

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto biocida del extracto hidroalcohólico de semillas  
de *Lupinus mutabilis* Sweet "tarwi" sobre larvas de  
*Culex quinquefasciatus* Say "zancudo".

Ayacucho, 2013

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

Presentado por la:

**Bach. QUISPE BÁRCENA, Zunilda Gloria**

AYACUCHO – PERÚ

2017



A la memoria de mis adorados padres,  
con cariño a mis hermanos e hijo por  
ser artífices de mi realización personal y  
profesional.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y la Facultad de Ciencias Biológicas, por haberme acogido en sus aulas y brindarme una sólida formación académica y profesional, con valores y principios.

A los docentes de la Escuela Profesional de Biología que me impartieron sus conocimientos, experiencias y valores. Por sus consejos, paciencia y tolerancia. Por haberme inculcado las bases de mi formación como investigadora con alta sensibilidad social y moral.

A mi asesor, Blgo. MC. Yuri Ayala Sulca, por brindarme su tiempo, conocimientos y guía para el desarrollo de la presente investigación, y por sobre todo su amistad compartida durante los años de estudios, que me ayudaron a salir adelante.

Expreso mis sinceros agradecimientos a mi coasesor Dr. Edwin Enciso Roca por su apoyo en el estudio fitoquímico de las semillas de la planta. A todos mis compañeros de estudio por haber compartido las alegrías, las dificultades y las vivencias académicas. A quienes estuvieron cerca apoyándome en los momentos más difíciles de mi vida, mis más sinceros agradecimientos, nombrarlos cometería el error de olvidar a alguno de ellos.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	7
2.3. Bases teóricas	10
2.3.1. Características agronómicas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi"	10
2.3.2. Composición química de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	15
2.3.3. Familia Culicidae (Insecta: Diptera): características e importancia	20
2.3.4. Insecticidas de origen vegetal	24
2.3.5. Efecto tóxico de los bioinsecticidas	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Área de estudio	27
3.2. Población y muestra	30
3.2.1. Población	30
3.2.2. Muestra	30
3.2.3. Unidad de análisis	30
3.3. Metodología y recolección de datos	30
3.4. Diseño de investigación	34
3.5. Análisis de datos	34
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	61



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Análisis composicional de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. <sup>36, 42</sup>	15
Tabla 2. Aminoácidos presentes en semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. <sup>43, 44</sup>	16
Tabla 3. Composición química de alcaloides quinolizidínicos presentes en semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> . <sup>48</sup>	18
Tabla 4. Número y porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” a diferentes diluciones, en 24 horas de evaluación.	36
Tabla 5. Media y desviación estándar del porcentaje de mortalidad generada en larvas del III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> a diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	37
Tabla 6. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilids</i> “tarwi” (Anexos 7 y 11).	41



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Características botánicas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet, descrita por Aucasime. <sup>34</sup>	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> . <sup>62</sup>	23
Figura 3. Georeferenciación del lugar de muestreo de las semillas de la planta <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.	28
Figura 4. Georeferenciación y ubicación del lugar de colecta de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> . Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.	29
Figura 5. Promedio y desviación estándar del porcentaje de mortalidad de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> , generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, a diferentes diluciones.	38
Figura 6. Línea de tendencia del porcentaje de mortalidad de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> generada por efecto de las diluciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	39
Figura 7. Curva de dosis mortalidad para establecer la concentración letal media del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” sobre larvas del III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	40



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificación taxonómica de la planta <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. Herbarium Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.	62
Anexo 2. Prensado y elaboración del herbario de la planta <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, para su confirmación taxonómica.	63
Anexo 3. Típica posturas de huevos del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> colectados en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totora”- Ayacucho.	64
Anexo 4. Certificación taxonómica del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> . Laboratorio de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.	65
Anexo 5. Molido de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, macerado y obtención del extracto hidroalcohólico para la pruebas experimentales de toxicidad.	66
Anexo 6. Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. <sup>69,70</sup>	67
Anexo 7. Perfil fitoquímico de los componentes hidroalcohólicos presentes en las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	68
Anexo 8. Test de Kolmogorov-Smirnov y Tukey ( $P<0,05$ ), de los porcentajes de mortalidad larval del III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> en relación a las concentraciones evaluadas del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	69
Anexo 9. Análisis de varianza para la tendencia lineal del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” sobre larvas del III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	70
Anexo 10. Concentración letal media (CL50) calculadas mediante la técnica Probit para el porcentaje de mortalidad de larvas del III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> en relación al efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	71

Anexo 11. Materiales e insumos para el análisis de los componentes químico presentes en el extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	72
Anexo 12. Matriz de consistencia	73

## RESUMEN

Los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, son alternativas válidas para el control de insectos de importancia médica en sustitución de los plaguicidas sintéticos convencionales, ya que no generan resistencia, efectos indeseables sobre los organismos e impactos negativos en el ambiente. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" (Fabaceae) en larvas de III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. La metodología consistió en preparar seis diluciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las semillas de *L. mutabilis* a partir de una solución madre (40 000 mg/L), para lo cual previamente fueron realizadas dos pruebas piloto, finalmente se formularon las siguientes diluciones experimentales: 3 000, 4 000, 5 500, 7 000, 9 000 y 11 000 mg/L, probadas a un volumen de 10 mL de extracto hidroalcohólico, 90 mL de agua de clorada y 10 larvas de III estadio por unidad experimental, en cuatro repeticiones, un control (Temefos®), a la misma dilución del extracto evaluado, en dos repeticiones y, un blanco que fue solo agua de clorada más las larvas del mosquito, a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad relativa (H.R.) de  $57 \pm 3\%$ . Las lecturas de mortalidad larval se llevaron a cabo luego de 24 horas. Se calculó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) mediante el análisis Probit y la fitoquímica preliminar del extracto hidroalcohólico. El extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" son tóxicas, generan mortalidad larval en *Culex quinquefasciatus* de 70 a 75% a las diluciones de 9000 a 11 000 mg/L, los menores valores de mortalidad (32,5 y 35%), se reportaron a las diluciones de 3 000 a 5 500 mg/L, lo que sugiere que a mayor concentración del extracto hidroalcohólico en las unidades experimentales, mayor será la mortalidad larval por efecto del extracto. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fue estimada en 6 364 mg/L, como la necesaria para generar mortalidad larval de 50% de la población de larvas de *Culex quinquefasciatus* expuestas al producto tóxico a 24 horas, con un límite de confianza de 95%. La fitoquímica preliminar del extracto hidroalcohólico, sugiere que los principales productos biotóxicos responsables de la mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus*, son los alcaloides y las lactonas, reportados como los más abundantes (+++). En menor concentración fueron halladas los taninos, saponinas y aminas (+).

