



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

**EVALUACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES
CON POTENCIAL EN EL CONTROL
BIOLÓGICO DEL VECTOR TRANSMISOR
DE DENGUE *Aedes aegypti***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:

ING. AGR. IVÁN BÁEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL ROSARIO RUÍZ GUERRERO

M. EN C. MARIANA MIRANDA ARAMBULA



Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de L siendo las 11 horas del día 17 del mes de junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA

para examinar la tesis de titulada:

EVALUACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES CON POTENCIAL EN EL CONTROL BIOLÓGICO DEL VECTOR TRANSMISOR DE DENGUE *Aedes Aegypti*.

Presentada por el alumno:

Iván

Apellido paterno

Báez

Apellido materno

Rodríguez

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	1	0	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

La Maestría en Biotecnología Aplicada

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. María del Rosario Ruiz Guerrero

M en B. Mariana Miranda Arambula

Dra. María del Carmen Cruz López



M en C. Lucila Aldana Llanos

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal el día 15 del mes de Octubre del año 2010 el (la) que suscribe Ing. Iván Báez Rodríguez alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B081108, adscrito a CIBA-IPN TLAX, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. María del Rosario Ruiz Guerrero y cede los derechos del trabajo intitulado “EVALUACION DE PLANTAS MEDICINALES CON POTENCIAL EN EL CONTROL BIOLOGICO DEL VECTOR TRANSMISOR DE DENGUE *Aedes aegypti*”, 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 rosarior@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ing. Iván Báez Rodríguez.

Nombre y firma

Resumen.

Se estima que existen 50 millones de casos de dengue al año en todo el mundo y prácticamente una tercera parte de la población mundial se encuentra en riesgo de padecer dengue. Esta enfermedad viral es transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*. Aun no se ha desarrollado una vacuna efectiva para la misma, por lo que la principal medida de prevención es el control del vector. Dentro de los planes de contingencia de este insecto es común emplear insecticidas sintéticos, pero la eficacia de estos productos se ha puesto en entredicho por los problemas en salud y medio ambiente que provocan.

Por lo que el propósito de este trabajo fue evaluar el potencial de los extractos obtenidos de las siguientes plantas medicinales: *Argemone mexicana* (Papaveraceae), *Tagetes lucida* (Asteraceae), *Hippocratea excelsa*, *H. Celastroides* (Hippocrateaceae), *Pseudosmodium perniciosum* (Anacardiácea), *Cissus hypoglauca* (Vitaceae), *Ficus benjamina* (Moraceae); en el control larvario de *A. aegypti*.

La metodología que se llevó a cabo en este estudio optó por una extracción fraccionada, de manera consecutiva, con hexano, acetato de etilo, acetona y metanol. Con el fin de lograr una separación de los metabolitos presentes en la planta.

Paralelamente se estableció el protocolo para el pie de cría de *A. aegypti*, con énfasis en la obtención de huevecillos de tercera generación. Los extractos crudos se probaron en las larvas obtenidas para determinar la toxicidad. Los extractos que presentaron una actividad interesante fueron sometidos a pruebas colorimétricas, para determinar la presencia de grupos de compuestos.

Dentro de los resultados se encontró que el desarrollo embrionario se concreta en 60 HDO (Horas Después de la Ovoposición) en Iguala, mientras que en el laboratorio de Tlaxcala se extiende a 74 HDO. Los huevecillos adquieren una alta resistencia a la desecación después de 12-15 HDO.

Los extractos con mayor actividad larvicida han sido obtenidos de la corteza de *P. perniciosum* y la semilla de *A. mexicana*, con dosis letales medias menores a 100 ppm. En las semillas de *A. mexicana* se logró detectar alcaloides, taninos del tipo catecólico, fenoles, esteroides y/o terpenoides.

Hasta el momento no se había documentado la actividad de *P. perniciosum* sobre larvas de *A. aegypti*. En los extractos de la corteza de *P. perniciosum* se detectaron taninos, fenoles, esteroides/terpenoides, cumarinas, flavonoides y glucósidos.

Abstrac.

There are an estimated 50 million cases of dengue fever per year worldwide and nearly a third of the world population is at risk for dengue. This viral disease is transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. Has not yet developed an effective vaccine for it, so the main preventive measure is vector control. Within the contingency plans of this insect is common to use synthetic insecticides, but the effectiveness of these products has been among the problems that health and the environment they cause.

So the purpose of this study was to evaluate the potential of the following extracts from medicinal plants: *Argemone mexicana* (Papavaracea), *Tagetes lucida* (Asteraceae), *Hippocratea excelsa*, *H. Celastroides* (Hippocrateaceae) *Pseudosmodingium perniciosum* (Anacardiácea), *Cissus hypoglauca* (Vitacea), *Ficus benjamina* (Moracea) in controlling larvae of *A. aegypti*.

The methodology was carried out in this study opted for a fractional extraction, consecutively, with hexane, ethyl acetate, acetone and methanol. In order to achieve a separation of the metabolites present in the plant.

Same protocol was established for seedstock *A. aegypti*, with emphasis on obtaining third generation eggs. The crude extracts were tested in larvae obtained to determine the toxicity. The extracts showed an interesting activity were subjected to colorimetric tests to determine the presence of groups of compounds.

Among the results was found to be specific embryonic development in 60 HDO (Horas Después de la Ovoposición) in Iguala, while in the laboratory of Tlaxcala extends to 74 HDO. The eggs take on a high resistance to desiccation after 12-15 HDO.

The extracts with higher larvicidal activity were obtained from the bark of *P. perniciosum* and the seed of *A. Mexicana*, with lethal doses below 100 ppm. In the seeds of *A. Mexicana* was achieved to detect alkaloids, catechol tannins, phenols, sterols and / or terpenoids.

So far there had documented the activity of *P. perniciosum* on larvae of *A. aegypti*. In extracts from the bark of *P. perniciosum* detected tannins, phenols, sterols / terpenoids, coumarins, flavonoids and glycosides.

CONTENIDO.

CAPITULO I INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.3 JUSTIFICACIÓN	6
1.4 HIPOTESIS	7
1.5 OBJETIVOS	8
1.5.1 Objetivo general	8
1.5.2 Objetivos específicos	8
CAPITULO II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 INTRODUCCIÓN	10
2.2 PLANTAS MEDICINALES: HISTORIA Y USO	11
2.3 PRODUCTOS NATURALES	13
2.4 LAS PLANTAS A ESTUDIAR	16
2.4.1 <i>Argemone mexicana</i> (L)	16
2.4.2 <i>Cissus hypoglauca</i> (A. Gray).	17
2.4.3 <i>Pseudosmodium perniciosum</i> Engl.	18
2.4.4 <i>Ficus benjamina</i> (L).	19
2.4.5 <i>Hippocratea excelsa</i> e <i>H. celastroides</i>	20
2.4.6 <i>Tagetes lucida</i>	21
2.5. DESCRIPCIÓN DEL DENGUE	23
2.5.1 Transmisión y epidemiología	24
2.5.2 Ciclo de vida del Vector-transmisor	26
2.5.3 Control del Vector-transmisor	28
2.5.4 Campañas de control en México	28
2.5.5 Bioinsecticidas	30
CAPITULO III METODOLOGÍA	37
EXTRACCIÓN	38
3.1 PLANTAS	39
3.1.1 Material vegetal	39

3.1.2 Extracción y destilación	41
3.2 PIE DE CRÍA DE <i>Aedes aegypti</i>	44
3.2.1 Protocolo para el establecimiento del pie de cría	45
3.2.2 Protocolo para la obtención de huevecillos de <i>A. aegypti</i>	46
3.2.2.1 <i>Dinámica del desarrollo embrionario de A. aegypti</i>	47
3.2.2.2 <i>Manejo de los huevecillos en laboratorio, (prueba del pincel)</i>	48
3.3 PRUEBA PRELIMINAR DE ACTIVIDAD LARVICIDA	50
3.4 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS	53
3.4.1 Detección de Alcaloides	53
3.4.2 Detección de Flavonoides	54
3.4.3 Detección de Esteroles y Terpenoides	54
3.4.4 Detección de Cumarinas	55
3.4.5 Glucósidos Cardiotónicos	55
3.4.6 Detección de Saponinas	56
3.4.7 Detección de compuestos fenólicos/taninos	56
CAPITULO IV RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN	57
4.1 EXTRACCIÓN	58
4.1.1. Extractos crudos	58
4.1.2 Análisis en Cromatografía en Capa Fina.	58
4.2 INSECTOS	59
4.2.1 Establecimiento del pie de cría	59
4.2.1.1 <i>Protocolo para la obtención de huevecillos de A. aegypti</i>	59
4.2.1.2 <i>Manejo de los huevecillos en laboratorio, (Prueba del Pincel)</i>	62
4.4 PRUEBA PRELIMINAR DE ACTIVIDAD LARVICIDA	64
4.5 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS	74
CAPITULO V CONCLUSIONES	77
5.1 CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	80

Índice de Tablas.

Tabla 2.1. Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	31
Tabla 3.1. Listado general de extractos evaluados en el experimento.....	51
Tabla 4.1. Rendimiento obtenido de los extractos de las plantas evaluadas (%).....	58
Tabla 4.2. Dosis letales medias calculadas a 24 y 48 horas de los extractos.....	65
Tabla 4.3. Principales familias de compuestos químicos encontrados en <i>A. mexicana</i> semilla y <i>P. Perniciosum</i> corteza.....	76

Índice de Cuadros.

Cuadro 3.1 Referencias geográficas de las colectas de las plantas estudiadas.....	39
Cuadro 3.2. Intervalos de tiempo a los que se deshidrataron huevecillos de <i>A. aegypti</i>	48
Cuadro 4.1 Dosis letales medias (mg/L) de los once mejores extractos a 28 y 48 horas sobre larvas de cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	70
Cuadro 4.2 Dosis letales medias (mg/L) de los extractos mas tóxicos a 28 y 48 horas sobre larvas de cuarto instar de <i>A. aegypti</i>	71

Índice de Figuras.

Figura 2.1 Esquema general del metabolismo secundario del Carbono...	15
Fotografía 2.1 <i>Argemone mexicana</i>	17
Figura 2.2 Estructura química de la sanguinarina.....	17
Fotografía 2.2 Estructuras de <i>Pseudosmodingium perniciosum</i> Engl., de izquierda a derecha detalle de ramas; ápice terminal, hojas; y tallo.....	18
Figura 2.3 Estructura del Urushiol, donde R es una cadena hidrocarbonada.....	19
Fotografía 2.3 Ejemplar maduro de <i>Ficus benjamina</i>	19
Fotografía 2.4 A la izquierda <i>H. excelsa</i> , nótese las semillas y el tallo en cruz. Derecha detalle de una hoja de <i>H. celastroides</i> , note el borde serrado.....	21
Figura 2.4 Compuestos aislados de <i>H. excelsa</i>	21
Fotografía 2.5 <i>T. lucida</i> mostrando la típica fisiología de esta planta.....	22
Figura 2.5 Cumarinas y flavonoides aislados de <i>Tagetes lucida</i>	22
Imagen 2.1 Petequia característica de FDH.....	23
Fotografía 3.1 Colecta de algunas especies usadas en este estudio.....	40
Fotografía 3.2 Material vegetal seco y molienda del mismo.....	40
Fotografía 3.3 Macerado del material vegetal en el laboratorio.....	41
Fotografía 3.4 Condensado de los extractos crudos al vacío.....	42
Figura 3.1 Esquema general de trabajo.....	43
Fotografía 3.5 Asesorías para iniciar el pie de cría por personal de CONAVE.....	44
Fotografía 3.6 Trampa de apareamiento para adultos de <i>A. aegypti</i>	45
Fotografía 3.7 Puntos regulares de muestreos de las palanganas de ovipostura recién cosechadas.....	48

Fotografía 3.8 Prueba del pincel. Nótese la disposición de los huevecillos para facilitar el conteo.....	49
Fotografía 3.9 Huevecillos vistos al microscopio (4X), el de la Izquierda se encuentra dañado por deshidratación, y el de la derecha no presenta ningún daño.....	50
Fotografía 3.10 Elaboración de soluciones de prueba.....	50
Figura 4.1 CCF y revelado con UV y KOH de algunos extractos.....	59

Índice de graficas.

Grafica 4.1 Historial de Temperatura y humedad Relativa en Iguala Gro y Tlaxcala en el experimento.....	60
Grafica 4.2 Desarrollo embrionario de <i>A. aegypti</i> en dos condiciones distintas.....	61
Grafica 4.3 Evaluación del porcentaje de huevecillos dañados al deshidratarlos al intervalo Indicado.....	61
Grafica 4.4 Evaluación del porcentaje de huevecillos que eclosionaron al deshidratarlos al intervalo Indicado.....	62
Grafica 4.5 Historial de viabilidad obtenida para huevecillos cosechados en el laboratorio de Tlaxcala.....	63
Grafica 4.6 Toxicidad de los testigos positivos y negativos, así como de los disolventes empleados.....	69
Gráfica 4.7 Varianza de la toxicidad de los extractos (Para abreviaciones ver cuadro 4.1).....	72
Grafica 4.8 Tendencia de la toxicidad de los extractos a las 24 y 48 horas (para abreviaciones ver cuadro 4.1.....	73

Índice de Esquemas.

Esquema 2.1 Ciclo de Vida del mosquito <i>A. aegypti</i>	26
Esquema 3.1 Representación de la obtención de F3 de <i>A. aegypti</i> en laboratorio.....	46
Esquema 3.2 Metodología para la obtención de huevecillos viables de <i>A. aegypti</i>	49

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos del género *Aedes*, entre los que *A. aegypti* es el más importante. La infección puede ser asintomática o con síntomas de moderados a agudos. Clínicamente se reconocen dos cuadros: (a) Fiebre del dengue (FD) y (b) Fiebre de dengue Hemorrágico (FDH), al complicarse este último se desarrolla el Síndrome de Shock por dengue (SSD). Se estima que existen 50 millones de casos al año en todo el mundo y prácticamente una tercera parte de la población mundial se encuentra en riesgo de padecer este problema, en especial en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente no se ha desarrollado una vacuna efectiva para esta enfermedad, por lo que la principal medida de prevención sigue siendo el control del vector transmisor en su fase larvaria o adulta.

Las campañas para controlar las poblaciones de estos insectos se basan en la aplicación de insecticidas sintéticos como el Temefos, DDT, Dieldorvos, entre otros. Sin embargo contaminan el ambiente, afectan a insectos no blanco, son tóxicos a mamíferos y ocasionan resistencia en el insecto blanco.

Existen numerosos trabajos que demuestran que los extractos de algunas plantas son efectivos en el control larvario de *A. aegypti* {Rajkumar and Jebanesan (2010), Sreelatha *et al.*; (2010), Vila *et al.*; (2010), , Cheng *et al.*; (2009), Cheng *et al.* ; (2009b), Vidal *et al.*; (2009), Vineetha y Murugan (2009), Chapagain *et al.*; (2008), Cheng *et al.*; (2008), Chowdhury *et al.*; (2008), Coria *et al.*; (2008) Omena *et al.*; (2007), Dharmagadda *et al.*; (2005), Prajapati *et al.*; (2005), Rajkumar and Jebanesan (2005), Barreira-Cavalcanti (2004), Sivagnaname y Kalyanasundaram (2004), Anyaele y Amusan (2005), Sakthivadivel y Thilagavathy (2003)}. Algunas ventajas de estos extractos o bio-insecticidas es que son específicos, no persistentes,

CAPITULO I

biodegradables, ambientalmente amigables, minimizan el uso de insecticidas sintéticos, son económicos y ofrecen una buena opción para el control integrado.

Estos antecedentes exhortan a continuar los estudios sobre el uso de los productos naturales contra el vector transmisor de dengue. Cabe destacar que en nuestro país, dada la diversidad vegetal y el fácil acceso al que la población en general tiene a esta, resulta muy interesante evaluar diversas plantas de uso popular contra este vector.

Por lo anterior el propósito de este trabajo fue evaluar el potencial de los extractos de las siguientes plantas medicinales: *Argemone mexicana* (Papavaracea), *Tagetes lucida* (Asteracea), *Hippocratea excelsa*, *H. Celastroides* (Hippocrateaceae), *Pseudosmodium perniciosum* (Anacardiácea), *Cissus hypoglauca*. (Vitacea), *Ficus benjamina*. (Moracea); en el control larvario de *A. aegypti*. Estas plantas son nativas de México y se encuentran dentro de la región de estudio.

Este trabajo se divide en cinco capítulos. El Capítulo uno, destinado a la Introducción, aborda desde la problemática hasta los objetivos del presente trabajo. En el Capítulo dos se presenta una revisión bibliográfica sobre los productos naturales, su historia y uso en México así como las principales rutas de biosíntesis de productos naturales. También se realiza una descripción de las plantas a utilizar, y algunos principios activos que se han aislado de ellas. Por último se hace una breve descripción de la fiebre de dengue y del vector *A. aegypti* que lo transmite.

El Capítulo tres se destina a la metodología empleada para la obtención de los extractos; el establecimiento del pie de cría para la obtención de larvas de *A. aegypti*; así como el protocolo empleado en los bioensayos para evaluar la toxicidad de los extractos. El Capítulo cuatro se centra en los

resultados obtenidos, el análisis y discusión de los mismos. En el Capítulo cinco se destacan las conclusiones generales del trabajo.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El *A. aegypti*, transmisor del dengue o fiebre de dengue (FD) es considerado un insecto adaptable y con una gran capacidad reproductiva, lo cual dificulta sobremanera el control de las poblaciones de este insecto. En otro aspecto aun no existe una vacuna disponible para el virus de la FD. Estos factores son determinantes al diseñar un plan de control para evitar la propagación del vector y la enfermedad que transmite. Dentro de los planes de contingencia y control es una práctica común el empleo de insecticidas y larvicidas sintéticos, sin embargo la eficacia de estos productos se ha puesto en entredicho por los grandes problemas en salud y medio ambiente que suelen provocar.

Por lo anterior la identificación de compuestos nuevos y efectivos es esencial para combatir el incremento en las tasas de resistencia del vector, disminuir el uso de organofosforados, organoclorados y de los piretroides sintéticos, y garantizar la seguridad del medio ambiente y de los alimentos. Actualmente un número creciente de investigadores están reconsiderando la investigación de activos fitoquímicos como una posible solución.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Desde que las plantas existen en la tierra, han co-evolucionado con los insectos que se alimentan de ellas. Tal es el caso de varios insectos del orden díptera (Hirzel et al.; 2004), emparentados taxonómicamente con el mosquito *A. aegypti*. En el transcurso de millones de años de interacción planta-insecto las primeras desarrollaron mecanismos de defensa contra estos últimos; produciendo compuestos de acción tóxica, repelente, esterilizante, anti-alimentaria, paralizante e incluso atrayente. Son estos compuestos los que pueden ser aplicados en la lucha para el control de insectos plaga y/o vectores (Hwee-Ling et al.; 2009, Shaalan et al.; 2005).

En este trabajo planteamos la posibilidad de implementar el uso de extractos vegetales, con el objetivo de tratar al vector principal causante de FD y FDH. Se propone trabajar con *Argemone mexicana*, *Cisus sp.*; *Pseudosmodingium perniciosum*, *Ficus benjamina.*; *Hippocratea excelsa*, *H. celestroides* y *Tagetes lucida*, de las cuales ya existen para algunas de ellas antecedentes efectivos en el control biológico de insectos {Rajkumar and Jebanesan (2010), Sreelatha et al.; (2010), Vila et al.; (2010), , Cheng et al.; (2009), Cheng et al. ; (2009b), Vidal et al.; (2009), Vineetha y Murugan (2009), Chapagain et al.; (2008), Cheng et al.; (2008), Chowdhury et al.; (2008), Coria et al.; (2008) Omena et al.; (2007), Dharmagadda et al.; (2005), Prajapati et al.; (2005), Rajkumar and Jebanesan (2005), Barreira-Cavalcanti (2004), Sivagnaname y Kalyanasundaram (2004), Anyaele y Amusan (2005), Sakthivadivel y Thilagavathy (2003)}.

