vez, observaron alteraciones morfológicas en las larvas tratadas revelando que la mayoría de los órganos, con excepción de las papilas anales, tenían una apariencia normal comparada con el control. Observaciones con microscopio de las estructuras internas de las papilas anales mostraron contracción, mientras que las características externas fueron normales en apariencia. Los estudios ultra estructurales, demostraron destrucción externa, con grandes daños y la cutícula encogida de las papilas anales. La deformación estructural de las papilas anales probablemente condujo a su disfunción, que puede estar intrínsecamente relacionado con la muerte de las larvas.

Cuadro 17. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Piper auritum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H ₂ O)	10	0.00 a	0.00 a	25.00 ab	75.00 bc	30.00 a	45.00 c	0.00 a
	1	0.00 a	3.75 a	13.75 b	82.50 b	16.25 a	66.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	3.75 a	15.00 b	81.25 b	20.00 a	61.25 bc	0.00 a
	0.01	0.00 a	1.25 a	31.25 a	67.50 c	21.25 a	46.25 c	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Etanol (C ₂ H ₆ O)	10	3.75 a	5.00 a	2.50 bc	88.75 b	3.75 bc	83.75 b	1.25 a
	1	2.50 a	3.75 a	5.00 ab	88.75 b	8.75 abc	76.25 bc	3.75 a
	0.1	2.50 a	5.00 a	6.25 ab	86.25 b	15.00 a	70.00 c	1.25 a
	0.01	0.00 a	0.00 b	7.50 a	92.50 b	12.50 ab	80.00 bc	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH ₄ O)	10	2.50 a	3.75 a	17.50 a	76.25 b	6.25 a	70.00 b	0.00 a
	1	1.25 a	2.50 a	21.25 a	75.00 b	8.75 a	66.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	1.25 a	18.75 a	80.00 b	6.25 a	72.50 b	1.25 a
	0.01	0.00 a	2.50 a	12.50 ab	85.00 b	3.75 a	77.50 b	3.75 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Cuadro 18. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Pluchea sagittalis* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C₂H₆O)	10	2.50 ab	0.00 a	20.00 a	61.25 bc	11.25 a	50.00 b	0.00 a
	1	6.25 a	2.50 a	18.75 a	57.50 c	1.25 bc	56.25 b	0.00 a
	0.1	0.00 b	1.25 a	23.75 a	62.50 bc	10.00 ab	52.50 b	0.00 a
	0.01	1.25 ab	0.00 a	17.50 a	76.25 b	10.00 ab	66.25 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	0.00 a	0.00 a	58.75 a	41.25 c	8.75 a	32.50 d	0.00 a
	1	2.50 a	2.50 a	53.75 ab	41.25 c	5.00 a	35.00 d	1.25 a
	0.1	0.00 a	1.25 a	46.25 bc	52.50 b	7.50 a	45.00 c	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 a	40.00 c	60.00 b	3.75 a	55.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 d	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Investigaciones acerca de la composición química de *P. sagittalis* han mostrado la presencia de eudesmano un tipo de sesquiterpeno (Guilhon & Müller, 1998; Mahmoud, 1997), así como monoterpenos, lignanos, triterpenos (Chakravarty & Mukhopadhyay, 1994) y flavonoides (Scholz et al. 1994), grupos químicos que se reportan como tóxicos sobre artrópodos, sin embargo, la bioactividad de los compuestos de esta especie vegetal se reporta poco, como lo es en el caso del estudio realizado por Faini et al. (1997) que publicaron actividad antialimentaria contra las larvas de *Spodoptera littoralis*.

Cuadro 19. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Agua (H₂O)	10	6.25 a	17.50 a	27.50 a	72.50 cd	31.25 a	41.25 c	0.00 a
	1	2.50 a	3.75 b	30.00 a	70.00 d	26.25 ab	43.75 c	0.00 a
	0.1	2.50 a	0.00 b	15.00 b	82.50 bc	12.50 bc	70.00 b	0.00 a
	0.01	1.25 a	5.00 ab	5.00 bc	92.50 ab	17.50 ab	75.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a
Etanol (C₂H₆O)	10	0.00 a	5.00 a	40.00 a	55.00 b	21.25 a	33.75 c	0.00 a
	1	0.00 a	2.50 a	38.75 a	58.75 b	0.00 b	58.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	10.00 a	25.00 a	65.00 b	1.25 b	63.75 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	6.25 a	26.25 a	67.50 b	2.50 b	65.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	0.00 a	0.00 a	88.75 a	11.25 d	1.25 a	10.00 d	0.00 a
	1	1.25 a	0.00 a	28.75 b	70.00 c	6.25 a	63.75 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	1.25 a	15.00 c	83.75 b	6.25 a	77.50 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	1.25 a	17.50 bc	81.25 bc	2.50 a	77.50 b	1.25 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 d	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Shrankhla et al. (2011) determinaron valores de CL₅₀ y CL₉₀ a las 24 y 48h de 2.49, 15.06 y 1.16, 8.45 ppm respectivamente, cuando evaluó el extracto hexánico de *P. alliaceum* sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Siendo este el único reporte existente del uso de esta especie vegetal con efecto larvívica.

Cuadro 20. Efectividad biológica (%) del extracto de metanol de hojas secas de *Rosmarinus officinalis* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
10	0.00 a	2.50 a	21.25 a	76.25 b	3.75 a	72.50 ab	0.00 a
1	0.00 a	7.50 a	22.50 a	70.00 b	7.50 a	62.50 b	0.00 a
0.1	0.00 a	8.75 a	12.50 ab	78.75 ab	7.50 a	71.25 ab	0.00 a
0.01	0.00 a	6.25 a	13.75 ab	80.00 ab	10.00 a	68.75 ab	1.25 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

No se reporta el uso de extractos de *R. officinalis* para el control de mosquitos vectores de enfermedades, pero si del aceite esencial sobre *Cx. tritaeniorhynchus* y *An. subpictus* con potencial larvídica de 98.2 y 97.6% a 250 y 125 ppm y CL₅₀ de 115.38 y 64.50 ppm respectivamente (Govindarajan, 2011).

Cuadro 21. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Schinus molle* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Etanol (C₂H₆O)	10	0.00 a	6.25 a	60.00 a	33.75 c	6.25 ab	26.25 b	1.25 a
	1	0.00 a	3.75 a	60.00 a	36.25 c	2.50 ab	33.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 a	1.25 a	51.25 a	47.50 b	11.25 a	36.25 b	0.00 a
	0.01	0.00 a	0.00 a	55.00 a	45.00 b	8.75 ab	36.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Metanol (CH₄O)	10	0.00 a	10.00 a	53.75 a	36.25 d	10.00 a	26.25 d	0.00 a
	1	0.00 a	6.25 a	47.50 ab	46.25 c	5.00 ab	41.25 c	0.00 a
	0.1	0.00 a	7.50 a	40.00 bc	52.50 c	5.00 ab	47.50 c	0.00 a
	0.01	0.00 a	1.25 b	32.50 c	66.25 b	5.00 ab	61.25 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 d	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Se reporta que los extractos de *S. molle* presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Quiroga et al. 2001; Schmourlo et al. 2005), así mismo se ha señalado que extractos acuosos y etanólicos de esta especie vegetal son tóxicos (Huerta et al. 2010), aseveración que se refleja en los resultados encontrados en este estudio.

Bioensayos con aceites esenciales sobre larvas de segundo y cuarto instar

En estudios recientes sobre el aceite de *A. triphylla* reportan como principales compuestos químicos geranial, neral, geraniol, bicilogermacreno y nerol (Rojas et al. 2010), atribuyéndole potencial de repelencia sobre mosquitos *A. aegypti* a la especie *Aloysia citriodora* en Argentina (Gillij et al. 2008).

Cuadro 22. Efectividad biológica (%) de extractos vegetales de hojas secas de *Tribulus terrestris* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Extracto	Concentracion (%)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
Metanol (CH₄O)	10	25.00 a	75.00 a	0.00 a	0.00 c	0.00 b	0.00 c	0.00 a
	1	27.50 a	56.25 a	12.50 a	3.75 c	0.00 b	3.75 c	0.00 a
	0.1	2.50 b	16.25 b	10.00 a	71.25 b	8.75 ab	62.50 b	0.00 a
	0.01	0.00 b	8.75 b	10.00 a	77.50 ab	11.25 a	70.00 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 b	0.00 a	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
Acetato de Etilo (C₄H₈O₂)	10	21.25 a	2.50 a	17.50 a	58.75 c	2.50 a	56.25 b	0.00 a
	1	1.25 b	1.25 a	15.00 a	82.50 ab	8.75 a	73.75 b	0.00 a
	0.1	0.00 b	3.75 a	12.50 a	83.75 ab	11.25 a	72.50 b	0.00 a
	0.01	2.50 b	2.50 a	16.25 a	78.75 bc	8.75 a	70.00 b	0.00 a
	Control	0.00 b	0.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Singh et al. (2008) evaluaron extractos acetónicos de hojas a 200 ppm y semillas a 100 ppm de *T. terrestris* sobre larvas de *An. culicifacies*, *An. stephensi*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*, obteniendo CL₅₀ de 117, 124, 168 y 185 y 100, 72, 91 y 91 ppm respectivamente.

Se ha reportado que extractos de *Bursera copallifera* y *Bursera grandifolia* tienen efecto bioinsecticida sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Singh et al. 2002). Todas las especies de *Bursera*, producen compuestos secundarios pertenecientes al grupo de los terpenos. *B. linaloe* contiene principalmente linalol y acetato de linalilo. El linalol ha demostrado actividad sobre especies de mosquitos *Ae. aegypti* (Lukwa et al. 2009) y *Cx. quinquefasciatus* (Tawatsin et al. 2001), resultados que no coinciden con la nula actividad de esta especie en esta investigación.

Cuadro 23. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Aloysia triphylla* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de segundo y cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	25.00 a	75.00 b	3.75 bc	71.25 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	25.00 a	73.75 b	8.75 ab	66.25 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	27.50 a	72.50 b	11.25 ab	60.00 b	1.25 a
100	0.00 a	0.00 a	23.75 a	76.25 b	10.00 ab	66.25 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	27.50 a	72.50 b	13.75 a	57.50 b	1.25 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	2.50 a	97.50 a	3.75 a	93.75 a	0.00 a
100	-	-	1.25 a	98.75 a	3.75 a	95.00 a	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	1.25 a	97.50 a	0.00 a
25	-	-	1.25 a	97.50 a	2.50 a	96.25 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Cuadro 24. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Bursera linanoe* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	0.00 a	100.00 a	1.25 a	98.75 a	0.00 a
100	-	-	0.00 a	100.00 a	1.25 a	98.75 a	0.00 a
50	-	-	0.00 a	100.00 a	1.25 a	98.75 a	0.00 a
25	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Bachir & Benali (2012) muestran que el aceite esencial de *E. globulus* posee actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Sen-Sung et al. (2009) comentan que el aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus urophylla* mostraron efectividad contra *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Así mismo, se ha mostrado la efectividad de *E. globulus* sobre pupas de moscas domesticas (Kumar et al. 2012; Abdel Halim & Morsy, 2005), sobre huevos y adutlos de hembras de *Pediculus humanus capitis* (Yang et al. 2004) y sobre larvas de *Ae. aegypti* (Lucia et al. 2007).

Cuadro 25. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Eucalyptus globulus* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de segundo y cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	48.75 a	51.25 b	6.25 a	42.50 b	2.50 a
400	0.00 a	0.00 a	43.75 a	56.25 b	6.25 a	50.00 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	43.75 a	56.25 b	6.25 a	50.00 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	36.25 a	62.50 b	10.00 a	53.75 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	37.50 a	62.50 b	8.75 a	53.75 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	0.00 b	100.00 a	1.25 a	98.75 ab	0.00 a
100	-	-	2.50 a	97.50 b	2.50 a	95.00 b	0.00 a
50	-	-	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
25	-	-	0.00 b	100.00 a	1.25 a	98.75 ab	0.00 a
Control	-	-	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Bagavan & Rahuman (2011) determinaron el potencial de *Syzygium aromaticum* (sinónimo *Eugenia caryophyllata*) contra *Anopheles vagus* al realizar la extracción con hexano a partir de hojas. Se ha reportado la actividad larvícida sobre *Ae. aegypti* y *An. darlingi* donde se muestra que las concentraciones letales fueron mas altas al evaluar extractos acuosos sobre *Ae. aegypti* que sobre *An. darlingi* (Medeiros et al. 2013). Yang et al. (2003) reportan el efecto ovicida y adulticida del aceite de *E. globulus* contra *Pediculus capitis*.

Cuadro 26. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Eugenia caryophyllata* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	11.25 a	88.75 a	6.25 ab	82.50 ab	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	10.00 a	90.00 a	7.50 ab	82.50 ab	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	8.75 a	91.25 a	3.75 ab	87.50 ab	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	11.25 a	88.75 a	12.50 a	76.25 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	12.50 a	87.50 a	5.00 ab	82.50 ab	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Las hojas de *L. cámara* son ricas en compuestos fenólicos (Costa et al. 2010). Los principales constituyentes del aceite esencial son el biciclogermacreno, isocariofileno, valenceno y D-germacreno (Sousa et al. 2010). Se demostró que esta especie muestra un efecto termiticida (Verma & Verma, 2006) e insecticida (Yadav & Tripathi, 2003). Contiene ingredientes bioactivos que causan actividad larvicida en mosquitos *Ae. aegypti* (Zoubiri & Baaliouamer, 2011) y repelente en *Culex quinquefasciatus* (Dua et al. 2010).

Cuadro 27. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Lantana cámara* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	1.25 a	98.75 a	3.75 a	95.00 a	0.00 a
100	-	-	0.00 a	98.75 a	3.75 a	96.25 a	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	3.75 a	96.25 a	0.00 a
25	-	-	0.00 a	98.75 a	2.50 a	96.25 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Se han identificado en el aceite esencial de *L. glaucescens* más de 45 compuestos pero principalmente constituyen a esta especie compuestos monoterpenicos tales como eucaliptol (1,8-Cineol), limoneno, terpinen-4-ol, α , β -pineno y linalol (Guzmán et al. 2012). Algunas especies como *Litsea cubeba* han demostrado 100% de repelencia de *Ae. aegypti*, *An. stephensi* y *Cx. quinquefasciatus*. (Amer & Mehlhorn, 2006).

Cuadro 28. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Litsea glaucescens* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	16.25 a	83.75 a	0.00 c	83.75 ab	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	13.75 a	86.25 a	7.50 ab	78.75 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	16.25 a	83.75 a	10.00 a	73.75 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	17.50 a	82.50 a	7.50 ab	75.00 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	16.25 a	83.75 a	3.75 bc	80.00 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Anees (2008) evaluó el extracto de acetona, cloroformo, acetato de etilo, hexano y metanol de hojas y flores de la especie *Ocimum sanctum* contra larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* determinando mayor efectividad con el extracto a partir de hojas para ambas especies de mosquito, sin embargo el aceite esencial de esta especie ha mostrado actividad contra *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, y *An. stephensi* (Pathak et al. 2000). Govindarajan et al. (2013) determino el potencial de *O. basilicum* contra *Cx. tritaeniorhynchus*, *Ae. albopictus* y *An. subpictus*.

Cuadro 29. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Ocimum basilicum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	8.75 a	31.25 a	60.00 b	2.50 ab	57.50 b	0.00 a
400	0.00 a	7.50 ab	26.25 a	66.25 b	8.75 a	57.50 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 b	30.00 a	70.00 b	7.50 a	62.50 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 b	27.50 a	72.50 b	6.25 ab	66.25 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 b	22.50 a	77.50 b	6.25 ab	68.75 b	2.50 a
Control	0.00 a	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Erhan et al. (2012) determinaron el potencial de *M. pulegium* sobre el crecimiento y desarrollo de *E. coli* y bacterias de ácido láctico. Algunas investigaciones reportan actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de esta planta (Mahboubi & Haghi, 2008; Sivropoulou et al. 1995). Brindando con esta información uno de los primeros reportes de actividad sobre larvas de mosquito.

Cuadro 30. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Mentha pulegium* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	20.00 a	80.00 b	0.00 a	80.00 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	15.00 ab	85.00 ab	1.25 a	83.75 ab	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	16.25 ab	83.75 ab	6.25 a	77.50 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	10.00 ab	90.00 ab	5.00 a	83.75 ab	1.25 a
50	0.00 a	0.00 a	11.25 ab	88.75 ab	6.25 a	82.50 ab	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Govindarajan et al. (2012) evaluaron la toxicidad del aceite esencial de hojas de *M. spicata* contra *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, y *An. stephensi* determinando el potencial de control contra larvas de tercer instar temprano con valores de CL₅₀ de 62.62, 56.08, y 49.71 ppm respectivamente.

Cuadro 31. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Mentha spicata* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de segundo y cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	40.00 a	60.00 b	8.75 ab	51.25 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	38.75 a	61.25 b	3.75 ab	57.50 b	0.00 a
200	0.00 a	2.50 a	41.25 a	56.25 b	11.25 ab	45.00 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	35.00 a	65.00 b	10.00 ab	53.75 b	1.25 a
50	0.00 a	0.00 a	41.25 a	58.75 b	12.50 a	45.00 b	1.25 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	0.00 a	100.00 a	7.50 a	92.50 a	0.00 a
100	-	-	2.50 a	97.50 a	5.00 a	92.50 a	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	6.25 a	92.50 a	0.00 a
25	-	-	0.00 a	97.50 a	6.25 a	93.75 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Torres et al. (2014) evaluaron el efecto de extractos de etanol y hexano de *P. americana* sobre tercer y cuarto instar de larvas de *Ae. aegypti* reportando efectividad con los dos tipos de extracciones. Resultados que se asemejan a los encontrados en este estudio.

Cuadro 32. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Persea americana* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de segundo y cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	1.25 a	45.00 a	53.75 b	8.75 ab	45.00 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	43.75 a	56.25 b	3.75 b	52.50 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	40.00 a	60.00 b	1.25 b	58.75 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	38.75 a	61.25 b	8.75 ab	52.50 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	36.25 a	63.75 b	16.25 a	47.50 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	1.25 a	98.75 a	1.25 a	97.50 a	0.00 a
100	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	0.00 a	98.75 a	0.00 a
25	-	-	1.25 a	98.75 a	0.00 a	98.75 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Los compuestos químicos mayoritarios que se han encontrado en *P. auritum* son safrol (94%) y miristicina (4.34%), que causan efecto insecticida en larvas *Ae. aegypti* de tercer instar (Leyva, et al. 2009). Especies de la India como *Piper longum*, *Piper betle*, *Piper peepuloides* y *Piper cubeba* han demostrado actividad insecticida contra mosquitos y moscas. Algunas especies como *Piper aequale*, *Piper hispidum*, *Piper reticulatum*, *Piper tuberculatum* y *Piper retrofractum* presentan actividad larvicida sobre mosquitos *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* (Chansang et al. 2005).

Cuadro 33. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Piper auritum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de segundo y cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	26.25 a	73.75 b	3.75 ab	70.00 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	32.50 a	67.50 b	12.50 a	53.75 b	1.25 a
200	0.00 a	0.00 a	21.25 a	78.75 b	7.50 ab	68.75 b	2.50 a
100	0.00 a	0.00 a	23.75 a	76.25 b	10.00 ab	63.75 b	2.50 a
50	0.00 a	0.00 a	18.75 a	81.25 b	10.00 ab	71.25 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200			0.00 a	98.75 a	1.25 a	97.50 a	0.00 a
100			0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
50			0.00 a	100.00 a	2.50 a	97.50 a	0.00 a
25			0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
Control			0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Existe poca información respecto a la composición química de *P. tagetoides*, pero se ha reportado que contiene una gran cantidad de polifenoles, aldehídos y terpenos tales como el nonanal, decanal en extracto etanólico; y trans-pineno, β -myrceno y D-limoneno en emulsión de aceite (Jiménez, 2012). El β -myrceno es un compuesto químico que se utiliza como repelentes de mosquitos (Pohlit et al. 2011). Se le atribuye actividad insecticida a otras especies del género *Porophyllum*, como *P. ruderale* y *P. gracile* sobre larvas de tercer instar de *Ostrinia nubilalis*, actividad repelente en *Melanoplus femurrubrum* (Guillet et al. 1998). Además de la actividad larvicida sobre *Ae. aegypti* (Fontes et al. 2012).