**Palabras Claves:** *Culex quinquefasciatus*, *Lupinus mutabilis*, Concentración letal media, extracto hidroalcohólico



## I. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos o zancudos, son insectos dípteros nematóceros que pertenecen a la familia Culicidae, se caracterizan por presentar una metamorfosis completa u holometábola, cuyos estados de huevo, larva y pupa se desarrollan en ambientes acuáticos, conocidos típicamente como criaderos, el estadio adulto es aéreo, siendo las hembras activas picadoras por su alimentación hematófaga que lo desarrollan en varios tipos de animales hospederos como las aves, anfibios, reptiles, diversos mamíferos incluyendo al hombre. En este proceso, estos insectos se convierten en vectores de patógenos como los virus, bacterias, protozoarios y nematodos filariformes, que causan diversas enfermedades en el hombre y los animales, reconociéndose entre ellas a la fiebre amarilla, dengue, chikungunya, zica, malaria, filariosis y diversos tipos de encefalitis. Los mosquitos culícidos adultos machos, son típicamente nectararios.

El control de los estadios larvales de los mosquitos culícidos, se basó fundamentalmente en el uso de larvicidas químicos, cuyos efectos contaminantes pronto afectaron el ambiente, los sistemas acuáticos generando desequilibrios ecológicos importantes, muchos de ellos irreversibles, por los residuos tóxicos que se acumularon. El Perú al igual que otras regiones biogeográficas en el mundo donde están presentes los mosquitos culícidos no es ajeno a este impacto. La búsqueda de nuevas alternativas de control que sean ecosaludables, que utilicen compuestos inocuos que no generen resistencia en los organismos a ser controlados, han conducido al uso de los productos naturales y los metabolitos de origen vegetal, constituyendo una importante línea de investigación en el control integrado de plagas y de insectos vectores de enfermedades. En los últimos años, los aceites esenciales de origen vegetal se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga. En este contexto, proponemos la utilización del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” para el control de las larvas del

mosquito *Culex quinquefasciatus*, insecto presente en criaderos larvales naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho, cuyas hembras adultas del insecto, genera picaduras dolorosas e irritantes en la población susceptible que vive en torno del hábitat larvario de estos organismos. Por otro lado, el “tarwi”, es una planta leguminosa muy reconocida en los andes peruanos sobre todo por sus propiedades nutricionales, al concentrar más de 45 a 55% de proteínas en sus semillas, pero poco consumidas y aprovechadas, sobre todo por el alto nivel de alcaloides que le confiere sabor amargo a estos frutos. El poblador andino aprovecha las semillas, previo desamargado en agua por uno o dos días; el líquido remanente rico en alcaloides es utilizado para el control de plagas principalmente de interés agrícola, en tal sentido, nuestra propuesta se orienta a utilizar estos metabolitos secundarios en el control de las larvas de los mosquitos culícidos presentes en los criaderos larvales de la ciudad de Ayacucho. En este contexto nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

### **1.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus* “zancudo” en condiciones de laboratorio.

### **1.2. Objetivos específicos**

- a) Establecer, el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” en seis diluciones crecientes, sobre larvas de III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*, a las 24 horas de exposición, en condiciones de laboratorio.
- b) Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, en el control de larvas de III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*, expuestas a seis diluciones crecientes, a las 24 horas de exposición.
- c) Desarrollar el *screening* fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, a fin de determinar los componentes bioquímicos mayores presentes en el producto biocida.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

La mayoría de las investigaciones que fueron realizadas hasta la actualidad sobre el uso de sustancias vegetales para el control de mosquitos están enfocadas a encontrar especies de plantas con propiedades larvicidas y adulticidas.<sup>1</sup> La búsqueda de nuevas alternativas y compuestos ambientalmente inocuos y que generen mínima resistencia, como los productos naturales y metabolitos de origen vegetal, constituye una importante línea de investigación en el control integrado de plagas y de insectos vectores. En los últimos años, los aceites esenciales de origen vegetal se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga.<sup>2</sup> No obstante, la escasa información que se tiene sobre la acción de los fitotóxicos se sugieren que estos estarían actuando como neurotóxicos.<sup>3,4</sup>

Maciel *et al.*,<sup>5</sup> al evaluar la actividad fitotóxica de los aceites esenciales de tres especies del género *Eucalyptus*: *E. staigeriana*, *E. citriodora*, y *E. globulus*, demostraron que estos produjeron una mortalidad superiores al 50% en huevos, larvas y adultos de *Lutzomyia longipalpis*, un tipo de mosquito díptero transmisor de la leishmaniosis.

Investigaciones desarrolladas en *Tagetes lucida* “tarragon mexicano”, demostraron tener propiedades plaguicidas y nematicidas. Por ejemplo, la citada planta fue utilizada en forma artesanal (combustión) en zonas rurales de México para la fumigación de casas y corrales infestados con pulgas, y para ahuyentar moscas y mosquitos como *Culex* spp., *Aedes* sp., *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae). De hecho, la actividad repelente contra mosquitos es la más importante, y la que ha sido estudiada en mayor extensión.<sup>6</sup>

Espitia Yanes,<sup>7</sup> al estudiar los compuestos orgánicos aislados de los aceites esenciales de la planta *Tagetes lucida*, demostró que el 5E-ocimenoneno a 40 ppm fue efectiva contra larvas de *Aedes aegypti* a 24 horas de exposición, y las

fracciones de etil acetato con éter de petróleo fueron tóxicas (LD<sub>50</sub>) para las larvas de *Anopheles stephensi* a concentraciones de 43 y 58 ppm.

Ramos Casilla *et al.*,<sup>8</sup> al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que a la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) equivalente a 20,39 ppm y a la CL<sub>95</sub> equivalente a 41,64 ppm, después de 24 h de evaluación obtuvieron buen efecto larvicida sobre los estadios 3° tardío y 4° temprano de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio, atribuyendo a los triterpenos y sesquiterpenlactonas la actividad larvicida hallada, en igual forma reportaron como antecedentes de otros trabajos que el extracto acuoso obtenido de la pulpa y las hojas de *Persea americana* demostraron tener efecto larvicida para *Anopheles gambiae*, *Spodoptera exigua* y *Bombix mori*; aislándose del fruto inmaduro el 1, 2, 4, trihidroxiheptadeca-16-ino de actividad tóxica para larvas de *Aedes aegypti*, resultando ser éste compuesto más potente que la rotenona.