1.4 HIPOTESIS

Existen al menos 150 reportes del uso de extractos de plantas medicinales para el control del vector transmisor del dengue *A. aegypti*. Sin embargo estos reportes provienen de especies colectadas en otros países. Por lo que consideramos que los extractos de las plantas colectadas en México: *A. mexicana*, *P. perniciosum*, *H. excelsa*, *H. celastroides*, *Ficus benjamina.*, *Cissus hypoglauca*, y *T. lucida*, presentaran una actividad larvicida interesante o semejante a lo ya reportado. Además la facilidad y familiaridad con que las plantas medicinales son usadas en nuestro país como remedio, deberá favorecer su uso en las mismas zonas geográficas donde coexisten con el mosquito *Aedes aegypti*, enriquecido esto con un estudio previo en laboratorio.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad larvicida de los extractos obtenidos de siete plantas medicinales (*Hippocratea excelsa*, *Hippocratea celastroides*, *Tagetes lucida*, *Argemone mexicana*, *Pseudosmodium perniciosum*, *Cissus hypoglauca*, y *Ficus benjamina*.) en bioensayos de efectividad, en larvas de cuarto estadio del mosquito *Aedes aegypti*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Obtener los extractos crudos en diferente polaridad y de manera consecutiva (hexano, acetato de etilo, acetona y metanol) de las diferentes estructuras vegetales: flores, hojas, tallos y raíces de las plantas.
- Establecer el pie de cría del insecto *Aedes aegypti* en laboratorio.
- Determinar las condiciones necesarias para la obtención de huevecillos de *A. aegypti*.
- Mantener el pie de cría de *Aedes aegypti* hasta llegar a la tercera generación (F₃) y obtener larvas F₃ de cuarto instar para las pruebas biológicas.
- Evaluar extractos biodirigidos en larvas de cuarto instar de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio.
- Determinar las dosis letales medias de los extractos obtenidos por medio del análisis Probit con el método de Finney.
- Identificar a partir de pruebas colorimétricas la presencia de metabolitos en los fitoextractos con actividad larvicida remarcable.

CAPITULO II
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

Existen numerosos reportes sobre el control de plagas de interés en los que se ha empleado extractos de plantas (Jbilou *et al.*; 2008, Hernández, *et al.*; 2006, Anyaele y Amusan 2005). Las más atractivas para su estudio, son las consideradas como medicinales. Este carácter medicinal le ha sido adjudicado a la planta, por la cultura popular al tener un efecto benéfico en el tratamiento de algún padecimiento.

Invariablemente este efecto benéfico no es más que el resultado de los principios activos que de una u otra manera se encuentran en los tejidos de la planta. La actividad benéfica o de interés bien puede deberse a un solo componente, o a la interacción de varios de ellos. Al fenómeno en el que varios principios activos actúan de una manera conjunta y potencian los efectos esperados, se le llama sinergia.

Como ya se ha mencionado el objetivo de este trabajo es evaluar los extractos de siete plantas medicinales sobre larvas del mosquito *A. aegypti*, y resulta muy importante conocer, al menos de manera parcial, los tipos de compuestos presentes en dichas plantas.

A continuación se muestra la reseña de cada una de las plantas con las que se propuso trabajar y de manera general aspectos relevantes sobre el mosquito *A. aegypti*, la enfermedad que transmite y las principales líneas que se siguen para su control.

2.2 PLANTAS MEDICINALES: HISTORIA Y USO

El uso de las plantas por el hombre, desde siempre, ha tenido distintos fines. Desde la obtención de alimentos, manufactura de ropa, calzado, como material para construcción, fabricación de armas, herramientas y utensilios. Sin embargo uno de los aspectos más llamativos es su uso para el tratamiento de enfermedades.

En general se asume que el uso de plantas medicinales en culturas indígenas se basa en una profunda tradición (medicina tradicional), basada en años de experimentación (Hirzel *et al.*; 2004).

La herencia cultural de los pueblos de México se puede apreciar en los códices, en los vestigios arqueológicos (estelas, murales, dinteles, pirámides), o en los restos vegetales, donde la flora medicinal tiene un papel preponderante. Los códices mixtecos y mayas nos hablan de los ritos, la agricultura, la astronomía y la medicina de estas civilizaciones.

Los textos del *Chilam Balam* y el *Popol Vuh* nos acercan a su historia y a sus costumbres; en estos documentos se mencionan algunas plantas medicinales que en la actualidad encontramos en los estados de Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.

El Códice Badiano —conocido también como Códice De la Cruz-Badiano, o por su título en latín *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Libro de las hierbas medicinales de los indios) — es un escrito sobre la herbolaria mexicana, escrito originalmente en náhuatl por el xochimilca Martín de la Cruz —alumno del Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco— hacia 1552.

El libro sobre herbolaria medicinal mexicana de Martín de la Cruz es un importante legado para botánica y la medicina tradicionales. Todavía en años recientes, su estudio permitió al grupo del doctor José Luis Mateos, en el Instituto Mexicano del Seguro Social, encontrar el principio activo del

cihuapahtli o zoapatle (Mateos *et al.*; 1976). De la Cruz cita que este vegetal se empleaba para facilitar el parto. Las investigaciones ratificaron que el zoapatle contiene un poderoso ocitósico (provoca la contracción del útero). Toda la sabiduría contenida en este libro fue heredada por los químicos orgánicos mexicanos de este siglo, que han sobresalido en el terreno internacional con sus investigaciones sobre productos naturales.

En México los sacerdotes mayas o “Chilanes” eran los encargados de las curaciones medicas (Leonti *et al.*; 2003). Como ejemplo algunas de las plantas que utilizaban eran el epazote, el maguey, el pirul, hierba de la cucaracha, hierba de san Juan, sabadilla, higuierilla y muchas más. Rodríguez-Hernández (2005) reporta el uso de varias especies, se mencionan como ejemplo:

1. *Haplophyton cimidum* (hierba de la cucaracha). Esta especie fue utilizada por los Aztecas para matar cucarachas. Actualmente se ha constatado su actividad plaguicida en ácaros, crustáceos, garrapatas, algunos insectos y roedores, dicha actividad ha sido atribuida a la presencia de varios alcaloides.
2. *Ricinus communis* (Higuierilla). Se ha empleado para el combate *Phitophthora infestans* y mosquita blanca en Oaxaca, en Puebla se le utiliza en solución acuosa para el control de las plagas del maíz. En Chiapas se usa en macerado para el control de la broca del Café.
3. *Schoenocaulon officinale* (Sabadilla). Se le atribuyen propiedades insecticidas, acaricidas, rodenticidas. Es efectiva en el combate de chicharritas, chinches, gusanos, plagas de jitomate, piojos, trips y mosquitos. Se ha detectado la presencia de una compleja mezcla de alcaloides en la planta.

También se ha documentado el uso de *Adiantum capillus-veneris* L., mejor conocido como sanguinaria o pelo de Venus, es un helecho nativo de México. Se le usa externamente en mordidas de serpientes, o bien como

tónico para el crecimiento del cabello. También se pueden usar las cenizas de la planta mezcladas con aceite de oliva y vinagre para aliviar la alopecia (Hwee-Ling *et al.*; 2009).

Una especie ampliamente usada en México es el chile piquín (*Capsicum annuum* L.). Las hojas se usan para el dolor de muelas y los frutos estimulan la actividad gástrica e incrementa la circulación sanguínea. También se le usa para tratar reumas, artritis, cólicos, dolor de espalda y brazos. Otra hierba originaria de México es *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Las partes aéreas de esta planta son usadas para tratar enfermedades venéreas, piedras en los riñones e hígado, disminuir la fiebre y controlar cólicos, aunque es utilizada para la pesca pues es un potente veneno para peces.

La jatrofa (*Jatropha curcas* L.) es usada para combatir parásitos como piojos y pulgas. La decocción de la raíz es usada como enjuague bucal para tratar el sangrado de encías y dolor de muelas. Otra especie mexicana es la *Lantana cámara* L., la planta entera es usada para tratar lesiones en la piel y lepra. También es empleada para tratar pústulas, tumores, malaria, reumatismo, tétanos y espasmos.

2.3 PRODUCTOS NATURALES

Las plantas sintetizan un amplio número de compuestos orgánicos. Estos pueden clasificarse como metabolitos primarios o secundarios, sin embargo en algunos casos es muy complicado establecer un límite entre metabolismo primario y secundario (Crozier *et al.*; 2006).

Los metabolitos primarios son compuestos que esencialmente tienen un rol en la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo. Estos incluyen a los fitoesteroles, lípidos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos.

Otros fitoquímicos, muchos de ellos acumulándose en altas concentraciones en algunas especies, son considerados como metabolitos secundarios. Son estructuralmente diversos y algunos solo pueden hallarse en unas pocas especies dentro de todo el reino vegetal y suelen usarse para estudios de quimiotaxonomía.

Anteriormente ignoradas, sus funciones en las plantas son ahora un importante punto de atención ya que parecen tener un rol clave en la protección de plantas de herbívoros, infecciones microbianas, atrayentes para polinizadores, animales dispersantes de semillas, agentes alelopáticos, protección UV, y la señalización de moléculas en el proceso formación de nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas. Los metabolitos secundarios son interesantes también por el uso que pueden tener como fibras, gomas, pegamentos, aceites, saborizantes, drogas y perfumes, también son considerados como una fuente potencial de nuevas drogas naturales, antibióticos, herbicidas e insecticidas (Croteau *et al.* 2000; Dewick 2002).

Basándose en el origen biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser divididos en tres grandes grupos (**Figura 2.1**):

Flavonoides y compuestos polifenólicos; Terpenoides; y Alcaloides-compuestos nitrogenados y compuestos sulfurados

Revisión Bibliográfica

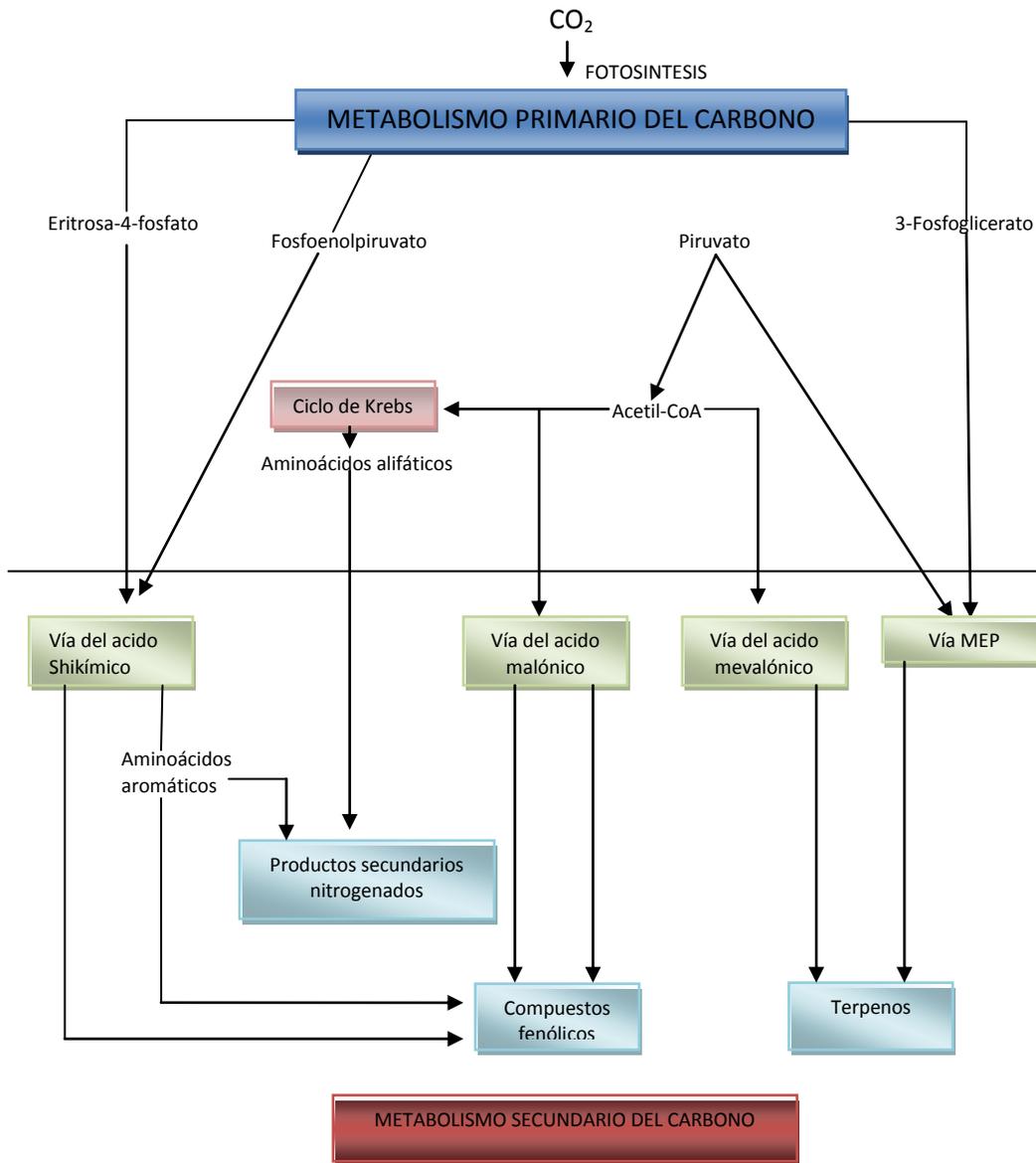


Figura 2.1 Esquema general del metabolismo secundario del Carbono

2.4 LAS PLANTAS A ESTUDIAR

A continuación se muestra una reseña con las características más importantes de cada una de las plantas que se evaluaron en este trabajo. Se presenta la descripción de la planta, así como algunos de los principales metabolitos aislados de las mismas. Se envió un ejemplar de cada especie para su identificación al Herbario Nacional De Mexico (MEXU) del Instituto de Biología, U.N.A.M.: *Hippocratea celastroides* Kunth, 974932. V. Juárez J. 2010; *Hippocratea aff. excelsa* Kunth, 97506, R. Torres C., 2010; *Argemone aff. mexicana* 974916, R. Torres C 2010; *Tagetes lucida* Cav. 975080, V. Juárez J. 2010.

2.4.1 *Argemone mexicana* (L)

México es el país de origen del chicalote [*Argemone mexicana* (L)], que se encuentra ampliamente distribuido en el territorio nacional y es considerado una maleza. También se le encuentra en los trópicos de todos los continentes. Además se le conoce como amapola montés, cardo, o cardo santo.

Es una planta herbácea, erecta, de un metro o menos de alto. Tallo verde-azulado y sin tricomas, con numerosas espinas firmes y punzantes. Las hojas son sésiles, alternas, de color verde-azuloso. Flores solitarias situadas sobre 2-3 brácteas muy similares a las hojas, posee 3 sépalos con espinas en el ápice y seis pétalos amarillos. El fruto es una cápsula con espinas contiene semillas redondas y negras. Raíz pivotante. Características especiales: látex amarillo-blancuzco (Carmona *et al.*; 2008) Ver fotografía 2.1.



Fotografía 2.1. *Argemone mexicana*.

Se le considera como medicinal, al presentar actividad antimicrobial, inmunosupresora y antiparasitaria (Nobuhiro *et al.*; 2009, Rubio-Piña y Vazquez-Mota 2008, Kisangau *et al.*; 2007; Willcox *et al.*; 2007). Por otro lado se han documentado numerosos reportes sobre envenenamiento en humanos que ingirieron aceite de semilla de chicalote como contaminante en aceite de colza. Algunos alcaloides aislados de la semilla de *A. mexicana* son la sanguinarina y la papaverina. Ver Figura 2.2.

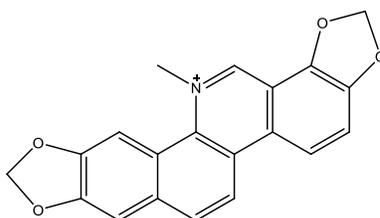


Figura 2.2 Estructura química de la sanguinarina.

2.4.2 *Cissus hypoglauca* (A. Gray).

Cissus es un género de aproximadamente 350 especies de lianas leñosas trepadoras de la familia de las Vitáceas. Tienen una distribución cosmopolita, aunque la mayoría son de los trópicos de África, el sur de Asia, Australia, Papúa y América.

Es una enredadera leñosa de gran tamaño. El nombre de “vid de agua” viene del hecho de que la vid se puede cortar en secciones y la savia que gotea puede ser bebida como el agua. Las hojas son palmeadas, y suelen formar un grupo de cinco. Hojas elípticas u ovaladas, con borde ligeramente dentado o entero. De color verde por encima y por debajo de un color grisáceo. Las hojas jóvenes son de color rojizo y peludo. Los zarcillos aparecen frente a la hoja.

Las flores amarillas se producen en umbelas terminales, sobre todo en primavera y verano. Un fruto globoso púrpura madura en la mitad del año. Las bayas azules se pueden comer crudas y ofrecer un gusto acuosa pero dejan un sabor acre que puede ser irritante (USDA 2010). Aunque aún no se ha documentado que *C. hypoglauca* sea medicinal a nivel genero existen numerosos reportes que evidencian principios medicinales (Onyechi *et al.*, 1998, Alshawsh *et al.*, 2009).

2.4.3 *Pseudosmodingium perniciosum* Engl.

Mejor conocida como “cuajote” este árbol de la familia de las Anacardiácea está ampliamente distribuido en el estado de Guerrero, aunque también se le ha encontrado en Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Sinaloa (Trópicos 2010, Martínez-Millán y Cevallos-Ferriz 2005).



Fotografía 2.2. Estructuras de *Pseudosmodingium perniciosum* Engl., de izquierda a derecha detalle de ramas; ápice terminal, hojas; y tallo.

La principal contribución fitoquímica sobre esta especie fue hecha por Aguilar-Ortigoza *et al.*; (2003) quienes determinaron la presencia de Urushiol, un fenol tóxico (Ver figura 2.3). También encontraron biflavonoides en las hojas y corteza de este árbol.

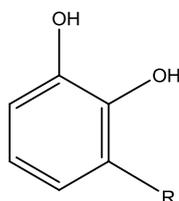
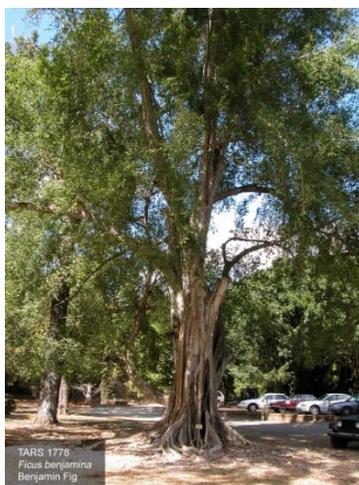


Figura 2.3 Estructura del Urushiol, donde R es una cadena hidrocarbonada.

2.4.4 *Ficus benjamina* (L).

El género *Ficus* contiene alrededor de 800 especies de árboles, arbustos y trepadoras de la familia *Moraceae*, originarias de la Zona Intertropical, con algunas de ellas distribuidas por las regiones templadas. La mayoría son perennes, excepto las que vegetan en latitudes no tropicales y zonas con una larga estación seca (Ver Fotografía 2.3).

Una de las características de las especies de este género, y de la familia es la secreción lechosa llamada látex que segregan al cortar o herir cualquier parte de la planta.



Fotografía 2.3. Ejemplar maduro de *Ficus benjamina*.

A la especie *Ficus benjamina* (L) se la atribuyen propiedades medicinales, de acuerdo a Parveen *et al.*, (2009a, 2009b), ya que detectaron ácidos triterpénicos con actividad antimicrobial en *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Aspergillus niger* y *Aspergillus brassicola*. Sin embargo la mayoría de las especies de este género tienen alguna propiedad medicinal (Sophia y Manoharan, 2007).