Cuadro 34. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Porophyllum tagetoides* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) a partir de cuarto instar.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	1.25 a	98.75 a	1.25 a	97.50 ab	0.00 a
100	-	-	1.25 a	98.75 a	1.25 a	97.50 ab	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	3.75 a	95.00 b	0.00 a
25	-	-	0.00 a	100.00 a	2.50 a	97.50 ab	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Los resultados de esta investigación coinciden con estudios previos, en los que se demuestra la actividad larvicida de extractos vegetales de *P. alliaceum* sobre *Cx. quinquefasciatus*, evidentemente esta especie vegetal es un fuente rica en productos naturales con potencial para el control de este culicido, pero indudablemente es necesario proseguir con estudios en los que se evalúe la toxicidad de esta especie en las dosis empleadas para determinar los riesgos a la salud humana antes que su uso se generalice. Shrankhla et al. (2011) determinaron concentraciones letales con valores de LC₅₀ y LC₉₀ a las 24 y 48 h post tratamiento de 2.49, 15.06 y 1.16, 8.45 ppm respectivamente, cuando evaluaron extracto hexánico de *P. alliaceum* sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*.

Cuadro 35. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	6.25 b	37.50 a	56.25 cd	3.75 ab	52.50 b	0.00 a
400	0.00 a	12.50 a	36.25 a	51.25 d	1.25 b	50.00 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 b	31.25 a	68.75 bcd	10.00 a	58.75 b	0.00 a
100	0.00 a	1.25 b	25.00 a	73.75 bc	6.25 ab	67.50 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 b	25.00 a	75.00 b	6.25 ab	66.25 b	2.50 a
Control	0.00 a	0.00 b	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	1.25 ab	98.75 ab	3.75 a	95.00 b	0.00 a
100	-	-	1.25 ab	100.00 a	1.25 ab	97.50 ab	0.00 a
50	-	-	3.75 a	96.25 b	1.25 ab	95.00 b	0.00 a
25	-	-	1.25 ab	98.75 ab	1.25 ab	97.50 ab	0.00 a
Control	-	-	0.00 b	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Ullah et al. (2013) determinaron actividad biológica de extracto etanólico de *R. officinalis* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*, similar a los datos obtenidos en este estudio. Así mismo se ha determinado su efectividad sobre *Tetranychus urticae* (Laborda et al. 2013) y se han elaborado estudios en los que se compara la toxicidad de preparados del aceite esencial de *R. officinalis* contra insecticidas sintéticos, en los que se han obtenido resultados favorables para el disminuir el uso de químicos para el control de vectores de enfermedades (Jing et al. 2013).

Cuadro 36. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Rosmarinus officinalis* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)*/Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	62.50 a	37.50 c	6.25 abc	31.25 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	57.50 ab	42.50 bc	2.50 bc	40.00 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	53.75 ab	46.25 bc	11.25 ab	35.00 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	50.00 ab	50.00 bc	5.00 abc	43.75 b	1.25 a
50	0.00 a	0.00 a	40.00 b	60.00 b	12.50 a	47.50 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Se ha realizado la caracterización del aceite esencial de hojas de *S. molle* determinando como compuesto mayoritarios mircenol, α -felandreno y limoneno (Huaman et al. 2004). Se ha reportado que el aceite de *S. molle* presenta acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mendonça et al. 2012).

Cuadro 37. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Schinus molle* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	41.25 a	58.75 b	8.75 a	50.00 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	41.25 a	58.75 b	8.75 a	50.00 b	0.00 a
200	0.00 a	0.00 a	37.50 a	62.50 b	10.00 a	51.25 b	1.25 a
100	0.00 a	0.00 a	32.50 a	63.75 b	6.25 a	61.25 b	0.00 a
50	0.00 a	0.00 a	36.25 a	67.50 b	3.75 a	60.00 b	0.00 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	1.25 a	98.75 a	2.50 ab	96.25 a	0.00 a
100	-	-	0.00 a	100.00 a	6.25 a	93.75 a	0.00 a
50	-	-	1.25 a	98.75 a	0.00 b	98.75 a	0.00 a
25	-	-	0.00 a	100.00 a	3.75 ab	96.25 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

La especie vegetal *T. lucida* contiene compuestos bioactivos como el timol (Isman, 2006) pineno, limoneno, cinerín, estragol y flavonoides glicosidos principalmente (Guadarrama et al. 2011). Se ha destacado por sus aplicaciones como plaguicida, nematicida (Hooks et al. 2010), antifúngico y antibacterial a nivel mundial y local (Espitia, 2011). Se le ha atribuido a la especie *Tagetes minuta* actividad repelente en *Culex quinquefasciatus* (Amer & Mehlhorn, 2006).

Cuadro 38. Efectividad biológica (%) del aceite esencial de hojas secas de *Tagetes lucida* sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
	II	III	IV	PF	PM	AF	AM
800	0.00 a	0.00 a	28.75 a	71.25 b	6.25 a	65.00 b	0.00 a
400	0.00 a	0.00 a	15.00 a	85.00 b	6.25 a	77.50 b	1.25 a
200	0.00 a	0.00 a	22.50 a	77.50 b	8.75 a	68.75 b	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a	23.75 a	76.25 b	5.00 a	70.00 b	1.25 a
50	0.00 a	0.00 a	16.25 a	83.75 b	3.75 a	78.75 b	1.25 a
Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
			IV	PF	PM	AF	AM
200	-	-	0.00 a	100.00 a	2.50 a	97.50 a	0.00 a
100	-	-	1.25 a	98.75 a	0.00 a	98.75 a	0.00 a
50	-	-	0.00 a	100.00 a	1.25 a	98.75 a	0.00 a
25	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a
Control	-	-	0.00 a	100.00 a	0.00 a	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo son estadísticamente diferentes (p<0.05). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Efectividad biológica de hidrolatos derivados de aceites esenciales

En el cuadro 39 se muestra la efectividad biológica de tres subproductos obtenidos de la hidrodestilación asistida por microondas de plantas aromáticas, esta sustancia es llamada hidrolato por permanecer en contacto directo con la recirculación del aceite en el agua.

Cuadro 39. Efectividad biológica (%) de hidrolatos de especies vegetales sobre las fases de desarrollo del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say)

Hidrolato	Concentracion (%)	Mortalidad (%)* /Fases de desarrollo						
		II	III	IV	PF	PM	AF	AM
<i>Eugenia caryophyllata</i>	20	0.00 a	3.75 a	55.00 a	41.25 c	3.75 ab	37.50 c	0.00 a
	10	0.00 a	2.50 ab	41.25 ab	56.25 bc	8.75 a	46.25 bc	1.25 a
	5	0.00 a	0.00 b	33.75 b	66.25 b	6.25 ab	60.00 b	0.00 a
	2.5	0.00 a	0.00 b	32.50 b	67.50 b	2.50 ab	65.00 b	0.00 a
	1.25	0.00 a	1.25 ab	31.25 b	66.25 b	7.50 ab	60.00 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a
<i>Ocimum basilicum</i>	20	0.00 a	1.25 a	47.50 a	51.25 a	6.25 abc	43.75 b	0.00 a
	10	0.00 a	0.00 a	50.00 a	48.75 a	10.00 a	40.00 b	0.00 a
	5	0.00 a	0.00 a	48.75 a	50.00 a	6.25 abc	43.75 b	0.00 a
	2.5	0.00 a	0.00 a	48.75 a	51.25 a	7.50 ab	43.75 b	0.00 a
	1.25	0.00 a	0.00 a	50.00 a	50.00 a	2.50 bc	47.50 b	0.00 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 b	100.00 b	0.00 c	100.00 a	0.00 a
<i>Piper auritum</i>	20	0.00 a	0.00 a	53.75 a	46.25 c	7.50 ab	38.75 c	0.00 a
	10	0.00 a	0.00 a	47.50 ab	52.50 bc	10.00 ab	42.50 c	0.00 a
	5	0.00 a	0.00 a	48.75 ab	51.25 bc	16.25 a	35.00 c	0.00 a
	2.5	0.00 a	0.00 a	40.00 ab	60.00 bc	6.25 ab	52.50 bc	1.25 a
	1.25	0.00 a	0.00 a	28.75 b	71.25 b	3.75 ab	66.25 b	1.25 a
	Control	0.00 a	0.00 a	0.00 c	100.00 a	0.00 b	100.00 a	0.00 a

*Media con letra distintas por fase de desarrollo y extracción son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). II: Segundo instar, III: Tercer instar, IV: Cuarto instar, PF: Pupas formadas, PM: Pupas muertas, AF: Adultos formados, AM: Adultos muertos

Se logra apreciar que existe mas del 50% de toxicidad con el hidrolato de *Eugenia caryophyllata* y *Piper auritum* y del 47.50% con el hidrolato de *Ocimum basilicum*.

CONCLUSIONES

1. Se demuestra el potencial larvícida de *Acacia farnesiana*, *Comocladia engleriana*, *Pluchea sagittalis* y *Schinus molle* cuando se extraen sus propiedades secundarias con metanol y el potencial de *Matricaria chamomilla* como extracto acuoso y de los extractos etanólicos de *Pseudocalymma alliaceum* y *Schinus molle* para ser considerados como alternativas de manejo y control en las estrategias de combate contra mosquitos.
2. En la aplicación de aceites esenciales sobre larvas del mosquito el mayor rango de toxicidad se logró observar con *Eucalyptus globulus*, *Mentha spicata*, *Persea americana*, *Rosmarinus officinalis* y *Schinus molle*, al igual que el subproducto adquirido de la hidrodestilación asistida por microondas de *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum basilicum* y *Piper auritum*.
3. El efecto ejercido sobre larvas del total de las plantas evaluadas demuestra que estas contienen elementos secundarios de diversos grupos químicos que pueden utilizarse como medidas de manejo y combate de este mosquito.
4. Se logra observar que aunque muchas larvas logran alcanzar el estado pupal muchas de estas no logran alcanzar la fase adulta, debido a la acción que ejercen los metabolitos secundarios sobre el crecimiento y desarrollo del insecto.

LITERATURA CITADA

- Abdel Halim, A.S., Morsy, T.A., 2005. The insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* oil on the development of *Musca domestica* third stage larvae. J. Egypt. Soc. Parasitol. 35 (2), 631-636.
- Aguilar-Ortigoza, C.J., Sosa V. and Aguilar-Ortigoza M. 2003. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. Economic Botany. 57(3): 354–364.
- Amer, A., Mehlhorn, H., 2006. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. Parasitology Research 99, 478-490.
- Anees, AM. 2008. Larvicidal activity of *Ocimum sanctum* Linn. (Labiatae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Parasitol Res. 103: 1451-1453.
- Ansari, M. A., P. Vasudevan, M. Tandon and R. K. Razdan. 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. Bioresour. Technol. 71: 267–271.
- Aragón, G. A., J. F. López-Olguín, A. M. Tapia R., V. G. Cilia L. y B. C. Pérez-Torres. 2002. Extractos vegetales una alternativa para el control de plagas del amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L. Memorias del VIII Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Control de Plagas. Colegio de Postgraduados. S.L.P., México. Pp. 52-62.
- Autran, E. S., I.A. Neves, C.S.B. da Silva, G.K.N. Santos, C.A.G. da Camara and D.M.A.F. Navarro. 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresource Technology. 100: 2284–2288.
- Bachir RG, Benali M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 739-742.
- Bagavan, A, Rahuman AA. 2011. Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 29-34.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essentials oils - A review. Food and Chemical Toxicology. 46(2): 446-475.
- Banko, P. C., R. E. Davies, J. D. Jacobi, and W. E. Banko. 2001. Conservation status and recovery strategies for endemic Hawaiian birds. Stud. Avian Biol. 22: 359-376.
- Bittner, M. and S. Schrickel. 2001. La Salud en Nuestras Manos, Gráfica Lamas, Concepción, Chile. 220 pp.
- Bukhari, IA, Khan, RA, Gilani, AH, Ahmed, S, Saeed, SA. 2010. Analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities of the methanolic extract of *Acacia modesta* leaves. Inflammopharmacol. 18:187-196.
- Camporese, A., M. J. Balick, R. Arvigo, R. G. Esposito, N. Morsellino, F. De Simone and A. Tubaro. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology. 87: 103-107.

- Cantrell, C. L., A. Ali, S. O. Duke and I. Khan. 2011. Identification of mosquito biting deterrent constituents from the Indian folk remedy plant *Jatropha curcas*. *J. Med. Entomol.* 48(4): 836-845.
- Cavalca, P. A. M., C. M. dos Santos, B. Reis and C. M. Bonato. 2011. Isothermic of *Culex* on the biological cycle of the mosquito *Culex* sp. *Int J High Dilution Res.* 10(36):259-262.
- Chaithong, U., W. Choochote, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, D. Chaiyasit, D. Champakaew, B. Tuetun and B. Pitasawat. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology* 31(1): 38-144.
- Chakravarty, A.K., Mukhopadhyay, S., 1994. New thiophene derivatives from *Pluchea indica*. *Indian Journal of Chemistry* 33, 978-980.
- Chandre, F., E. Darriet, M. Darder, A. Cuany, J. M. C. Doannio, N. Pasteur and E. Guillet. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*12: 359-366.
- Chansang, U., Zahiri, N.S., Bansiddhi, J., Boonruad, T., Thongsrirak, P., Mingmuang, J., Benjapong, N., Mulla, M.S., 2005. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum*). *Journal of Vector Ecology* 30(2): 195-200.
- Cheng, S., C. Huang, Y. Chen, J. Yu, W. Chen, S. Chang. 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresource Technology.* 100:452-456.
- Cherry, R. and R. Nagata. 2005. Development of resistance in southern chinch bugs (Hemiptera: Lygaeidae) to the insecticide bifenthrin. *Florida Entomol.* 88:219-221.
- Corbel, V., R. N'Guessan, C. Brengues, F. Chandre, L. Djogbenou, T. Martin, M. Akogbeto, J. M. Hougard and M. Rowland. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*101: 207-216.
- Coria, C., W. Almiron, G. Valladares, C. Carpinella, F. Ludueña, M. Defago and S. Palacios. 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology.* 99: 3066-3070.
- Costa, J.G.M., Rodrigues, F.F.G., Sousa, E.O., Junior, D.M.S., Campos, A.R., Coutinho, H.D.M., De Lioma, H.G., 2010. Composition and larvicidal activity of the essential oils of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. *Chemistry of Natural Compounds* 46, 313-15.
- Dipanwita, D. and C. Goutam. 2012. Mosquito larvicidal activity of *Rauvolfia serpentina* L. seeds against *Culex quinquefasciatus* Say. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 42-45.
- Dua, V.K., Pandey, A.C., Dash, A.P. 2010. Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. *Indian Journal of Medical Research* 131: 434-439.
- Elango, G., A. A. Rahuman, C. Kamaraj, A. Bagavan, A. A. Zahir. 2011. Screening for feeding deterrent activity of herbal extracts against the larvae of malaria vector *Anopheles subpictus* Grassi. *Parasitol Res* 109:715-726.

- Erhan, M.K., Bolukbasin, SC, Urusan, H. 2012. Biological activities of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) in broilers. *Livestock Science* 146: 189-192.
- Espitia, Y.C.R., 2011. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra *Tribolium castaneum* herbst (Coleóptera: Tenebrionidae). Tesis, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. p. 31-35.
- Faini, F., Labbe, C., Torres, R., Delle Monache, G., Delle Monache, F., Coll, J., 1997. Eudesmane derivatives from *Flourensia thurifera*: structure and biological activity. *Natural Products Letters* 11, 1 - 4.
- Fontes-Jr., R.U., Ramos, S.C., Serafini, R.M., Cavalcanti, H.S.C., Alves, B.P., Lima, M.G., Andrade, S.P.H., Bonjardim, R.L., Quinstar-Jr., J.L., Araujo, S.A.A., 2012. Evaluation of the lethality of *Porophyllum ruderale* essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *African Journal of Biotechnology* 11(13): 3169-3172.
- Ghosh, A. and G. Chandra. 2006. Biocontrol efficacy of *Cestrum diurnum* L. (Solanaceae: Solanales) against the larval forms of *Anopheles stephensi*. *Nat Prod Res.* 20: 371-379.
- Ghosh, A., N. Chowdhury and G. Chandra. 2008. Laboratory evaluation of phytosteroid compound of mature leaves of Day Jasmine (Solanaceae: Solanales) against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and nontarget organisms. *Parasitol Res.* 103: 271-77.
- Gillij, Y.G., Gleiser, R.M., Zygadlo, J.A., 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99, 2507-2515.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen and T. W. Scott. 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1385–1391.
- Govindarajan, M, Sivakumar, R., Rajeswary, M., Yogalakshmi, K. 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitol* 134: 7-11.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M., Yogalakshmi, K. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol Res.* 110: 2023-2032.
- Govindarajan, M., R. Sivakumar and M. Rajeswari. 2011. Larvicidal efficacy of *Cassia fistula* Linn leaf extract against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 295-298.
- Guadarrama, C.G., Alarcon, A.F.J., Lezama, V.R., Vazquez, P.G., Bonilla, J.H., 2011. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology* 120: 277-281.
- Guilhon, G.M.S.P., Müller, A.H., 1998. Eudesmane sesquiterpenoids from *Pluchea quitoc*. *Phytochemistry* 47: 227-229.

- Guillet, G., Belanger, A., Arnason, T.J., 1998. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *P. ruderale* (Asteraceae): Identification, localization and insecticidal synergism with α - Terthienyl. *Phytochemistry* 49(2): 423-429.
- Guzmán, G.S.L., Gómez, C.R., García, Z.J.C., Jiménez, P.N.C., Reyes, C.R., 2012. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology* 143: 673-679.
- Hooks, C.R.R., Wang, K.H., Ploeg, A., Mcsorley, R., 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* 46: 307-320.
- Huaman, Y., de la Cruz, O.A., Bosilcov, A., Batiu, I., 2004. Essential oil from *Schinus molle* L. from Peru. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 7: 223-227.
- Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azúa, F., Araya, J.E. 2010. Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protect.* 29: 1118-1123.
- Isman, M. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Jaenson, T.G., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K., 2006. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. *J. Med. Entomol.* 43: 113-119.
- Jawale, C., R. Kirdak and L. Dama. 2010. Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. *Bangladesh J Pharmacol.* 5: 39-40.
- Jiménez, M., Guzmán, A.P., Azuara, E., García, O., Mendoza, M.R., Beristain, C.I., 2012. Volatile Compounds and Antioxidative Activity of *Porophyllum tagetoides* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition* 67: 57-63.
- Jing Yu, Xiang-Yi Liu, Bin Yang, Jie Wang, Fu-Qiang Zhang, Zi-Liang Feng, Chen-Zhu Wang and Quan-Shui Fan. 2013. Larvicidal Activity Of Essential Extract Of *Rosmarinus officinalis* Against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(1):44-48.
- Junor, G. O., R. B. R. Porter and T. H. Yee. 2008. The Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves, Bark and Fruits of *Bursera simaruba* (L.) Sarg from Jamaica. *Journal of Essential Oil Research.* 20: 426-429.
- Kumar, P, Mishra, S, Malik, A, Satya, S. 2012. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica* 122: 212-218.
- Laborda, R., Manzano, I., Gamon, M., Gavidia, I., Perez-Bermudez, P., Boluda, R. 2013. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products* 48: 106-110.

- Leyva, M., M. C. Marquetti, J. E. Tacoronte, R. Scull, O. Tiomno, A. Mesa y D. Montada. 2009. Actividad larvícida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed.* 20:5-13.
- López-Olguín, J. F., A. Aragón G. y A. M. Tapia R. 2001. Manejo Integrado de Plagas. Contribución para una agricultura sostenible. En: Aragón, G.A., J.F. López-Olguín y A. Saldaña M. (Eds.). Fundamentos para una agricultura sostenible. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 129-153.
- Lucia, A., P. González A., E. Seccacini and S. Licastro, E. Zerba and H. Masuh. 2007. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(3):299-303.
- Lukwa, N., Per, M., Peter, F., Claus, B., 2009. *Lippia javanica* (Burm F) Spreng: Its general constituents and bioactivity on mosquitoes. *Tropical biomedicine* (26): 85-91.
- Mahboubi, M., Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 119: 325-327.
- Mahmoud, A., 1997. 7-Epi-eudesmanes, eudesmanoic acids, eudesmanolides and other sesquiterpenes from *Pluchea dioscoridis*. *Phytochemistry* 45: 1633-1688.
- Mandal, S. 2011. Repellent activity of *Eucalyptus* and *Azadirachta indica* seed oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* S109-S112.
- Marotti M., R. Piccaglia, B. Biavati and I. Marotti. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research.* 16: 440-444.
- Massebo, F., M. Tadesse, T. Bekele, M. Balkew and T. Gebre-Michael. 2009. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology.* 8(17): 4183-4188.
- Maurya, P., P. Sharma, L. Mohan, L. Batabyal and C. N. Srivastava. 2009. Evaluation of larvicidal nature of fleshy fruit wall of *Momordica charantia* Linn. (Family: Cucurbitaceae) in the management of mosquitoes. *Parasitol Res.* 105:1653-1659.
- Mendonça R.P., Rodilla, J.M., Díez, D., Elder, H., Guala, M.S., Silva, L.A., Pombo, E.B. 2012. Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*17: 12023-12036.
- Medeiros, ES, Rodrigues, IB, Litaiff-Abreu, E, Pinto ACS, Tadei WP. 2013. Larvicidal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) extracts and eugenol against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi*. *African Journal of Biotechnology.* 12(8): 836-840.
- Mimaki, Y., K. Wantanabe, H. Sakagami and Y. Sashida. 2002. Steroidal glycosides from the leaves of *Cestrum nocturnum*. *J Nat Prod.* 65: 1863-68.