Cárdenas Castro *et al.*,<sup>9</sup> evaluaron la toxicidad del extracto acuoso de *Ruta graveolens* sobre larvas de cuarto instar de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* a las concentraciones de 50, 100, 300 y 500 mg/L, en 60 larvas por concentración y un control (20 larvas), al tiempo de exposición de 24 horas a una temperatura de 28 ± 2°C, demostraron que a la concentración de 300 mg/L el porcentaje de mortalidad de larvas fue de 98% en el mosquito *Anopheles albimanus*, en tanto que en *Culex quinquefasciatus* la mortalidad estuvo entre 86 y 95%. Al estimar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y la concentración letal noventaicinco (CL<sub>95</sub>) por la prueba de Probit, demostraron, que la CL<sub>50</sub> para larvas de *Anopheles albimanus* en la colonia Barranquilla (Colombia) fue de 143,79 mg/L; mientras que para la de Cartagena fue de 109,73 mg/L. Para larvas de *Cx. quinquefasciatus* en la colonia Sibaté, la CL<sub>50</sub> fue de 148,79 mg/L; mientras que para la de Villavicencio, de 209,91 mg/L. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* mostró tener efecto tóxico para larvas de las dos especies de mosquitos, lo cual sugiere que esta planta podría ser una alternativa promisoría para el control de los referidos insectos.

Aouinty *et al.*,<sup>10</sup> realizaron la evaluación preliminar de la actividad larvicida de los extractos acuosos de hojas de *Ricinus communis* y de la corteza de “tuya” (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.), sobre las larvas en segundo y cuarto estadio de los mosquitos: *Culex pipiens* L., *Aedes caspius* Pallas, *Culiseta longiareolata* Aitken y *Anopheles maculipennis* Meigen. Se utilizaron además tres plantas

locales que también son utilizadas contra los insectos, (*Ammi visnaga* Lam., *Nerium oleander* L., e *Inula viscosa* (L.) Ait.). Se encontró que los extractos más tóxicos son los de las hojas de *R. communis* y de la corteza de *T. articulata*. Las  $LC_{50}$  parecen siempre menores para el segundo estadio larval que para el cuarto estadio, para cualquiera de las especies de mosquito estudiadas con cualquiera de los extractos utilizados. Después de 24 horas de exposición al extracto, los bioensayos demostraron concentraciones letales bajas. Concluyendo que los extractos de estas plantas pueden ser utilizados como biocidas naturales.

Choochote *et al.*,<sup>11</sup> evaluaron la susceptibilidad de las hembras adultas de *Stegomyia aegypti* a una serie de concentraciones de extractos de varias especies de plantas del género *Piper*, determinaron que ésta es dependiente de la dosis. El extracto que mostró mayor actividad adulticida fue el de *P. sarmentosum*, seguido por *P. ribesoides* y *P. longum* con valores de  $DL_{50}$  de 0,14; 0,15 y 0,26 respectivamente.

Chaithong *et al.*,<sup>12</sup> evaluaron la actividad larvicida de extractos de tres especies de *Piper*, en el cual *P. longum* presentó mayor actividad larvicida que *P. sarmentosum* y *P. ribesoides* con valores de  $CL_{50}$  de 2,23, 4,06 y 8,13 ppm, respectivamente. Después de su tratamiento con una dosis letal de los extractos ( $DL_{99}$ ), cada larva en IV estadio muerto fue estudiada para observar alteraciones morfológicas mediante microscopía de luz y electrónica. Se observaron alteraciones en la morfología de la larva; el efecto tóxico del extracto fue principalmente sobre la branquia anal, dando como resultado la deformación. Este órgano es el que controla los niveles electrolíticos. El mecanismo que causó la muerte de la larva aún se desconoce, por lo cual, recomendaron, se deba realizar más estudios.

En el Perú fueron evaluadas las actividades tóxicas de los extractos obtenidos por decocción de *Paullinia clavigera* var. *bullata* e infusión de *Tradescantia zebrina*, la cuales fueron evaluadas en el control del III estadio larval de *Anopheles benarrochi*, principal vector de la malaria en Ucayali, reportándose mortalidades superiores al 50% en la población larval a la concentración letal medias ( $CL_{50}$ ) de 0,81% y de 0,86%, en 24 h de exposición.<sup>13</sup>

Bazán Calderón *et al.*,<sup>14</sup> evaluaron la acción insecticida del extracto DCM: MeOH 2:1, de espigas maduras y plantas in vitro de *Piper tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio y el estadio adulto de *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis*, El método de inoculación del extracto fue por suspensiones

acuosas en el estadio larval y por aspersión en el estadio adulto. El mayor efecto tóxico correspondió a los extractos de espigas maduras respecto a plantas in vitro, a los estadios larvales II y III respecto al estadio adulto y a *Ae. aegypti* respecto a *An. pseudopunctipennis*, tal como lo expresan los resultados de las concentraciones letales a 50% (LC<sub>50</sub>) y 90% (LC<sub>90</sub>), en 2 h y 30 min de exposición, para los estadios larvales II y III y 24 h, para el estadio adulto. El potencial de *P. tuberculatum*, como un nuevo tipo de insecticida en el control de los mosquitos, fue explorado.

Por otro lado Vidal *et al.*,<sup>15</sup> estudiaron el efecto tóxico de los extractos etanólicos foliares de *Argemone subfusiformis* “cardo santo” y *Tagetes patula* “marigold” sobre larvas IV y pupas de *Aedes aegypti*. El procesamiento de los extractos y los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Entomología de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, de abril a diciembre de 2007, basados en los lineamientos metodológicos de la World Health Organization (2005). En larvas, se registró 100% de mortalidad con 76,8 y 153,6 mg/L del extracto de *A. subfusiformis* a las 12 horas de exposición, mientras que en pupas el mismo porcentaje de mortalidad se alcanzó con 153,6 mg/L a las 24 horas. De otro lado, el 92% y 77% de mortalidad en larvas y pupas respectivamente se registró con el extracto de *T. patula* al emplear 153,6 mg/L del extracto a las 48 horas. En *A. subfusiformis* las concentraciones letales al 50% (CL<sub>50</sub>) y al 90% (CL<sub>90</sub>) a las 48 horas se registraron con 6,24 y 9,91 mg/L sobre larvas y con 9,45 mg/L y 16,92 mg/L sobre pupas. En *T. patula* la CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> a las 48 horas se registraron con 72,21 mg/L. y 137,37 mg/L sobre larvas y con 89,1 mg/L. y 167,38 mg/L sobre pupas. Según el ANAVA existen diferencias significativas entre los tiempos de exposición y los tratamientos. La susceptibilidad de larvas y pupas de *Ae. aegypti* se evidenciaron mediante las rectas probit-logarítmicas que indican efecto tóxico de sus hojas, siendo *A. subfusiformis* la especie con mayor índice de mortalidad.