2.4.5 Hippocratea excelsa e H. celastroides

La familia Hippocrateaceae está integrada por más de 300 especies, distribuidas principalmente en las regiones tropicales de ambos hemisferios (Dodson y Robyns, 1965), que en su mayoría están contenidas en dos géneros: *Hippocratea* con alrededor de 100 especies y *Salacia* con 200 aproximadamente.

En México, *Hippocratea excelsa* es llamada popularmente mata piojo, miseg-bat (Oaxaca), barajillo (Guerrero), piojo, zipche (Chiapas) y palo de reguilete (Yucatán), aunque por su anatomía puede confundirse con *Hippocratea celastroides* (Villa y Barajas-Morales 1998). En medicina tradicional se le conoce como cancerina y ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades como úlceras gástricas, padecimientos renales, afecciones de la piel, amenorrea y algunas infecciones uterinas. Debido a sus propiedades aparentemente curativas, la especie ha sido objeto de una sobreexplotación (Villa y Barajas-Morales 1998).

Ambas especies son arbustivas, capaces de llegar a los 15 metros de alto. Los tallos son leñosos con ramas opuestas que forman una cruz, típica de estas especies. Se distinguen a simple vista por la forma de las hojas, ya que aunque en ambas especies tienen los bordes aserrados, las de *H.*

celastroides son más largas (elipsoides) mientras que en *H. excelsa* son oblongas (redondeadas). Ver fotografía 2.4



Fotografía 2.4. A la izquierda *H. excelsa*, nótense las semillas y el tallo en cruz. Derecha detalle de una hoja de *H. celastroides*, note el borde serrado.

Algunos compuestos aislados de tejidos de *H. excelsa* y *H. celastroides* son hidroxi-triterpenos pentacíclicos (Figura 2.4) (Cáceres-Castillo *et al.* 2008); canofilol (Herrera-Santoyo *et al.* 2007); alcaloides (sesquiterpenos) (Mata *et al.* 1990; Reyes-Chilpa *et al.*, 2003).

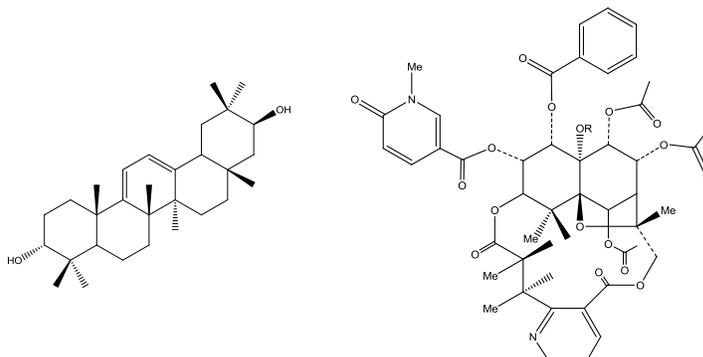


Figura 2.4 Compuestos aislados de *H. excelsa*

2.4.6 *Tagetes lucida*

Se le conoce comúnmente como pericón, hierbanís o flor de santa María. Es una hierba perenne, erecta, hasta de 80 cm de altura, con fuerte olor a anís al estrujarse. Sus hojas son opuestas, sésiles, lineares a oblongas, de margen aserrado. Capítulos florales con la base alargada, tres o cuatro florecillas liguladas de color amarillo. Aquenios linear-claviformes (Fotografía 2.5). Se distribuye por todo el territorio nacional, localizándose

en valles, sierras, pastizales y bosques. Se le considera medicinal y es ampliamente usada en por grupos étnicos de México (Leonti *et al.* 2003).



Fotografía 2.5. *T. lucida* mostrando la típica fisiología de esta planta

Aquino *et al.*, (2002) reportan que el aceite esencial contiene cumarinas, fenoles, flavonoides (Ver Figura 2.5). También se reportan estragol, eugenol y metil-estragol (Abdala 1999; Bicchi *et al.* 1997; Céspedes *et al.* 2006).

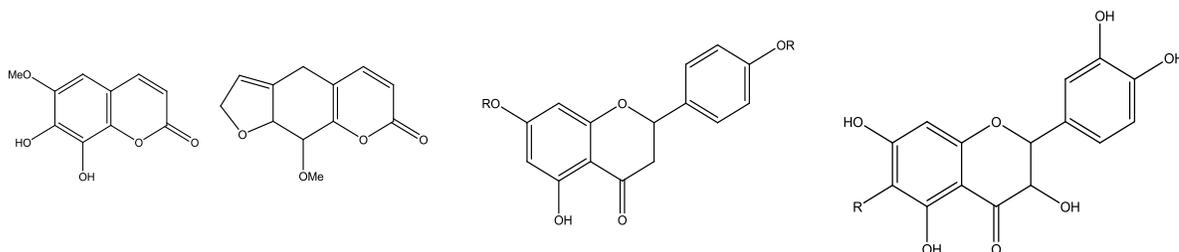


Figura 2.5 Cumarinas y flavonoides aislados de *Tagetes lucida*.

2.5. DESCRIPCIÓN DEL DENGUE

El dengue o fiebre de dengue (FD), y la fiebre de dengue Hemorrágico (FDH) son enfermedades febriles agudas, el síndrome de Shok por dengue (SSD) es una complicación de la FD y FDH que puede ser mortal. Generalmente la FD eleva la temperatura, ocasiona fluido facial y otras manifestaciones no específicas, como anorexia, vomito, dolor de cabeza, y dolor en músculos y articulaciones. Esta enfermedad es transmitida por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti*. La manifestación más común de la FDH es un positivo en la prueba del torniquete, o bien la presencia de petequias (Imagen 2.1).



Imagen 2.1 Petequia característica de FDH

Los cuatro virus serotipos de la FD, conocidos como DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 constituyen un complejo de la familia flaviviridae transmitida por mosquitos del genero *Aedes*.

Después de la picadura de un mosquito infectado, el periodo de incubación del virus es de 4 a 6 días. Los infantes y niños pequeños usualmente desarrollan fiebre, algunas veces acompañada por erupciones en la piel. Niños mayores y adultos pueden presentar síntomas de leves a moderados

como: fiebre, dolor de cabeza, mialgias (sangrado en encías), artralgia (dolor de articulaciones), náusea, vómito y erupciones, aunque también se pueden presentar sangrado por la piel, petequias, o equimosis (sangrado intradérmico).

Algunos individuos se recuperan fácilmente o bien después de una adecuada terapia con fluidos. Sin embargo en algunos casos entran en shock con la sintomatología típica de una falla circulatoria. Inicialmente los pacientes están letárgicos pero se debilitan y rápidamente entran a un estado crítico de shock. Algunos de ellos presentan una falla circulatoria severa, arritmia, con pulsos de hipotensión, frío, piel húmeda y estado mental alterado. El SSD es fatal en un 5 a 10 por ciento de los casos.

La infección por alguno de los cuatro serotipos induce inmunidad de por vida contra la re infección con el mismo serotipo, pero solo confiere inmunidad parcial y temporal contra los demás. Una infección secuencial por diferentes serotipos da lugar a la FDH.

2.5.1 Transmisión y epidemiología

El mosquito hembra ingiere el virus cuando se alimenta de individuos enfermos, y después de 8 a 12 días de incubación ellas pueden transmitir el virus a otros humanos durante su ingesta de sangre (Watts *et al.*, 1987).

La hembra infectada permanece contagiada de por vida. La transmisión del virus de hembras infectadas a su prole ha sido documentada, pero la significancia epidemiológica de este hecho no es bien comprendida (Hull *et al.*, 1984; Rosen *et al.*, 1983).

Aunque se pensaba que era originaria de África, la especie *A. aegypti* está ahora diseminada alrededor de los trópicos y subtrópicos, explotando casi cualquier contenedor de agua como criadero de larvas; es además el vector urbano de la fiebre amarilla. *Aedes albopictus* también transmite la FD y es un importante vector secundario en algunas partes del sudeste de Asia

y el Pacífico. Esta especie es originaria de Asia pero se ha extendido a África, América y Europa por el transporte de masas de huevos en llantas de carros usados, que son trasladadas alrededor del mundo.

Las mayores epidemias de FD fueron documentadas en el siglo 18 y 19 en África, América y Asia; descripciones clínicas de enfermedades compatibles con dengue en China datan de alrededor del año 265. Durante 1900 a 1950 han ocurrido epidemias de dengue en Australia, China, Grecia, India, Japón, Malasia, Tailandia, Vietnam y el Caribe (Gubler y Kuno 1997). La FDH se reconoció por primera vez en los 50's, sin embargo una fiebre hemorrágica similar fue reportada en Filadelfia en 1780, en Australia en 1897, y en Grecia en 1928.

El dengue o FD es ahora endémico en África, América, el este del Mediterráneo, el sudeste de Asia, y el oeste del Pacífico. De acuerdo a la OMS, esto ocurre en más de 100 países, y se estima que son 2.5 billones de personas en riesgo.

El incremento en epidemias de dengue se pueden atribuir al aumento de las zonas urbanas, que promueven el contacto entre humanos y el vector; la mala disposición de almacenes de agua doméstica; y el incremento de viajes internacionales, migración y comercio, que ayudan a diseminar el vector y el virus. Los cambios epidemiológicos en América desde la década de los 70 ilustran este proceso:

Durante 1940 hasta 1960, el programa de control de *A. aegypti* fue exitoso en la mayoría de las regiones, llegando incluso a declararse varios países libres de dicho insecto. Sin embargo después de algunos años, la reinfestación con *A. aegypti* fue clara, y en 1995 este había regresado a más países de los que previamente estaban infestados.

La reinvasión del vector fue seguida por un aumento en la circulación del virus, y las regiones no-endémicas se volvieron hipo-endémicas (epidemias

esporádicas causadas por un solo serotipo) o hiper-endémicas (circulación simultánea de varios serotipos resultando en epidemias frecuentes). La FDH se convirtió en un problema de salud pública mundial.

Después de 1981, cinco países de América presentaron pocos casos de FDH, pero en 2002, 21 países reportaron más de 14 mil casos y 250 muertes (Gubler 2002; Guzmán y Kouri 2002, 2003; Guzmán *et al.*, 2002).

2.5.2 Ciclo de vida del Vector-transmisor

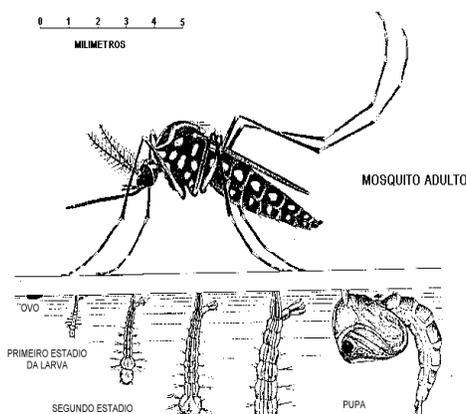
El *A. aegypti*, como todos los mosquitos, tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes: (huevo, larva y pupa) y fase aérea: adulto o imago:

La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce días dependiendo de la temperatura. Los huevecillos soportan la desecación hasta de un año, por eso es muy frecuente encontrar grandes cantidades de larvas en la temporada de lluvias, en diversos recipientes. El periodo de larvas comprende cuatro grados evolutivos denominados primero, segundo, tercero y cuarto estadio. Ver Esquema 2.1

El tiempo aproximado para pasar de un grado a otro, es de aproximadamente 48 horas. El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge (del agua) el mosquito que corresponde a la fase aérea.

Una vez que los mosquitos han emergido, se alimenta por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores.

Esquema 2.1 Ciclo de Vida del mosquito *A. aegypti*



La sobrevivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Generalmente el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse; se ha observado que el ruido que emite al volar es un mecanismo por el cual el macho es atraído así como con otras sustancias que liberan los moscos. Una vez copulada e inseminada la hembra, el esperma que lleva es suficiente para fecundar todos los huevecillos que produce durante su existencia, no aceptando otra inseminación adicional.

El horario de actividad de picadura de los mosquitos es en horas de baja intensidad de la luz solar; en general, se inicia al amanecer (6:00 a 8:00 hrs.) o antes del anochecer (17:00 a 19:00 hrs.). Las curvas de actividad alimenticia muestran que hay dos periodos de mayor actividad, más durante el alba que por las noches. Sin embargo, la alimentación puede estar condicionada a la posibilidad de obtener sangre de los habitantes de las casas, pudiendo modificar su actividad y picar aun en horas de la noche y en el día.

El periodo de vida del mosquito adulto o de imago se ve afectada por las características climáticas, principalmente la temperatura, pues condicionan sus actividades de alimentación, reproducción y reposo. A una temperatura inferior a 4°C o superior a los 40°C generalmente no sobreviven.

La sobrevivencia de los mosquitos adultos tiene un promedio de dos a cuatro semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la

hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental.

Su alimentación puede hacerla en cualquier momento de acuerdo a la disponibilidad del hospedero (puede picar varias veces a las personas de una casa). Las proteínas contenidas en la sangre le son indispensables para la maduración de los huevecillos. La variación de temperatura y humedad, así como la latitud pueden hacer variar estos rangos del ciclo de vida de las cepas de mosquitos.

Entre cada ciclo gonadotrófico, se ha observado que a diferencia de otros géneros de mosquitos, el *A. aegypti* pica o se alimenta varias veces de uno o varios huéspedes, hasta satisfacer sus necesidades alimenticias, lo que representa un factor de importancia en su capacidad como transmisor de enfermedades.

2.5.3 Control del Vector-transmisor

El control de la FD y FDH, se ha limitado a combatir al vector usando insecticidas sintéticos, al no existir aún una vacuna disponible.

El control químico ha sido el más utilizado, sin embargo (y a pesar de su eficacia), su uso conlleva riesgos a largo plazo como el desarrollo de resistencia del insecto, la persistencia del químico en el ambiente y el impacto ecológico negativo que tienen estos compuestos.

En 1946 el DDT, por ejemplo, se introdujo para controlar los brotes de dengue, pero años más tarde los mosquitos presentaron resistencia a este y otros compuestos por lo que su uso se encuentra limitado (Chowdhury *et al.*; 2008, Macoris *et al.*; 2003, Saelim *et al.*; 2005).

2.5.4 Campañas de control en México

En 1963 México fue declarado libre del vector *A. aegypti* debido a la campaña sanitaria dirigida a erradicar la fiebre amarilla a través de la

Organización Panamericana de la Salud después de la segunda Guerra Mundial utilizándose grandes dosis de DDT. Sin embargo cuatro años más tarde se volvió a detectar la presencia del vector en el país (Morrison *et al.*, 2008; SSA 1995).

En 1978 se presentó un brote de dengue clásico en Chiapas y poco tiempo después el padecimiento se había diseminado a casi todo el territorio nacional. Este mal se ha reportado ininterrumpidamente desde 1978 hasta la fecha (SSA 1995).

En otro aspecto, el organismo encargado del control de mosquito *A. aegypti* en México es el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. El tratamiento dirigido a la fase acuática y adulta del mosquito, consiste en aplicar insecticidas organofosforados y piretroides autorizados por la Secretaría de Salud Pública de México, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002.

Para el tratamiento larvario se encuentra el Temephos del grupo de los organofosforados. Tiene tres presentaciones: líquido al 50%, cápsulas al 5% y granos de arena al 1%. En cápsulas debe aplicarse un gramo por cada 50 litros de agua; en granos de arena se aplica a dosis de un gramo por cada 10 litros de agua y en líquido al 50% se aplica a 1 mililitro por cada 1,000 litros de agua.

La aplicación del Temephos se efectúa en recipientes positivos a larvas como una medida preventiva básica con periodicidad bimestral y en situaciones de emergencia o brotes, previo a estudios entomológicos evaluados con criterios operativos de control.

Para el control del mosquito en fase adulta se utilizan insecticidas tipo piretroide. Usualmente se aplica una mezcla de tres insecticidas: Permetrina 10.9, con efecto letal, Esbiol 0.15 con efecto de derribo y Butóxido de Piperonilo 11.1, gramos de ingrediente activo, a dosis de

descarga de 416 mililitros/minuto de preparación para aplicar 100 mililitros de insecticida por hectárea.

El insecticida se aplica en nebulizaciones espaciales en volumen ultra reducido (VUR) y termonebulizaciones.

2.5.5 Bioinsecticidas

Muchas plantas producen metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de insectos. Por ejemplo el extracto de flor de *Chrysanthemum cinerariaefolium* fue el primer compuesto natural en ser usado extensivamente contra mosquitos adultos y el extracto de piretro sigue siendo el insecticida de origen vegetal mejor conocido y es ampliamente usado.

Estos insecticidas basados en vegetales parecen no causar efecto en organismos no blanco.

Varios fitoquímicos se han aislado de un amplio número de especies vegetales (ver Tabla 2.1) para el control del vector transmisor del dengue, el mosquito *Aedes aegypti*.

Revisión Bibliográfica

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
Abarema cochliacarpus (Gomes) R. C. Barneby & .W. Grimes	Omena <i>et al.</i> (2007)
Abuta grandifolia	Ciccía <i>et al.</i> (2000)
Acantholippia seriphioides (A. Gray) Mold	Gillij <i>et al.</i> (2008)
Acanthospermum hispidum DC.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Achyrocline satureioides (Lam.) D.C.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
Acorus calamus	Ranaweera (1996)
Acorus calomus	Sharma <i>et al.</i> (1994)
Aegle marmelos	Vineetha y Murugan (2009)
Agave sisalana	Pizarro <i>et al.</i> (1999)
Ailanthus altissima L.	Tsao <i>et al.</i> (2002)
Allium sativa	Thomas y Callaghan 1999
Alnus glutinosa	Rey <i>et al.</i> (1999)
Aloysia citriodora Palau	Gillij <i>et al.</i> (2008)
Alpinia zerumbet	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
Amaryllis belladonna L	Omena <i>et al.</i> (2007)
Anemia tomentosa (Savigny) Sw. var. anthriscifolia (Schrad.) Mickel	Gillij <i>et al.</i> (2008)
Angelico glauca	Sharma <i>et al.</i> (1994)
Annona crassiflora Mart	Omena <i>et al.</i> (2007)
Annona muricata L.	Luna <i>et al.</i> (2005)
Annona squamosa	Monzon <i>et al.</i> (1994)
Anona glabra L.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Anona montana Macfad & R. E. Fries	Omena <i>et al.</i> (2007)

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
Anona salzmanni A.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Anthemis nobilis	Soliman and El-Sherif (1995)
Anthurium affine Schot	Omena <i>et al.</i> (2007)
Argemone mexicana	Karmegam <i>et al.</i> (1997)
Argemone subfusiformis Ownb.	Vidal <i>et al.</i> (2009)
Aspidosperma sp.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Aspidosperma tomentosum Mart	Omena <i>et al.</i> (2007)
Atlantia monophylla	Sivagnaname y Kalyanasundaram 2004
Austroplenckia populnea (Reissek ex Mart.) Lundell	Omena <i>et al.</i> (2007)
Auxema onocalyx Taub	Omena <i>et al.</i> (2007)
Azadirachta indica	Monzon <i>et al.</i> (1994)
Baccharis spartioides (H. et al.) J. Rimy	Gillij <i>et al.</i> (2008)
Balanites aegyptiaca	Chapagain <i>et al.</i> (2008)
Basiloxylon brasiliensis K. Schum	Omena <i>et al.</i> (2007)
Bauhinia cheilantha (Bong.)	Luna <i>et al.</i> (2005)
Boerhaavia coccinea Mill.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Bryonopsis laciniosa	Kabir <i>et al.</i> (2003)
Bursera leptophloeos Mart	Luna <i>et al.</i> (2005)
Caesalpinia echinata Lam.	Luna <i>et al.</i> (2005)
Caesalpinia ferrea Mart.	Luna <i>et al.</i> (2005)
Caesalpinia pyramidalis Tul.	Luna <i>et al.</i> (2005)