- Monroy-Ortíz, C. and E. P. Castillo. 2000. Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos, UAEM, México, Chapter 2.
- Mulla, M. S. and T. Su. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J American Mosquito Control Association* 15: 133-152.
- Nishimura, H., 2001. Aroma constituents in plants and their repellent activities against mosquitoes. *Aroma Research* 2: 257-267.
- Noguera, B, Diaz, E, Garcia, MV, San Feliciano, A, López-Perez, JL, Israel, A. 2009. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92: 129-133.
- Olofintoye, L. K., I. A. Simon-Oke and O. B. Omoregie. 2011. Larvicidal Properties of *Datura stramonium* (Jimson Weed) and *Nicotiana tabacum* (Tobacco) extracts against the larvae of (*Anopheles* and *Culex*) mosquitoes. *African Research Review. An International Multi-Disciplinary Journal, Ethiopia.* 5(2):337-344.
- Pathak N, Mittal PK, Singh OP, Sagar V, Vasudevan P (2000) Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). *Int Pest Cont* 42:53.
- Peng, Z., A. N. Beckett, R. J. Engler, D. R. Hoffman, N. L. Ott and F. E. R. Simons. 2004. Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 1189-1194.
- Pérez, S. G., M. A. Ramos-López, M. A. Zavala-Sánchez and N. C. Cárdenas-Ortega. 2010. Activity of essential oils as a biorational alternative to control coleopteran insects in stored grains. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(25): 2827-2835.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. y G. Ramírez V. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana.* 20: 141-152.
- Pohlit, M.A., Peporine, L.N., Antonaci G.R., Pedro T.W., Ferreira De Andrade, N.V. 2011. Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils - A Review. *Planta Medica* 77: 598-617.
- Prajapati, V., A .K. Tripathi, K. K. Aggarwal and S. P. S. Khanuja. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology* 96: 1749-1757.
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 74: 89-96.

- Rahuman A. A., A. Bagavan, C. Kamaraj, E. Saravanan, A. A. Zahir and G. Elango. 2009. Efficacy of larvicidal botanical extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 104: 1365-1372.
- Rahuman, A. A. and P. Venkatesan. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. Parasitol Res. 103:133-139.
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am J Pub Health. 4:243-251.
- Rodríguez, H. C. y D. Nieto A. 1997. Anonáceas con propiedades insecticidas. In: Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). A. Reboucas São Jose, I. Vilas Boas S., O. Magalhaes M. e T. N. Hojo R. (Eds). Bahía, Brasil. Pp.229-239.
- Rojas, B.L., Velasco, J., Díaz, T., Otaiza, G.R., Carmona, J., Usubillaga, A. 2010. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urarios. BLACPMA 9: 56-62.
- Rojas-Hernández NM, Avellaneda-Saucedo S, Cuéllar-Cuéllar, A, Romeu-Álvarez B, Lugo-Moya D. 2009. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, V 2009.
- Sakthivadivel M and D. Thilagavathy. 2003. Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L seed. Bioresour Technol. 89(2):213-216.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S. 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. J. Ethnopharmacol. 96: 563-568.
- Scholz, E., Heinrich, M., Hunkler, D., 1994. Caffeoilquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. Planta Medica 60: 360-364.
- Sen-Sung C, Chin-Gi H, Ying-Ju C, Jane-Jane Y, Wei-June C, Shang-Tzen C. 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. Bioresource Technology 100: 452-456.
- Sharma, N., J. S. Qadry, B. Subramaniam, T. Verghese, S. J. Rahman, S. K. Sharma and S. Jalees. 1998. Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Pharmaceutical Biology, 36(1): 3-7.
- Sharma, P., L. Mohan and C. N. Srivastava. 2006. Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. Bioresource Technology. 97(14): 1599-1604.
- Shrankhla, Bhan, S., Sharma, P., Mohan, L. and Srivastava, C. N. 2012. Relative larvicidal potential of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Liston). J. Europ. Mosq. Contr. Assoc. European Mosquito Bulletin 30: 83-90.

- Shrankhla, P. Sharma, L. Mohan and C. N. Srivastava. 2011. Larvicidal activity of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against *Culex quinquefasciatus* (Say). Entomological Research. 41(6): 216-220.
- Silva G., A. Lagunes and J. C. Rodríguez 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio. Ciencia e Investigación Agraria 30: 153-160.
- Singh, G.; Kapoor, I.P.; Pander, S.S.K.; Singh, U.K. 2002. "Studies on essential oils. Part 10; Antibacterial activity of volatile oils of some spices". Phytotherapy Research 16, 680-682.
- Singh, R. K., R. C. Dhiman and P. K. Mittal. 2006. Mosquito larvicidal properties of *Momordica charantia* Linn (Family: Cucurbitaceae). Journal of Vector Borne Disease. 43: 88-91.
- Singh, S. P., K. Raghavendra, R. K. Singh, S. S. Mohanty, A. P. Dash. 2008. Evaluation of *Tribulus terrestris* Linn (Zygophyllaceae) acetone extract for larvicidal and repellence activity against mosquito vectors. J Commun Dis. 40(4): 255-61.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. J. Agric. Food Chem. 43, 2384-2388.
- Sousa, E.O., Silva, N.F., Rodrigues, F.F.G., Campos, A.R., Lima S.G., Costa, J.G.M., 2010. Chemical composition and resistance modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* Linn. Pharmacognosy Magazine 6, 79-82.
- Sukumar, K., Perich, M.J., Boobar, L.R., 1991. Botanical derivatives in mosquito control: A review. J. Am. Mosq. Contr. Assoc. 7: 210-237.
- Sutherland, J., P. Baharally V. and D. Permaul. 2002. Use of the botanical insecticide, neem to control the small rice stinkbug *Oebalus poecilus* (Dallas, 1985) (Hemiptera: Pentatomidae) in Guayana. Entomotropica. 17:96-101.
- Svoboda, K. and R. Greenaway. 2003. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. International Journal of Aromatherapy. 13(4): 196-202.
- Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R.R., Thavara, U., Techadamrongsin, Y. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. Journal of Vector Ecology 26: 76-82.
- Torres, R.C., Garbo, A.G., Walde, R.Z.M.L. 2014. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. Asian Pac J Trop Biomed. 4(12): 960-964.
- Trongtokit, Y., Rrongsriyam, Y., Komalamisra, N., Apiwathnasorn, C.H., 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother. Res. 19: 303-309.
- Ullah, S., Ibrar, M., Barkatullah, Muhammad, N., Roohullah. 2013. Pharmacognostic, larvicidal and phytotoxic profile of *Coleus forskohlii* and *Rosmarinus officinalis*. J. Pharmacognosy Phytother. 5(4): 59-63.

- Verma, R.K., Verma, S.K., 2006. Phytochemical and termiticidal study of *Lantana camara* var. *aculeata* leaves. *Fitoterapia* 77: 466-468.
- Warikoo, R., A. Ray, J. K. Sandhu, R. Samal, N. Wahab and S. Kumar. 2012. Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 152-155.
- World Health Organization. 2009. "Weekly epidemiological record," WHO, vol. 84, pp. 437-444.
- Wrigley, S. K., M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal and N. Nicholson. 2000. Biodiversity—new leads for the pharmaceutical and agrochemical industries. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- Yadav, S.B., Tripathi, V. 2003. A new triterpenoid from *Lantana camara*. *Fitoterapia* 74: 320-321.
- Yang Y.C., Lee S.H., Lee W.J., Choi D.H., Ahn Y.J. 2003. Ovicidal and Adulticidal Effects of *Eugenia caryophyllata* Bud and Leaf Oil Compounds on *Pediculus capitis*. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 4884-4888.
- Yang, P., Y. Ma and S. Zheng. 2005. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J. Pestic. Sci.* 30: 84-89.
- Yang, Y.C., Choi, H.C., Choi, W.S., Clark, J.M., Ahn, Y.J. 2004. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Agric. Food Chem.* 52, 2507-2511.
- Zhu, J., X. Zeng, M. O'neal, G. Schultz, B. Tucker, J. Coats, L. Bartholomay and R. Xue. 2008. Mosquito larvicidal activity of botanical-based mosquito repellents. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 24(1):161-168.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A., 2011. GC and GC/MS analyses of the Algerian *Lantana camara* leaf essential oil: effect against *Sitophilus granarius* adults. *Journal Saudi Chemical Society*. 16(3): 291-297.

CAPÍTULO 2

Inhibición del crecimiento y desarrollo de larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) tratados con derivados de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae)¹

Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with derived from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae)

RESUMEN

Los volátiles del aceite esencial de *Pseudocalymma alliaceum* fueron analizados por microextracción de la fase sólida (SPME) a través de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS). El aceite esencial, el hidrolato resultante de la hidrodestilación asistida con microondas y el extracto vegetal acuoso, etanólico y metanólico fueron evaluados para determinar el efecto insecticida sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Los compuestos más abundantes fueron disulfuro de dialilo (50.05%), sulfuro de dialilo (11.77%), trisulfuro de 2-propenilo (10.37%) y 1-Octen-3-ol (4.89%). El aceite esencial aplicado a 800 ppm mostró actividad larvívica a las 24h con valores letales LC₅₀ y LC₉₀ de 267.33 y 493.63 ppm respectivamente. A las 48h la concentración de 400 ppm ocasionó más del 92% de mortalidad con LC₅₀ y LC₉₀ de 201.90 y 385.29 ppm. El hidrolato a concentraciones de 20 y 10% sobre larvas de 2do estadio presentó 100% de efectividad a las 24 h con LC₅₀ y LC₉₀ de 5.01 y 8.25% respectivamente. Las concentraciones de 40 y 20% sobre larvas de 4to instar provocaron 100% de efectividad a las 24 h y 72h, estimando valores LC₅₀ y LC₉₀ de 10.20 y 15.60 y de 7.51 y 11.47% para cada día. Los extractos vegetales inhiben el crecimiento del mosquito, el extracto acuoso al 10 % presentó 0.58 de índice relativo de crecimiento (IRC), con el extracto metanólico y etanólico se obtuvo 0.76 y 0.70 en comparación con el testigo sin aplicación que presentó 0.99. Las larvas tratadas con 10% del extracto de metanol, etanol y agua registraron una reducción en la duración larval de 5.0, 2.2 y 4.35 días respectivamente. Las larvas tratadas con extracto etanólico al 1 % presentan una disminución en el desarrollo de 2.40 días y exhibieron una prolongación de 3.30 días cuando se trató con 0.01%. El extracto acuoso prolonga en 0.85 y 2.45 días la duración larval al emplear concentraciones al 0.1 y 0.01 % y la reduce en 1.18 días al ser tratadas con 1.0 %. El polisorbato 20 utilizado como emulsificante prolonga en 0.87 días el desarrollo larval sin significancia estadística al ser comparado con el testigo sin aplicación. Resultados similares se obtuvieron en la duración pupal al aplicar tratamientos al 10 % reduciendo en 6.15, 3.42 y 5.57 días el desarrollo con extracto acuoso, etanólico y metanólico respectivamente y al ser comparado con el testigo que registro 19.17 días. Las pupas tratadas con concentraciones de 0.01% del extracto de etanol y agua presentaron una prolongación en la durabilidad de 3.73 y 2.33 días respectivamente.

Palabras claves: *Pseudocalymma*, Inhibición de crecimiento, extractos, aceite esencial, hidrolato.

¹Artículo publicado en la revista *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2014) 594-601 (JCR)

ABSTRACT

The volatile from the essential oil of *Pseudocalymma alliaceum* were analyzed by solid phase microextraction using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The essential oil, the hydrolat resulting from the hydrodistillation assisted with microwave and ethanolic, methanolic and aqueous plant extract were evaluated to determine the insecticide effect on larvae of *Cx. quinquefasciatus*. The most abundant compounds were *diallyl disulfide* (50.05%), *diallyl sulfide* (11.77%), *trisulfidedi-2-propenyl* (10.37%) and *1-Octen-3-ol* (4.89%). Essential oil applied at 800 ppm showed larvicidal activity at 24 h with lethal values of LC₅₀ and LC₉₀ of 267.33 and 493.63 ppm respectively. At 48 h the concentration of 400 ppm caused over 92 % mortality with LC₅₀ and LC₉₀ of 201.90 and 385.29 ppm. The hydrolat at concentrations of 20 and 10% applied on 2nd stage larvae showed 100% effectiveness at 24 h with LC₅₀ and LC₉₀ of 5.01 and 8.25 % respectively. The concentrations of 40 and 20% showed 100% effectiveness on 4th instar larvae at 24 h and 72 h, estimating values of LC₅₀ and LC₉₀ of 10.20, 15.60, 7.51 and 11.47 % for each day. Plant extracts inhibit the growth of mosquitoes, the aqueous extract at 10% had 0.58 relative growth index, with the ethanolic and methanolic extract was obtained 0.76 and 0.70 compared to the untreated application filed 0.99. Larvae treated with 10% of methanol extract, ethanol and water showed a reduction in larval duration of 5.0, 2.2 and 4.35 days, respectively. Larvae treated with 1% of ethanol extract showed a decrease in the development of 2.40 days and exhibited a prolongation of 3.30 days when treated with 0.01%. The aqueous extract prolongs 0.85 and 2.45 days in larval duration when using concentrations at 0.1 and 0.01%. Also it showed a 1.18 days reduction when treated with 1.0%. Polysorbate 20 used as an emulsifier prolonged in 0.87 days larval development without statistical significance when compared with the untreated application. Similar results were obtained at the pupal duration when applying treatments at 10% reduced in 6.15, 3.42 and 5.57 days development with aqueous extract, ethanol and methanol, respectively, when was compared with the control that registered 19.17 days. The pupae treated with concentrations of 0.01% of ethanol and aqueous extract showed a prolongation in the durability of 3.73 and 2.33 days, respectively.

Keywords: *Pseudocalymma*, *Culex*, Inhibición de crecimiento, extractos, aceite esencial, hidrolato.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son vectores y agentes causales de enfermedades que afectan significativamente a millones de personas a nivel mundial (WHO, 2010). *Culex* (Diptera: Culicidae) es un género que está presente en regiones tropicales y subtropicales. Algunas especies de este género, como *Culex quinquefasciatus* (Say) son transmisores de *Wuchereria bancrofti* un nematodo parásito, causante de la parasitosis humana llamada filariasis linfática (Cavalca et al. 2011), de *Plasmodium relictum* Grassi & Feletti que provoca malaria aviar y mixomatosis (Banko et al. 2001; Goddard et al. 2002). La filariasis

es un problema mundial de salud pública, 120 millones de personas están actualmente infectadas por enfermedades transmitidas por mosquitos y alrededor de 1,3 billones se encuentran en riesgo de infección (WHO, 2009). La forma tradicional de controlar este culícido ha sido con insecticidas sintéticos y debido al empleo irracional que se les ha dado, ha provocado el surgimiento de resistencia a las alternativas utilizadas (Rawlins, 1998; Cherry & Nagata, 2005), así como la contaminación del agua, aire y suelo, acumulación de residuos tóxicos e intoxicación de usuarios (Aragón et al. 2002). *Cx. quinquefasciatus* es resistente a una amplia gama de insecticidas (Chandre et al. 1998; Corbel et al. 2007), lo que limita la elección de los productos químicos que pueden ser utilizados para su control. Estas consecuencias han contribuido a la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente, entre los que se encuentran extractos de especies vegetales y aceites esenciales de uso etnofarmacológico y etnobotánico (Mulla & Su, 1999).

Pseudocalymma alliaceum (Lam.) Sandwith (Bignoniaceae) conocida con los sinónimos *Adenocalymma alliaceum* Miers., *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry, *Bignonia alliacea* Lam., *Pachyptera alliacea* (Lam.) A. H. Gentry y *Pachyptera hymenaea* (DC.) es una enredadera leñosa conocida comúnmente como “bejuco de ajo” en la región del Istmo, Oaxaca, México; cuando sus hojas son trituradas liberan un fuerte aroma similar a los dientes de ajo. La familia Bignoniaceae incluye alrededor de 120 géneros y 800 especies, creciendo principalmente en África, América Central y del Sur. Las hojas y flores son ampliamente consumidas y utilizadas en medicina tradicional por las poblaciones de Sudamérica, entre los que se encuentran Brasil y Perú (Zoghbi et al. 1984). Las propiedades que se le atribuyen son analgésicas, antiartríticas, antiinflamatorias, antipiréticas, antirreumáticas, depurativas, purgantes y vermífugas (Hasrat et al. 1997; Taylor, 2005, Dugasani et al. 2009), las hojas secas se utilizan para el tratamiento de resfriados, neumonía, infección de garganta y desordenes respiratorios (Naik, 1998), náusea y constipación (Berg, 1993). Con base a lo anterior el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la actividad biológica del extracto acuoso, etanólico y metanólico, el efecto tóxico del aceite esencial e hidrolato de *P. alliaceum* sobre larvas de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, y a su vez determinar los compuestos químicos presentes en los volátiles del aceite esencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de huevos de mosquitos y cuidado de larvas

Las balsas de huevos fueron recolectadas en agua estancada en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-OAX) localizado en Santa Cruz Xoxocotlán; Oaxaca, México (17°01'41.08" N, 96°43'19.35" O), las balsas se trasladaron al laboratorio y se colocaron individualmente en bandejas de plástico de 47 x 35 x 12 cm que contenía 300 mL de agua suavizada para que cumplieran con su desarrollo. Las larvas del mosquito fueron alimentadas con un producto pulverizado para peces Atilapia-1 hasta que alcanzaran la fase pupal.

Cuidado de pupas y adultos del mosquito

Las pupas formadas se transfirieron a recipientes de 30 x 20 x 6 cm y se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos fueron provistos con una solución azucarada al 10 % en un frasco con una mecha de algodón y semanalmente se introducía una gallina inmovilizada por una noche como material hematofágico para las hembras. La cría se mantuvo a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 60 – 70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Se siguió el método establecido por Rauman et al. (2008).

Obtención del material vegetal

Se recolectaron hojas frescas de *P. alliaceum* en el Municipio de San Pedro Comitancillo ($16^{\circ}29'20.67''$ N, $95^{\circ}09'15.70''$ O), de la Región Istmo del estado de Oaxaca, México. Se seleccionó *P. alliaceum* por el uso etnofarmacológico y estudio etnobotánico empleado en otros trabajos, por presentar un característico aroma, sabor amargo y resistencia a los daños ocasionados por insectos plaga en la zona de colecta. La identificación taxonómica fue realizada por el curador del Herbario del CIIDIR-OAX y se depositó un ejemplar de muestra en el laboratorio de investigación para futuras consultas. La planta se lavó con agua de grifo, se colocó sobre papel periódico en sombra para su secado durante 16 - 20 días, luego se pulverizó con ayuda de un molino mecánico para obtener un polvo que fue posteriormente hidratado (Govindarajan et al. 2011; Pérez-Pacheco et al. 2004).

Obtención de hidrolato y aceite esencial

El aceite esencial (AE) se obtuvo sometiendo 500 g de material vegetal seco a hidrodestilación asistida con microondas durante 3 h. Se utilizó un microondas con salida de frecuencia de 2450 MHz. La capa de AE se separó de la fase acuosa utilizando un embudo de separación. El aceite esencial resultante se secó aplicando sulfato de sodio anhidro y se almacenó en botellas color ámbar a 4°C hasta ser utilizado. El hidrolato impregnado con las moléculas aromáticas de la planta se almacenó para ser evaluado en los bioensayos.

Análisis cromatográfico e identificación de compuestos volátiles

La identificación de compuestos volátiles se realizó mediante microextracción de la fase sólida (SPME) en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México; el dispositivo de SPME para el muestreo manual fue obtenido por Agilent Technologies (USA). Se utilizaron fibras recubiertas con polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm . Las fibras se acondicionaron antes de su uso por calentamiento en el puerto de inyección del cromatógrafo realizando una corrida completa en el sistema. Siempre que fue necesario la etapa de acondicionamiento se repitió para la limpieza de la fibra. Para realizar el

contacto de los volátiles con la fibra se utilizaron frascos esterilizados sellados color ámbar de 5 mL de capacidad, se depositó 4 μL del aceite esencial en los frascos y se mantuvo la fibra en el interior por 4 min; posteriormente se realizó la inserción de la aguja del dispositivo en el puerto de inyección del sistema cromatográfico. El análisis se llevó a cabo en un sistema HP 6890 – 5973 GC – MS. Los compuestos se separaron en una columna capilar HP-5MS. La temperatura del horno fue programada de 40 a 250 °C en intervalos crecientes de 10 °C min^{-1} con 21 min de duración total de la corrida. Los porcentajes relativos de los compuestos del aceite esencial fueron obtenidos usando helio como gas acarreador con flujo de 1.0 mL min^{-1} . Los compuestos fueron identificados por el tiempo de retención del GC y la biblioteca de espectros de masas NIST 02; se realizó una comparación de los espectros con los almacenados en la librería Wiley 275 GC/MS y NIST 11.0.