Flores Cisneros,<sup>16</sup> evaluó la actividad biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* “marco” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* que habitan criaderos larvales de la ciudad de Ayacucho (Perú), demostró que, a la concentración de 9 a 10 mg/L del extracto hidroalcohólico producido, generaron mortalidad larval del 54 al 58%, respectivamente, determinando la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en 8,84 mg/L, como la más recomendable para el control de larvas de mosquitos en la ciudad de Ayacucho, atribuyendo a la

presencia de alcaloides y glicósidos (+++), metabolitos abundantes, y a la presencia de triterpenos, esteroides (++) , metabolitos secundarios de moderada presencia, como los responsables de generar el efecto tóxico en las larvas. En igual forma, Ayala *et al.*,<sup>17</sup> al evaluar la actividad fitotóxica de los extractos hidroalcohólico de las hojas de *Ruta graveolens* “ruda” y semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, presentes en la ciudad de Ayacucho (Perú), demostraron que a la concentración de 5 000 mg/L de los productos, se produjo una mortalidad larval de 72,5 a 75%, respectivamente, estableciendo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), en 3583 mg/L para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ruta graveolens* “ruda” y de 1776 mg/L para el extracto de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, como las más recomendables para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho.

Huamán Campos,<sup>18</sup> en estudios de biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* demostró mortalidad larval de 70 ± 8,16 a 75 ± 12,91 %, a las concentraciones de 20 000 a 30 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, porcentaje de mortalidad estadísticamente diferente para cada concentración evaluada según la prueba de comparación de medias de Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ), dependiente del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue establecida en 17 470 ppm, reportándose a los fenoles y taninos pirogalotánicos (+++), como los más abundantes. De moderada presencia (++) los flavonoides y triterpenos. Los alcaloides como trazas (+). Atribuyó el efecto biotóxico de la planta probablemente a la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos, algunos tipos de fenoles y taninos, y a la complejidad de los productos trazas hallados en las hojas de la planta.

## **2.2. Marco conceptual**

**2.2.1. Sustancias biotóxicas.-** Según la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero de 1998, se denominan productos biocidas o biotóxicas aquellas sustancias activas y preparadas que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción sobre cualquier organismo nocivo por medios biológicos y químicos.<sup>19</sup>

**2.2.2. Toxicidad.-** Se entiende por "toxicidad" a la cantidad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos perjudiciales. La toxicidad indica la potencia de una sustancia venenosa y no la afección producida por ésta (concepto que corresponde a "intoxicación" o "envenenamiento"). La toxicidad se expresa como la cantidad de la sustancia en mg/kg de peso vivo que origina efectos biológicos determinados, en un tiempo dado y en una especie establecida.<sup>20</sup>

**2.2.3. Toxicidad aguda y crónica.-** La toxicidad "aguda" señala los efectos de una o de varias dosis administradas en 24 horas, pudiendo aparecer sus efectos en pocas horas o días. La toxicidad "crónica" se refiere a los efectos producidos por una exposición prolongada (semanas a meses) a una sustancia, generalmente a dosis inferiores a las necesarias para causar una intoxicación aguda.<sup>20</sup>

**2.2.4. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>):** proporción o concentración calculada estadísticamente de una sustancia tóxica presente en un medio, que se espera que produzca la muerte de al menos un 50% de individuos de una población susceptible, durante la exposición o en un periodo determinado, bajo un conjunto de condiciones definidas y después de un período de exposición determinada. El valor de la CL<sub>50</sub> se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen ( $\mu\text{m/L}$ , mg/L, ppm, etc.).<sup>21</sup>

**2.2.5. Metabolitos secundarios de plantas.-** Son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. El reconocimiento de las propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas.<sup>22</sup>

**2.2.6. Extracto hidroalcohólico.-** Consisten en la obtención de la fracción no volátil de los principios activos presentes en las plantas, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante un líquido solvente,

que para el caso es una mezcla de alcohol etílico, que disuelta las sustancias activas contenidas en una planta afines molecularmente a ella.<sup>23</sup>

**2.2.7. Método de análisis Probit.-** El Probit se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad de un organismo al ser expuesto a un tóxico. Dicho método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables a los fenómenos físicos peligrosos. El método de análisis Probit permite estimar la CL<sub>50</sub> ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit.<sup>24</sup>

**2.2.8. *Lupinus mutabilis*.-** Leguminosa oriunda de los Andes Sudamericanos y del Mediterraneo. Las semillas desamargadas y en cocimiento son utilizadas por el poblador andino con fines alimenticios y como planta medicinal. Esta leguminosa es promisoría y puede crecer en suelos pobres. El *Lupinus* ha sido tradicionalmente considerado de gran valor nutritivo por su alto contenido de proteínas (38,9%), grasa (17,1 %), calorías (411 cal/100 g), y alcaloides (3,5%-4,2%) que no permiten su consumo directo, debiendo previamente eliminarse estos. El producto líquido del desamargado es utilizado por pequeños agricultores para combatir a las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos sudamericanos, asimismo se utilizan como reguladores del crecimiento o fertilizante en los cultivos de maíz, trigo, soya y papa.<sup>25</sup>

**2.2.9. Orden Diptera.-** Orden caracterizado por poseer solamente un par de alas: las mesotorácicas. El metatórax provisto de unas modificaciones alares denominados balancines o halterios con los cuales equilibra el vuelo. El aparato bucal puede ser chupador, cortador chupador o picador chupador; son holometabólicos; pueden ser ovíparos o larvíparos. Las formas larvales son ápodas y vermiformes, la mayoría de vida libre y algunas especies adaptadas a la vida parasitaria.<sup>26, 27</sup>