Revisión Bibliográfica

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Callitris glaucophylla</i>	Shaalan <i>et al.</i> (2003)
<i>Calophyllum inophyllum</i>	Pushpalatha y Muthukrishnan (1999)
<i>Calotropis procera</i>	Markouk <i>et al.</i> (2000)
<i>Cannabis sativa</i>	Jalees <i>et al.</i> (1993)
<i>Cassia obtusifolia</i>	Jang <i>et al.</i> (2002)
<i>Cassia tora</i>	Jang <i>et al.</i> (2002)
<i>Caulerpa scalpelliformis</i>	Thangam y Kathiresan (1991)
<i>Cedrus deodara</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Centella asiatica</i> Brahma	Rajkumar y Jebanesan (2005)
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Chloroxylon swietenia</i>	Kiran <i>et al.</i> 2006
<i>Chorophora tinctoria</i> (L.) Gaudich. Ex. Benth	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Citrus limon</i>	Thomas y Callaghan (1999)
<i>Citrus limonia</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Citrus sinensis</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Clausena dentata</i> (Willd) M. Roam.	Rajkumar y Jebanesan (2010)

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Cleome viscosa</i>	Kalyanasundaram y Babu (1982)
<i>Codiaeum variegatum</i>	Monzon <i>et al.</i> (1994)
<i>Copaifera langsdorfii</i> Desf.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Cotula cinerea</i>	Markouk <i>et al.</i> (2000)
<i>Cryptomeria japonica</i>	Cheng <i>et al.</i> 2003
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Cupania oblongifolia</i> Mart.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Curcuma domestica</i>	Ranaweera (1996)
<i>Curcuma longa</i> L	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Cymbopogon martini</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Cymbopogon nardus</i>	Ranaweera (1996)
<i>Cyperus scariosus</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Daucus carota</i>	Thangam y Kathiresan (1991a)
<i>Dennettia tripetala</i> (G.Baxer)	Anyaele y Amusan (2005)
<i>Dictyota dichotoma</i>	Thangam y Kathiresan (1991a)
<i>Didymopanax morototoni</i> (Aubl.) Decne & Planch	Omena <i>et al.</i> (2007)

Revisión Bibliográfica

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Dirca palustris</i>	Ramsewak <i>et al.</i> (2001)
<i>Dorstenia sp.</i>	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Erythrina mulungu</i> Mart.ex. Benth	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Kumar and Dutta (1987)
<i>Eucalyptus saligna</i> Sm.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Eucalyptus urophylla</i>	Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Luna <i>et al.</i> (2005)
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Himatanthus obovatus</i> (Muñ. Il. Arg.) R. E.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Woodson	
<i>Himatanthus phagedaenicus</i> (Mart.)	Omena <i>et al.</i> (2007)
Woodson	
<i>Himatanthus sp.</i>	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Hyptis fruticosa</i>	Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Briq.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Hyptis pectinata</i>	Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Hyptis suaveolens</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Inga edulis</i> Mart	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Ipomea pescaprae</i> (L.) Roth	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Jasminum fruticans</i>	Soliman y El-Sherif (1995)

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Jatropha curcus</i>	Karmegam <i>et al.</i> (1997)
<i>Juniperus macropoda</i> Bois.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Kaempferia galanga</i> L.	Kanjanapothi <i>et al.</i> (2004)
<i>Khaya senegalensis</i>	Shaalán <i>et al.</i> (2003)
<i>Lafoensia pacari</i>	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Languas galanga</i>	Monzon <i>et al.</i> (1994)
<i>Lansium domesticum</i>	Monzon <i>et al.</i> (1994)
<i>Lavandula officinalis</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Leonotis nepetaefolia</i> Schimp. Ex Benth.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Lippia gracilis</i>	Silva <i>et al.</i> 2008
<i>Lippia gracilis</i>	Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Lippia sidoides</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M.Roem.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Mandevilla hirsuta</i> (Rich) K. Schum	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Manilkara salzmannii</i> (A. DC) H. J. Lam	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Marsdenia altissima</i> (Jacq.)	Luna <i>et al.</i> (2005)
<i>Melia azadirachta</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Melia azedarach</i>	Al-Sharook <i>et al.</i> (1991)
<i>Melia volkensii</i>	Al-Sharook <i>et al.</i> (1991)
<i>Mentha arvensis</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Mentha pulegium</i> L.	Omena <i>et al.</i> (2007)

Revisión Bibliográfica

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Minthostachys mollis</i> (H.B.K.) Griseb	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Minthostachys setosa</i>	Ciccica <i>et al.</i> (2000)
<i>Musa paradisiaca</i> L.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Nigella sativa</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Ocimum americanum</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)
<i>Operculina macrocarpa</i> (Linn)	Luna <i>et al.</i> (2005)
<i>Origanum majoranal</i>	Soliman y El-Sherif (1995)
<i>Parkia platycephala</i> Benth.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Paullinia meliaefolia</i> Juss	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Piper hostmanianum</i>	Morais <i>et al.</i> 2008
<i>Piper longum</i>	Lee (2000)
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Autran <i>et al.</i> (2009)
<i>Piper nigrum</i>	Moawed (1998)
<i>Piper permucronatum</i>	Morais <i>et al.</i> 2007
<i>Plinia cerrocampansensis</i> Barrie	Vila <i>et al.</i> (2010)
<i>Plumbago capensis</i> Thunb	Sreelatha <i>et al.</i> (2010)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Rajkumar y Jebanesan

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
	(2008)
<i>Pterodon polygalaeiflorus</i> (Benth.) Benth.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Quassia amara</i>	Evans y Raj (1991)
<i>Rhinocanthus nasutus</i>	Pushpalatha y Muthukrishnan (1999)
<i>Ricinus communis</i>	Kumar y Dutta (1987)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Sassurea lappa</i>	Sharma <i>et al.</i> (1994)
<i>Senecio jurgenseni</i> Hemsl.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link.	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Serjania lethalis</i> A.	Omena <i>et al.</i> (2007)
Several marine angiosperms	Thangam y Kathiresan (1999)
<i>Simarouba amara</i> Aubl	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Markouk <i>et al.</i> (2000)
<i>Solanum sodomaeum</i>	Markouk <i>et al.</i> (2000)
<i>Solanum villosum</i>	Chowdhury <i>et al.</i> (2008)
<i>Sorghum bicolor</i>	Jackson <i>et al.</i> (1990)
<i>Spondias mombin</i> L.	Luna <i>et al.</i> (2005)
<i>Syzygium jambolana</i>	Barreira Cavalcanti <i>et al.</i> (2004)

Revisión Bibliográfica

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart ex DC.) Standl	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Tabebuia sp.</i>	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Tagetes minuta</i>	Perich <i>et al.</i> (1995)
<i>Tagetes minuta</i> L.	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Tagetes patula</i>	Dharmagadda <i>et al.</i> (2005)
<i>Tagetes patula</i> Link	Vidal <i>et al.</i> (2009)
<i>Tagetes pusilla</i> Kunth	Gillij <i>et al.</i> (2008)
<i>Thymus capitatus</i>	Mansour <i>et al.</i> (2000)
<i>Toddalia asiatica</i> (L)	Vineetha y Murugan (2009)
<i>Valarian wallichii</i>	Sharma <i>et al.</i> (1994)
<i>Vernonia condensata</i> Baker	Omena <i>et al.</i> (2007)

Tabla 2.1 Reportes sobre el control biológico de <i>A. aegypti</i>	
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Soliman y El-Sherif (1995)
<i>Vicia tetrasperma</i>	Jang <i>et al.</i> (2002)
<i>Vitex nequrdo</i>	Kalyanasundaram y Babu (1982)
<i>Wilbrandia sp.</i>	Omena <i>et al.</i> (2007)
<i>Withania somnifera</i>	Karmegam <i>et al.</i> (1997)
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Prajapati <i>et al.</i> (2005)
<i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.	Omena <i>et al.</i> (2007)

Tal como puede apreciarse en la tabla anterior existen numerosos reportes para el control del vector transmisor de la FD, sin embargo aún queda mucho por investigar pues es necesario demostrar su eficacia, el efecto que tienen sobre el medio ambiente, así como la posible formulación comercial del producto, entre otros factores.

Sin embargo es una carrera contra el tiempo, el aparentemente inevitable cambio climático y la adaptabilidad del *A. aegypti* a nuevos hábitats son factores que juegan en contra, por lo que es de vital importancia el desarrollo de nuevos Bioinsecticidas que puedan usarse en estrategias integrales de control, sin dejar de lado la participación ciudadana y del estado.

CAPITULO III METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN

Existen diferentes estrategias para la extracción de compuestos activos en las plantas: arrastre de vapor, maceración extracción con soxhlet, con sólidos, fluidos supercríticos entre otros. La metodología que se llevó a cabo en este estudio optó por una extracción fraccionada, de manera consecutiva, con distintos disolventes de menor a mayor polaridad: hexano, acetato de etilo, acetona y metanol. Con el objetivo de lograr una separación de los metabolitos presentes en la planta de estudio.

Paralelamente a la maceración se estableció el protocolo para el pie de cría de *A. aegypti*, dando especial énfasis en la obtención de huevecillos de tercera generación.

Los extractos crudos fueron probados en larvas del mosquito *Aedes aegypti* para determinar la toxicidad mediante el método de Finney. Los extractos que presentaron una actividad interesante fueron sometidos a pruebas colorimétricas, para determinar la presencia de grupos de compuestos: alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, glucósidos, saponinas y terpenoides, mediante los métodos de Wagner, cloruro férrico, Shinoda, Baljet, Salkowski entre otros.

3.1 PLANTAS

3.1.1 Material vegetal

El material vegetal de las siete especies fue colectado en campo de acuerdo a la ubicación geográfica que se detalla en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Referencias geográficas de las colectas de las plantas estudiadas.

Planta	Estado de colecta	Coordenadas	
<i>A. mexicana</i>	Tlaxcala	19°19'46.07" N	98°22'46.07" O
<i>P. perniciosum</i>	Guerrero	18°26'49.32" N	99°27'03.01" O
<i>Cissus hypoglauca</i>	Morelos	nd*	nd
<i>Ficus benjamina</i>	Morelos	nd	nd
<i>H. celastroides</i>	Guerrero	18°24.323'N	99°32.153'O
<i>H. excelsa</i>	Guerrero	18°24.323'N	99°32.153'O
<i>T. lucida</i>	Tlaxcala	19°33'42.78"N	98°35'45.42"O

* nd = no disponible, material vegetal proporcionado e identificado por investigadores en IPN-CEPROBI, IPN.

El material se separó por estructuras: Raíz, Tallo, Hojas, Flores y semillas de acuerdo a lo que fue posible colectar.

En el caso de *T. lucida* contamos con hoja, tallo y flor.

Para *H. excelsa*, *H. celastroides* y *P. perniciosum*, por tratarse de arbustos leñosos de tamaño considerable (± 10 m), por la dificultad del terreno y porque son especies depredadas, solo se colectó partes aéreas. Se procuró hacer cortes limpios en la base de los tallos para prevenir infecciones. Se cuidó no dañar la raíz para evitar la muerte de la planta para favorecer el retoño. De este modo, el trabajo de investigación tuvo un mínimo impacto ecológico y se conservó, al menos por un tiempo, el recurso vegetal en estudio.

Metodología

Las hojas de *Ficus benjamina* y *Cissus hypoglauca* fueron donadas por el CEPROBI de Morelos.

En el caso de *A. mexicana* se colectó con raíz, tallo, hoja, flor y semilla (Ver fotografía 3.1).



Fotografía 3.1 Colecta de algunas especies usadas en este estudio.

Todo el material vegetal colectado y separado por estructuras, fue secado a la sombra a temperatura y humedad ambiente, y molido finamente con la ayuda de un molino para granos, ver Fotografía 3.2.



Fotografía 3.2 Material vegetal seco y molienda del mismo.

3.1.2 Extracción y destilación

Para la obtención de los extractos crudos: se colocaron 250 g de material molido y seco en un recipiente de vidrio limpio. Se agregó hexano hasta cubrir el material vegetal. Se dejó macerar a temperatura ambiente por 72 horas (ver Fotografía 3.3). Transcurrido este tiempo se separó el disolvente por filtración al vacío. Enseguida se agregó hexano nuevo hasta cubrir el material, se dejó reposar otras 72 horas y se volvió a filtrar. El material vegetal se colocó en bandejas extendidas para permitir que se evaporara totalmente el disolvente.

El material vegetal seco se pesó y se colocó en un recipiente vacío de vidrio. Se agregó acetato de etilo y se procedió de la misma forma que en el macerado con hexano descrito anteriormente.



Fotografía 3.3 Macerado del material vegetal en el laboratorio.

Esto se realizó en idénticas condiciones pero con acetona y metanol de manera sucesiva. De tal manera que se procuró obtener un primer fraccionamiento de los metabolitos vegetales presentes de acuerdo a su polaridad.

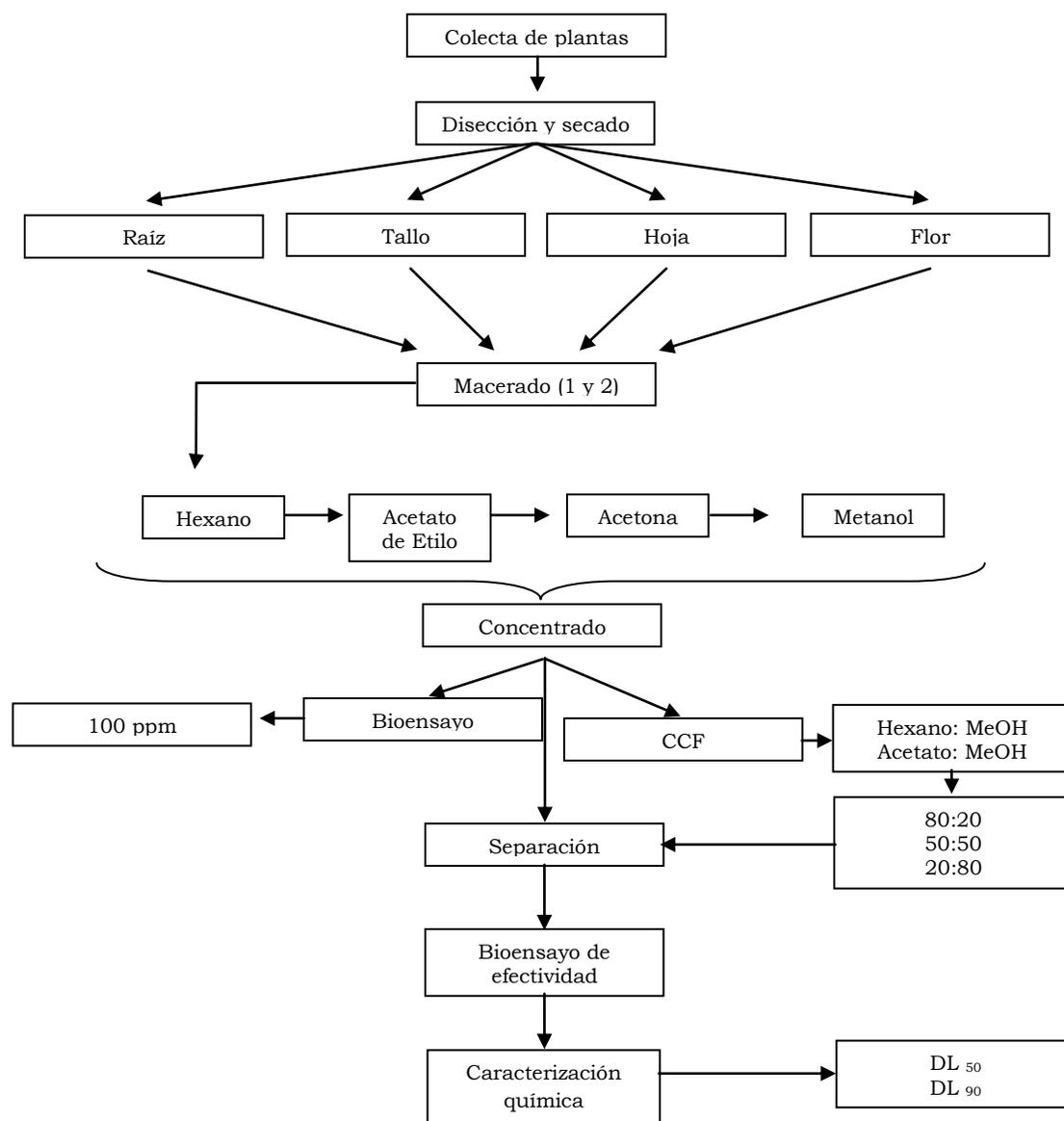
Los extractos crudos obtenidos se condensaron con la ayuda de un rotavapor (SEV Modelo D402-2, Fotografía 3.4) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.



Fotografía 3.4 Condensado de los extractos crudos al vacío.

De cada extracto condensado se realizaron pruebas en cromatografía en capa fina, con mezclas de diferentes disolventes, para reconocimiento preliminar de ciertos metabolitos, algunas de estas mezclas fueron: Hexano: Metanol y Acetato de Etilo: Metanol como eluyentes. Como reveladores se utilizó Luz UV, sulfato cérico y KOH. En la Figura 3.1 se esquematiza el procedimiento descrito anteriormente y adicionalmente el detalle de bioensayos de efectividad.

Metodología

Figura 3.1 Esquema general de trabajo.

El rendimiento de cada extracto se determinó en relación al peso seco total del material vegetal y el peso del extracto recuperado. Cada extracto obtenido se evaluó en larvas de *A. aegypti* para valorar actividad larvicida.

3.2 PIE DE CRIA DE *Aedes aegypti*

Los huevecillos de *A. aegypti*, fueron colectados bajo la supervisión del Ing. Juan Sánchez Arriaga perteneciente al programa de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaria de Salud del estado Guerrero (Fotografía 3.5). Estos huevecillos fueron colectados de ovitrampas colocadas en la Colonia Centro de Iguala Gro., en el mes de Septiembre del 2009.

A partir de estos huevecillos se estableció el pie de cría en instalaciones apropiadas asociadas al CIBA-IPN Tlaxcala. Las condiciones del laboratorio para la cría de insectos fueron las siguientes: Se mantuvo una habitación, previamente acondicionada con mosquiteros y doble puerta, a 27 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad y 70 ± 15 % de humedad relativa.



Fotografía 3.5. Asesorías para iniciar el pie de cría por personal de CONAVE

Se utilizó alimento comercial para peces (WARDLEY®) como fuente de alimentación para las larvas. Los mosquitos adultos debían ser alimentados con sangre de conejo tres días antes de ovopositar. Se proporcionó solución azucarada con miel al 20% *at libitum* para hidratarlos.

3.2.1 Protocolo para el establecimiento del pie de cría

Dado que los huevecillos proporcionados a este proyecto fueron colectados en campo se les reconoce como generación cero o F_0 por ser considerados silvestres. Sin embargo de acuerdo a la literatura es recomendable realizar las pruebas biológicas con larvas de tercera generación o F_3 . (Omena *et al.* 2007; Anyaele y Amusan 2005; Prajapati *et al.*, 2005). De esta manera se homogeniza la población y se garantiza obtener un número suficiente de larvas libres de contaminantes y patógenos que puedan alterar la longevidad de la población.

El ciclo completo de una generación (F_1 , F_2 o F_3) se lleva a cabo a grandes rasgos en un ciclo de cuatro etapas: Huevo, Larva, Pupa y Adulto o Imago. A continuación se describe el método que se siguió para llegar a dicha generación:

Los huevecillos F_0 se colocaron a eclosionar en una palangana con agua a 37°C al menos por 30 minutos. A esta temperatura se estimula a las larvas para comenzar a eclosionar, en este momento se les proporciona alimento suficiente. Seis días después, las larvas de primer estadio se desarrollan hasta llegar a pupas.