Concentraciones de aplicación de aceite esencial e hidrolato

De la solución almacenada de aceite esencial se tomaron 0.008 mL y se diluyó en 10 mL de agua destilada con polisorbato 20 al 0.01% que sirvió como emulsificante para la solución, obteniendo así la concentración de 0.08% (800 ppm), posteriormente por dilución volumétrica en serie se elaboraron las concentraciones de 400, 200, 100, 50 y 25 ppm que se utilizaron para el bioensayo de mortalidad sobre larvas de 4to instar temprano del mosquito. Para preparar las concentraciones de aplicación del hidrolato se tomaron 4 mL del material almacenado y se diluyó en 10 mL de agua destilada para obtener la concentración al 40%, a partir de esta se elaboraron las concentraciones al 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.65%. Para determinar el efecto de mortalidad sobre larvas de 2do instar temprano se utilizaron concentraciones de 20 a 0.65%, y para larvas de 4to instar se utilizaron concentraciones de 40 a 1.25%.

Preparación de extractos crudos

Se agregaron 100 g de planta molida en 300 mL de disolvente contenidos en un matraz y se dejó reposar por 24h para la extracción acuosa y 72h para los disolventes de menor polaridad, se separó el sólido del líquido utilizando papel filtro y el remanente se descartó; se eliminó el disolvente a presión reducida en un rota evaporador, obteniendo el extracto crudo para cada disolvente. Se almacenó el extracto crudo en frascos color ámbar a 8°C. Del extracto crudo se tomó 1 g y diluyó en 10 mL de agua destilada con polisorbato 20 al 0.01%, posteriormente se centrifugó por 10 min y se filtró utilizando tela tricot para evitar grumos, obteniendo el tratamiento al 10% y a través de dilución volumétrica en serie se elaboraron los tratamientos 1, 0.1 y 0.01% para el bioensayo de inhibición de crecimiento.

Bioensayos de acción larvívica

El efecto de mortalidad sobre larvas de segundo y cuarto instar temprano de *Cx. quinquefasciatus* se determinó durante tres días consecutivos post aplicación de los tratamientos, siguiendo la metodología

de Pérez-Pacheco et al. 2004 y Rawani et al. 2009. Para el establecimiento del bioensayo se seleccionaron grupos de 20 larvas colocándolas en un vaso de plástico con 99 ml de agua destilada y 1 mL de los tratamientos. Se consideró larva muerta aquella que no presentaba movimientos normales en comparación con el testigo y al ser perturbada con un pincel en el sifón o en la región cervical. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones.

Inhibición de crecimiento

Se utilizaron larvas de segundo instar temprano. La unidad experimental consistió en un vaso de plástico de 125 mL de capacidad con 99 mL de agua destilada y 20 larvas. Cada unidad experimental recibió 1 mL de las concentraciones empleadas con cuatro repeticiones. Se evaluaron concentraciones al 10, 1, 0.1 y 0.01%. Cada bioensayo incluyó un testigo con polisorbato 20 al 0.01% y uno sin aplicación de tratamiento.

Cuando en el testigo sin aplicación se formó entre el 90 – 93% de pupas, se contabilizó el número de larvas y pupas vivas y muertas en cada estadio y el número de adultos emergidos. Se consideró adulto muerto aquellos que quedaron atrapados en la exuvia pupal y larva y pupa muerta las que no presentaron movimientos normales al ser perturbadas con una aguja de disección; utilizando la metodología empleada por Martínez-Tomas et al. (2009). Con la información recabada se cuantificó el índice de inhibición de crecimiento (IIC) utilizando la fórmula de Zhang et al. (1993).

$$IIC = \frac{\sum_1^4(\text{No. de insectos vivos} * \text{fase insecto}) + \sum_1^4[\text{No. de insectos muertos} * (\text{fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} * \text{total de fases del insecto})}$$

Donde 1, 2, 3 y 4 que corresponden al 2do, 3ro, 4to instar y pupa del insecto formado respectivamente. El número de insectos utilizados por concentración fue de 80, el número total de estadios del insecto fueron cuatro (tres larvas y una pupa). El índice de crecimiento relativo (ICR) se determinó por $ICR = IIC \text{ de tratamiento} / IIC \text{ del testigo sin aplicación}$.

Viabilidad y durabilidad larval y pupal

Con las larvas y pupas sobrevivientes se continuó registrando datos para obtener la duración y viabilidad larval y pupal, donde la duración larval es el número de días transcurridos desde que la larva se sometió al tratamiento hasta que termino su fase y la duración pupal desde que se formó la pupa hasta la emergencia de adulto. La viabilidad larval y pupal se registró en porcentaje, considerando la población inicial y final de cada fase biológica.

Análisis estadístico

Los bioensayos se establecieron bajo un diseño experimental completamente aleatorizado. Se realizó un análisis Probit para estimar los valores LC₅₀ y LC₉₀ y un análisis de varianza y comparación de medias con el programa SAS 9.0 (SAS Inc., 2008). Resultados menores a $p < 0.01$ se consideraron significativamente diferentes.

RESULTADOS

Identificación de compuestos volátiles

La hidrodestilación asistida con microondas de 500 g de hojas secas pulverizadas de *P. alliaceum* en 1000 mL de agua, dio como resultado un aceite café oscuro con un fuerte aroma a ajo con un rendimiento de 0.44%. Los compuestos volátiles determinados se muestran en el Cuadro 1. Se identificaron 26 compuestos por comparación de los espectros de masas de cada compuesto con los datos reportados en la librería Wiley 275 GC/MS y NIST 11 representando un 99.98%. Los compuestos más abundantes fueron disulfuro de dialilo (50.05%), sulfuro de dialilo (11.77%), trisulfuro de 2-propenilo (10.37%) y 1-Octen-3-ol (4.89%). El resto de los compuestos se encontraron entre 2.27 y 0.21%.

Acción larvícida

El Cuadro 2 muestra los resultados de susceptibilidad de larvas de cuarto instar de *Cx. quinquefasciatus* al aceite esencial de *P. alliaceum*; se evaluaron concentraciones de 25 a 800 ppm, mostrando a las 24h post tratamiento valores letales LC₅₀ y LC₉₀ de 267.33 y 493.63 ppm respectivamente. Se observó efecto tóxico sobre las larvas tratadas con las concentraciones de 800 a 100 ppm, la concentración de 800 ppm presentó más del 80 % de efectividad antes del primer día de registro, ocasionando un 100% de mortalidad a las 24h. A las 48h la concentración de 400 ppm ocasionó más del 92% de mortalidad con LC₅₀ y LC₉₀ de 201.90 y 385.29 ppm respectivamente. Al tercer día de registro la concentración de 200 ppm mostró más de 50 % de efectividad.

Se evaluó el subproducto obtenido de la hidrodestilación de *P. alliaceum*, se evaluaron dosis de 20 a 0.65% sobre larvas de segundo instar (Cuadro 3) y de 40 a 1.25% sobre cuarto instar (Cuadro 4). Concentraciones de 20 y 10 % sobre larvas de segundo estadio presentaron 100% de efectividad a las 24h post tratamiento. El tratamiento aplicado al 5% de concentración presentó más del 50% de toxicidad al tercer día de registro; estimando para el primer día concentraciones letales LC₅₀ y LC₉₀ de 5.01 y 8.25 % respectivamente. En la evaluación sobre larvas de cuarto instar temprano se obtuvo nula formación de pupas con concentraciones al 40 y 20%, registrando 100% de mortalidad a las 24 y 72h respectivamente. La concentración al 5% disminuye su efectividad sobre larvas de cuarto instar en un 22.5% comparada con las de segundo estadio. Se estimó concentraciones letales para larvas de cuarto instar con valores LC₅₀ y LC₉₀ para las 24 y 72h de 10.20 y 15.60 y de 7.51 y 11.47% respectivamente.

Cuadro 1. Composición química de los volátiles extraídos de hojas secas de *P. alliaceum*.

#	Tiempo de Retención	Compuesto	Composición (%)
1	3	2-Butenal, 2-methyl-	0.66
2	4.32	1,5-Cyclooctadiene, 3,4-dimethyl	1.42
3	4.54	Diallyl sulfide	11.77
4	5.39	Catecholborane	1.89
5	6.11	3-Chloropropionic acid, 2-phenylet	1.71
6	6.41	1-Octen-3-ol	4.89
7	6.54	1-Ethynylcyclopentanol	0.56
8	6.63	3-Octanol	2.27
9	7.11	Pyridine, 5-ethyl-2-methyl-	0.99
10	7.29	1,3-Dithiolane, 2,2-dimethyl-	1.22
11	7.60	γ -Terpinene	0.62
12	8.29	Diallyl disulphide	50.05
13	8.39	Crotonic acid, 4-mercapto-3-(methy	1.46
14	8.45	1-Oxa-4,6-diazacyclooctane-5-thione	2.01
15	8.98	(Methylthio)-acetonitrile	1.14
16	9.74	Thiophene, 2,4-dimethyl-	1.80
17	9.96	Hydrazinecarbodithioic acid, 1-met	0.35
18	10.10	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	1.35
19	10.78	Isobutyl isothiocyanate	0.29
20	11.14	Safrole	0.44
21	11.39	Trisulfide, di-2-propenyl	10.37
22	12.38	5,6-Diamino-1,3-dimethyluracil	0.41
23	14.52	Tetrasulfide, di-2-propenyl	1.52
24	17.01	5-Ethylthiazole	0.31
25	17.30	2-Mercapto-4,5-dimethylthiazole	0.21
26	17.64	Propanedioic acid, methyl-, bis(trimethylsilyl) ester	0.27
Total (%)			99.98

Inhibición de crecimiento

Los extractos vegetales inhiben el crecimiento larval de *Cx quinquefasciatus* con las concentraciones empleadas, cuando se aplicó el tratamiento al 10% el extracto acuoso presentó 0.58 de índice relativo de crecimiento (IRC), con el extracto metanólico y etanólico se obtuvo 0.76 y 0.70 respectivamente; el testigo sin aplicación registró 0.99 de IRC. Los tratamientos a concentraciones de 1, 0.1 y 0.01% mostraron una reducción en el crecimiento de larvas comparado con el testigo (Cuadro 5). Al formarse entre el 90 y 93% de pupas en el testigo sin aplicación se contabilizó el número de larvas y pupas muertas y vivas; las larvas de *Cx. quinquefasciatus* fueron más susceptibles al extracto acuoso y etanólico que al metanólico. En el Cuadro 5 se observa la significancia existente entre las concentraciones empleadas. El extracto acuoso de hojas secas de *P. alliaceum* registró un 73.75% de mortalidad y el extracto metanólico 46.25% al emplear concentraciones al 10%. En cambio el extracto etanólico al 1% presentó mayor efectividad biológica con un 46.25% en comparación con el extracto acuoso con 35% y el extracto elaborado con metanol con 37.5%. Todas las concentraciones y extractos vegetales empleados presentaron efecto tóxico.

Cuadro 2. Actividad larvívica por tres días consecutivos del aceite esencial de *P. alliaceum* sobre larvas de 4to instar de *Culex quinquefasciatus*.

Concentracion (ppm)	Mortalidad (%)		
	24 h	48 h	72 h
800	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
400	73.75±13.14 b	92.50±8.66 b	100.00±0.00 a
200	35.00±4.08 c	43.75±4.78 c	58.75±12.50 b
100	0.00±0.00 d	11.25±2.50 d	28.75±4.78 c
50	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	5.00±0.00 d
25	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
Polysorbate 20	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
Control	0.00±0.00 d	0.00±0.00 e	0.00±0.00 d
LC ₅₀	267.33	201.90	146.69
(LCL-UCL)	(243.08 - 293.89)	(183.17 - 222.73)	(132.12 - 163.10)
LC ₉₀	493.63	385.29	312.22
(LCL-UCL)	(434.04 - 586.04)	(337.29 - 458.72)	(269.61 - 377.43)

*Datos con letras distintas por columna son significativamente diferentes P<0.01. LC: Concentración letal; LCL: Limite fiduciales mínimo; ULC: Limite fiducial máximo.

Cuadro 3. Actividad larvívica por tres días consecutivos del hidrolato de *P. alliaceum* sobre larvas de 2do instar de *Culex quinquefasciatus*.

Concentracion (%)	Mortalidad (%)		
	24 h	48 h	72h
20	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
10	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
5.0	38.75±7.50 b	47.50±6.45 b	50.00±7.07 b
2.5	6.25±2.50 c	6.25±2.50 c	6.25±2.50 c
1.25	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d
0.65	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d
Control	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d

*Datos con letras distintas por columna son significativamente diferentes P<0.01.

Cuadro 4. Actividad larvívica por tres días consecutivos y porcentaje de pupas formadas de larvas de 4to instar de *Culex quinquefasciatus* tratadas con hidrolato de *P. alliaceum*.

Concentracion (%)	Mortalidad (%)			(%) Pupas Formadas
	24 h	48 h	72h	
40	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	-
20	96.25±4.78 a	98.75±2.50 a	100.00±0.00 a	-
10	52.5±10.40 b	68.75±8.53 b	80.00±7.07 b	5.00
5.0	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	11.25±2.50 c	38.75
2.5	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	52.50
1.25	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	53.75
Control	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 d	43.75
LC ₅₀	10.20	9.05	7.51	
(LCL-UCL)	(9.41 - 11.05)	(8.37 - 9.71)	(6.94 - 8.13)	-
LC ₉₀	15.60	12.77	11.47	
(LCL-UCL)	(14.08 - 18.03)	(11.68 - 14.61)	(10.35 - 13.21)	-

*Datos con letras distintas por columna son significativamente diferentes P<0.01.

Viabilidad y durabilidad larval y pupal

La viabilidad de larvas de segundo instar larval del mosquito tratado con 10 % de extracto acuoso presentó una reducción en la formación de larvas de 28.75% lo que representa una disminución del 30 % con lo registrado por el testigo sin aplicación que presentó 96.25%. En el estudio, a medida que disminuye la concentración de tratamientos se incrementa la viabilidad larval para los tres extractos evaluados, el extracto etanólico y metanólico presentaron 48.75 y 56.25% de formación larval al emplear concentraciones al 10%. La viabilidad en el estado pupal presentó significancia estadística al emplear

extracto etanólico al 10 % con 14.10% de formación del mosquito. El testigo sin aplicación mostró una duración larval de 16.25 días. Las larvas tratadas con 10% del extracto de metanol, etanol y agua registraron una reducción en la duración larval de 5.0, 2.2 y 4.35 días respectivamente. El extracto metanólico a concentraciones de 1.0 a 0.01% no exhibe reducción significativa en la duración larval. Las larvas tratadas con extracto etanólico al 1 % presentan una disminución en el desarrollo de 2.40 días y existe una prolongación de 3.30 días cuando se trató con 0.01%. El extracto acuoso prolonga en 0.85y 2.47 días la duración larval al emplear concentraciones al 0.1 y 0.01% respectivamente y la reduce en 1.18 días al ser tratadas con 1.0%. El polisorbato 20 utilizado como emulsificante prolonga en 0.87 días el desarrollo larval sin significancia estadística al ser comparado con el testigo sin aplicación. Resultados similares se obtuvieron en la duración pupal al aplicar tratamientos al 10 % reduciendo en 6.15, 3.42 y 5.57 días el desarrollo del culícido al ser tratadas con extracto acuoso, etanólico y metanólico respectivamente. El testigo registró 19.17 días de duración pupal. Las pupas tratadas con extracto de etanol y agua presentaron una prolongación en la durabilidad de 3.73 y 2.33 días al ser tratadas con la concentración de 0.01% respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 5. Porcentaje de larvas y pupas muertas e inhibición relativo de crecimiento (IRC) de larvas de 2do instar de *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos de *P. alliaceum*.

Tratamiento	Concentración (%)	Mortalidad (%) por instar					IRC
		2do	3ro	4to	Pupa	Total	
Metanol	10.0	5.00	6.25	32.50	2.50	46.25 a	0.76±0.03 c
	1.0	3.75	5.00	25.00	3.75	37.5 ab	0.83±0.07 bc
	0.1	5.00	7.50	23.75	2.50	38.75 ab	0.79±0.06 bc
	0.01	1.25	6.25	18.75	8.75	35.00 b	0.85±0.08 b
	Polisorbato 20	0.00	0.00	1.25	1.25	2.50 c	1.02±0.00 a
Etanol	Control	0.00	0.00	1.25	2.50	3.75 c	0.99±0.04 a
	10.0	0.00	5.00	46.25	21.25	72.50 a	0.70±0.08 b
	1.0	1.25	5.00	40.00	0.00	46.25 b	0.77±0.05 b
	0.1	1.25	20.00	21.25	0.00	42.50 b	0.73±0.16 b
	0.01	1.25	8.75	30.00	0.00	40.00 b	0.76±0.11 b
Acuoso	Polisorbato 20	0.00	0.00	1.25	1.25	2.50 c	1.02±0.00 a
	Control	0.00	0.00	1.25	2.50	3.75 c	0.99±0.04 a
	10.0	10.00	18.75	42.50	2.50	73.75 a	0.58±0.07 c
	1.0	2.50	3.75	25.00	3.75	35.00 c	0.83±0.10 b
	0.1	2.50	2.50	22.50	2.50	30.00 c	0.87±0.04 b
Acuoso	0.01	1.25	3.75	28.75	16.25	50.00 b	0.79±0.07 b
	Polisorbato 20	0.00	0.00	1.25	1.25	2.50 d	1.02±0.00 a
	Control	0.00	0.00	1.25	2.50	3.75 d	0.99±0.04 a

*Datos con letras distintas por tratamiento son significativamente diferentes $P < 0.01$.

DISCUSIÓN

Los extractos crudos y aceites esenciales de especies vegetales presentan una compleja diversidad de elementos químicos, estos metabolitos secundarios se han utilizado durante mucho tiempo de forma empírica en el control de vectores y agentes causales de enfermedades. Nuestros resultados coinciden con estudios previos con solventes no polares, en los que se demuestra la actividad larvicida de extractos vegetales de *P. alliaceum* sobre *Cx. quinquefasciatus*, evidentemente esta especie vegetal es un fuente

rica en productos naturales con potencial para el control de este culicido, pero es necesario proseguir con estudios en los que se evalúe la toxicidad de esta especie para determinar los riesgos a la salud humana antes que su uso se generalice. Se demostró que el aceite esencial extraído de hojas secas d *P. alliaceum* puede ser un larvicida natural de *Cx. quinquefasciatus* y se sabe que los aceites esenciales son una fuente rica de productos insecticidas (Gbolade et al. 2000; Adebayo et al. 1999). Se estimó la CL₅₀ del aceite esencial a las 24h post tratamiento siendo 267.33 ppm (243.08 - 293.89) el valor medio para el control de larvas de cuarto instar. Se evidenció la efectividad del subproducto obtenido de la extracción del aceite esencial de *P. alliaceum*, al emplear concentraciones de 20 y 10% sobre larvas de segundo instar y sobre larvas de cuarto instar al ser tratadas con el hidrolato al 40% presentando 100% de efectividad biológica; esto nos permite considerar que los elementos químicos efectivos del aceite esencial se encuentran en el subproducto y que este puede emplearse como alternativa para el control de este díptero.

Cuadro 6. Duración y formación larval y pupal y mortalidad total de larvas de *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos vegetales de *P. alliaceum*.

Tratamiento	Concentración (%)	Larval (Larva a pupa)		Pupal (Pupa a adulto)	
		Formed (%)	Duration (d)	Formed (%)	Duration (d)
Metanol	10	56.25 c	11.25 b	23.30 a	13.02 b
	1	66.25 bc	16.65 a	23.58 a	18.77 a
	0.1	63.75 bc	15.77 a	24.02 a	17.75 a
	0.01	73.75 b	15.20 a	21.61 a	17.15 ab
	Polisorbato 20	96.25 a	17.12 a	24.68 a	20.10 a
Etanol	Control	96.25 a	16.25 a	23.05 a	19.17 a
	10	48.75 b	14.05 b	14.10 b	15.75 b
	1	51.25 b	13.85 b	25.00 a	15.52 b
	0.1	53.75 b	15.92 ab	24.42 a	17.97 ab
	0.01	58.75 b	19.55 a	24.47 a	22.90 a
Acuoso	Polisorbato 20	96.25 a	17.12 ab	24.68 a	20.10 ab
	Control	96.25 a	16.25 ab	23.05 ab	19.17 ab
	10	28.75 c	11.90 c	22.82 a	13.60 c
	1	68.75 b	15.07 b	23.63 a	17.05 bc
	0.1	72.50 b	17.10 ab	24.13 a	19.70 ab
Acuoso	0.01	66.25 b	18.72 a	18.86 a	21.50 a
	Polisorbato 20	96.25 a	17.12 ab	24.68 a	20.10 ab
	Control	96.25 a	16.25 ab	23.05 a	19.17 ab

*Datos con letras distintas por tratamiento son significativamente diferentes P<0.01.