**2.2.10. Familia Culicidae.-** La familia Culicidae es un grupo bastante grande de insectos dípteros, de los más abundantes. Los estados de huevo, larva y pupas, son acuáticos, en tanto que los adultos son hábiles voladores, se les puede reconocer por la venación característica de las alas y por lo largo de la probóscide. Los zancudos son muy importantes porque las hembras succionan sangre y muchas especies pican al humano actuando como vectores en la

transmisión de varias enfermedades humanas de gran importancia a nivel mundial. Dentro del Orden Diptera y en el ámbito de la parasitología, los mosquitos o zancudos, son considerados como succionadores de sangre, individuos inferiores porque carecen de mandíbulas.<sup>27</sup>

**2.2.11. *Culex quinquefasciatus*:** mosquito díptero nematócero, considerado como una especie acentuadamente antropofílica asociado frecuentemente al hábitat humano tanto urbano como rural. Esta especie se ha relacionado con la transmisión de filarias como *Wuchereria bancrofti* y *Dirofilaria immitis*, virus del oeste del Nilo y de los virus causantes de la encefalitis de San Luis y la encefalitis equina venezolana, entre otros. En áreas donde no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por parte de esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por las altas densidades de población que alcanzan.<sup>28</sup>

**2.2.12. Larvas.-** Las larvas son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (con metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto. Las larvas difieren siempre muy significativamente de los adultos, en aspectos como tamaño, forma externa, e incluso anatomía interna y fisiología (desarrollo de sus funciones). Las diferencias guardan relación con las diferencias ecológicas, tanto en cuanto a hábitat como en cuanto a los recursos.<sup>29</sup>

## **2.3. Bases teóricas**

### **2.3.1. Características agronómicas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”**

#### **a) Taxonomía**

La taxonomía de *Lupinus* ha sido y es aun notoriamente problemática, debido principalmente a la proliferación de especies poco consistentes, la mayoría de ellas nombradas por el taxónomo Norteamericano C.P. Smith 1938-1952 en su monografía *Species Lupinorum* pero no se sabe si son especies diferentes o ecotipos mostrados por la gran variedad de microambientes a los que se ha visto sometido. Aunque se han hecho trabajos con los más sofisticados métodos aún persisten problemas para la determinación y se están descubriendo nuevas especies, aun en Europa.<sup>30</sup>

El género *Lupinus* está dividido en dos grandes regiones genéticas. Una corresponde a Europa y a la mitad del Norte de África, con una decena de especies silvestres y algunas cultivadas. La otra corresponde a casi toda América, con más de 400 especies.<sup>31</sup> Las investigaciones desarrolladas en las

dos últimas décadas, han mejorado el conocimiento taxonómico y sistemático del género *Lupinus* del Viejo Mundo; sin embargo, en las del Nuevo Mundo aún permanece compleja, difícil y confusa, donde numerosos taxos o grupos han sido diferenciados basados en algunos inconsistentes caracteres morfológicos.<sup>32</sup> En algunas revisiones, a las especies del Nuevo Mundo se le considera como especies polimórficas, estableciéndose algunos grupos y complejos, como las 22 especies perennes unifoliadas, colectadas hasta ahora solamente de la región centro oriental de Sud América; el grupo que muestra combinación de hojas simples y compuestas como *L. paraguayensis* y el grupo de los *Lupinus* con hojas compuestas tanto de la Región Andina de Sud América y las de Norte y Centro América.<sup>32</sup>

De manera general, investigaciones desarrolladas por el Field Museum a través de su Programa “Flora of Peru”, registró para el país 84 especies del género *Lupinus*, publicaciones más recientes han reportado 183 especies. Para Europa, se tienen registradas 99 especies, lo cual indica la versatilidad en la literatura y las controversias existentes para las especies de este género. Lo que sí se conoce es que, tiene amplia distribución geográfica y ocupa diversos hábitats, concentrándose en dos grandes regiones del hemisferio oriental y occidental.<sup>33</sup>

En Ayacucho, se han reportado especies del género *Lupinus*, que corresponden a *Lupinus mutabilis*, *L. paniculatus*, *L. mollendoensis*, *L. microphyllus*, *L. montanus* entre otros. La taxonómica de la planta *Lupinus mutabilis*, descrita en 1988 por Cronquis y caracterizada taxonómicamente por Aucasime,<sup>34</sup> la tipifican de la siguiente manera (Anexo 1):

División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Subclase : Rosidae  
Orden : Fabales  
Familia : Papilionaceae  
Género : *Lupinus*  
Especie : *Lupinus mutabilis* Sweet  
N.V. : “tarhui”, “tarwi”, “chocho”

#### **b) Descripción botánica de *Lupinus mutabilis* Sweet**

*Lupinus mutabilis* “tarwi”, es una planta herbácea, anual erguida de hasta dos metros de alto, tallos poco ramificados, hojas digitadas largamente pecioladas formado por ocho folíolos oval-lanceoladas de color verde claro villosos.

Inflorescencias en racimos; flores vistosas de un color que varía entre rojo y azul, con manchas amarillas, bisexuales, heteroclamídeas, pentámeras y zigomorfas; sépalos soldados en la base ligeramente pubescentes, corola amariposada, con el pétalo grande, ovalado que viene a ser estandarte, dos pétalos laterales simétricos denominados alas y dos internos unidos en la parte anterior y libres en la parte superior que forma la quilla o carina; androceo formado por diez estambres monodelfos, todos soldados formando el tubo estaminal que rodea el ovario; gineceo de ovario súpero unilocular, unilocular y multiseminado y con el estilo delgado y curvado. Fruto legumbre dehiscente, viloso, de aproximadamente 10 cm de largo conteniendo numerosas semillas ovoides.<sup>34</sup>

El cultivo del tarwi en la sierra peruana se localiza entre los 2800 a 3900 msnm. Correspondiendo aproximadamente el 20% del área sembrada en la sierra norte entre los departamentos de Cajamarca, La libertad y Amazonas; el 41 % de la sierra central entre los departamentos de Ancash, Huánuco, y un mínimo porcentaje en Junín y el 39 % en la sierra sur, en los departamentos de Cusco, Puno y Apurímac.<sup>35</sup>

Según Aucasime,<sup>34</sup> esta especie fue domesticada desde la época incaica, es nativa de los andes, en Ayacucho se reporta su presencia sobre los 3 000 msnm, se cultiva generalmente en los bordes de cultivos de “maíz”, “papa”, “quinua” entre otros, como barrera para proteger contra el ataque de plagas por su sabor amargo.