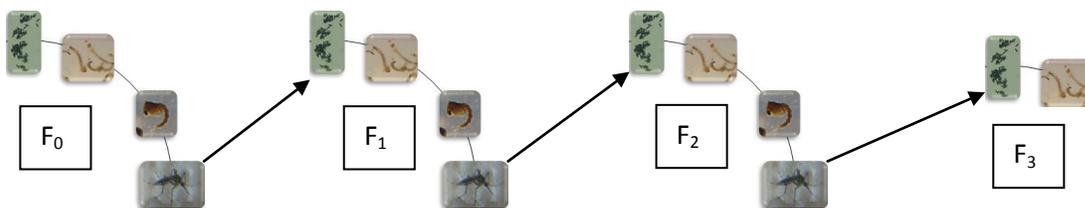
Dos días después los adultos emergen, estos se dejan aparear durante tres días en una trampa cilíndrica adaptada para este propósito, de modo que los adultos no puedan escapar (ver fotografía 3.6).



Fotografía 3.6 Trampa de apareamiento para adultos de *A. aegypti*.

Posteriormente las hembras son seleccionadas y aisladas en una jaula de malla provista de una manga, donde se puede manejar de manera sencilla la recolección de huevecillos, la hematofagia (alimentar con sangre de conejo) y proporcionar solución azucarada.

Una vez apartadas se les alimenta con sangre de conejo cada 96 horas, periodo durante el cual se recolectan huevecillos (F_1). Una vez que se ha obtenido un número razonable de huevecillos F_1 (± 2000) se lleva a cabo el mismo procedimiento para obtener las generaciones sucesivas conocidas como F_2 y F_3 . Cabe recalcar que el tiempo de vida de una hembra en estas condiciones es de alrededor de treinta días. El procedimiento de obtención de cada una de las generaciones se presenta en el Esquema 3.1.



Esquema 3.1 Representación de la obtención de F_3 de *A. aegypti* en laboratorio

3.2.2 Protocolo para la obtención de huevecillos de *A. aegypti*

Debido a la necesidad de obtener un considerable número de huevecillos en buen estado, se decidió optar por establecer en base a la literatura, un protocolo para la obtención de huevecillos de *A. aegypti*.

El principal factor a estudiar fue el tiempo necesario para la formación del embrión en el interior del huevecillo. Esta variable llamada Horas después

de la Ovoposición (HDO) se define como: el tiempo, medido en horas, que tiene un grupo de huevecillos, tomando como punto inicial el momento en el que la hembra realiza la ovipostura.

3.2.2.1 Dinámica del desarrollo embrionario de *A. aegypti*

Esta prueba se realizó originalmente en el laboratorio de la Jurisdicción Sanitaria 02 Norte de la Secretaría de Salud en Iguala Gro., por considerarse las condiciones ambientales de este lugar idóneas para el desarrollo del vector en cuestión. Posteriormente se trató de reproducir el mismo ensayo en el laboratorio implementado en el estado de Tlaxcala.

Para determinar el tiempo que los huevecillos de *A. aegypti* necesitan para desarrollar el embrión y así obtener eclosiones sincronizadas bajo condiciones de laboratorio, se utilizó la metodología descrita por Rezende *et al.*, (2008) y Farnesi *et al.*, (2009). Que consiste en alimentar con sangre un grupo de hembras, aislarlas por al menos tres días y permitir que realicen la ovipostura en un breve periodo de tiempo.

Aproximadamente 200 hembras listas para ovopositar, manejadas previamente de acuerdo a lo establecido por Rezende *et al.*, (2008), se colocaron en una jaula de malla recubierta con plástico negro para evitar el paso de luz. En el interior de esta jaula se coloca una palangana de plástico con papel filtro en las paredes (Chadee 2009) durante una hora. En este periodo de tiempo las hembras depositan huevecillos de tal manera que todos ellos se consideran prácticamente de la misma edad.

Los huevecillos cosechados se dejaron en agua y se retiraron en grupos de 50 de la palangana a intervalos de tiempo definidos arbitrariamente (Horas Después de la Ovoposición, HDO) para deshidratarlos a la temperatura y humedad de la habitación de pie de cría (Ver Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Intervalos de tiempo a los que se deshidrataron huevecillos de *A. aegypti*.

HDO*	U. E. 1**	U. E. 2	U. E. 3	Testigo***
1	50	50	50	150
3	50	50	50	150
6	50	50	50	150
9	50	50	50	150
12	50	50	50	150
15	50	50	50	150
24	50	50	50	150
48	50	50	50	150
60	50	50	50	150

*Horas después de la ovoposición.

**UE = Unidad experimental 1, 2 y 3.

*** Suma de tres repeticiones.

Los huevecillos deshidratados se observaron al microscopio para determinar por conteo directo, el porcentaje de daño que la deshidratación causó. Los resultados obtenidos en el Laboratorio de Iguala se contrastaron con los resultados de la prueba realizada en las condiciones de clima artificiales del Laboratorio de Tlaxcala.

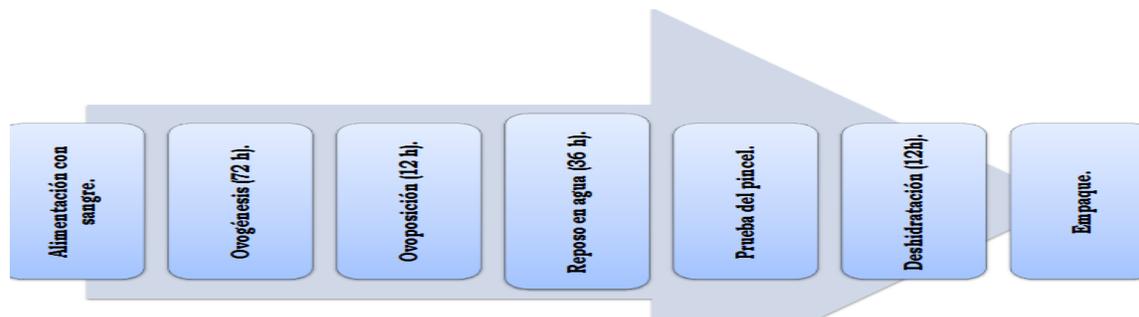
3.2.2.2 Manejo de los huevecillos en laboratorio, (prueba del pincel)

Para asegurar que los huevecillos cosechados presentaran condiciones homogéneas de viabilidad, es decir eclosión y aceptables (porcentaje de viabilidad $\geq 90\%$) se realizó un muestreo de los huevos recién cosechados.



Fotografía 3.7 Puntos regulares de muestreos de las palanganas de ovipostura recién cosechadas

El procedimiento consiste en deshidratar una muestra de la cosecha de huevecillos y observar al microscopio el efecto de la deshidratación en la muestra (% de huevecillos viables) *antes* de deshidratar la cosecha completa, Ver Esquema 3.2:



Esquema 3.2 Metodología para la obtención de huevecillos viables de *A. aegypti*.

Se le llamó “*prueba del pincel*” (nombre asignado por un servidor) se utilizó un pincel para obtener cuatro muestras de huevecillos en distintos puntos de la palangana de oviposición, colocarlos en papel filtro fijado a un portaobjetos (Fotografía 3.8).



Fotografía 3.8 Prueba del pincel. Nótese la disposición de los huevecillos para facilitar el conteo.

Estos huevecillos se deshidrataron durante dos horas a temperatura y humedad ambiente. Se cuantificó con la ayuda de un microscopio (KONUS MG-1140; Fotografía 3.8 y 3.9) los huevecillos dañados o estrujados, para obtener el porcentaje de viabilidad (Ver fotografía 3.9). Si el porcentaje de

viabilidad obtenido era $\geq 90\%$ la cosecha completa de huevecillos se deshidrata y almacena, en caso contrario la cosecha permanece en agua hasta obtener la prueba positiva.



Fotografía 3.9 Huevecillos vistos al microscopio (4X), el de la Izquierda se encuentra dañado por deshidratación, y el de la derecha no presenta ningún daño.

3.3 PRUEBA PRELIMINAR DE ACTIVIDAD LARVICIDA

Se probaron 60 extractos (tratamientos) para observar actividad larvicida. La prueba de actividad se condujo de acuerdo a lo establecido por Rafikali y Nair (2001) y Cheng y otros (2003). Se preparó una solución madre de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) en la que se disolvió una porción de cada uno de los extractos obtenidos. Un mililitro de esta solución se disolvió en 99 ml agua destilada-desionizada, para obtener una concentración final de 500 mg/L del extracto a evaluar (Ver fotografía 3.8). Se colocaron 20 larvas de cuarto instar de *A. aegypti*, criadas en el Laboratorio de Tlaxcala en la solución con la ayuda de pequeñas redes permeables, hechas para este fin en el laboratorio y evitar variaciones en las concentraciones. Se agitó ligeramente para asegurar una solución homogénea.



Fotografía 3.10 Elaboración de soluciones de prueba.

Los extractos crudos (ver **Tabla 3.1**) se probaran a 500 mg/L. Cada contenedor se mantuvo a temperatura de incubación. Se utilizaron dos testigos: como positivo, se usaron dos insecticidas organofosforados (Temefos y Diclorvos) con la dosis recomendada por el fabricante. El control negativo se preparó con 99 ml de agua destilada-desionizada y un ml de DMSO.

Tabla 3.1 Listado general de extractos evaluados en el experimento.

Extracto		Extracto	
<i>Hippocratea excelsa</i> Tallo	Hexano	<i>Argemone mexicana</i> Tallo	Acetona
<i>Hippocratea excelsa</i> Tallo	Acetato	<i>Argemone mexicana</i> Tallo	Metanol
<i>Hippocratea excelsa</i> Tallo	Acetona	<i>Argemone mexicana</i> Hoja	Hexano
<i>Hippocratea excelsa</i> Tallo	Etanol	<i>Argemone mexicana</i> Hoja	Acetato
<i>Hippocratea excelsa</i> Hoja	Hexano	<i>Argemone mexicana</i> Hoja	Acetona
<i>Hippocratea excelsa</i> Hoja	Acetato	<i>Argemone mexicana</i> Hoja	Metanol
<i>Hippocratea excelsa</i> Hoja	Acetona	<i>Argemone mexicana</i> Flor	Hexano
<i>Hippocratea excelsa</i> Hoja	Etanol	<i>Argemone mexicana</i> Flor	Acetato
<i>Hippocratea celastroides</i> Hoja	Hexano	<i>Argemone mexicana</i> Flor	Acetona
<i>Hippocratea celastroides</i> Hoja	Acetato	<i>Argemone mexicana</i> Flor	Metanol
<i>Hippocratea celastroides</i> Hoja	Acetona	<i>Argemone mexicana</i> Semilla	Hexano
<i>Hippocratea celastroides</i> Hoja	Metanol	<i>Argemone mexicana</i> Semilla	Acetato
<i>Hippocratea celastroides</i> Tallo	Hexano	<i>Argemone mexicana</i> Semilla	Acetona
<i>Hippocratea celastroides</i> Tallo	Acetato	<i>Argemone mexicana</i> Semilla	Metanol
<i>Hippocratea celastroides</i> Tallo	Acetona	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Hoja	Hexano
<i>Hippocratea celastroides</i> Tallo	Metanol	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Hoja	Acetato
<i>Tagetes lucida</i> Hoja	Hexano	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Hoja	Acetona
<i>Tagetes lucida</i> Hoja	Acetato	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Hoja	Metanol
<i>Tagetes lucida</i> Hoja	Acetona	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Corteza	Hexano
<i>Tagetes lucida</i> Hoja	Metanol	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Corteza	Acetato
<i>Tagetes lucida</i> Tallo	Hexano	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Corteza	Acetona
<i>Tagetes lucida</i> Tallo	Acetato	<i>Pseudosmodigium perniciosum</i> Corteza	Metanol
<i>Tagetes lucida</i> Tallo	Acetona	<i>Cissus hypoglauca</i> Hoja	Hexano
<i>Tagetes lucida</i> Tallo	Metanol	<i>Cissus hypoglauca</i> Hoja	Acetato
<i>Tagetes lucida</i> Flor	Hexano	<i>Cissus hypoglauca</i> Hoja	Acetona

Metodología

<i>Tagetes lucida</i> Flor	Acetato	<i>Cissus hypoglauca</i> Hoja	Metanol
<i>Tagetes lucida</i> Flor	Acetona	<i>Ficus benjamina</i> Hoja	Hexano
<i>Tagetes lucida</i> Flor	Metanol	<i>Ficus benjamina</i> Hoja	Acetato
<i>Argemone mexicana</i> Raíz	Hexano	<i>Ficus benjamina</i> Hoja	Acetona
<i>Argemone mexicana</i> Raíz	Acetato	<i>Ficus benjamina</i> Hoja	Metanol
<i>Argemone mexicana</i> Raíz	Acetona	Abate 1 mg/L	
<i>Argemone mexicana</i> Raíz	Metanol	Diclorvos diluido 0.025 %	
<i>Argemone mexicana</i> Tallo	Hexano	DMSO + agua	
<i>Argemone mexicana</i> Tallo	Acetato		

La mortalidad se registró a las 24 y 48 h de exposición de acuerdo a lo reportado en la literatura (Cheng *et al.*, 2003). En este periodo de tiempo no se alimentó a las larvas. El porcentaje de mortalidad se corrigió para el control de mortalidad con la formula de Abbot's, cuando fue necesario. Los resultados se procesaron de acuerdo al análisis Probit usando el método de Finney (1971) en el paquete Biostat 2008. La toxicidad se reportó como DL₅₀ a 24 y 48 horas (promedio de tres replicas).

Los extractos que presentaron una DL₅₀ menor a 200 mg/L se seleccionaron para un análisis estadístico detallado y para un segundo bioensayo. Este bioensayo se condujo en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. Se prepararon 100 ml de una solución madre de cada uno de los extractos de interés a una concentración de 500 mg/L. De esta solución se obtuvieron tres diluciones a 250, 125 y 50 mg/L. Se hicieron tres replicas por tratamiento.

En las soluciones ya preparadas se colocaron 20 larvas de cuarto instar F₃ de *A. aegypti*, con la ayuda de pequeñas redes permeables.

La mortalidad se registró como se describe anteriormente. De las dosis letales obtenidas se realizó un análisis de varianza con el paquete STATISTICA 2000.

3.4 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

A los extractos seleccionados se les realizaron pruebas colorimétricas para determinar la presencia de alcaloides (prueba de Wagner, Dragendorff, Mayer y Hager), flavonoides (Shinoda), glucósidos cardiotónicos (Baljet), taninos (Cloruro Férrico, Gelatina, Sal), terpenoides (Lieberman-Bucchard), Cumarinas (Baljet) y Saponinas (Espuma).

3.4.1 Detección de Alcaloides

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractados en medio ácido), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio o tungsteno formando precipitados; estos ensayos preliminares se pueden realizar en el laboratorio o en el campo.

En la práctica, se utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: la solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer), tetrayodo bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff), solución de ácido pícrico (reactivo de Hager).

Preparación de reactivos para alcaloides:

Reactivo de Mayer: se preparó disolviendo 1.3 g de dicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml. Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

El reactivo de Dragendorff: se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la

formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona este reactivo a una solución ácida de alcaloides.

Reactivo de Wagner (yodo-yoduro de potasio): Disolver un gramo de I_2 y 10g KI en 50 mL H_2O . Acidificar con 2 ml ácido acético glacial. Diluir a 100 ml.

3.4.2 Detección de Flavonoides

Usualmente se usa la reacción de Shinoda, donde el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H_2 , que es eliminado en forma de gas y el $MgCl_2$, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características.

A una alícuota del extracto etanólico o acuoso se le añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos. El ensayo se considera positivo cuando aparecen coloraciones en amarillo, rojo o carmesí intenso.

3.4.3 Detección de Esteroles y Terpenoides

La reacción de Liebermann-Burchard es típica de los esteroides que contienen dos dobles enlaces conjugados en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble enlace de un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La reacción debe realizarse en un medio absolutamente anhidro, ya que al existir moléculas de agua estas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la reacción con el núcleo esteroideal o triterpenoide. El diclorometano solubiliza a la muestra favoreciendo la captación de alguna molécula de agua presente y el ácido sulfúrico, favorece la deficiencia electrónica del anhídrido acético, el cual es estabilizado por los electrones de los dobles enlaces (dienos) conjugados, dando de esta manera la coloración respectiva.

Preparación: a un mililitro del extracto clorofórmico se le adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se

dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Se considera positivo un cambio rápido de coloración. Del rosa-azul a verde oscuro-negro al final de la reacción.

3.4.4 Detección de Cumarinas

La prueba de Baljet es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo.

Se basa en la formación de un complejo entre el Acido Pícrico y la lactona α , β , y γ insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo claro a oscuro. Si la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el disolvente y redisolverse en 1 ml de alcohol. Se añade 1 mL del reactivo. La prueba es positiva cuando aparece una coloración o precipitado color rojo.

El reactivo se prepara disolviendo 1g de ácido Pícrico en 100 mL de etanol. Por separado se disuelven 10g de NaOH en 100 ml de agua. Se mezclan ambas soluciones antes de usarse.

3.4.5 Glucósidos Cardiotónicos

El ensayo de Kedde es útil para identificarlos en un extracto. Un ml del extracto etanolico se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar 5-10 minutos. Se considera positivo al observarse una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas.

Se prepara dos soluciones:

- Solución 1: Acido 3-5 Dinitrobenzónico al 2% en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de Potasio al 5.7% en agua.

Se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones justo antes de realizar la prueba.

3.4.6 Detección de Saponinas

En el extracto alcohólico se pueden detectar saponinas, del tipo esteroideal como triterpénica. Se diluye un volumen del extracto en cinco volúmenes de agua y se agita fuertemente por 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de dos minutos.

3.4.7 Detección de compuestos fenólicos/taninos

El ensayo con cloruro férrico determina en un extracto alcohólico tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en una solución salina (cloruro de sodio al 1% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo fundamentalmente determina taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

4.1 EXTRACCIÓN

4.1.1. Extractos crudos

Los extractos obtenidos de las distintas partes de las plantas evaluadas fueron concentrados hasta la total evaporación del disolvente en el que se había preparado el macerado, el residuo se pesó en una balanza analítica; y con estos datos se calculó el rendimiento (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Rendimiento obtenido de los extractos de las plantas evaluadas (%).

Planta	Estructura	Hexano	Acetato	Acetona	Metanol
<i>Tagetes lucida</i>	hoja	2.38	3.43	6.98	1.18
	tallo	0.79	2.65	4.04	18.10
	flor	3.58	7.13	9.05	25.70
<i>Argemone mexicana</i>	raíz	0.62	0.91	0.71	9.36
	tallo	1.79	3.42	6.06	8.98
	hoja	1.50	5.90	0.11	13.09
	flor	1.45	2.58	2.21	18.32
	semilla	13.49	1.76	3.69	13.20
<i>Ficus benamina</i>	hoja	1.91	0.95	1.59	3.88
<i>Cissus hypoglauca</i>	hoja	1.25	2.58	1.44	5.73
<i>H. excelsa</i>	tallo	0.38	1.96	3.50	2.48
	hoja	1.04	3.27	8.52	1.64
<i>H. celastroides</i>	tallo	0.62	3.41	1.30	1.10
	hoja	1.40	4.06	9.61	13.65
<i>P. perniciosum</i>	corteza	1.35	1.19	4.71	9.88
	hoja	2.58	1.32	7.08	8.65

4.1.2 Análisis en Cromatografía en Capa Fina.

De manera preliminar, se logró identificar compuestos con reportes de actividad, gracias a la CCF, tales como cumarinas, flavonoides, y terpenoides (ver figura 4.1.).