La prolongación en la duración larval al aplicar extracto etanólico y acuoso de *P. alliaceum* demuestra el efecto sobre el desarrollo normal del insecto, efectos similares fueron reportados por Sagar & Sehgal (1997) al utilizar extracto acetónico de *Azadirachta indica* sobre larvas y pupas de mosquitos *Cx. pipiens* y *Aedes aegypti* y, Singh (1996) utilizó extracto metanólico de semillas de neem donde pudo observar prolongación en el estadio larval de *Cx. quinquefasciatus*. Ndung'u et al. (2004) observaron después de la exposición de larvas de *Anopheles gambiae* Giles a extractos de corteza de raíz de cinco Meliáceas efectos de inhibición del crecimiento interesantes.

El efecto regulador de crecimiento sobre insectos se atribuye a compuestos que imitan la hormona juvenil en artrópodos (Mulla, 1991) retrasando o prolongando su desarrollo o causando mal formaciones

que llevan a la muerte del mismo. En el presente trabajo se hace evidente el efecto larvicida de extractos polares como el agua y el etanol, aunque existen reportes de efectividad con extractos menos polares como los de Shrankhla et al. (2011) en el que determinaron concentraciones letales con valores de LC₅₀ y LC₉₀ a las 24 y 48h post tratamiento de 2.49, 15.06 y 1.16, 8.45 ppm respectivamente, cuando evaluaron el extracto hexánico de *P. alliaceum* sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus* y LC₅₀ de 8.7 ppm sobre lavas de *Anopheles stephensi* (Liston) (Shrankhla et al. 2012). En el desarrollo experimental del estudio se pudo apreciar que el aceite esencial y el extracto metanólico de *P. alliaceum* causan una coloración café oscura en el abdomen de las larvas tratadas, semejante a una necrosidad que ocasiona la muerte del insecto y adultos quedaban atrapados en la exuvia de la pupa. Tabassum et al. (1993) observaron que extractos de plantas afectan la morfología de larvas de *Cx. quinquefasciatus* provocando pigmentaciones y alteraciones en el abdomen y cabeza. Murty et al. (1997) reportan que adultos de *Cx. quinquefasciatus* emergen de las pupas con deformaciones quedando atrapados en la cubierta exterior de la misma; del mismo modo han reportado inhibición de la emergencia de adultos al ser tratados con el extracto de hojas de *Polyalthia longifolia* Sonn.

Sin embargo, el estudio de efectividad del aceite esencial e hidrolatos de *P. alliaceum*, así como el efecto de extractos vegetales polares sobre el crecimiento y desarrollo de larvas de este mosquito no ha sido totalmente investigado. En la literatura consultada no se encontró antecedentes del efecto inhibitorio de crecimiento de extractos vegetales y acción larvicida del aceite esencial e hidrolato de *P. alliaceum* presentados en los resultados de esta investigación por lo que representan el primer reporte de este tipo sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus*. Se reporta prolongación larval con la exposición de las larvas de *A. stephensi* a dosis sub-letales de neem (Su & Mulla, 1999; Murugan et al. 1996). Shaalan et al. (2005) comentan que metabolitos secundarios de muchas especies vegetales muestran efectos sobre el crecimiento y desarrollo en diversas etapas biológicas de mosquitos; ocasionando un amplio rango de efectos como retrasos y prolongaciones del desarrollo larval y pupal, inhibición de muda, anomalías morfológicas y mortalidad; especialmente durante el proceso de muda y melanización.

La composición química de esta especie vegetal ha sido estudiada por Verma et al. (2012) en la que analizaron los compuestos volátiles de hojas de *P. alliaceum* a través de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) determinando como compuestos mayoritarios disulfuro de dialilo (65.9%) y trisulfuro de dialilo (29.6%), compuestos organosulfurados derivados de allicina que le brindan el aroma característico a ajo. Rao et al. (1999) al analizar el aceite esencial de hojas de *P. alliaceum* a través GC-MS determinaron la presencia de trisulfuro de dialilo (44%), disulfuro de dialilo (37%) 1-octen-3-ol (5%) y tetrasulfuro de dialilo (4%). Compuestos volátiles identificados en este estudio a través de SPME. El fuerte aroma a ajo que emana de las hojas de *P. alliaceum* es debido a naftaquinonas derivadas del lapachol y de compuestos secundarios como el disulfuro de alilo, aliína, alicina o sulfuro de dialilo entre

los más representativos, algunas naftaquinonas pueden resultar citotóxicas lo que explica las propiedades insecticidas de estos compuestos (Thomson, 1971; Itokawa et al. 1992; Tang, 2007; Martin et al. 2007).

das Graças et al. (2009) mencionan la presencia de polisulfuros de alilo en el aceite esencial de esta especie. Itokawa et al. (1992) informan que al utilizar extracto metanólico de tallo observaron actividad citotóxica contra células del cáncer de colon. Rugkeart et al. (2005) reportan actividad antioxidante y antimicrobiana con extracto de éter de petróleo y etanol. Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn (2009) documentan que sulfuro de dialilo fue capaz de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas de origen alimentario.

En conclusión, los resultados obtenidos contribuyen en conocer el efecto insectistático y elementos químicos de *P. alliaceum*, los resultados del análisis químico denotan como constituyentes mayoritarios del aceite esencial de hojas secas a disulfuro de dialilo (50.05%) y sulfuro de dialilo (11.77%). Se demostró por primera vez la actividad larvicida del aceite esencial e hidrolatos de *P. alliaceum* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*; los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de hojas inhiben el crecimiento y desarrollo normal del insecto prolongando y retrasando la duración larval y pupal del culicido. Estos resultados demuestran el potencial de esta especie vegetal para ser incluida como alternativa de control de este mosquito.

LITERATURA CITADA

- Adebayo, T.A., Gbolade, A.A., Olaifa, J.I., 1999. Comparative study of toxicity of essential oils to larvae of three mosquito species. *Niger J. Nat. Prod. Med.* 3: 74–76.
- Aragón, G. A., J. F. López-Olguín, A. M. Tapia R., V. G. Cilia L. y B. C. Pérez-Torres. 2002. Extractos vegetales una alternativa para el control de plagas del amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L. Memorias del VIII Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Control de Plagas. Colegio de Postgraduados. S.L.P., México. Pp. 52-62.
- Banko, P. C., R. E. Davies, J. D. Jacobi, and W. E. Banko. 2001. Conservation status and recovery strategies for endemic Hawaiian birds. *Stud. Avian Biol.* 22: 359-376.
- Berg, M. E. 1993. Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2nd ed. rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke.
- Camarillo, R. G., L. D. Ortega, M. A. Serrato, and C. Rodríguez. 2009. Biological activity of *Tagetes filifolia* (Asteraceae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 35: 177-184.
- Cavalca, P. A. M., C. M. dos Santos, B. Reis and C. M. Bonato. 2011. Isothermic of *Culex* on the biological cycle of the mosquito *Culex* sp. *Int J High Dilution Res.* 10(36):259-262.

- Chandre, F., E. Darriet, M. Darder, A. Cuany, J. M. C. Doannio, N. Pasteur and E. Guillet. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*12: 359-366.
- Cherry, R. and R. Nagata. 2005. Development of resistance in southern chinch bugs (Hemiptera: Lygaeidae) to the insecticide bifenthrin. *Florida Entomol.* 88:219-221.
- Corbel, V., R. N'Guessan, C. Brengues, F. Chandre, L. Djogbenou, T. Martin, M. Akogbeto, J. M. Hougard and M. Rowland. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*101: 207-216.
- das Graças, M., Zoghbi, B., Oliveira, J., Skelding, G. M. & Guilhon, P. 2009. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 19(3): 795-804.
- Dugasani, S. L., Balijepalli, M. K. & Pichika, M. R. 2009. Growth inhibition and induction of apoptosis in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cells by *Adenocalymma alliaceum* flowers. *Curr Trends Biotechnol.*3:278 –286.
- Gbolade, A.A., Oyedele, A.O., Sosan, M.B., Adewayin, F.B., Soyela, O.L., 2000. Mosquito repellent activities of essential oils from two Nigerian *Ocimum* species. *J Trop Med Plants* 1, 146–148.
- Goddard, L. B., A. E. Roth, W. K. Reisen and T. W. Scott. 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1385–1391.
- Govindarajan, M., R. Sivakumar and M. Rajeswari. 2011. Larvicidal efficacy of *Cassia fistula* Linn. leaf extract against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.*295-298.
- Hasrat, J. A., De Backer, J. P., Vanquelin, G. & Vlietinck, A. J. 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plant extracts for receptor binding activity. *Phytomedicine.* 4: 59-65.
- Itokawa, H., Matsumoto, K., Morita, H. and K. Takeya. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry.* 31(3):1061-1062.
- Martin, F., A. Hay, L. Corno, M. Gupta and K. Hostettmann. 2007. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). *Phytochemistry.* 68:1307-1311.
- Martínez-Tomás, S. H., R. Pérez-Pacheco, C. Rodríguez-Hernández, G. Ramírez-Valverde and J. Ruíz-Vega. 2009. Effects of an aqueous extract of *Azadirachta indica* on the growth of larvae and development of pupae of *Culex quinquefasciatus*. *African Journal of Biotechnology.* 8(17):4245-4250.
- Mulla, M. S. 1991. Insect Growth Regulators for the Control of Mosquito Pests and Disease Vectors. *Chinese J. Entomology,* 6: 81-91.

- Mulla, M. S. and T. Su. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15: 133-152.
- Murty, U.S., Sriram, K. and Jamil, K. 1997. Effect of leaf extract of *Polyalthia longifolia* (Family: Annonaceae) on mosquito larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say of different habitats. *International Pest Control*, 39: 52–53.
- Murugan, K., Babu, R., Jeyabalan, D., Senthil Kumar, N. and Sivaramakrishnan, S. 1996. Antipupal effect of neem oil and neem seed kernel extract against mosquito larvae of *Anopheles stephensi* (Liston). *J. Ent. Res.* 20, 137–139.
- Naik, V. N. 1998. *Flora of Marathwada*. Amrut Publication, Aurangabad, India, p. 646.
- Ndung'u, M., Tortoa, B., Knolsa, B. G. J. and Hassanalia, A. 2004. Laboratory evaluation of some eastern African Meliaceae as sources of larvicidal botanicals for *Anopheles gambiae*. *International Journal of Tropical Insect Science*. (24): 4:311-318.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. y G. Ramírez V. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* SAY (Díptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20 (001): 141-152.
- Rahuman, A. A. and P. Venkatesan. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitol Res.* 103:133 – 139.
- Rao, L. J. M., P. Srinivas and K. N. Gurudutt. 1999. Chemical composition of the volatile oil from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum*). *J Med Arom Pl Sci.* 21: 987 – 989.
- Rattanachaiakunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2009. Shallot (*Allium ascalonicum* L.) oil: Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 3(11): 747-750.
- Rawani, A., K. M. Haldar, A. Ghosh and G. Chandra. 2009. Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 105:1411–1417.
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am J Pub Health.* 4:243-251.
- Rugkeart, C., Tanomjit, S., Niwan, I., Sopa, K., Natemata, J., Brenjaporn, C. & Arunaporn, I. 2005. Study on biological activities of *Mansao hymenaea* (DC.) A. Gentry leaf extract. *Thai Herbs.* 27: 399–495.
- Sagar, S. K. and S. S. Sehgal. 1997. Toxicity of neem seed coat extract against mosquitoes. *Indian J. Entomol.* 59(2): 215-223.
- Shalan, E. A. S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel-Wahab, H. and Mansour, A. H. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int.* (31)8:1149-1166.

- Shrankhla, Bhan, S., Sharma, P., Mohan, L. and Srivastava, C. N. 2012. Relative larvicidal potential of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Liston). Journal of the European Mosquito Control Association. European Mosquito Bulletin 30: 83-90.
- Shrankhla, Sharma, P., Mohan, L. and Srivastava, C. N. 2011. Larvicidal activity of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against *Culex quinquefasciatus* (Say). Entomological Research 41: 216–220.
- Singh, S. 1996. Growth regulatory effects of neem extracts on *Culex quinquefasciatus*. Indian J. Entomol. (58)1: 22-26.
- Su, T. and Mulla M. R. 1999. Oviposition bioassay responses of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* to neem products containing azadirachtin. Entomol. Exp. Appl. 91: 337–345.
- Tabassum, R., Naquvi, S.N.H., Jahan, M. and Khan, M.Z. 1993. Toxicity and abnormalities produced by plant products against *Culex fatigans*. *Proceedings of Pakistan Congress Zoology*, 13: 387–393.
- Tang, M. 2007. Producción de plantas Amazónicas con propiedades cosméticas y/o medicinales y sus productos derivados en el ámbito de la Cordillera Escalera, con fines de consumo interno y exportación. Proyecto Bosques del Chinchipe 1: 46.
- Taylor, L. N. D. 2005. The Healing Power of Rainforest Herbs. Square One Publishers, Inc. Garden City Park, New York. 583 pp.
- Thomson, R. H. 1971. Naturally Occurring Quinones, 2 Edn. Academic Press, Londres.
- Verma, P. R., Deshpande, S. A., Kamtham, Y. N. & Vaidya, L. B. 2012. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects from an aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) leaves in rats. Food Chemistry. 132: 1251–1257.
- World Health Organization. 2009. “Weekly epidemiological record,” WHO, vol. 84, pp. 437–444.
- World Health Organization. 2010. Malaria fact sheets No. 94. WHO Report. Geneva: WHO media center.
- Zhang, M., S. K. Chaudhuri and I. Kubo. 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. J. Chem. Ecol. 19(6):1109-1118.
- Zoghbi, M. G. B., Ramos, L. S., Maiya, J. G. S., De Silva, M. L., Lun, A. I. R. 1984. Volatile studied of the Amazonian garlic bush. Journal of Agriculture and food Chemistry. 32: 1009 - 1010.

CAPÍTULO 3

Actividad larvívica y caracterización química del aceite esencial de hojas de *Persea americana* (Lauraceae) contra *Culex quinquefasciatus*(Say)¹

Mosquito larvicidal activity and chemical characterization of essential oil from leaves of *Persea americana* Miller (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say)

RESUMEN

El trabajo se desarrollo para investigar el efecto larvívica de mosquitos de aceite esencial de hojas secas de *Persea americana* sobre *Culex quinquefasciatus* y determinar la composición química del aceite esencial. Grupos de veinte larvas fueron utilizados en los ensayos de larvívicas. Se estimó la mortalidad, índice de crecimiento relativo, la duración y la viabilidad de las larvas y pupas. Se analizó el aceite esencial mediante microextracción en fase sólida utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos más abundantes fueron Estragol (61.86%), sabineno (15.16%) y 1R- α -pineno (14.25%). El aceite esencial a 800 ppm inhibe el crecimiento de las larvas moquito a 26.73% (0.74) y 50 ppm a 16.83% (0.84), mientras que el control no tratado y polisorbato 20 registraron 1.01 respectivamente. La viabilidad de larva a pupa disminuyó en 53.25% con 800 ppm de aceite esencial causando una prolongación del desarrollo en 14.14 días, mientras que el control tuvo una durabilidad en su desarrollo de 12 días. En la fase de pupa-adulto utilizando 800 ppm se formaron 22.36% aultos y 21.81% con 50 ppm, hubo prolongación de 15.88 días y un retraso en el desarrollo de 13.62 días respectivamente, mientras que el control registró 14.63 días. La mortalidad al final del experimento registró 57.50% con 800 ppm, disminuyendo gradualmente a 40.00% con 50 ppm del aceite esencial de aguacate. El estudio demostró la actividad larvívica de aceite esencial de aguacate; inhibiendo el crecimiento y desarrollo normal del mosquito, prolongando la duración de larvas y pupas.

Palabras clave: control de mosquitos, inhibición del crecimiento, desarrollo, aceites esenciales.

ABSTRACT

The aim of the study was investigate mosquito larvicidal effect of essential oil from dried leaves of *P. americana* on *Culex quinquefasciatus* and determine the chemical composition of the essential oil and its volatile. Groups of twenty larvae were used in the larvicidal assays. The mortality, relative growth index, larval and pupal duration and viability was estimated. The essential oil were analyzed by solid phase microextraction using gas chromatography coupled to mass spectrometry. The most abundant compounds were Estragole (61.86%), Sabinene (15.16%) and 1R- α -Pinene (14.25%). The essential oil to 800 ppm inhibits up the growth of moquito larvae to 26.73% (0.74) and 50 ppm to 16.83% (0.84),

¹Artículo enviado a la revista *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*

while the untreated control and polysorbate 20 recorded 1.01 respectively. The viability of larva to pupa decreased 53.25% with 800 ppm of essential oil causing prolongation of development in 14.14 days, while the control had a durability in its development of 12 days. In the pupa-adult phase using 800 ppm 22.36% adults were formed and 21.81% with 50 ppm, there was prolongation of 15.88 days and delay of 13.62 days in the development respectively, while the control record 14.63 days. Mortality at the end of the experiment record 57.50 % with 800 ppm, gradually decreased to 40% with 50 ppm of avocado oil. The study demonstrated the larvicidal activity of essential oil of Mexican avocado; inhibited the normal growth and development of mosquito larvae, prolonging larval and pupal duration.

Keywords: mosquito control, growth inhibition, development, essential oils, avocado.

INTRODUCCIÓN

Persea americana Miller (Lauraceae) (*P. americana*), conocido como el aguacate mexicano y/o aguacatillo (Owolabi et al. 2005) es originaria de México y América Central, pero se encuentra en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Ortiz et al. 2004). La familia Lauraceae incluye 50 géneros y unas 2200 especies (Chanderbali et al. 2001). La corteza, frutos y hojas se usan en medicina tradicional en el Sur y Centro América para el tratamiento de diversas dolencias. Las investigaciones se han centrado en diversas partes de la planta, y se ha demostrado que el extracto de hojas tiene actividad anti-diabética (Lima et al. 2012), efecto hipoglucemiante (Gondwe et al. 2008), efecto anti-espástica (Odo, 2013), propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Adeyemi et al. 2002). Las personas han utilizado diversas partes de plantas, productos y metabolitos secundarios de origen vegetal en el control de plagas desde tiempos históricos (Ghosh et al. 2012). En las últimas décadas se ha producido un aumento significativo en el uso de productos naturales, centrándose en el potencial de utilización en la agricultura y el control del mosquito vectores de enfermedades de importancia en salud pública. Las enfermedades transmitidas por mosquitos siguen siendo una causa importante de padecimientos, molestias y muerte en todo el mundo (Taubes, 2000); el control de estos insectos se ha complicado debido a la resistencia adquirida a los insecticidas sintéticos, así como la toxicidad de los mismos sobre organismos no objetivo (Rohani et al. 2001). Los aceites esenciales han sido reportados como fuentes alternativas para el control de insectos, porque algunos son selectivos, biodegradables y productos no tóxicos (Pavela, 2007; Isman, 2006). También se ha documentado el potencial larvicida sobre mosquitos (Granados-Echegoyen et al. 2014; Govindarajan et al. 2013; Kamaraj et al. 2009). Algunos miembros de la familia Lauraceae son fuentes importantes de sustancias bioactivas con propiedades que actúan como insecticidas (Furtado et al. 2014, Cuca-Suárez et al. 2012).

Culex quinquefasciatus (Say) (Diptera: Culicidae) (*Cx. quinquefasciatus*) es un miembro del complejo *Culex pipiens* es una de las especies de mosquitos más extendidos a nivel mundial que se

encuentra en regiones tropicales y subtropicales y se ha reportado que es resistente a insecticidas sintéticos para su control. Los mosquitos pueden ser vectores de enfermedades humanas graves como la malaria, la encefalitis, la fiebre amarilla, el dengue y la filariasis. La filariasis linfática comúnmente conocida como elefantiasis considerada como la segunda enfermedad más común a nivel mundial es transmitida por mosquitos infecciosos y es una enfermedad tropical desatendida (Gyapong et al. 2010). Por esa razón, hemos diseñado el presente estudio con el fin de investigar el efecto larvicida del aceite esencial de hojas secas de *P. americana* sobre *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y determinar la composición química del aceite esencial.

MATERIALES Y METODOS

Poblacion de larvas de mosquito

Las larvas de *Cx. quinquefasciatus* se obtuvieron del insectario del CIIDIR Oaxacadel laboratorio de produccion masiva que cuenta con una cria de insectos en jaulas entomologicas y es alimentada con la introduccion de una gallina inmovilizada semanalmente.