### **c) Importancia**

Desde el punto de vista alimenticio, medicinal, ritual, cultural, en la transformación y mejoramiento de las especies domesticadas en el Perú, existen una diversidad de parientes silvestres de *Lupinus mutabilis*, que tienen importancia y repercusión en su utilización, proporcionando actualmente al agricultor disponibilidad sostenida y seguridad alimentaria. Los parientes silvestres que muestran diversidad y variabilidad encontradas en el género *Lupinus* a parte de *L. mutabilis*, están representadas por las siguientes especies: *Lupinus cuzcensis*, *L. tomentosus*, *L. microphyllus*, *L. paniculatus*, *L. aridulus*, *L. ananeanus*, *L. condensiflorus*, *L. chlorolepis*, *L. tarapacensis*, *L. subferuquinous*, *L. doraе*, *L. macbrideanus*, *L. ballianaus*, *L. gilbertianus* y *L. eriuclyadus*. Los usos de cada uno de los parientes silvestres son clasificados en: alimenticios, medicinales, rituales, culturales, en transformación, forraje y combustible.<sup>36</sup>

*Lupinus mutabilis*, es una especie comestible, denominado comúnmente "chocho" o "tarwi", es una especie agrícola ancestral y cultivada desde hace aproximadamente 2 000 años y probablemente ha sido la fuente para la nutrición proteica del poblador andino ya que su contenido proteico en semillas secas oscila entre 40 - 45%, además de otros elementos nutritivos como grasas y carbohidratos, habiéndose determinado también que el aceite de "tarwi" tiene efectos antioxidantes, dado su contenido en beta carotenos y tocoferol. En las semillas de *L. albus* se han encontrado un nivel elevado de ácido linoleico (17%) y linolénico (9%), y en Chile se usa y comercializa la harina de esta especie y *L. angustifolius* para sustituir parcialmente la harina de pescado en la preparación de dietas para estadios juveniles de truchas.<sup>37, 33</sup>

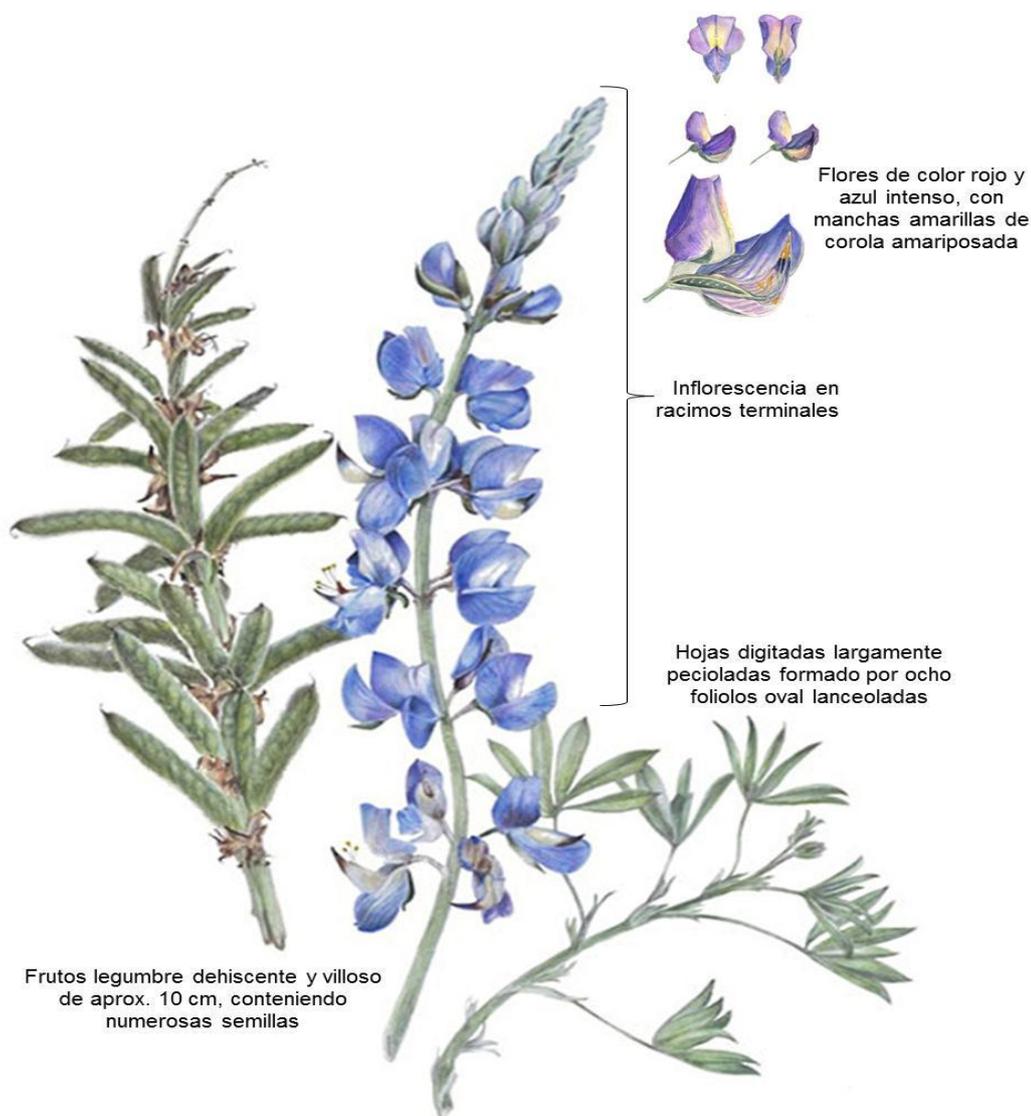


Figura 1.- Características botánicas de *Lupinus mutabilis* Sweet, descrita por Aucasime.<sup>34</sup>

Desde el punto de vista agronómico, el género *Lupinus* tienen un enorme potencial como mejoradores del suelo al incrementar la cantidad de nitrógeno en el suelo, y como abono verde, ya que estudios de campo han demostrado que *L. mutabilis* es capaz de fijar alrededor de 200 kg de nitrógeno por hectárea, alcanzando de manera experimental una producción de hasta 7 000 kg/ha. Por lo tanto, el cultivo de chocho con una óptima fijación de nitrógeno sería una alternativa para rotación de cultivos y cultivos asociados. Así mismo, se ha demostrado que los rizobios son capaces de participar en la biorremediación del suelo al eliminar residuos de insecticidas organofosforados; con ello se estaría desarrollando una agricultura basada en principios ecológicos, manteniendo la diversidad biológica, y en el futuro, permitiría restaurar los efectos nocivos de la sequía, salinidad, y daño de plaguicidas.<sup>33</sup>