Resultados y su Discusión

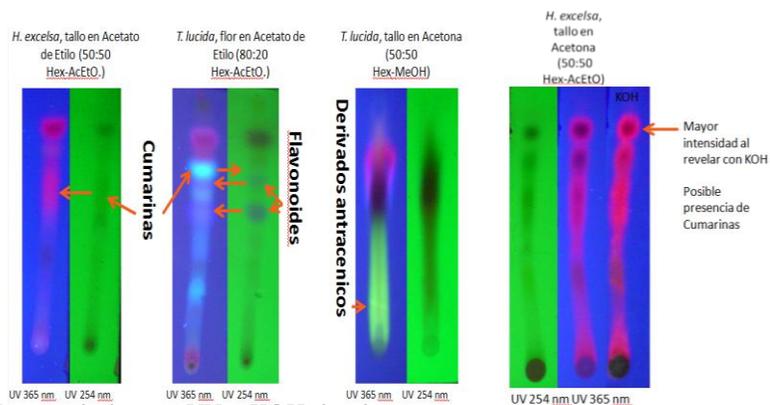


Figura 4.1. CCF y revelado con UV y KOH de algunos extractos.

4.2 INSECTOS

4.2.1 Establecimiento del pie de cría

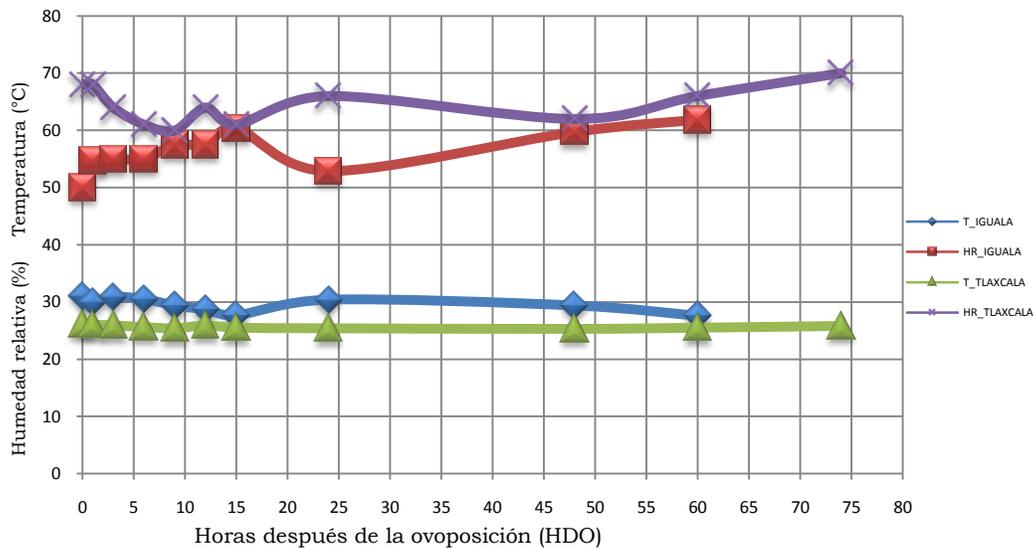
La finalidad de este experimento fue establecer la metodología y determinar los principales parámetros para mantener un pie de cría estable a fin de obtener una población homogénea sobre la cual trabajar. Es decir determinar el tiempo necesario para completar el desarrollo embrionario de los huevecillos de *A. aegypti* en laboratorio y en Iguala (Horas después de la ovoposición HDO), y además evaluar el porcentaje de viabilidad de los huevecillos cosechados en laboratorio.

4.2.1.1 Protocolo para la obtención de huevecillos de *A. aegypti*

Se determinó el ambiente (Humedad relativa y Temperatura) idóneo para el desarrollo del mosquito *A. aegypti*, (ver grafica 4.1). Una vez establecidos los parámetros bajo estas condiciones, fue necesario transferir estos parámetros a un laboratorio en el estado de Tlaxcala, lugar donde se llevaron a cabo las pruebas biológicas.

En la grafica 4.1 se muestran las variaciones de la Humedad relativa (HR) y Temperatura (T) en ambos laboratorios donde se llevaron a cabo posteriores investigaciones.

Resultados y su Discusión

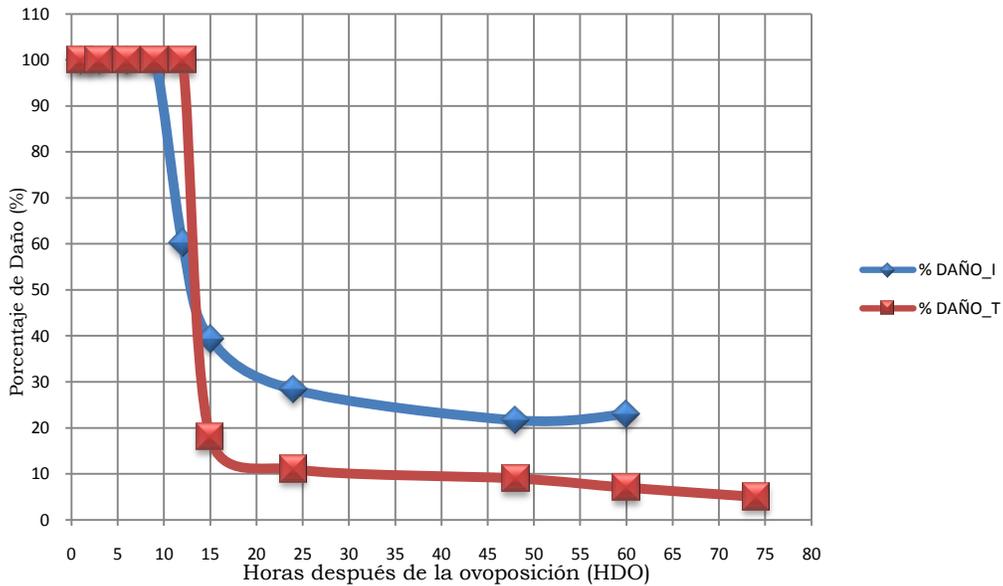


Gráfica 4.1 Historial de Temperatura y humedad Relativa en Iguala Gro y Tlaxcala en el experimento.

Como puede observarse en la Gráfica 4.1, los datos indican que en las condiciones climáticas de Iguala Gro., (Temperatura ambiente promedio de 29.5 ± 2 °C y Humedad Relativa $> 65\%$, durante el experimento), son relativamente diferentes a las condiciones del laboratorio, es decir el clima en Iguala tiende a ser más caluroso pero con una menor cantidad de agua en el aire. Sin embargo en el laboratorio instalado en el CIBA-Tlaxcala aunque la temperatura es ligeramente menor la humedad relativa es más abundante que en Iguala.

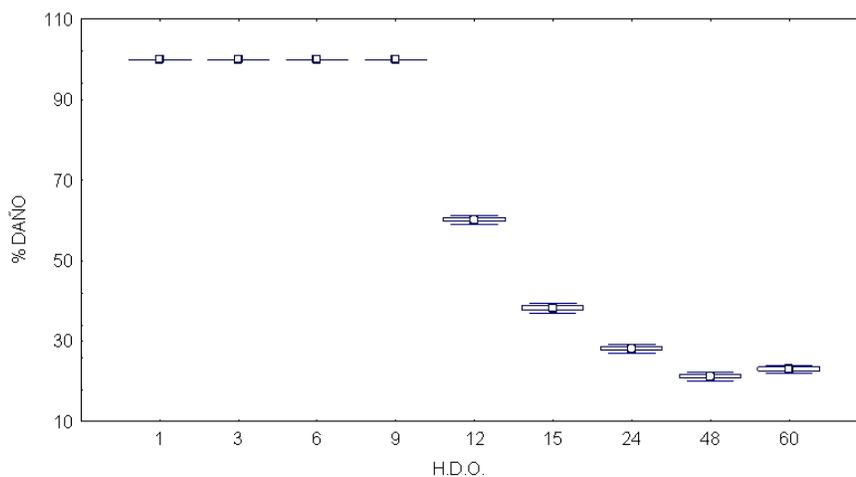
Estas pequeñas diferencias influyen en el desarrollo embrionario de *A. aegypti*. Como puede apreciarse en las Gráficas 4.2 y 4.3 el desarrollo del embrión en Iguala inicia alrededor de las 10 HDO (Horas Después de la Ovoposición) en tanto que en el laboratorio este mismo fenómeno se observó hasta las 12 HDO. En otro aspecto es remarcable el hecho de que el porcentaje de huevecillos dañados se estabiliza alrededor del 25% en Iguala, mientras que en el laboratorio del CIBA-Tlaxcala se obtiene de un 5-10 % de huevecillos dañados. Esto quizá se deba a una mayor humedad relativa en el laboratorio aunque es fácil distinguir el hecho de que el desarrollo embrionario es más rápido en Iguala.

Resultados y su Discusión



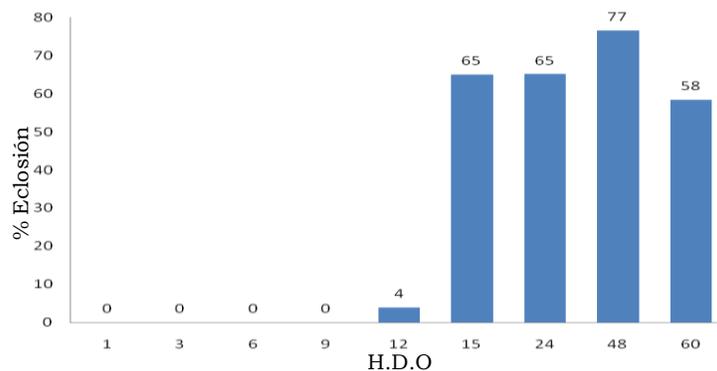
Gráfica 4. 2 Desarrollo embrionario de *A. aegypti* en dos condiciones distintas.

De acuerdo a la literatura, Rezende *et al.*, (2008) señalan que es alrededor de las 12 HDO cuando el embrión comienza a formar una cutícula serosa que lo aísla completamente del ambiente. De esta forma los huevecillos de *A. aegypti* pueden soportar condiciones adversas y permanecer viables por más tiempo.



Gráfica 4.3 Evaluación del porcentaje de huevecillos dañados al deshidratarlos al intervalo Indicado.

De acuerdo a los resultados que nosotros pudimos observar en el Laboratorio, si los huevecillos permanecen en agua todo el tiempo la eclosión de los mismos no es del todo sincronizada (Grafica 4.4), pero si son sometidos a un periodo de deshidratación antes de que finalice la formación de la larva y puedan eclosionar (60 HDO), los huevecillos adquieren una sorprendente capacidad de soportar resequedad y aun más curioso, la mayoría de ellos eclosionan de una manera homogénea, como se puede considerar en la grafica 4.4. Continuando con nuestros resultados, los huevecillos que se deshidrataron después de 48 HDO mostraron un 77 % de eclosión, a las 24 horas de haber inducido el nacimiento de las larvas; mientras que los que se mantuvieron siempre en agua, (60 HDO) solo tuvieron un 58 % de eclosión.



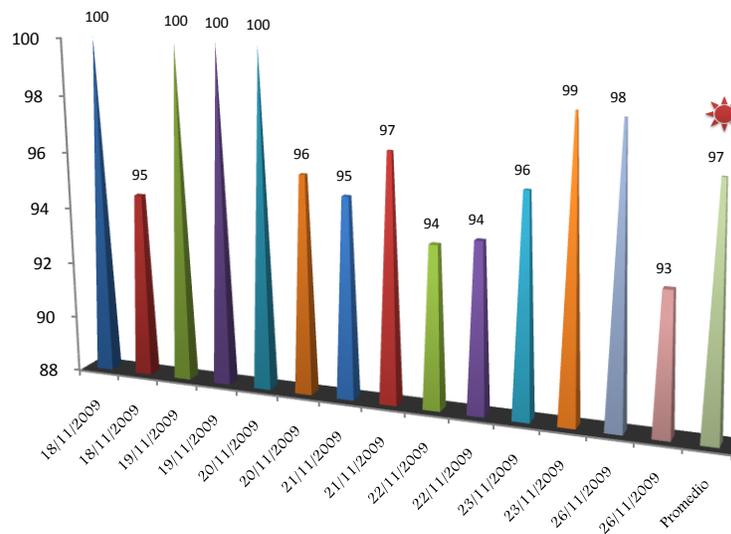
Gráfica 4.4 Evaluación del porcentaje de huevecillos que eclosionaron al deshidratarlos al intervalo Indicado.

4.2.1.2 Manejo de los huevecillos en laboratorio, (Prueba del Pincel)

Los resultados de la prueba del pincel pueden observarse en la Gráfica 4.5, donde el porcentaje de huevecillos viables es superior al 95 %. Esto quizá se deba a las condiciones ambientales promedio de las instalaciones del laboratorio en CIBA-Tlaxcala ($27 \pm 2^\circ\text{C}$ y HR 85-75 %) en comparación a las condiciones de Iguala ($29.5 \pm 2^\circ\text{C}$ y HR 65-50%).

Resultados y su Discusión

La diferencia entre temperaturas pudiera ser crucial en el desarrollo embrionario y en el porcentaje de viabilidad de los huevecillos, tal como señalan Rezende *et al.*, (2008), ya que los mismos obtuvieron resultados semejantes a los presentados. De esta manera se confirma que la temperatura optima para el desarrollo embrionario, de *A. aegypti* es de 27°C.



Grafica 4.5 Historial de viabilidad obtenida para huevecillos cosechados en el laboratorio de Tlaxcala.

4.4 PRUEBA PRELIMINAR DE ACTIVIDAD LARVICIDA

Los datos obtenidos de más de 60 extractos estudiados, en cuanto a actividad larvicida (ver **Tabla 4.2**) indican que sólo algunos de ellos presentan una actividad por debajo de 200 mg/L. Dentro de ellos se observó que tres géneros presentan una actividad larvicida media (DL_{50} entre 200-100 mg/L) y dos una buena actividad (DL_{50} menor a 100 mg/L).

Tabla 4.2 Dosis letales medias calculadas a 24 y 48 horas de los extractos.

Extracto	DL₅₀ 24	DL₅₀ 48
<i>Hippocratea excelsa</i> tallo hexano	+	+
<i>Hippocratea excelsa</i> tallo acetato	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> tallo acetona	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> tallo metanol	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> hoja hexano	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> hoja acetato	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> hoja acetona	-	-
<i>Hippocratea excelsa</i> hoja metanol	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> hoja hexano	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> hoja acetato	+	+
<i>Hippocratea celastroides</i> hoja acetona	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> hoja metanol	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> tallo hexano	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> tallo acetato	-	-
<i>Hippocratea celastroides</i> tallo acetona	+	+
<i>Hippocratea celastroides</i> tallo metanol	-	-
<i>Tagetes lucida</i> hoja hexano	+	+

Tabla 4.2 Continuación.

Extracto	DL₅₀ 24	DL₅₀ 48
<i>Tagetes lucida</i> hoja acetona	+	+
<i>Tagetes lucida</i> hoja metanol	-	-
<i>Tagetes lucida</i> tallo hexano	+	+
<i>Tagetes lucida</i> tallo acetato	++	++
<i>Tagetes lucida</i> tallo acetona	+	+
<i>Tagetes lucida</i> tallo metanol	-	-
<i>Tagetes lucida</i> flor hexano	+	+
<i>Tagetes lucida</i> flor acetato	++	++
<i>Tagetes lucida</i> flor acetona	+	+
<i>Tagetes lucida</i> flor metanol	-	-
<i>Argemone mexicana</i> raíz hexano	-	-
<i>Argemone mexicana</i> raíz acetato	+	++
<i>Argemone mexicana</i> raíz acetona	+	++
<i>Argemone mexicana</i> raíz metanol	+	+
<i>Argemone mexicana</i> tallo hexano	-	-
<i>Argemone mexicana</i> tallo acetato	+	+

Tabla 4.2 Continuación.

Extracto	DL₅₀ 24	DL₅₀ 48
<i>Argemone mexicana</i> tallo acetona	-	-
<i>Argemone mexicana</i> tallo metanol	-	-
<i>Argemone mexicana</i> hoja hexano	+	+
<i>Argemone mexicana</i> hoja acetato	+	+
<i>Argemone mexicana</i> hoja acetona	+	+
<i>Argemone mexicana</i> hoja metanol	-	-
<i>Argemone mexicana</i> flor hexano	+	+
<i>Argemone mexicana</i> flor acetato	+	+
<i>Argemone mexicana</i> flor acetona	+	+
<i>Argemone mexicana</i> flor metanol	-	-
<i>Argemone mexicana</i> semilla hexano	+++	+++
<i>Argemone mexicana</i> semilla acetato	+	++
<i>Argemone mexicana</i> semilla acetona	+++	+++
<i>Argemone mexicana</i> semilla metanol	++	+++
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> hoja hexano	-	-
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> hoja acetato	+	++

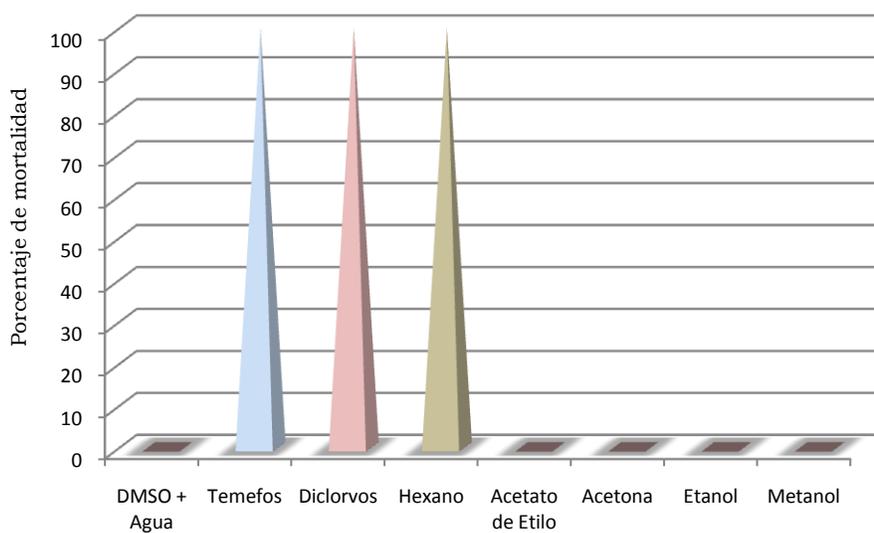
Tabla 4.2. Continuación.

Extracto	DL₅₀ 24	DL₅₀ 48
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> hoja acetona	-	-
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> hoja metanol	-	-
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza hexano	++	+++
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza acetato	+	++
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza acetona	-	-
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza metanol	-	-

*(+++) Indica una DL₅₀ < 100; (++) DL₅₀ > 100, < 200; (+) DL₅₀ > 200 y (-) extracto no tóxico.

Tal como puede apreciarse en la siguiente grafica, los testigos positivos y negativos no proporcionan evidencia que indique sesgos por manejo o diseño del experimento. De los disolventes utilizados para la extracción solo el hexano resulto ser toxico para las larvas, sin embargo ningún otro disolvente mostro la misma tendencia.

Por otra parte los testigos positivos muestran que la población de insectos con la que se trabajó no presenta resistencia a los insecticidas (el porcentaje de supervivencia es menor al 10%, Gráfica 4.6) a las dosis recomendadas por los fabricantes.



Grafica 4.6 Toxicidad de los testigos positivos y negativos, así como de los disolventes empleados.

El testigo negativo (DMSO+Agua) resultó no toxico a las dosis indicadas anteriormente. Por lo que se puede aseverar que la mortalidad observada en todos los tratamientos fue el efecto del extracto utilizado sobre las larvas de *A. aegypti*.

Como puede observarse en el **Cuadro 4.1** los resultados de la segunda prueba de actividad larvicida revelan diferencias significativas entre extractos y una diferencia clara entre los tiempos de exposición, de acuerdo al análisis de varianza realizado a los once mejores extractos. Los extractos de *T. lucida* de tallo, hoja y flor en acetato de etilo muestran una

DL₅₀ entre 100 y 200 mg/L, tomando en cuenta que se tratan de extractos crudos es posible que existan metabolitos tóxicos que al ser aislados presenten una mayor actividad.