Preparacion del material vegetal

Se colectaron hojas frescas de *P. americana* en Santa María Huitepec, Oaxaca, Mexico. La planta fue seleccionada por sus propiedades aromaticas y por el uso etnobotanicos que le da la poblacion. La identificacion taxonomica fue realizada por el curador del herbario del CIIDIR Oaxaca y se deposito una muestral de referencia en el laboratorio para futuras consultas. El material fue lavado con agua y puesto sobre papel periodico en sombra para su secado.

Extraccion del aceite esencial

El material seco se rehidrato durante 45 minutos antes de la extraccion. El aceite esencial fue obtenido sometiendo 300 g de material vegetal a hidrodestilación convencional durante tres horas con un aparato tipo Clevenger. La capa de aceite esencial se separo de la fase acuosa con un tubo de separacion y al resultante se le añadio sulfato de sodio anhidrido Na₂SO₄ para almacenarlo en frascos color ambar a 4°C hasta ser utilizados.

Cromatografia de gases (GC-MS) e identificación de compuestos volátiles

La identificación de compuestos volátiles se realizó mediante microextracción en fase sólida (SPME). Se utilizaron fibras recubiertas con polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 micras. Las fibras fueron acondicionadas antes de su uso por calentamiento en el puerto inyector cromatográfico realizando una carrera completa en el sistema. Para poner en contacto los volátiles con la fibra, se utilizaron frascos esterilizados de 5 ml de capacidad color ámbar. Cuatro µL de aceite esencial se depositaron en los frascos

y se mantuvo dentro la fibra por 4 min; posteriormente se hizo la inserción de la aguja en el puerto inyector del sistema cromatográfico. El análisis se realizó en un sistema HP 6890 - 5973 GC-MS. Los compuestos fueron separados en una columna capilar HP-5MS. La temperatura del horno se programó de 40 a 250 ° C con un aumento de intervalos de 10 °C min⁻¹ y una duración total de la corrida de 21 min. Los porcentajes relativos de los compuestos de aceites esenciales se obtuvieron utilizando helio como gas acarreador con un caudal de 1,0 mlmin⁻¹. Los compuestos se identificaron por el tiempo de retención y espectros de masa de la biblioteca NIST 02; se hizo una comparación de los espectros con los almacenados en la biblioteca NIST 14.

Preparación de las concentraciones de aceites esenciales

A partir de la solución madre de aceite esencial, se tomaron 0.008 ml y se diluyeron en 10 ml de agua destilada con 0.01% de polisorbato 20 que sirvió como un emulsionante a la solución, obteniendo de este modo la concentración de 0.08% (800 ppm), y posteriormente por dilución volumétrica en serie se prepararon concentraciones de 400, 200, 100 y 50 ppm y se usaron para bioensayo sobre larvas de segundo instar temprano.

Actividad larvicida y bioensayos de inhibición de crecimiento

El efecto de la mortalidad total y parcial sobre larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* se determinó al momento de obtener el índice relativo de crecimiento (IRC) y al final del experimento, respectivamente. Para el establecimiento de los bioensayos, se seleccionaron grupos de 20 larvas y se colocaron en un vaso de precipitado de plástico con 99 ml de agua destilada. Cuando las larvas no tuvieron movimientos normales en comparación con el control, se consideraron muertas y al ser perturbadas con un pincel en la región cervical sin muestras de reacción. Cada unidad experimental recibió 1 ml de las concentraciones utilizadas con cuatro repeticiones. Cada bioensayo incluyó un tratamiento de control con 0.01% de polisorbato 20 y uno sin la aplicación de tratamiento. Cuando los tratamientos de control presentaron entre 90 a 93% las pupas formadas, pupas muertas y vivas se contaron y se agruparon en cada etapa. Los adultos fueron considerados muertos al quedar atrapados en el exuvia de la pupa y larvas y pupas muertas aquellas que no mostraron movimientos normales (Martínez-Tomás et al. 2009). Con la información recopilada, se estimó el índice de inhibición del crecimiento (Zhang et al. 1993).

Viabilidad y duración de larva y pupa

La duración de las larvas y pupas se obtuvo multiplicando el porcentaje de pupas y adultos desarrollado por el número de días en que se desarrolló en cada repetición, estos valores se suman y el total se divide por el porcentaje total de pupas y adultos desarrollado. La viabilidad de las larvas y pupas

se estimó contando el número de individuos que llegó a pupas y adultos y se expresa en porcentaje de acuerdo con el número inicial de los individuos tratados.

Análisis estadístico

En todas las pruebas, no se detectó mortalidad en el control después de la exposición de tratamientos, por lo que no se requirió corrección basado en la fórmula de Abbott. El índice de crecimiento, la duración larval y pupal se expresan como media \pm SE (n = 4). Se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de Duncan con un valor de p de 0,01 para considerarlos como significativo. El análisis de los datos se realizó utilizando el software SAS 9.0.

RESULTADOS

Identificación de compuestos volátiles

El hidrodestilación asistida con microondas de 300 g de hojas secas de *P. americana* en 1000 ml de agua, mostró un aceite transparente con un rendimiento de 0.24%. Los compuestos volátiles se muestran en el Cuadro 1. Mediante la comparación de los espectros de masas de cada compuesto con los datos reportados en la biblioteca NIST 14, se identificaron 11 compuestos que representa 99.99%. Los compuestos más abundantes fueron Estragol (61.86%), sabineno (15.16%) y 1R- α -pineno (14.25%).

Cuadro 1. Composición química de los volátiles extraídos de hojas secas de *P. americana*.

Pico #	Tiempo de Retención	Compuestos	Composición (%)
1	6.05	1R- α -Pineno	14.25
2	6.24	Campheno	0.66
3	6.78	Sabineno	15.16
4	6.85	β -Pineno	2.10
5	7.55	Eucalyptol	3.08
6	7.74	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	0.37
7	8.63	Linalool	1.96
8	10.32	Estragole	61.86
9	11.51	Anethole	0.15
10	12.99	Methyleugenol	0.24
11	13.34	Caryophylleno	0.16
Total (%)			99.99

Actividad larvicida e inhibición del crecimiento

El cuadro 2 muestra los resultados de susceptibilidad de larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* al aceite esencial de *P. americana*; se registró más del 50% de mortalidad entre larvas y pupas de mosquitos usando 800 ppm del producto, presentando una disminución proporcional en la eficacia biológica al disminuir la dosis a 50 ppm con un efecto tóxico del 35%. El aceite esencial de *P. americana* con las dosis utilizadas inhibió el crecimiento de las larvas, 800 ppm inhibe el crecimiento a 26.73% (0.74) y 50 ppm a 16.83% (0.84), mientras que el control y polisorbato 20 registraron 1.01 respectivamente.

Cuadro 2. Numero y porcentaje parcial de larvas y pupas muertas e índice relativo de crecimiento (IRC) de larvas de segundo instar de *Culex quinquefasciatus* tratadas con aceite esencial de *Persea americana*.

Concentración (ppm)	N° Larva (4 rep.)	Mortalidad Parcial				%	IRC
		N° de larvas y pupas por instar					
		II	III	IV	Pupa		
800	80	0.00	1.00	40.00	3.00	55.00 ± 12.24 a	0.74 ± 0.07 c
400	80	0.00	0.00	34.00	3.00	46.25 ± 12.50 ab	0.78 ± 0.07 bc
200	80	0.00	0.00	34.00	1.00	43.75 ± 4.78 ab	0.81 ± 0.01 bc
100	80	0.00	0.00	31.00	4.00	43.75 ± 6.29 ab	0.80 ± 0.03 bc
50	80	0.00	0.00	23.00	5.00	35.00 ± 8.16 b	0.84 ± 0.05 b
Control	80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00 c	1.01 ± 0.02 a
Polysorbato 20	80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00 c	1.01 ± 0.02 a

Durabilidad y la viabilidad de larva y pupa

El Cuadro 3 muestra la viabilidad de larvas de segundo estadio de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con aceites esenciales de hojas secas de *P. americana*; la viabilidad de larvas a pupas disminuyó 53.25% cuando se utilizan 800 ppm de aceite causando prolongación del desarrollo en 14.14 días, mientras que el control tiene una durabilidad en su desarrollo de 12 días. En la fase de pupas a adultos utilizando 800ppm se formaron 22.36% de adultos y 21.81% con 50 ppm, hubo prolongación de 15.88 días y un retraso de 13.62 días en el desarrollo, el control registró 14.63 días. La mortalidad al final del experimento registró 57.50% con 800 ppm, la mortalidad disminuyó gradualmente hasta el 40% con 50 ppm de aceite de aguacate.

Cuadro 3. Duración de las fases de desarrollo de larvas y pupas y mortalidad total de larvas de *Culex quinquefasciatus* tratadas con aceite esencial de *Persea americana*.

Concentración (ppm)	Larval (Larvas a pupas)		Pupal (Pupas a adultos)		Mortalidad (%)
	Formdas (%)	Duracion (d)	Formadas (%)	Duracion (d)	
800	46.25 c	14.14 ± 0.60 a	22.36 a	15.88 ± 0.91 a	57.50 a
400	55.00 bc	13.33 ± 1.87 ab	20.19 a	15.08 ± 1.77 ab	47.50 ab
200	57.50 bc	12.79 ± 0.56 ab	24.45 a	14.14 ± 0.88 b	43.75 ab
100	61.25 b	12.44 ± 0.72 b	22.95 a	14.42 ± 0.90 ab	43.75 ab
50	68.75 b	13.04 ± 0.31 ab	21.81 a	13.62 ± 0.19 b	40.00 b
Control	100.00 a	12.47 ± 1.18 b	25.00 a	14.63 ± 1.05 ab	0.00 c
Polysorbato 20	100.00 a	12.53 ± 0.99 b	25.00 a	14.45 ± 0.71 ab	0.00 c

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que el desarrollo del mosquito *Cx. quinquefasciatus* se extiende en la etapa de larvas-pupas con dosis de 800 a 50 ppm, también en la fase de pupas a adultos con dosis que van desde 800 a 100 ppm, estos resultados son similares a los obtenidos por Cabral et al. (2007) que evaluaron un neoliganano (yangambin) aislado de varias especies de Lauraceae sobre la duración de la fase de larva y pupa en el desarrollo de la mosca *Chrysomya megacephala* (Fabricius 1794) (Diptera: Calliphoridae) obtuvieron resultados de 6.07 y 5.48 días respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p < 0.001$) cuando se compara con el grupo control que muestran 5.51 y 4.39 días respectivamente.

Regnault-Roger & Hamraoui (1994) usaron aceites esenciales aromáticos de *Cinnamomum verum* (Lauraceae) obteniendo resultados eficaces y controlando totalmente el desarrollo biológico de larvas

Acanthoscelides obtectus Say (Coleoptera: Bruchidae). La toxicidad de aceites esenciales sobre insectos de productos almacenados está influenciada por la composición química del aceite, que a su vez depende de la fuente, temporada y las condiciones ecológicas, método de extracción, tiempo de extracción y parte de la planta utilizada (Lee et al. 2001).

Los resultados de la composición química varían con respecto a la labor realizada, Ogunbinu et al. (2007) investigó la composición de los aceites esenciales de *P. americana* de Nigeria determinando a β -cariofileno (43.9%) y valenceno (16.0%) como los compuestos más abundantes, pero no son similares a los compuestos identificados por Pino et al. (2004) quienes determinaron Estragol (53.9%) como el componente principal en el aceite de *P. americana* var. *drymifoliacv* Duke de Cuba.

Larijani et al. (2010) investigaron los componentes de las hojas de *P. americana* cultivada en Irán y los compuestos más abundantes encontrados fueron metileugenol (31.2%), β -cariofileno (16.9%) y estragol (=metilchavicol) (9.0%); estos resultados son similares a las de nuestro trabajo en la determinación de compuestos pero no en abundancia de porcentaje porque en nuestro estudio estragol (61.86%) es la más abundante y Metil eugenol (0.24%) uno de los compuestos con menor presencia.

Sagrero-Nieves & Bartley (1995) investigaron la composición química de los volátiles del aceite esencial de las hojas de aguacate raza Mexicana (*P. americana*) por cromatografía de gases y cromatografía de gases-espectrometría de masas; donde identificaron treinta compuestos en 92.45% del aceite; estragol (78.12%), α -cubebeno (3.58%), metil eugenol (3.37%) y β -cariofileno (2.10%) fueron los principales componentes que representaron más del 87%. El estragol y sus compuestos fenólicos han sido reportados por presentar importantes propiedades insecticidas (Marcus & Lichtenstein, 1979).

Existe evidencia del potencial de *P. americana* como una estrategia para el control de mosquitos, pero éstos han sido realizados principalmente con extractos de diferentes partes de plantas y con solventes de polaridad variable, ejemplo de ello es el trabajo de Giffoni et al. (2009) en el cual determinaron concentraciones letales CL_{50} contra larvas de *Aedes aegypti* de 16.7 mg mL⁻¹ con extracto hexánico y de 8.87 mg mL⁻¹ con el de metanol a partir de semillas de aguacate, así mismo se encuentra el trabajo de Torres et al. (2014) donde evaluaron la toxicidad del extracto crudo de etanol y hexano de diferentes partes de *P. americana* sobre tercer y cuarto instar de larvas de *Aedes aegypti*. La mortalidad fue observada en 24 y 48h después del tratamiento. Tanto el extracto de hexano como el de etanol de distintas partes de *P. americana* muestran evidencia de toxicidad sobre larvas. El extracto de hexano de las semillas expuso la toxicidad más alta con valores de CL_{50} y CL_{90} de 9.82 y 22.19 mg/L respectivamente, mientras que el extracto de semilla de etanol expuso CL_{50} de 16.48 mg/L y CL_{90} de 45.77 mg/L, respectivamente. Esto fue estrechamente cercano por el extracto de etanol de la cascara con CL_{50} de 10.35 mg/L y CL_{90} de 26.29 mg/L. La pulpa extraída con etanol también mostró toxicidad sobre larvas con CL_{50} de 21.32 mg/L y CL_{90} de 59.45 mg/L.

Harrison-Ferreira (2010) estimó CL₅₀ de extractos de semilla y corteza del tallo de *P. americana* sobre *Aedes albopictus* (Skuse) de 3.5 y 4.2 para larvas y 75.2 y 68.9 mg/L para pupas respectivamente. Diversos estudios indican que los monoterpenos causan mortalidad del insecto inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Houghton et al. 2006).

Ramos-Casillas et al. (2007) evaluaron el extracto metanólico de los huesos de esta planta mostrando eficacia sobre tercer y cuarto estadio larval de *Ae. aegypti*, determinando CL₅₀ y CL₉₅ a las 24h de 20.39 y 41.64 ppm respectivamente, aunque los efectos insecticidas de los químicos de las plantas varían no sólo a las especies vegetales, especies de mosquitos y las partes utilizadas, sino también a la metodología empleada para su extracción (Ghosh et al. 2012; Mann & Kaufman, 2012).

LITERATURA CITADA

- Adeyemi OO, Okpo SO, Ogunti OO (2002). Analgesic and antiinflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia* 73: 375–380.
- Cabral MMO, Mendonça PM, Gomes CMS, Barbosa Filho JM, Queiroz MMC, Mello RP. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. *Fitoterapia*. 2007; 78(1):20-4.
- Chanderbali AS, Werff Hvd, Renner SS. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Ann Mo Bot Gard*. 2001; 88(1):104-34.
- Cuca-Suárez LE, Dary Luz Mendoza-Meza, Juan Manuel Álvarez-Caballero, Víctor Enrique Macías-Villamizar, Ericsson David Coy-Barrera. Acaricide activity of Lauraceae extracts against domiciliary mites *Dermatophagoides farinae* and *Blomia tropicalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012; 17(4): 308-319.
- Furtado R., J. Baptista, E. Lima, L. Paiva, J.G. Barroso, J.S. Rosa, L. Oliveira. Chemical composition and biological activities of Laurus essential oils from different Macaronesian Islands. *Biochemical Systematics and Ecology* 55 (2014) 333-341.
- Garcez WS, Garcez FR, da Silva LMGE, Hamerski L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. *Bioresource Technology*. 2009; 100(24):6647-50.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res* 2012; 135(5): 581-598.
- Giffoni Leite JJ, Érika Helena Salles Brito¹, Rossana Aguiar Cordeiro, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, José Júlio Costa Sidrim, Luciana Medeiros Bertini, Selene Maia de Moraes and Marcos Fábio Gadelha Rocha. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(2):110-113, 2009.

- Gondwe, M., Kamadyaapa, D.R., Tufts, M.A., Chuturgoon, A.A., Ojewole, J.A., Musabayane, C.T., 2008. Effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) [Avocado] ethanolic leaf extract on blood glucose and kidney function in streptozotocin-induced diabetic rats and on kidney cell lines of the proximal (LLCPK1) and distal tubules (MDBK). *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 30, 25–35.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., Veerakumar, K., 2013. Mosquito larvicidal activity of thymol from essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus*, and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 112, 3713–3721.
- Granados-Echegoyen C, Pérez-Pacheco R, Soto-Hernández M, Ruiz-Vega J, Lagunez-Rivera L, Alonso-Hernandez N, et al. Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pac J Trop Med* 2014; 412-420.
- Gyapong, J., Gyapong, M., Yellu, M., Anakwah, K., Amofah, G., Bockarie, M., Adjei, S., 2010. Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. *Lancet* 375 (9709), 160-165.
- Harrison-Ferreira G. 2010. Toxicological effects of ethanolic extract of seed and bark of *Persea americana* (Lauraceae), on larvae and pupae of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae). *Vita et Sanitas, Trindade-Go*, 4: 21-25.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* 23, 181–199. Sánchez-Pérez JDL, Jaimes-Lara MG, Salgado-Garciglia R, López-Meza JE. Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *Eur J Plant Pathol* (2009) 124:595–601.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrent, and repellent in modern agriculture and increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66.
- Kamaraj, C., Bagavan, A., Rahuman, A.A., Zahir, A.A., Elango, G., Pandiyan, G., 2009. Larvicidal potential of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi and *Culex tritaeniorhynchus* Giles (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 104, 1163–1171.
- Larijani K, Abdolhossein Rustaiyan, Parviz Abroomand Azar, Fereshteh Nematollahi and Sepehr Taban. Composition of essential oil of leaves of *Persea americana* cultivated in Iran. *Chemistry of Natural Compounds* 2010, 46(3): 489-490.
- Lee, S.E., Lee, B.H., Choi, W.S., Park, B.S., Kim, J.G., Campbell, B.C., 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Science* 57, 548–553.
- Lima CR, C.F.B. Vasconcelos, J.H. Costa-Silva, C.A. Maranhao, J. Costa, T.M. Batista, E.M. Carneiro, L.A.L. Soares, F. Ferreira, A.G. Wanderley. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana*

- Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 141 (2012) 517– 525.
- Mann, R.S., Kaufman, P.E., 2012. Natural product pesticides: their development, delivery and use against insect vectors. *Mini-Rev. Org. Chem.* 9, 185–202.
- Marcus C, Lichtenstein E P 1979 Biologically active components of anise: Toxicity and interactions with insecticides in insects. *J Agric Food Chem* 27 1217-1223.
- Martínez-Tomás SH, Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Ramírez-Valverde G, Ruíz-Vega J. Effects of an aqueous extract of *Azadirachta indica* on the growth of larvae and development of pupae of *Culex quinquefasciatus*. *Afric J Biotechnol* 2009; **8**: 4245-4250.
- Odo CE. Anti-motility and reductions in the concentrations of gut electrolytes: Bases for the anti-spastic use of the leaves of *Persea americana* in folk medicine. *Journal of Pharmacy Research* 6(2013) 336-341.
- Ogunbinu AO, Ogunwande IA, Flamini G, Cioni PL (2007) Volatile compounds of *Persea americana* Mill from Nigeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 10(2): 133 – 138.
- Ortiz MA, Dorantes AL, Gallindez MJ, Cardenas SE (2004). Effect of a novel oil extraction method on avocado (*Persea americana* Mill) pulp microstructure. *Plant Foods Hum. Nutr.* 59: 11–14.
- Owolabi, M.A., Jaja, S.I., Coker, H.A.B., 2005. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia* 76, 567–573.
- Pavela, R., 2007. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pest. Tech.* 1, 47–52.
- Pino, J.A., R. Marbot, A. Rosado, and V. Fuentes. 2004. Volatile components of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Moro grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 16(2): 139–140.
- Ramos-Casillas F, Azucena Oranday Cárdenas, María Luisa Rodríguez Tovar, Ma. Julia Verdes Star, Adriana Flores Suárez, Gustavo Ponce García. 2007. Efecto larvídica del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass, en *Aedes aegypti* (L.). *Ciencia UANL*, 10(1): 25-28.
- Regnault-Roger C and Hamraoui A. Inhibition of reproduction of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera), a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) bruchid, by aromatic essential oils. *Crop Protection* 1994, 13(8): 624-628.
- Rohani, A., Chu, W.L., Saadiyah, I., Lee, H.L., Phang, S.M., 2001. Insecticide resistance status of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* collected from urban and rural in major towns of Malaysia. *Trop. Biomed.* 18 (1), 29–39.
- Sagrero-Nieves L and Bartley JP. Volatile Components of Avocado Leaves (*Persea americana* Mill) from the Mexican Race. *J Sci Food Agric* 1995, 67: 49-51.
- Taubes, G., 2000. Vaccines. Searching for a parasites weak spot. *Science* 290 (5491), 434–437.