*Lupinus mutabilis* presentan una serie de sustancias tóxicas, sobre todo en su forma silvestre, como el caso de alcaloides que le confieren un sabor amargo.<sup>38</sup> La ingestión de estas plantas provoca un efecto morboso al que se le denomina lupinosis, el cual consiste en una forma de paroplejia epástica con temblor que puede afectar a humanos y animales. Se mencionan cinco principales alcaloides responsables de la toxicidad producida por las especies de *Lupinus*, de estos, tres corresponden a las especies con flores azules: 1-lupanina, d1- lupanina e hidroxilupanina, que se distribuyen en toda la planta, pero concentrados especialmente en la semilla y las ramas de la planta.<sup>39, 33</sup> La sintomatología de la lupinosis es pérdida de apetito, paroplejia o cuadriplejia espástica con temblor, trastornos respiratorios, hematuria, obnubilación y muerte por asfixia. No se ha aclarado si los principales tóxicos varían estacionalmente.<sup>33</sup>

Desde el punto de vista nutricional, dado su riqueza en proteínas, básicamente aminoácidos esenciales, aceites y carbohidratos, el consumo del chocho es una alternativa frente a los problemas de desnutrición, no solamente para el poblador andino, sino para la población en general, ya que se puede obtener diversos productos derivados; e inclusive para la preparación de alimentos para animales.<sup>33</sup> Según Aucasime,<sup>34</sup> las semillas de *Lupinus mutabilis*, se usan en la alimentación por su alto contenido de proteínas (40 a 50%) y casi 30% de aceite más que la “soya”, quitándolo previamente el sabor amargo, haciendo hervir y cambiando el agua varias veces o remojando en agua corriente por dos o tres días. También se usa como planta medicinal para curar afecciones hepáticas, úlceras tomando las hojas en infusión. Se conoce que en el agua proveniente del

desamargado del chocho existe 3,53% (P/V) de alcaloides los mismos que al ser vertidos a los ríos, acequias, etc, provocan contaminación en el ambiente ocasionando la muerte de algunas especies por la gran toxicidad que poseen.<sup>40</sup> El agua procedente de las semillas remojadas o del primer hervor de las semillas se usa como insecticida en fumigaciones contra diversas plagas, garrapatas y piojos de animales.<sup>34</sup>

Desde un punto de vista taxonómico, las investigaciones se han concentrado geográficamente al denominado Viejo Mundo, Norte América, Argentina y especies brasileñas unifoliadas, por lo que la diversidad específica en México, y países andinos como Perú, Bolivia, Ecuador, son poco conocidos o están incompletos, dando lugar a muchos nombres específicos no válidos. Los dos tercios de los aproximadamente 1800 nombres específicos han sido propuestos por Smith en su texto “Species Lupinorum”, desconociéndose el real número de especies, aunque se estima debe fluctuar entre 150 – 600.<sup>33</sup>

### 2.3.2. Composición química de *Lupinus mutabilis* Sweet

Las semillas de *Lupinus mutabilis* contienen 40% de proteínas y 20% de grasa, similar a la soya pero valores más altos que otras legumbres. Las globulinas son las proteínas principales de reserva (80-90%) en el “tarwi”, estos valores son similares a los reportados en la mayoría de semillas de legumbres. También los *Lupinus* son fuentes nutritivas importantes de hidratos de carbono complejos, minerales, vitaminas y antioxidantes. Además contienen compuestos con capacidad antioxidante tales como polifenoles, principalmente taninos y flavonoides. Sin embargo aunque estas semillas tienen los más bajos niveles de compuestos no nutricionales (inhibidores de tripsina, ácido fítico, saponinas y lectinas, contienen también grandes cantidades de alfa galactósidos (7-15%).<sup>41</sup>

Tabla 1.- Análisis composicional de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”.<sup>36, 42</sup>

Componentes mayores	Semillas de tarwi (%) <sup>*</sup>	Semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> **		
		Semilla total (%)	Cotiledón (88,97%)	Tegumento (11,03%)
Proteína	44,3	44,87	49,22	9,39
Grasa	16,5	13,91	15,38	2,20
Carbohidrato	28,2	27,12	27,08	27,5
Fibra	7,1	8,58	2,42	58,35
Ceniza	3,3	5,52	5,89	2,55
Humedad	7,7	9,63	9,67	10,79

Las proteínas principales de las semillas se localizan en vacuolas de almacenamiento de los tejidos cotiledonarios y la mayoría, pero no exclusivamente pertenecen a la familia de proteínas de almacenamiento y sirven como fuentes de nitrógeno y esqueletos carbonados para la planta.<sup>41</sup>

#### a) Aminoácidos del “tarwi”

En caso del “tarwi” la presencia de aminoácidos es de suma importancia, puesto que afecta sus propiedades funcionales e influye en la calidad proteica. Todas las proteínas están básicamente constituidas por aminoácidos, comprendiendo entre los 20 aminoácidos, sin embargo, algunas proteínas pueden carecer de uno o varios aminoácidos. Las diferencias estructurales y funcionales de los miles de proteínas se deben a su composición aminoacídica de las mismas.<sup>39</sup>

Tabla 2.- Aminoácidos presentes en semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”.<sup>43, 44</sup>

Aminoácidos	Patrón de aminoácidos (mg/g proteína)	Semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> (mg/g proteína)
Isoleucina	28	40
Leucina	66	70
Lisina	58	57
Metionina + cistina	25	23
Fenilalanina + tirosina	63	75
Treonina	34	37
Triptófano	11	9
Valina	35	38
Histidina	19	-.-

Uno de los principales factores que afectan a las propiedades físico-químicas, como la estructura, la solubilidad, fijación de grasa, etc., de proteínas y péptidos es la hidrofobia de sus aminoácidos constitutivos.<sup>39</sup>

La proteína del “tarwi” contiene cantidades adecuadas de aminoácidos como lisina y cistina, pero tiene únicamente del 23 al 30% de la metionina requerida para el óptimo crecimiento de los animales (Tabla 2). Es necesario resaltar el elevado aporte de aminoácidos azufrados de la semilla de “tarwi”, en comparación a otras leguminosas de Sudamérica.<sup>44</sup>