Cuadro 4.1 Dosis letales medias (mg/L) de los once mejores extractos a 28 y 48 horas sobre larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

Extracto	Clave	DL₅₀24*	DL₅₀48*
<i>Argemone mexicana</i> semilla hexano	AMSH	72.02 abcd	67.4 abc
<i>Argemone mexicana</i> raíz acetona	AMRA	259.99 i	178.68 fgh
<i>Argemone mexicana</i> raíz acetato	AMRAEt	267.86 i	152.54 efg
<i>Argemone mexicana</i> semilla acetona	AMSA	68.82 abc	61.18 ab
<i>Argemone mexicana</i> semilla metanol	AMSM	120.71 bedef	104.61 bcde
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza acetato	CECAEt	561.57 j	129.83 cdefg
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> corteza hexano	CECH	132.17 cdefg	32.54 a
<i>Pseudosmodingium perniciosum</i> hoja acetato	CEHAEt	893.69 k	193.18 gh
<i>Tagetes lucida</i> flor acetato de etilo	TLFAEt	170.47 fgh	164.32 efg
<i>Tagetes lucida</i> hoja acetato de etilo	TLHAEt	219.43 hi	156.96 efg
<i>Tagetes lucida</i> tallo acetato de etilo	TLTAet	179.71 fgh	135.99 defg

*Dosis letales en mg/L.

Dosis con letras distintas indican diferencias significativas (TUKEY, $\alpha=0.05$).

Los extractos de *T. lucida* en acetato de etilo de tallo, hoja y flor mostraron una actividad moderada contra larvas de *A. aegypti* con una DL₅₀ en un rango de 100 a 200 mg/L, contrastando con lo obtenido por Dharmagadda *et al.* (2005) quienes demostraron que el aceite esencial de *T. patula* es eficaz en el control de larvas de *A. aegypti* con una DL₅₀₋₂₄ de 13.57 mg/L. Sus estudios también revelan que el principal componente del aceite esencial son limoneno, (Z) y (E)- β -ocimeno, dihidrotagetona, terpinoleno, junto a un gran número de compuestos. Sin embargo Ciccio (2004) reporta que el principal componente del aceite esencial de *T. lucida* no es el limoneno, sino el metil-clavicol, lo cual en parte puede explicar la

diferencia entre las dosis letales observadas y las reportadas en otros estudios.

La semilla de *A. mexicana*, mostró una actividad larvicida de buena a moderada con dosis letales menores a 100 mg/L para los extractos hexánico, acetonico y metanólico. El extracto con acetato de etilo no presentó una actividad larvicida eficiente. El extracto de *A. mexicana* semilla con acetona mostró una DL₅₀₋₂₄ de 61 mg/L, posicionándose como la más tóxica de su grupo. Karmegam *et al.* (1997) hallaron que el extracto acuoso de *A. mexicana* no es eficiente para el control de larvas de *A. aegypti*. Sin embargo Sakthivadivel y Thilagavathy (2003) demostraron que la fracción cetónica de semillas de *A. mexicana* en éter de petróleo tuvo una DL₅₀₋₂₄ de 17.4 mg/L en laboratorio. Cabe mencionar que el extracto empleado en este estudio es el extracto crudo, por lo que podría considerarse que al fraccionarlo la toxicidad del mismo incrementa. Los principales metabolitos reportados para la semilla de *A. mexicana* son la sanguinarina y la protopina, ambos alcaloides tóxicos (Santos y Adkilen 1932).

Cuadro 4.2 Dosis letales medias (mg/L) de los extractos mas tóxicos a 28 y 48 horas sobre larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

Extracto	Clave	DL₅₀₂₄*	DL₅₀₄₈*
<i>P. perniciosum</i> Corteza Hexano	CECH	132.17 ^c	32.54 ^a
<i>Argemone mexicana</i> Semilla Hexano	AMSH	72.02 ^b	67.40 ^b
<i>Argemone mexicana</i> Semilla Acetona	AMSA	68.82 ^b	61.18 ^{ab}
<i>Argemone mexicana</i> Semilla Metanol	AMSM	120.71 ^c	104.61 ^c

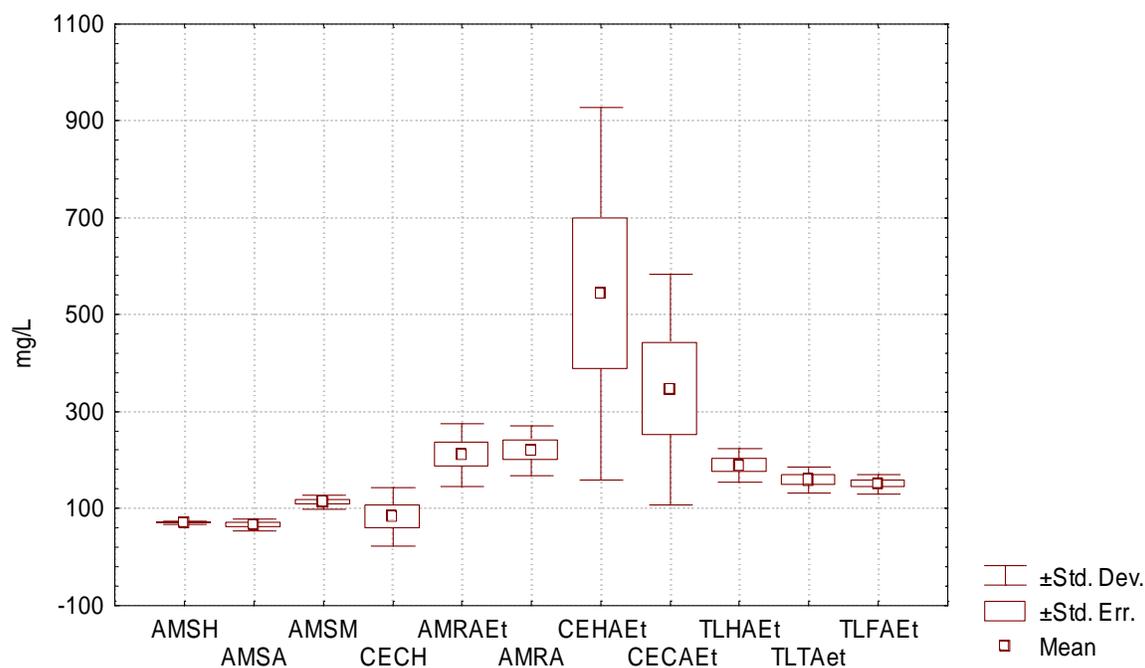
*Dosis letales en mg/L.

Dosis con letras distintas indican diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$).

Como puede apreciarse en el cuadro 4.2 el extracto mas toxico es *P. perniciosum* corteza hexano con una dosis letal de 32.54 mg/L a las 48

horas, aunque los extractos más rápidos en actuar son *A. mexicana* semilla hexano y acetona, quizá por la presencia de alcaloides.

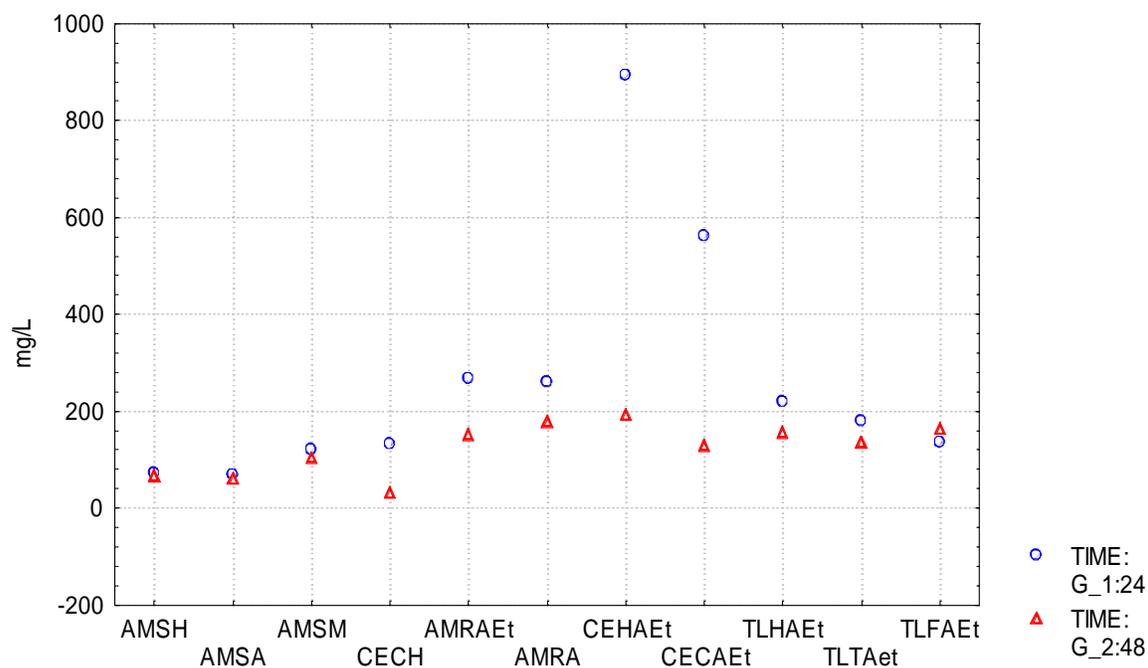
La grafica 4.7 muestra las DL_{50} de los extractos evaluados así como la desviación estándar de los mismos. Cabe señalar que para los extractos crudos obtenidos de *A. mexicana* existe poca variabilidad. En contraste los extractos crudos de *P. perniciosum* de corteza y hoja en acetato de etilo son de comportamiento inconsistente, estadísticamente hablando, como se puede apreciar en el gráfico. Los extractos de *P. perniciosum* y *T. lucida* presentan una varianza media, lo que indica un comportamiento homogéneo.



Gráfica 4.7. Varianza de la toxicidad de los extractos (Para abreviaciones ver cuadro 4.1).

Sin embargo *P. perniciosum* corteza hexano, presenta una DL_{50-48} de tan solo 32 mg/L, siendo el más toxico observado en este estudio. Para la especie *P. perniciosum* aun no se han reportado ensayos en los que se le utilice para el control larvario de *A. aegypti*. Son aun escasos los estudios

orientados a determinar los principales metabolitos de esta especie, siendo una importante contribución el trabajo realizado por Aguilar-Ortigoza *et al.* (2003) al haber identificado fenoles tóxicos.



Grafica 4.8 Tendencia de la toxicidad de los extractos a las 24 y 48 horas (para abreviaciones ver cuadro 4.1).

Tal como se puede observar en la Gráfica 4.8 se distinguen claramente las tendencias existentes entre los extractos evaluados y el tiempo de exposición. A excepción de los tres primeros extractos (*A. mexicana* semilla hexano, acetona y metanol), las dosis letales tienden a ser más tóxicas en relación al tiempo de exposición. Es decir los extractos son menos tóxicos a las 24 horas que a las 48 horas. En otro aspecto se puede observar que las DL_{50} de los extractos de *A. mexicana* no suelen tener un efecto prolongado, es decir las DL_{50} a 24 y 48 horas son estadísticamente similares.

Sin embargo para *P. perniciosum* la toxicidad tiende a incrementarse de las 24 a las 48 horas. Este fenómeno sugiere que el ó los principios activos presentes en esta planta tienen un ligero grado de residualidad. Otra posible explicación es que las moléculas responsables de la actividad a corto plazo (24 h) se descompongan en subproductos de igual o mayor toxicidad. Se necesitan nuevas investigaciones para saber qué es lo que ocurre en realidad.

4.5 PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Como puede apreciarse de manera general en la siguiente tabla los principales metabolitos encontrados en los extractos de *A. mexicana* semilla son alcaloides mientras que para *P. perniciosum* corteza son taninos (Tabla 4.3)

Las reacciones para la detección de alcaloides (Draguendorf, Wagner, Mayer y Hager) dieron positivo para *A. mexicana* semilla en Hexano y Acetato de Etilo. Las reacciones para taninos con cloruro férrico, gelatina, gelatina-sal dieron positivo. Las fracciones etanólicas de todos los extractos dieron positivo en cloruro férrico lo que sugiere la presencia tanto de taninos como de fenoles.

Sin embargo los extractos en acetato de etilo, acetona y metanol dieron positivo al realizar la misma prueba en medio acuoso y presentaron una coloración verdosa lo que es indicativa de taninos del tipo catecólico. Otros componentes importantes encontrados fueron esteroides y/o terpenoides (positivo a Lieberman-Buccharde), flavonoides (positivo a Shinoda y Salkowski), glucósidos cardiotónicos (Kedde) y cumarinas (positivo a NaOH al 5% y Baljet) aunque estas últimas solo se detectaron en el extracto cetónico de la semilla de *A. mexicana*.

En los extractos de la corteza de *P. perniciosum* se detectaron taninos/fenoles al realizar la prueba de cloruro férrico en etanol, dando un

precipitado grisáceo. Al realizar la misma prueba en medio acuoso se obtuvo un precipitado grisáceo en el extracto hexánico, y un color azulado en el resto, esta última coloración es típica de taninos del tipo pirogalotánicos.

Toda la familia de estos extractos dieron positivo a Lieberman-Bucchard (esteroles/terpenoides); en los extractos en AcOEt, acetona y metanol se detectaron cumarinas con la prueba de Baljet y NaOH. El extracto hexánico dio positivo en la detección de flavonoides (Shinoda); también se detectaron glucósidos cardiotónicos al observarse una coloración violácea en el ensayo de Kedde. La tabla 4.3 resume el total de pruebas a la gota realizadas a los extractos que presentaron una actividad larvicida por debajo de 100 mg/L.

Resultados y su Discusión

Tabla 4.3. Principales familias de compuestos químicos encontrados en *A. mexicana* semilla y *P. Perniciosum* corteza.

Reacción	<i>A. mexicana</i> semilla				<i>P. perniciosum</i> corteza			
	Hexano	AcEto	Acetona	Metanol	Hexano	AcEto	Acetona	Metanol
Baljet MeOH	-	-	-	-	+	+	+	+
Tricloruro de Antimonio	-	-	-	-	-	+	+	+
Cloruro férrico	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina/sal	+	+	+	+	+	+	+	+
Sal	+	+	+	+	+	+	+	-
Lieberman-Bucchard	+	+	+	+	+	+	+	-
Salkowski	+	+	+	+	+	+	+	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-	+	+
NaOH 5%	-	-	-	-	-	+	+	+
Guinard	-	-	-	-	-	-	-	-
Draguendorf	+	+	-	+	-	-	-	-
Hager	+	+	-	-	-	-	-	-
Mayer	+	+	-	-	-	-	-	-
Wagner	+	+	-	-	-	-	-	-
Pew's	-	-	-	+	+	-	-	+
Shinoda	-	-	-	+	+	-	-	-
EtOH/NaOH 5%	-	-	+	-	-	-	-	-
Kedde	+	+	+	+	+	+	+	+
Salkowski	+	+	+	-	+	+	-	-
Lieberman-Bucchard	+	+	-	-	-	-	-	-
Keller	-	-	-	-	+	+	-	-
Baljet Acuoso	-	-	-	+	-	+	-	-
Cloruro férrico acuoso	-	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina acuoso	+	-	+	+	-	+	+	+
gelatina/sal acuoso	+	-	+	+	-	+	+	+
Sal acuoso	+	-	+	-	-	-	-	-

CAPITULO V
CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES

En lo que respecta al pie de cría, obtención y manejo de los huevecillos se puede concluir que:

Los huevecillos de *A. aegypti* y su capacidad de resistencia a la deshidratación están en función de dos parámetros principales:

- La Temperatura ambiente.
- La disponibilidad de agua en las primeras 24 HDO.

Para obtener un porcentaje de viabilidad recomendable ($\geq 90\%$) los huevecillos no deben deshidratarse antes de las 48 HDO, ni después de las 59 HDO, a 27 ± 2 °C.

Por otra parte, el desarrollo embrionario se concreta en 60 HDO en Iguala, mientras que en el laboratorio de Tlaxcala se extiende a 74 HDO. Los huevecillos adquieren una alta resistencia a la desecación después de 12-15 HDO. Se obtiene una mayor sincronización de la eclosión de huevecillos deshidratándolos después de 48 HDO.

Los extractos crudos con mayor actividad larvicida sobre *A. aegypti* han sido obtenidos de la corteza de *Pseudosmodium perniciosum* y la semilla de *Argemone mexicana*, con dosis letales medias menores a 100 ppm. El mayor efecto se observa dentro de las primeras 48 horas de exposición.

Aunque es necesaria mas evidencia, es posible que los alcaloides contenidos en las semillas de *A. mexicana* sean los responsables de la actividad larvicida, ya que se logró detectar alcaloides, taninos del tipo catecólico, fenoles, esteroides y/o terpenoides, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y cumarinas.

Hasta el momento no se había registrado la actividad de *P. perniciosum* sobre larvas de *Aedes aegypti*. En los extractos de la corteza de *P.*

CONCLUSIONES

perniciosum y se detectaron taninos del tipo pirogalotánicos (hidrolizables), fenoles, esteroides/terpenoides, cumarinas, flavonoides, glucósidos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdala L. R. 1999.** *Flavonoids of the aerial parts from Tagetes lucida (Asteraceae).* Biochemical Systematics and Ecology 27 (7), 753-754.
2. **Aguilar-Ortigoza C. J., Sosa V., y Aguilar-Ortigoza M. 2003.** *Toxic phenols in various Anacardiaceae species.* Economis Botany 57(3) 354-364.
3. **Al-Sharook Z., Balan K., Jiang Y., and Rembold H. 2007.** *Insect growth inhibitors from two tropical meliaceae. Effect of crude seed extracts on mosquito larvae.* Journal of Applied Entomology 111, 425-430
4. **Alshawsh M. A., Mothana R. A., Al-shamahy H. A., Alslami S. F., Lindequist U. 2009.** *Assessment of antimalarial activity against Plasmodium falciparum and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants.* eCAM; 6(4).
5. **Anyaele O. O., y Amusan A. A. S. 2005.** *Toxicity of hexanolic extract of Dennettia tripetala (g. Baxer) on larvae of Aedes aegypti (L).* Afr. J. Biomed. Res. 6; 49 - 53.
6. **Aquino, R., Cáceres A., Morelli S., & Rastrelli L. 2002.** *An Extract of Tagetes lucida and Its Phenolic Constituents as Antioxidants.* J. Nat. Prod (65), 1773-1776.
7. **Autran E. S., Neves I. A., da Silva C. S., Santos G. K., da Câmara C. A., Navarro D. M. 2009.** *Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against Aedes aegypti of essential oils from Piper marginatum Jacq. (Piperaceae).* Bioresour Technol 100:2284-2288
8. **Bicchi, C., Fresia M., Rubiolo P., Monti D., Franz C., & Goehler I. 1997.** *Constituents of Tagetes lucida Cav. ssp. lucida essential oil.* Flavour and Fragrance Journal, 12 (1), 47-52.
9. **Cáceres-Castillo D., Mena-Rejón G. J., Cedillo-Rivera R., Quijano L. 2008.** *21-Hydroxy-oleanane-type triterpenes from Hippocratea excelsa.* Phytochemistry 69: 1057-1064
10. **Carmona A. J., Gil O. R., Rodríguez A. 2008.** *Descripción taxonómica, morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida- Venezuela.* Boletín Antropológico 73: 113-129.
11. **Cavalcanti E. S., Morais S. M., Lima M. A., Santana E. W. 2004.** *Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against Aedes aegypti L.* Mem Inst Oswaldo Cruz. (5):541-4.
12. **Céspedes, C. L., Ávila G. J., Martínez A., Serrato B., Calderón-Múgica J. C. & Salgado-Garciglia R. 2006.** *Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (Tagetes lucida).* J. Agric. Food Chem. (54), 3521-3527.
13. **Chadee D. D. 2009.** *Oviposition strategies adopted by gravid Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002-2006).* Acta tropica 111(3):279-83.
14. **Chapagain B.P., Saharan V., Wiesman Z. 2008.** *Larvicidal activity of saponins from Balanites aegyptiaca callus against Aedes aegypti mosquito.* Bioresour Technol. 99(5):1165-8.
15. **Cheng S. S., Chang H. T., Chang S. T., Tsai K. H., Chen W. J. 2003.** *Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito Aedes aegypti larvae.* Bioresour Technol. 89(1):99-102.
16. **Cheng S. S., Chua M. T., Chang E. H., Huang C. G., Chen W. J., Chang S. T. 2009.** *Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from Cryptomeria japonica at different ages.* Bioresour Technol. 100(1):465-70.
17. **Cheng S. S., Huang C. G., Chen W. J., Kuo Y. H., Chang S. T. 2008.** *Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type Cryptomeria japonica against two mosquito species.* Bioresource Technology 99: 3617-3622.
18. **Cheng S. S., Huang C. G., Chen Y. J., Yu J. J., Chen W. J., Chang S. T. 2009.** *Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species.* Bioresour Technol. 100(1):452-6.
19. **Chowdhury N., Ghosh A., y Chandra G. 2008.** *Mosquito larvicidal activities of Solanum villosum berry extract against the dengue vector Stegomyia aegypti.* BMC Complementary and Alternative Medicine, 8:10.
20. **Ciccía G., Coussio J. and Mongelli E. 2000.** *Insecticidal activity against Aedes aegypti larvae of some medicinal South American plants.* J. Ethnopharmacol 72:185-189.
21. **Cicció J. 2004.** *A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of Tagetes lucida (Asteraceae) cultivated in Costa Rica.* Revista de Biología Tropical 52 (4): 853-857.
22. **CONAVE. 2008.** *Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas.* Boletín informativo México.