Torres RC, Garbo AG, Walde RZML. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(12): 960-964.

Zhang M, Chaudhuri SK, Kubo I. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *J Chem Ecol* 1993; **19**: 1109-1118.

CAPÍTULO 4

Efectos del extracto acuoso y etanólico de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum* (Bignonaceae) sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos de ratas Wistar¹

Effects of aqueous and ethanol extract of dried leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignonaceae) on haematological and biochemical parameters of wistar rats

RESUMEN

Se evaluaron extractos acuosos y etanólicos de hojas secas de *Pseudocalymma alliaceum*, administrando 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal a ratas wistar vía oral por 14 días, se aleatorizaron 4 grupos con 3 repeticiones. No se registraron muertes después de la administración oral de los extractos, ni se observaron signos físicos de toxicidad ni efectos adversos al tratamiento. Los índices hematológicos eritrocitos, hemoglobina y hemoglobina corpuscular media no mostraron anormalidad significativa, en cambio se mostró una disminución en los niveles de la serie blanca presentando una leucopenia y un aumento plaquetario y de linfocitos. Los parámetros bioquímicos que aumentaron fueron glucosa, creatinina y albumina, mientras que la urea disminuyó; los valores de TGO disminuyeron con el extracto acuoso a 50 y 100 mg/kg y aumentó con la dosis de 200 mg/kg, en cambio para extractos etanólicos las dosis empleadas ocasionaron un aumento en este parámetro. La TGP disminuyó con el extracto acuoso y con el etanólico se incrementó. Los triglicéridos disminuyeron al administrar el extracto acuoso y se redujo con el extracto etanólico a 100 y 200 mg/kg, en cambio a 50 mg/kg decreció al ser comparado con el control. El colesterol disminuyó con el extracto acuoso y aumento con el extracto etanólico. En conclusión, la ingesta de *Pseudocalymma* no produce toxicidad aguda a 50 mg/kg que pudieran ser interpretadas como signos tóxicos o de daño biológico, pero altera la función hepática y renal a dosificaciones de 100 y 200 mg/kg.

Palabras clave: Toxicología, *Pseudocalymma*, extractos botánicos, ratas.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the hematological status, liver and renal physiology and cardiovascular risk parameters in wistar rats received orally 50, 100 and 200 mg/kg of body weight of aqueous and ethanolic extract of dried leaves of *Pseudocalymma alliaceum* for 14 days. The animals were completely randomized into four groups of three rats each. No deaths were reported after oral administration of the extracts, no physical signs of toxicity or adverse effects were observed. Hematological indices of red blood cell count, hemoglobin concentration and mean corpuscular hemoglobin showed no significant abnormality, however showed a decrease in the levels of white series

¹Artículo aceptado para publicación en la revista *Asian Pacific Journal of Reproduction* (JCR)

presenting a leukopenia and increased platelet and lymphocyte count. Biochemical parameters were increased glucose, creatinine and albumin, while urea decreased; aspartate aminotransferase values decreased with the aqueous extract at 50 and 100 mg/kg and increased with dose of 200 mg/kg, in contrast to the doses used ethanol extracts caused an increase in this parameter. The alanine aminotransferase decreased with aqueous extract and using the ethanol extract increased. Triglycerides decreased by administering the aqueous extract and was reduced with ethanolic extract at 100 and 200 mg/kg, in contrast to 50 mg/kg decreased to be purchased with the control. Cholesterol decreased by administering the aqueous extract and increased with the ethanol extract. In conclusion, *P. alliaceum* intake produces no acute toxicity at 50 mg/kg, which may be interpreted as a toxic signs or biological damage, but changes the liver and renal function at dosages of 100 and 200 mg/kg.

Keywords: Toxicity, *Pseudocalymma*, extracts, rats.

INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales son utilizadas por el hombre con diversos propósitos en todo el mundo. La OMS (2008) menciona que más del 80% de la población mundial hace uso de medicina tradicional y enfatiza que las plantas medicinales que tradicionalmente se utilizan como alternativa a fármacos convencionales en el tratamiento de enfermedades necesitan ser estudiadas para determinar los riesgos de dañar la salud humana y sus efectos secundarios tóxicos; resultados toxicológicos obtenidos a través de experimentación nos permiten decidir si es seguro o no el uso de especies vegetales como alternativa clínica. La utilización y el estudio de plantas medicinales se ha incrementado notablemente (Keter & Mutiso, 2012; Maroyi, 2011; Goleniowski et al. 2006), ya que muchos son precursores para la síntesis de drogas (Abolaji et al. 2007), y estas siguen siendo el principal proveedor de medicamentos activos de fuentes naturales para el hombre (Ogbonnia et al. 2008).

Pseudocalymma alliaceum (Lam.) Sandwith (Bignoniaceae) syn: *Adenocalymma alliaceum* Miers., *Mansoa alliacea* (Lam.), *Bignonia alliacea* Lam., *Pachyptera alliacea* (Lam.) y *Pachyptera hymenaea* (DC.) es una enredadera leñosa que cuando sus hojas son perturbadas emanan un fuerte aroma similar al ajo. La familia Bignoniaceae es neotropical y comprende casi 800 especies y 104 géneros (Fischer et al. 2004), *P. alliaceum* ha sido objeto de estudios para determinar su composición química y actividad biológica sobre distintos organismos, además de su importancia económica por servir como sustituto de ajo en los alimentos. Las hojas y flores son ampliamente consumidas y utilizadas en medicina tradicional por poblaciones de Sudamérica, entre las que se encuentran Brasil y Perú (Zoghbi et al. 1984), sin embargo, son pocos los antecedentes literarios con evidencia científica suficiente que indiquen algún grado de seguridad por su uso.

Las propiedades que se le atribuyen son analgésicas, antiartríticas, antiinflamatorias, antipiréticas, antirreumáticas, depurativas, purgantes y vermífugas (Dugasani et al. 2009; Taylor, 2005; Hasrat et al.

1997), las hojas secas se utilizan para el tratamiento de resfriados, neumonía, infección de garganta y desordenes respiratorios (Naik, 1998), náusea y constipación (Berg, 1993). Verma et al. (2012) y Rao et al. (1999) analizaron los compuestos volátiles de hojas de *P. alliaceum* determinando como compuestos mayoritarios diallyl disulfido, diallyl trisulfido, diallyl tetrasulfido y 1-octen-3-ol, compuestos organosulfurados derivados de alicina; el fuerte aroma a ajo presente en esta especie vegetal es debido a naftaquinonas derivadas del lapacol (Tang, 2007; Itokawa et al. 1992). El extracto metanólico del tallo de *Pseudocalymma* ha mostrado actividad citotóxica contra células de cáncer de colon (Itokawa et al. 1992).

Rugkeart et al. (2005) reportan actividad antioxidante y antimicrobiana con extracto de éter de petróleo y etanol. Verma et al. (2012) revelaron que el extracto acuoso de hojas de *P. alliaceum* mostró actividad antinociceptiva, hipolipidémica y antihiperlipidémica en ratas normales y con hipercolesterolemia inducida por 28 días. Basándonos en lo anterior el presente trabajo se planteó como objetivo realizar la evaluación toxicológica del extracto acuoso y etanólico de hojas secas de *P. alliaceum* a través de la administración oral por 14 días en ratas wistar machos, determinando los parámetros bioquímicos sanguíneos que permitieron evaluar la condición hematológica, fisiología hepática, renal y parámetros de riesgo cardiovascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Se recolectaron hojas frescas de *P. alliaceum* en el Municipio de San Pedro Comitancillo (16° 29' 20.67" N, 95° 09' 15.70" O), de la Región Istmo del estado de Oaxaca, México; se lavaron con agua de grifo y se colocaron sobre papel periódico en sombra para su secado durante 20 días, posteriormente se pulverizaron las hojas con ayuda de un molino mecánico para obtener un polvo el cual fue hidratado posteriormente.

Preparación de los extractos crudos

Se agregaron 100 g de planta molida seca en 300 mL de disolvente contenidos en un matraz, se agitó y se dejó reposar por 24h para la extracción acuosa y 72h para etanol, se separó el sólido del líquido utilizando papel filtro y el remanente se descartó, se eliminó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio para obtener el extracto crudo y se almacenó en frascos color ámbar a 8°C hasta ser utilizados. Al momento de su uso los extractos se reconstituyeron en agua destilada para obtener las dosis de 50, 100, y 200 mg/kg

Animales de experimentación

Se realizaron los bioensayos toxicológicos en la Escuela de Medicina de la Universidad Cristóbal Colón, Veracruz, México; se utilizaron ratas wistar machos adultos de 10 a 12 meses de edad, con un peso corporal entre 200 y 230 g criados en el Bioterio de la Escuela de Medicina. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de acero inoxidable limpias, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h y en condiciones óptimas de temperatura 20 - 25 °C y humedad relativa de 50 – 60 %.

Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar de laboratorio en presentación sólida (croqueta) de la marca Harlan - Teklad 2014 (14 % proteína – 3.5 % grasa). La administración de la dieta sólida y agua fue *ad libitum*. El estudio se desarrolló siguiendo los procedimientos éticos de utilización de animales de experimentación establecidos en las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Nacional Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Administración de extractos y grupo de animales

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar formado por 4 grupos, a los cuales se administró 50, 100 y 200 mg del extracto acuoso y etanólico por kg de peso corporal, y el grupo control que solo recibió agua purificada. Los extractos fueron administrados vía oral consecutivamente por 14 días; cada grupo tuvo 3 repeticiones.

Muestras de sangre y preparación del suero

Después de 14 días de administración oral de los extractos, los animales con 18 h de ayuno fueron anestesiados con Pentobarbital y se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardíaca, para ser sacrificados posteriormente. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de ensayo al vacío conteniendo EDTA como anticoagulante para estudios hematológicos y sin anticoagulante para determinaciones bioquímicas. Se recolectaron 3 mL y se centrifugó a 1086 rpm por 10 min y el suero se retiró con pipetas Pasteur y se almacenó a -20 °C hasta el análisis bioquímico.

Determinación de los parámetros bioquímicos

Se determinaron parámetros fenotípicos del suero de la sangre en la rata control y en el tratamiento como: colesterol, triglicéridos, glucosa, albumina, ácido úrico, urea, creatinina, transaminasa glutámica oxalacética y transaminasa glutámica pirúvica utilizando métodos enzimático-colorimétricos y el equipo automatizado DXC Synchron.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se sometieron a pruebas de normalidad de errores y homogeneidad de varianza, se transformaron datos para cumplir con los supuestos experimentales y posteriormente se

procedió al desarrollo de un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Fischer ($p < 0.05$); los resultados se expresan en promedios de tres repeticiones con desviación estándar. Se utilizó el paquete estadístico Minitab 16.1.0.

RESULTADOS

Parámetros hematológicos

No se registraron muertes después de la administración oral de los extractos. No se observaron signos físicos de toxicidad ni efectos adversos al tratamiento. Los resultados toxicológicos del extracto acuoso en los parámetros de la serie roja y blanca de las ratas tratadas se muestran en el Cuadro 1. No se encontraron variaciones en los valores de glóbulos rojos (ERI), hemoglobina (HGB) y de hemoglobina corpuscular media (HCM) para los extractos evaluados. Se presentó una disminución significativa en los resultados de hematocritos (HCT) y volumen corpuscular medio (VCM) con los extractos administrados. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) presentó un aumento significativo con el extracto acuoso a 200 mg/kg de 34.14 g/dL, las ratas tratadas con el extracto etanólico registran 33.37 g/dL con dosis de 50 mg/kg, mientras que el grupo control presentó 28.50 g/dL (Cuadro 2). La amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) presentó significancia estadística con el extracto acuoso y etanólico, se observó una disminución al emplear el extracto acuoso a 50, 100 y 200 mg/kg de 13.14, 11.79 y 11.61 % respectivamente al ser comparado con el control que mostró 13.20 %.

Cuadro 1. Efecto de extractos acuosos de *P. alliaceum* en los parámetros hematológicos de ratas.

Parámetros	Valor de Referencia	Grupo control	Concentración mg/kg/day		
			50	100	200
ERI ($10^6/uL$)	4.00 - 6.00	7.06±0.20 a	6.89±0.60 a	6.75±0.90 a	6.94±0.57 a
HGB (g/dL)	11.00 - 17.00	14.25±0.35 a	14.40±1.45 a	13.85±1.41 a	14.17±0.18 a
HCT (%)	35.00 - 50.00	49.95±1.25 a	43.21±3.99 ab	40.49±6.13 b	41.59±1.97 b
VCM (fL)	80.00 - 99.90	70.75±0.25 a	62.70±0.90 b	59.87±1.59 b	60.05±2.93 b
HCM (pg)	27.00 - 32.00	20.50±0.20 a	20.89±0.35 a	20.58±0.83 a	20.50±1.78 a
CHCM (g/dL)	32.00 - 37.00	28.50±0.10 a	33.31±0.32 b	34.39±1.90 b	34.14±2.07 b
ADE (%)	10.00 - 20.00	13.20±0.30 a	13.14±0.29 a	11.79±0.39 b	11.61±1.29 b
PTL ($10^{-3}/uL$)	150 - 450.00	579.00±2.00 ab	561.25±51.75 b	679.50±79.50 a	635.50±60.50 ab
VPM (fL)	6.00 - 10.00	10.60±0.10 a	7.00±0.49 bc	7.44±0.26 b	6.53±0.39 c
LEU ($10^{-3}/uL$)	5.00 - 10.50	5.40±1.36 a	2.84±0.27 bc	3.15±0.42 b	1.69±0.12 c
NEU (%)	50.00 - 80.00	12.25±2.05 a	7.20±0.30 b	9.85±0.05 a	10.85±1.85 a
LIN (%)	25.00 - 50.00	55.55±3.95 b	91.00±0.40 a	86.70±5.85 a	86.60±1.50 a
MON (%)	2.00 - 10.00	24.85±2.65 a	1.45±0.05 b	2.05±0.45 b	1.90±0.20 b
EOS (%)	0.10 - 5.00	1.65±0.05 a	0.10±0.00 b	0.33±0.07 c	0.20±0.00 d
BAS (%)	0.10 - 2.00	1.00±0.00 a	0.30±0.10 b	0.33±0.05 b	0.45±0.15 b

n = 3, X±SD. Valores con letras iguales por fila no son significativamente diferentes ($P > 0.05$). ERI: Eritrocitos, HGB: Hemoglobina, HCT: Hematocritos, VCM: Volumen corpuscular medio, HCM: Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Amplitud de distribución eritrocitaria, PTL: Plaquetas, VPM: Volumen plaquetar medio, LEU: Leucocitos, NEU: Neutrocitos, LIN: Linfocitos, MON: Monocitos, EOS: Eosinófilos, BAS: Basófilos.

Las PTL presentaron un aumento al utilizar extracto etanólico con las tres dosificaciones empleadas pero sin significancia estadística al ser comprado con el control. El volumen de plaquetas medias (VPM) mostró una disminución significativa al utilizar las tres dosis y extractos vegetales. Los leucocitos (LEU)

mostraron significancia estadística al emplear extracto acuoso y etanólico, presentado una disminución en los valores de 2.84, 3.15 y 1.69 $\times 10^{-3}/\text{uL}$ y de 3.14, 2.30 y 3.17 $\times 10^{-3}/\text{uL}$ a 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente, mientras el grupo control reflejó 5.40 $\times 10^{-3}/\text{uL}$. Los glóbulos blancos, neutrófilos y monocitos presentaron una disminución significativa de los valores hematológicos al ser comparado con el grupo control con extractos acuosos y etanólicos.

Cuadro 2. Efecto de extractos etanólicos de *P. alliaceum* en los parámetros hematológicos de ratas wistar.

Parámetros	Valor de Referencia	Grupo control	Concentración mg/kg/day		
			50	100	200
ERI ($10^{-6}/\text{uL}$)	4.00 - 6.00	7.06 \pm 0.20 a	7.11 \pm 0.18 a	7.023 \pm 0.17 a	7.35 \pm 0.28 a
HGB (g/dL)	11.00 - 17.00	14.25 \pm 0.35 a	14.69 \pm 0.44 a	14.15 \pm 0.79 a	14.66 \pm 0.16 a
HCT (%)	35.00 - 50.00	49.95 \pm 1.25 a	44.02 \pm 1.34 b	42.70 \pm 2.01 b	45.32 \pm 1.70 b
VCM (fL)	80.00 - 99.90	70.75 \pm 0.25 b	61.97 \pm 2.86 a	60.81 \pm 2.14 a	61.67 \pm 1.09 a
HCM (pg)	27.00 - 32.00	20.50 \pm 0.20 a	20.68 \pm 1.02 a	20.15 \pm 0.82 a	19.97 \pm 0.56 a
CHCM (g/dL)	32.00 - 37.00	28.50 \pm 0.10 c	33.37 \pm 0.23 a	33.13 \pm 0.34 ab	32.38 \pm 0.88 b
ADE (%)	10.00 - 20.00	13.20 \pm 0.30 a	12.36 \pm 0.38 b	12.40 \pm 0.28 b	12.68 \pm 0.53 ab
PTL ($10^{-3}/\text{uL}$)	150 - 450.00	579.00 \pm 2.00 a	631.50 \pm 59.50 a	626.00 \pm 29.00 a	613.66 \pm 24.54 a
VPM (fL)	6.00 - 10.00	10.60 \pm 0.10 a	6.61 \pm 0.41 b	7.22 \pm 0.49 b	6.74 \pm 0.19 b
LEU ($10^{-3}/\text{uL}$)	5.00 - 10.50	5.40 \pm 1.36 a	3.14 \pm 0.20 b	2.30 \pm 0.50 b	3.17 \pm 0.89 b
NEU (%)	50.00 - 80.00	12.25 \pm 2.05 a	7.05 \pm 0.25 b	5.25 \pm 0.65 b	7.25 \pm 0.65 b
LIN (%)	25.00 - 50.00	55.55 \pm 3.95 a	88.85 \pm 1.25 b	92.86 \pm 2.57 b	90.25 \pm 0.05 b
MON (%)	2.00 - 10.00	24.85 \pm 2.65 a	2.80 \pm 0.20 b	2.05 \pm 0.75 b	2.75 \pm 0.05 b
EOS (%)	0.10 - 5.00	1.70 \pm 0.05 a	0.40 \pm 0.20 bc	0.60 \pm 0.40 b	0.10 \pm 0.00 c
BAS (%)	0.10 - 2.00	0.93 \pm 0.11 a	0.25 \pm 0.05 b	0.30 \pm 0.00 b	0.36 \pm 0.05 b

n = 3, X \pm SD. Valores con letras iguales por fila no son significativamente diferentes (P > 0.05). ERI: Eritrocitos, HGB: Hemoglobina, HCT: Hematocritos, VCM: Volumen corpuscular medio, HCM: Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Amplitud de distribución eritrocitaria, PTL: Plaquetas, VPM: Volumen plaquetar medio, LEU: Leucocitos, NEU: Neutrocitos, LIN: Linfocitos, MON: Monocitos, EOS: Eosinofilos, BAS: Basofilos.

Parámetros bioquímicos de la sangre

Los resultados toxicológicos de los parámetros bioquímicos en las ratas tratadas se muestran en el Cuadro 3 y 4 para extractos acuosos y etanólicos respectivamente. La glucosa (GLU) presentó un incremento con el extracto acuoso y etanólico de 189.50 y 160.66 mg/dL a 200 y 100 mg/kg respectivamente, las dosis empleadas con los extractos administrados presentaron diferencias significativas al ser comparados con el control que mostró 103.33 mg/dL. Al tratar las ratas con extracto acuoso la urea (URE) mostró un aumento de 47.91 mg/dL con 100 mg/kg valor que posteriormente disminuyó al incrementar la dosis a 200 mg/kg a 38.35 mg/dL; el extracto etanólico no presentó significancia estadística al ser comparado con el grupo control que mostró 42.33 mg/dL. El valor de creatinina (CRE) presentó aumento significativo con extracto acuoso y etanólico a 100 y 200 mg/kg con valores de 0.31 y 0.45 mg/dL respectivamente y ser comparado con el control que mostró 0.26 mg/dL. Estadísticamente los valores de ácido úrico (AUR) no presentaron significancia comparados con el control pero se observó una disminución en los parámetros de 0.96, 0.80 y 1.00 mg/dL al utilizar extractos acuosos y con extractos etanólicos disminuye a 0.76 y 0.83 en las dos primeras dosis

empleadas, pero con 200 mg/kg presentó un aumento de 2.26 mg/dL, mientras el control registró 1.30 mg/dL.

Los valores de colesterol (COL) no mostraron diferencias significativas con los extractos empleados, pero se observó un ligero aumento al utilizar la dosis de 50 y 200 mg/kg del extracto etanólico de 106.33 y 114.00 mg/dL y una disminución con el extracto acuoso de 83.33, 89.50 y 93.50 mg/dL con 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente y ser comparados con el control que mostró 97.33 mg/dL. Los valores de triglicéridos (TRI) mostraron un aumento con el uso del extracto etanólico de 172.33 y 181.33 mg/dL a 100 y 200 mg/kg comparado con el control que registró 151.33 mg/dL, y una disminución con extractos acuosos de 100.00, 115.00 y 129.00 mg/dL al emplear extractos acuosos a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg, mientras el grupo control registró 151.33 mg/dL (Cuadro 3). Las transaminasa glutámica oxalacética (TGO) mostró una disminución al administrar el extracto acuoso a 50 y 100 mg/kg con valores de 132.66 y 135.50 U/L respectivamente y aumenta a 173.00 U/L con la dosis de 200 mg/kg, así mismo los registros con el extracto etanólico presentan un aumento de 186.00, 227.66 y 447.00 U/L con 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente, mientras que el grupo control presentó 150.00 U/L. Los valores de transaminasa glutámica pirúvica (TGP) incrementaron al emplear extracto etanólico a 50, 100 y 200 mg/kg registrando 82.66, 121.66 y 182.66 U/L respectivamente, mientras que con el extracto acuoso sufrió una disminución de 63.00 U/L a 200 mg/kg; el grupo control presentó 70.00 U/L. Los niveles de albumina (ALB) aumentan con el extracto acuoso y etanólico a 100 y 50 mg/kg a 4.88 y 4.11 g/dL en comparación con el grupo control que mostró 3.16 g/dL. Los TRI disminuyeron al administrar extracto acuoso y los valores sufrieron un incremento con extracto etanólico a 100 y 200 mg/kg, en cambio a 50 mg/kg disminuyó al ser comprado con el control. De forma similar el AUR en las dosis empleadas disminuye con extracto acuoso y al administrarles extracto etanólico disminuye con las dosis de 50 y 100 mg/kg y sufre un aumento significativo con la dosis de 200 mg/kg. El COL disminuyó con el extracto acuoso y aumento con el extracto etanólico.

Cuadro 3. Efecto de extractos acuosos de *P. alliaceum* en los valores bioquímicos de sangre de ratas wistar.

Parámetros	Valor de Referencia	Grupo control	Concentración mg/kg/day		
			50	100	200
GLU (mg/dL)	65 - 110	103.33±12.01 b	179.33±29.28 a	165.50±2.50 a	189.50±2.50 a
URE (mg/dL)	15 - 43	42.33±5.68 ab	40.16±5.40 b	47.91±1.21 a	38.35±0.45 b
CRE (mg/dL)	0.7 - 1.5	0.26±0.03 b	0.21±0.02 c	0.31±0.00 a	0.31±0.01 a
AUR (mg/dL)	3.5 - 8.5	1.30±0.95 a	0.96±0.41 a	0.80±0.20 a	1.00±0.00 a
COL (mg/dL)	0 - 200	97.33±5.50 a	83.33±9.29 b	89.50±5.50 ab	93.50±1.50 ab
TRI (mg/dL)	30 - 150	151.33±38.55 a	100.00±25.70 b	115.00±30. a	129.00±38.00 a
TGO (U/L)	15 - 46	150.00±8.00 a	132.66±46.50 a	135.50±42.50 a	173.00±82.00 a
TGP (U/L)	13 - 66	70.00±21.00 a	70.33±12.58 a	59.33±5.51 a	63.00±9.00 ab
ALB (g/dL)	3.50 - 5.00	3.16±0.76 b	3.74±0.19 b	4.88±0.52 a	3.99±0.09 ab
GLO (g/dL)	2.1 - 3.5	2.69±0.21 a	2.45±0.18 a	2.57±0.24 a	2.60±0.03 a
PRO (g/dL)	6.30 - 8.20	5.86±0.55 b	6.19±0.06 b	7.45±0.76 a	6.59±0.12 ab

n = 3, X±SD. Valores con letras iguales por fila no son significativamente diferentes (P > 0.05). GLU: Glucosa, URE: Urea, CRE: Creatinina, AUR: Ácido úrico, COL: Colesterol, TRI: Triglicéridos, TGO: Transaminasa glutámica oxalacética, TGP: Transaminasa glutámica pirúvica, ALB: Albumina.

DISCUSIÓN

Pseudocalymma es una especie vegetal que contiene diversos principios bioactivos con potencial farmacológico que puede causar efectos benéficos y/o perjudiciales; Tomlinson & Akerele (1998) mencionan que la seguridad debe ser uno de los principales criterios de selección de especies medicinales útiles en salud pública. Saad et al. (2006) reportan que la preocupación de usuarios por falta de evidencia científica ha favorecido a realizar estudios respecto a la toxicidad y efectos perjudiciales de especies vegetales que son utilizados por las personas como medicamentos naturales.

Cuadro 4. Efecto de extractos etanólicos de *P. alliaceum* en los valores bioquímicos de sangre de ratas wistar.

Parámetros	Valor de Referencia	Grupo control	Concentración mg/kg/day		
			50	100	200
GLU (mg/dL)	65 - 110	103.33±12.01 b	158.33±8.32 a	160.66±9.45 a	160.33±11.50 ab
URE (mg/dL)	15 - 43	42.33±5.68 a	41.73±5.70 a	38.36±1.70 a	45.40±8.63 a
CRE (mg/dL)	0.7 - 1.5	0.26±0.03 a	0.25±0.02 a	0.30±0.05 a	0.45±0.14 b
AUR (mg/dL)	3.5 - 8.5	1.30±0.95 ab	0.76±0.05 b	0.83±0.30 ab	2.26±1.20 a
COL (mg/dL)	0 - 200	97.33±5.50 a	106.33±13.20 a	91.33±2.08 a	114.00±28.58 a
TRI (mg/dL)	30 - 150	151.33±38.55 a	140.66±55.89 a	172.33±27.22 a	181.33±20.03 a
TGO (U/L)	15 - 46	150.00±8.00 a	186.00±43.86 a	227.66±123.02 a	447.00±184.00 b
TGP (U/L)	13 - 66	70.00±21.00 b	82.66±5.68 b	121.66±70.81 ab	182.66±63.31 a
ALB (g/dL)	3.50 - 5.00	3.16±0.76 b	4.11±0.18 a	3.76±0.22 ab	4.10±0.11 a
GLO (g/dL)	2.1 - 3.5	2.69±0.21 a	2.57±0.12 a	2.75±0.11 a	2.72±0.20 a
PRO (g/dL)	6.30 - 8.20	5.86±0.55 b	6.68±0.23 a	6.51±0.26 a	6.82±0.10 a

n = 3, X±SD. Valores con letras iguales por fila no son significativamente diferentes (P > 0.05). GLU: Glucosa, URE: Urea, CRE: Creatinina, AUR: Ácido úrico, COL: Colesterol, TRI: Triglicéridos, TGO: Transaminasa glutámica oxalacética, TGP: Transaminasa glutámica pirúvica, ALB: Albumina.

En este estudio se encontró que el extracto acuoso y etanólico de *P. alliaceum* administrado oralmente durante 14 días no ocasionan mortalidad en las ratas tratadas. Los índices hematológicos ERI, HGB y HCM después de la administración de extractos de hojas no mostraron ninguna anomalía significativa, en cambio se mostró una disminución en los niveles de HCT, VCM, ADE, VPM, LEU, NEU, MON, EOS y BAS y un aumento en los parámetros CHCM, PTL y LIN. Los parámetros bioquímicos que sufrieron un aumento fueron GLU, CRE y ALB, mientras que URE disminuyó; los valores de TGO disminuyen con extracto acuoso a 50 y 100 mg/kg y aumenta al incrementar la dosis a 200 mg/kg, en cambio para extractos etanólicos las dosis empleadas ocasionaron un aumento en los niveles de este parámetro. El TGP disminuyó los valores con extracto acuoso y al utilizar extracto etanólico sufrió un incremento.

El hecho de que los ERI no mostrarán significancia estadística al utilizar los extractos vegetales, es indicativo de que existe un equilibrio entre la producción y destrucción de glóbulos rojos; los datos registrados en los valores de HGB demuestran que el extracto no afecta la serie roja lo que permite tener una disponibilidad de oxígeno normal para la función pulmonar y tisular de los tejidos y por ende de la función celular. Mitruka & Rawnsley (1993) mencionan que el incremento en el número de plaquetas es indicativo del estímulo en la biosíntesis de factores de coagulación y esto puede ser útil en el tratamiento

de hemorragias; en el presente trabajo se observó un aumento al utilizar extractos acuosos a 100 y 200 mg/kg y extractos etanólicos a 50, 100 y 200 mg/kg; la disminución registrada en el conteo de plaquetas al utilizar extracto acuoso a 50 mg/kg (391.00 U/L) comparado con el grupo control (579.00 U/L) indica que el extracto tuvo un efecto sobre la producción de plaquetas ocasionando una trombocitopenia inducida a esa dosis, lo que sugiere que *P. alliaceum* tiene actividad anti-hematopoyética como lo asevera Mdhluli (2003), las plaquetas son responsables del proceso destinado a reducir la pérdida de sangre y reparación de la lesión vascular conocido como hemostasia (Dahlback, 2007).

Las especies vegetales presentan compuestos químicos con diversos principios activos que las hacen útiles (Ocegueda et al. 2005), según Harnafi y Amrani (2007) comentan que las plantas que contiene flavonoides han mostrado acción a nivel de plaquetas en la prevención de trombosis y se reporta que extractos orgánicos de *P. alliaceum* contiene alcanos, alcanoles, triterpenos, flavonoides y derivados de lapachol y que flavonoides y polifenoles han presentado propiedad antioxidante y capacidad de disminuir los niveles de lípidos en sangre (das Graças et al. 2009; Cao et al. 1996). Gourley & Herfindal (2000) mencionan que el VCM es un parámetro que sirve de indicativo para determinar anemia microcítica y macrocítica, debido a que es un índice que mide el volumen promedio de eritrocitos (Morris y Davey, 1996), por lo tanto, la disminución observada en los valores de VCM con el extracto acuoso que registraron 62.70, 59.87 y 60.05 fL y con el extracto etanólico 61.97, 60.81 y 61.67 fL a 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente; no es un indicativo de anemia hemolítica ya que los valores obtenidos en este experimento caen dentro del rango de referencia para este parámetro en laboratorio (80.00 – 99.90 fL), mientras que el grupo control registro 70.75 fL. Adebayo et al. (2010) mencionan que una reacción normal de las ratas al administrarles sustancias extrañas al organismo es el aumento en el conteo de glóbulos blancos como un mecanismo de defensa del organismo que altera los procesos fisiológicos normales, sin embargo en el estudio se observó una leucopenia con la disminución de los valores de leucocitos en todas las concentraciones y extractos empleados. Sacher & McPherson (1991) comentan que los linfocitos son mediadores de la respuesta inmune específica contra patógenos, mientras que los neutrófilos son responsables de la fagocitosis; estos son mecanismos de defensa ante microorganismos invasores y eliminación de tejidos muertos.

En este estudio, la CRE aumento significativamente a dosis de 100 y 200 mg/kg con las extracciones empleadas en comparación con el grupo control, siendo este parámetro un indicador de insuficiencia renal (Hilaly et al. 2004; Rahman et al. 2001). El nivel de creatinina se redujo al tratar las ratas con 50 mg/kg del extracto acuoso lo que indica que el extracto no fue tóxico para el riñón a esa concentración. La TGO o Aspartato Aminotransferasa (AST) aumentó súbitamente al administrar el extracto etanólico a las tres dosificaciones empleadas, sin embargo con la extracción acuosa a 50 y 100 mg/kg disminuyó y se registró un aumento con 200 mg/kg.

La TGO está presente casi en todos los órganos y cuando se encuentra en sangre a niveles muy elevados significa que ha habido destrucción celular, tal es el caso de los resultados obtenidos al utilizar extractos etanólicos en este estudio. La TGP o Alanina Aminotransferasa (ALT) no presentó cambio al utilizar extractos acuosos, pero sufrió un incremento con la extracción etanólica con las dosis administradas. La TGP se localiza en el hígado y su función es la fabricación de glucosa. Las transaminasas son enzimas que sirven de indicadores de la función hepática y como biomarcadores de toxicidad y el aumento de estas enzimas en la sangre indica la existencia de una lesión celular en el hígado, corazón, riñones o músculos (Rahman et al. 2001). Por lo tanto, los resultados registrados en este estudio indican que *P. alliaceum* altera la función hepática y renal de las ratas tratadas con extracciones etanólicas y con el extracto acuoso a 200 mg/kg. La disminución presentada de la TGO con dosis de 50 y 100 mg/kg y de la TGP con 100 y 200 mg/kg al administrar extractos acuosos posiblemente se debe a la presencia de flavonoides en los extractos empleados, tal y como lo mencionan Singab et al. (2005) y Wu et al. (2006) en estudios con *Vicia calcarata* Desf. Y *Lagdera alata* (D. Don) donde lograron reducir los niveles de TGO y brindarle protección al hígado.

El aumento en el nivel de URE cuando se trató las ratas con 100 y 200 mg/kg del extracto acuoso y etanólico respectivamente es indicativo de azotemia, pero se observó una disminución de los valores de URE con las demás concentraciones y extractos empleados. Los TRI a concentraciones de 100 y 200 mg/kg disminuyen a 100.00, 140.66, 122.00 y 106.33 mg/dL con el extracto acuoso y etanólico respectivamente y el COL disminuye sus valores con el extracto acuoso a las tres concentraciones evaluadas lo que denota una posible acción cardioprotectora, resultados similares son reportados por Verma et al. (2012) donde mencionan que el extracto de hojas de *Pachyptera hymenaea* (DC.) (syn: *P. alliaceum*) evaluado en ratas presentó actividad hiperlipidémica a dosis bajas y antihiperlipidémica a dosis altas. Srinivasan & Srinivasan (1995) al incorporar flores secas de *P. alliaceum* en la dieta de ratas experimentales por seis semanas observaron disminución del colesterol en la sangre.

En conclusión, la ingesta diaria durante 14 días de *Pseudocalymma alliaceum* no produce toxicidad aguda a 50 mg/kg que pudieran ser interpretadas como signos tóxicos o de daño biológico, pero altera la función hepática y renal a dosificaciones de 100 y 200 mg/kg; su capacidad de reducción de glóbulos blancos podría considerarse para estudios específicos en el tratamiento de pacientes con leucemia.

LITERATURA CITADA

Abolaji, O. A., A. H. Adebayo & O. S. Odesanmi. 2007. Nutritional qualities of three medicinal plant parts (*Xylopiya aethiopica*, *Blighia sapida* and *Parinari polyandra*) commonly used by pregnant women in the western part of Nigeria. Pak. J. Nutr. 6: 665-668.8n.

- Adebayo, A. H., A. O. Abolaji, T. K. Opatá and I. K. Adegbenro. 2010. Effects of ethanolic leaf extract of *Chrysophyllum albidum* G. on biochemical and haematological parameters of albino Wistar rats. *African Journal of Biotechnology* 9(14): 2145-2150
- Berg, M. E. 1993. *Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 2nd ed. rev. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke.
- Cao, G., Sofic, R. L., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 3421–3426.
- Dahlback B (2007). Blood coagulation. *Lancet*; 355: 1627-1632. In: Bertram G. Katzung. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th Ed. Boston, USA. pp. 543-558.
- das Graças, M., Zoghbi, B., Oliveira, J., Skelding, G. M. & Guilhon, P. 2009. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(3): 795-804.
- Dugasani, S. L., Balijepalli, M. K. & Pichika, M. R. 2009. Growth inhibition and induction of apoptosis in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cells by *Adenocalymma alliaceum* flowers. *Curr Trends Biotechnol*. 3:278 –286.
- Fischer, E.; Theisen, I.; Lohmann, L. G. In: *The families and genera of vascular plants*; Kadereit, J. W., ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 2004, vol. 7.
- Goleniowski, M. E., G. A. Bongiovanni, L. Palacio, C. O. Nuñez & J. J. Cantero. 2006. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 324–341.
- Gourley ET, Herfindal DR (2000). *Textbook of Therapeutics: Drug and Disease Management*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p. 83.
- Harnafi, H. and Amrani, S. 2007. Flavonoids as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. *Pharmacognosy Reviews*. 1(2): 193-202.
- Hasrat, J. A., De Backer, J. P., Vanquelin, G. & Vlietinck, A. J. 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plant extracts for receptor binding activity. *Phytomedicine*. 4: 59-65.
- Hilaly, J.E., Israili, Z.H., Lyouss, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 43–50.
- Itokawa, H., Matsunoto, K. & Takeya, K. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry*. 31: 1061–1062.
- Keter, L. K. & P. C. Mutiso. 2012. Ethnobotanical studies of medicinal plants used by Traditional Health Practitioners in the management of diabetes in Lower Eastern Province, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 74 – 80.
- Maroyi, A. 2011. An ethnobotanical survey of medicinal plants used by the people in Nhema communal area, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*. 136: 347–354.

- Mdhluli, M., 2003. Toxicological and antifertility investigations of oleanolic acid in male vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*). PhD Thesis. Discipline of Physiological Sciences, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa.
- Mitruka BM, Rawnsley HM (1993). Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental animals. In: Ernest D. Olfert; Brenda M. Cross; and A. Ann McWilliam Ed. Guide to the care and use of experimental Animals. 1: Appendix IV: a publication of the Canadian Council on Animal Care.
- Morris MW, Davey FR (1996). Basic Examination of Blood. In: Henry JB ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 549-593.
- Naik, V. N. 1998. Flora of Marathwada. Amrut Publication, Aurangabad, India, p. 646.
- Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. Biodiversitas. Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. No. 62. México, D.F. pp. 12-15.
- Ogbonnia, S., A. A. Adekunle, M. K. Bosa & V. N. Enwuru. 2008. Evaluation of acute and subacute toxicity of *Alstonia congensis* Engler (Apocynaceae) bark and *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) fruits mixtures used in the treatment of diabetes. Afr. J. Biotechnol. 7(6): 701-705.
- Rahman, M.F., Siddiqui, M.K., Jamil, K., 2001. Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. Human and Experimental Toxicology 20, 243–249.
- Rao, L. J. M., P. Srinivas and K. N. Gurudutt. 1999. Chemical composition of the volatile oil from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum*). J Med Arom Pl Sci. 21: 987 – 989.
- Rugkeart, C., Tanomjit, S., Niwan, I., Sopa, K., Natemata, J., Brenjaporn, C. & Arunaporn, I. 2005. Study on biological activities of *Mansao hymenaea* (DC.) A. Gentry leaf extract. Thai Herbs. 27: 399–495.
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, S., 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 3, 433–439.
- Sacher RA, McPherson RA (1991). Widmann's Clinical interpretation of laboratory tests. 10th Ed. Philadelphia: F. A. Davis, pp. 1-6.
- Singab, A.N., Youssef, D.T., Noaman, E., Kotb, S., 2005. Hepatoprotective Effect of flavonol glycosides rich fraction from Egyptian *Vicia calcarata* Desf. against CCl₄-induced liver damage in rats. Archives of Pharmacal Research 28, 791 – 798.
- Srinivasan, M. R. & Srinivasan, K. 1995. Hypocholesterolemic efficacy of garlic-smelling flower *Adenocalymma alliaceum* Miers. in experimental rats. Indian J Exp Biol. 33: 64-66.

- Tang, M. 2007. Producción de plantas Amazónicas con propiedades cosméticas y/o medicinales y sus productos derivados en el ámbito de la Cordillera Escalera, con fines de consumo interno y exportación. Proyecto Bosques del Chinchipe 1: 46.
- Taylor, L. N. D. 2005. The Healing Power of Rainforest Herbs. Square One Publishers, Inc. Garden City Park, New York. 583 pp.
- Tomlinson, T.R., Akerele, O., 1998. Medicinal Plants their Role in Health and Biodiversity. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.
- Verma, P. R., Deshpande, S. A., Kamtham, Y. N. & Vaidya, L. B. 2012. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects from an aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) leaves in rats. Food Chemistry. 132: 1251–1257
- WHO (World Health Organization), 2008. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems, Geneva.
- Wu, Y., Wang, F., Zheng, O., Lu, L., Yao, H., et al. 2006. Hepatoprotective Effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. Journal of Biomedical Science 13, 569 – 578.
- Zoghbi, M. G. B., Ramos, L. S., Maiya, J. G. S., De Silva, M. L., Lun, A. I. R. 1984. Volatile studied of the Amazonian garlic bush. Journal of Agriculture and food Chemistry. 32: 1009 - 1010.