BIBLIOGRAFÍA

23. **Coria C.**, Almiron W., Valladares G., Carpinella C., Ludueña F., Defago M., Palacios S. **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.
24. **Dharmagadda V. S. S.** Naik S. N., Mittal P. K., Vasudevan P. **2005**. *Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species*. Bioresource Technology 96: 1235-1240.
25. **de Moraes S. M.**, Facundo V. A., Bertini L. M., Cavalcanti E. S. B., Anjos-Júnior J. F., Ferreira S. A., de Brito E. S., de Souza Neto M. A. **2007**. *Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species*. Biochemical Systematics and Ecology, 35 (10), pp. 670-675
26. **de Omena M.C.**, Navarro D.M., de Paula J.E., Luna J.S., Ferreira de Lima M.R., Sant'Ana A.E. **2007**. *Larvicidal activities against Aedes aegypti of some Brazilian medicinal plants*. Bioresour Technol. 98(13):2549-56.
27. **de Luna J. S.**, dos Santos A. F., de Lima M. R., de Omena M. C., de Mendonça F. A., Bieber L. W., Sant'Ana A. E. **2005**. *A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil*. J Ethnopharmacol. 97(2):199-206.
28. **Dharmagadda V. S.**, Naik S. N., Mittal P. K., Vasudevan P. **2005**. *Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species*. Bioresour Technol. 96(11):1235-40.
29. **Dodson C. H.** y Robyns A. **1965**. *Flora of Panama. Hippocrateaceae*. Ann. Miss. Bot. Garden 52(1):81-98.
30. **Evans D. A.**, Raj R. K. **1991**. *Larvicidal efficacy of Quassia against Culex quinquefasciatus*. Indian J. Med. Res. 93: 324-327.
31. **Farnesí L. C.**, Martins A. J., Valle D., Rezende G. L. **2009**. *Embryonic development of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(1):124-6.
32. **Finney, D. J.**, **1971**. *Probit Analysis*. Third ed. Cambridge university press, Cambridge, p. 333.
33. **Gillij Y. G.**, Gleiser R. M., Zygadlo J. A. **2008**. *Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina*. Bioresour Technol. 99(7):2507-15.
34. **Gubler, D. J.**, **2002**. *Epidemic Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever as a Public Health, Social, and Economic Problem in the 21st Century*. Trends in Microbiology 2: 100-3.
35. **Gubler, D. J.**, and Kuno G. **1997**. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International.
36. **Guzmán, M. G.**, and Kouri G. **2002**. *Dengue: An Update*. Lancet Infectious Disease 2: 33-42.
37. **Guzmán, M. G.**, and Kouri G. **2003**. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Lessons and Challenges*. Journal of Clinical Virology 27: 1-13.
38. **Guzmán, M. G.**, Kouri G., Valdes L., Bravo J., Vazquez S., and Halstead S. B. **2002**. *Enhanced Severity of Secondary Dengue-2 Infections: Death Rates in 1981 and 1997 Cuban Outbreaks*. Pan American Journal of Public Health 11: 223-27.
39. **Hernández T.**, Canales M., Flores C., García A., Duran A., & Avila J. **2006**. *Antimicrobial Activity of Tagetes lucida*. Pharmaceutical Biology 44 (1), 19-22.
40. **Herrera-Santoyo J.**, López D. H., y Mora H. M. **2007**. *Stress in callus of Hippocratea excelsa: catalase activity hydrogen peroxide content and canophyllol accumulation*. Inter ciencia 32 (4), 253-256.
41. **Hirzel J.**; Rodríguez N. y Del Valle P. **2004**. *Efecto de la nutrición mineral sobre la producción de culén (Otholobium glandulosum (L.) Grimes)*. Agric. Téc., 64: 3, 280-287.
42. **Hull B.**, Tikasingh E., de Souza M., and Martinez R. **1984**. *Natural Transovarial Transmission of Dengue 4 Virus in Aedes aegypti in Trinidad*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 33: 1248-50.
43. **Hwee-Ling K.**, Tung-Kiam C., Chay-Hoon T. **2009**. *A guide to medicinal plants: an illustrated, scientific and medicinal approach*. World scientific publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. 513 p.
44. **Jackson F. L.**, Behkeit S. S., EL-Etr S. M. and Quach N. K. **1990** *Larvicidal effects of grain sorghum (Sorghum bicolor) seedling extracts upon Culex pipiens larvae*. J Am Mosq Control Assoc 6, pp. 500-503
45. **Jalees S.**, Sharma S. K., Rahman S. J. and Verghese T. **1993**. *Evaluation of insecticidal properties of an indigenous plant, Cannabis sativa Linn., against mosquito larvae under laboratory conditions*. J Entomol Res 17 (2), 117-120.
46. **Jang Y. S.**, Baek B. R., Yang Y. C., Kim M. K., Lee H. S. **2002**. *Larvicidal activity of leguminous seeds and grains against Aedes aegypti and Culex pipiens pallens*. J Am Mosq Control Assoc; 18:210-3.
47. **Jbilou R.**, Amri H., Bouyad N., Ghailani N., Ennabili A., & Sayah F. **2008**. *Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of Tribolium castaneum (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae)*. Bioresource Technology 99, 99, 959-964.
48. **Kabir K. E.**, Khan A. R. and Mosaddik M. A. **2003**. *Goniothalamina-a potent mosquito larvicide from Bryonopsis laciniosa L.* J Appl Entomol 127 , pp. 112-115

BIBLIOGRAFÍA

49. **Kalyanasundaram M.** y Babu C. J. **1892.** *Biologically active plant extracts as mosquito larvicides.* Indian J Med Res 76; 102-106.
50. **Kanjanapothi D.,** Panthong A., Lertprasertsuke N., Taesotikul T., Rujjanawate C., Kaewpinit D., Sudthayakorn R., Choochote W., Chaithong U., Jitpakdi A., Pitasawat B. **2004.** *Toxicity of crude rhizome extract of Kaempferia galanga L. (Proh Hom).* J Ethnopharmacol. 90(2-3):359-65.
51. **Karmegam N.,** Sakthivadivel M., Anuradha V. and Daniel T. **1997.** *Indigenous plant extracts as larvicidal agents against Culex quinquefasciatus Say.* Bioresour Technol 59; 137-140.
52. **Kiran S. R.,** Bhavani K., Sita Devi P., Rajeswara Rao B.R., Janardhan Reddy K. **2006.** *Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of Chloroxylon swietenia DC against Aedes aegypti and Anopheles stephensi.* Bioresour Technol.; 97(18):2481-4.
53. **Kisangau D. P.,** Lyaruu H. V., Hosea K. M., and Joseph C. C. **2007.** *Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district.* Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 3:29
54. **Kumar A.** y Dutta G. P. **1987.** *Indigenous plant oils as larvicidal agent against Anopheles stephensi mosquitoes.* Curr Sci 56; 959-960.
55. **Lee S. E. 2000** *Mosquito larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, Piper longum.* J Am Mosq Control Assoc; 16:245-7.
56. **Leonti M.,** Sticher O., & Heinrich M. **2003.** *Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México).* Journal of Ethnopharmacology (88), 119-124.
57. **Macoris M.,** Andrighetti M. T., Takaku L., Glasser C. M., Garbeloto V. C., Bracco J. E. **2003.** *Resistance of Aedes aegypti from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides.* Mem Inst Oswaldo Cruz; 98(5):703-8.
58. **Mansour S. A.,** Messeha S. S. y EL-Gengaihi S. E. **2000.** *Botanical biocides. 4. Mosquitocidal activity of certain Thymus capitatus constituents,* J Nat Toxins 9; 49-62.
59. **Martínez-Millán M.** y Cevallos-Ferriz S. R. S. **2005.** *Arquitectura foliar de anacardiácea.* Revista Mexicana de Biodiversidad 76 (2): 137-190.
60. **Mata R.,** Calzada F., Díaz E., and Toscano R. A. **1990.** *Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, XV. Sesquiterpene Evoninoate Alkaloids from Hippocratea excelsa.* J. Nat. Prod., 53 (5), 1212-1219
61. **Mateos J. L.,** Noriega L., Huettemann R. E., Kanojia R. M. **1976.** *U. S. Patent n° 3, 996, 132.* United States Patent.
62. **Moawed H. A. M. 1998.** *Joint action of some plant extracts against the mosquito larvae of Culex pipiens and their physiological impact.* MSc Thesis, Faculty of Science-Dmietta, Mansoura University.
63. **Monzon R. B.,** Alvior J. P., Luczon L.L, Morales A.S. and Mutuc F.E. **1994.** *Larvicidal potential of five Philippine plants against Aedes aegypti (Linnaeus) and Culex quinquefasciatus (Say).* Southeast Asian J Trop Med Public Health 25; 755-759.
64. **Morrison, A.,** Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. **2008.** *Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector Aedes aegypti.* PLoS Med 5(3): e68.
65. **Omolo O. M.,** Okinyo D., Ndiege I. O., Lwande W., Hassanali A. **2004.** *Repellency of essential oils of some Kenyan plants against Anopheles gambiae.* Phytochemistry 65; 2797-2802.
66. **Onyechi U. A.,** Judd P. A., Ellis P. R. **1998.** *African plant foods rich in non-starch polysaccharides reduce postprandial blood glucose and insulin concentrations in healthy human subjects.* British Journal of Nutrition 80, 419-428.
67. **Parveen M.,** Ghalib R. M., Mehdi S. H., Hassan-Mattu R. U., Ali M. **2009a.** *A novel antimicrobial triterpenic acid from the leaves of Ficus benjamina (var. comosa).* Journal of Saudi Chemical Society 13, 287-290.
68. **Parveen, M.,** Ghalib, R. M., Mehdi, S. H., Rehman, S. Z., Ali, M. **2009b.** *A new triterpenoid from the leaves of Ficus benjamina (var. comosa).* Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters 23 (8): 729-736.
69. **Perich M. J.,** Wells C., Bertsch W., Tredway K. E. **1995.** *Isolation of the insecticidal components of Tagetes minuta (Compositae) against mosquito larvae and adults.* J Am Mosq Control Assoc.; 11(3):307-10.
70. **Prajapati V.,** Tripathi A. K., Aggarwal K. K., Khanuja S. P. **2005.** *Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus.* Bioresour Technol.; 96(16):1749-57.
71. **Pushpalatha E.,** Muthukrishnan J. **1999.** *Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes.* J Appl Entomol 123:369-373.

BIBLIOGRAFÍA

72. **Rafikali**, A. M., Nair, M. G., **2001**. *Mosquitocidal, nematicidal, and antifungal compounds from Apium graveolens L. seeds*. J. Agric. Food Chem. 49 (1), 142-145.
73. **Rajkumar** S., y Jebanesan A. **2005**. *Larvicidal and Adult Emergence Inhibition Effect of Centella asiatica Brahmī (Umbelliferae) against Mosquito Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae)*. African Journal of Biomedical Research 8 (1) 31-33.
74. **Rajkumar** S., y Jebanesan A. **2010**. *Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from Clausena dentata (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, Aedes aegypti Linn. (Diptera: Culicidae)*. Journal of Asia-Pacific Entomology 13, 2, 107-109.
75. **Rajkumar** S., y Jebanesan A. **2008**. *Bioactivity of flavonoid compounds from Poncirus trifoliata L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae)*. Parasitol Res. 104(1):19-25.
76. **Ramsewak** R. S., Nair M. G., Murugesan S., Mattson W. J., Zasada J. **2001**. *Insecticidal fatty acids and triglycerides from Dirca palustris*. J Agric Food Chem.; 49:5852- 6.
77. **Ranaweera** S. S. **1996**. *Mosquito-larvicidal activity of some Sri Lankan plants*. J Natl Sci Counc Sri Lanka 24:63-9.
78. **Rey** D., Pautou M-P., Meyran J-C. **1999**. *Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae*. J Invertebr Pathol; 73:173- 81.
79. **Reyes-Chilpa** R., Jiménez-Estrada M., Cristóbal-Telésforo E., Torres-Colín L., Villavicencio M. A., Pérez-Escandón B. E., and Mercado-González R. **2003**. *Natural Insecticides from Hippocratea Excelsa and Hippocratea celastroides*. Economic Botany. 57 (1) 54-64.
80. **Rezende** G. L., Martins A. J., Gentile C., Farnesi L. C., Pelajo-Machado M., Peixoto A. A., Valle D. **2008**. *Embryonic desiccation resistance in Aedes aegypti: presumptive role of the chitinized serosal cuticle*. BMC Developmental Biology 8: 82.
81. **Rodriguez-Hernandez** C. **2005**. *Plantas contra plagas 2; epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuera y sabadilla*, RAP-AL, RAPAM, SOMAS, CP E ITA, ISBN: 968-839-486-6. 209 pp.
82. **Rosen**, L., Shroyer D. A., Tesh R. B., Freier J. E., and Lien J. C.. **1983**. *Transovarial Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes: Aedes albopictus and Aedes aegypti*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32: 1108-19.
83. **Rubio-Piña**, J.A. and Vázquez-Flota, F.A. **2008**. **Isolation of functional total RNA from Argemone mexicana tissues**. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 11 (4).
84. **Saelim** V., Brogdon W. G., Rojanapremsuk J., Suvannadabba S., Pandii W., Jones J. W., Sithiprasasna R. **2005**. *Bottle and biochemical assays on temephos resistance in Aedes aegypti in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health.; 36(2):417-25.
85. **Sakthivadivel** M., Thilagavathy D. **2003**. *Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from Argemone mexicana L. seed*. Bioresource Technology 89; 213-216.
86. **Santos** A. C., and Adkilen P. **1932**. *The alkaloids of Argemone mexicana*. J. Am. Chem. Soc. 54 (7): 2923-2924
87. **Shaan** E. A., Canyon D., Younes M. W., Abdel-Wahab H., Mansour A. H. **2005**. *A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential*. Environ Int.; 31(8):1149-66.
88. **Sharma** R. N., Deshpande S. G., Tungikar V. B., Joseph M. **1994**. *Toxicity of natural essential oils to mosquitoes, Aedes aegypti and Culex fatigans*. Geobios; 21:162- 5.
89. **Silva** W. J., Dória G. A., Maia R. T., Nunes R. S., Carvalho G. A., Blank A. F., Alves P. B., Marçal R. M., Cavalcanti S. C. **2008**. *Effects of essential oils on Aedes aegypti larvae: alternatives to environmentally safe insecticides*. Bioresour Technol.; 99(8):3251-5.
90. **Sivagnaname** N., Kalyanasundaram M. **2004**. *Laboratory evaluation of methanolic extract of Atlantia monophylla (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms*. Mem Inst Oswaldo Cruz.; 99(1):115-8.
91. **Soliman** B. A, El-Sherif L. S. **1995**. *Larvicidal effect of some plant oils on mosquito Culex pipiens L (Diptera: Culicidae)*. J Egypt Ger Soc Zool; 16:161- 9.
92. **Sophia** and Manoharan. **2007**. *Hypolipidemic activities of Ficus racemosa linn. Bark in alloxan induced diabetic rats*. Afr. J. Trad. CAM 4 (3): 279 – 288
93. **Sreelatha** T., Hymavathi A., Murthy J. M., Rani P. U., Rao J. M., Babu K. S. **2010**. *Bioactivity-guided isolation of mosquitocidal constituents from the rhizomes of Plumbago capensis Thunb*. Bioorg Med Chem Lett. 20(9):2974-7.
94. **SSA**. **1995**. *Panorama epidemiológico del dengue y dengue hemorrágico en México*. Suplemento, 37, 109-113.
95. **Thangam** T. S., Kathiresan K. **1991a**. *Mosquito larvicidal activity of marine plant extracts with insecticides*. Bot Mar; 34:537- 9.

BIBLIOGRAFÍA

96. **Thangam** T. S., Kathiresan K. **1991b**. *Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts*. Bot; 34:433- 5.
97. **Thangam** T. S., Kathiresan K. **1998**. *Toxic effect of mangrove plant extracts on mosquito larvae, Anopheles stephensi*. Curr Sci; 57:914- 5. In: Pushpalatha E, Muthukrishnan J, editors. *Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes*. J Appl Entomol, 123: 369- 73.
98. **Thomas** C. J., Callaghan A. **1999**. *The use of garlic (Allium sativa) and lemon peel (Citrus limon) extracts as Culex pipiens larvicides: persistence and interaction with an organophosphate resistance mechanism*. Chemosphere 39: 2489- 96.
99. **Tropicos.org**. Missouri Botanical Garden. 19 Aug 2010 <<http://www.tropicos.org/Name/50143802>>
100. **Tsao** R., Romanchuk F. E, Peterson C. J., Coats J. R. 2002. *Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the Tree of Heaven (Ailanthus altissima L.)*. BMC Ecology 2
101. **USDA, NRCS. 2010**. *The PLANTS Database* (<http://plants.usda.gov>, 7 May 2010). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
102. **Vidal** J., Carbajal A., Sisniegas M., Bobadilla M. **2009**. *Efecto tóxico de Argemone subfusiformis Ownb. y Tagetes patula Link sobre larvas del IV estadio y pupas de Aedes aegypti L*. Rev. peru. biol. 15(2): 103- 109.
103. **Vila** R., Santana A. I., Pérez-Rosés R., Valderrama A., Castelli M. V., Mendonca S., Gupta M. P, Cañigual S. **2010**. *Composition and biological activity of the essential oil from leaves of Plinia cerrocampaensis, a new source of a-bisabolol*. Bioresource Technology 101: 2510-2514.
104. **Villa** F. M. G., Barajas-Morales J. **1998**. *Estudio anatómico de Hippocratea excelsa Hbk. (Hippocrateaceae)*. Acta Botánica Mexicana. 43:7-21.
105. **Vineetha** A. y Murugan K. **2009**. *Larvicidal and smoke repellency effect of Toddalia asiatica and Aegle marmelos against the dengue vector, Aedes aegypti (Insecta: Diptera: Culicidae)*. Entomological Research, 39 (1): 61-65(5).
106. **Watts** D. M., Burke D. S., Harrison B. A., Whitmire R. E., and Nisalak A. **1987**. *Effect of Temperature on the Vector Efficiency of Aedes aegypti for Dengue 2 Virus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36: 143-52.
107. **Willcox** M. L, Graz B., Falquet J., Sidibé O., Forsterd M., and Diallo D. **2007**. *Argemone mexicana decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 101, 1190-1198.