#### b) Alcaloides quinolizidínicos

Los alcaloides son normalmente sólidos cristalizables, mientras que las bases oxigenadas son líquidas a temperatura ambiente. En general los alcaloides son bases poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco

polares y en alcoholes de elevada graduación. Al ser básicos los alcaloides forman sales con ácidos minerales u orgánicos y estos en cambio son solubles en agua. La formación de sales estabiliza la molécula por lo que comercialmente los alcaloides se encuentran en estado de sales.<sup>45</sup>

En *Lupinus mutabilis* “tarwi” los alcaloides se sintetizan en los cloroplastos de las hojas y son transportados vía floema a otros órganos de la planta para su almacenamiento en tejido epidérmico y subepidérmico de hojas, tallos y principalmente en las semillas.<sup>46</sup>

El grano de “tarwi” crudo es amargo (alto contenido de lupinina, lupanidina, esparteína y otros), por lo tanto es no consumible, no es apetecido por aves, rumiantes ni insectos; por ello para consumir los granos de tarwi, el primer paso es el desamargado.<sup>36</sup> Se mencionan cinco principales alcaloides responsables de la toxicidad, de estos, tres corresponden a las especies con flores azules: 1-lupinina, d1-lupanina e hidroxilupanina, que se distribuyen en toda la planta, pero concentrados especialmente en la semilla.<sup>33</sup>

El contenido de alcaloides en el “tarwi” varía de 0,02 a 4,45% y en el follaje de 0,1 a 0,4%; los alcaloides reportados son los quinolizidínicos tales como: lupina, esparteína, 13- hidroxilupanina, 4-hidroxilupanina, isolupanina entre otros. Entre todos los indicados, los que se representan en mayor proporción son las lupininas (27-74%), estos alcaloides quinolizidínicos amargos en la semilla del “tarwi” son sustancias antinutritivas, que hasta el momento han sido mayor obstáculo para su utilización en la alimentación humana y animal, se reporta que las variedades mejoradas denominadas dulces tienen un contenido de alcaloides menor al 1,16%.<sup>47</sup>

Los alcaloides quinolizidínicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas lotoideas, siendo los *Lupinus* los más ricos en este tipo de alcaloides que están basados en un anillo bicíclico de quinolizidina. En *Lupinus mutabilis* se han encontrado 25 alcaloides quinolizidínicos de los cuales 19 se han identificado hasta la presente (Tabla 3).<sup>48</sup>

*Lupinus* utiliza los alcaloides quinolizidínicos como defensa contra predadores, pero esto es un factor limitante para el consumo humano. Concentraciones elevadas producen gusto amargo, y se han reportado efectos farmacológicos. Sin embargo, se ha probado que los alcaloides no son tóxicos a concentraciones bajas. Cualquier efecto potencial de los alcaloides en *Lupinus* se elimina durante la preparación de proteína ya que los alcaloides son solubles en agua y se remueven durante el proceso.<sup>49</sup>

Tabla 3. Composición química de alcaloides quinolizidínicos presentes en semillas de *Lupinus mutabilis*.<sup>48</sup>

<b>Alcaloides</b>	<b>Composición relativa (%)</b>
Esparteína	7,39
K2 ( no identificada)	0,07
Ammodendrina	0,23
K5 (no identificada)	0,16
N-Metilangustifolia	3,46
Angustifolia + 17 oxoesparteína	0,60
Isolupanina	0,29
K9 (no identificada)	57,5
4- hidroxilupanina	8,65
Multiflorina	0,14
17- Oxolupanina	0,09
Anagirina	0,03
13-Hidroxilupanina	14,9
4,13- dehidroxilupanina	2,12
K17- K19 (no identificada)	0,09
13- tigloiloxilupanina	0,28
Monoangeloil + ester de la monogloil	0,45
de la 4,13 dehidroxilupanina	0,08
K24 (no identificada)	0,21
13 Benzoiloxilupanina	1,15
13-cis-cinnammoiloxilupanina	0,39
13-trans-cinnammoiloxilupanina	99,39
13-angeloiloxilupanina	1,57
<b>Contenido total de alcaloides en la semilla</b>	<b>3,10</b>

- **La lupanina.-** es el alcaloide que se encuentra en mayor concentración en el chocho; tiene actividad antibacteriana, antinematocida contra lepidópteros y coleópteros, también produce inhibición de las actividades moduladoras, inhibe la síntesis de proteínas, además posee actividad antiarrítmica, hipotensora, y actividad hipoglicemiante.<sup>50</sup>
- **Esparteína.-** es un gangliopléjico poco potente, bloquea la transmisión por impedir la despolarización de la membrana postsináptica; después de una fase transitoria de excitación ganglionar, aísla el miocardio de la influencia neurovegetativa central, disminuye la excitabilidad del tejido nodal, la

conductibilidad, frecuencia y amplitud de las concentraciones. Sus efectos secundarios son poco importantes como trastornos digestivos, hipotensión ortostática.<sup>50</sup>

La esparteína y lupanina son considerados tóxicos para los vertebrados por ser agonistas de los receptores de acetilcolina, inhibidores de los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, lo que bloquea la señal de transducción neuronal.<sup>51</sup>

- **La lupinina.-** es un alcaloide quinolizidínicos que se difunde más rápidamente a través de las membranas biológicas, y la duración de su actividad es más corta que la esparteína. Esto demuestra que dichos alcaloides puros o en forma de sales (clorhidratos y sulfatos) administrados en dosis altas actúan como tóxicos, pero cuando se administran en dosis moderadas actúan como medicamento.<sup>52</sup>
- **La angustifolina.-** inhibe el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis* y *Escherichia coli*, participa en la inhibición de las actividades moduladoras y en la biosíntesis de las proteínas. La angustifolina posee actividades similares a la de la esparteína, lupanina, angustifolina, 13 – hidroxilupanina, lupinina, 17 – oxoesparteína, 13 – tiglioiloxilupanina, La anagirina produce malformaciones congénitas en terneros.<sup>50</sup>

### c) Toxicidad de los alcaloides de *Lupinus mutabilis* “tarwi”

El principal propósito de los alcaloides del chocho es la defensa de la planta, contra animales herbívoros (nematodos, insectos, vertebrados). Ocasionalmente los agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, tienen efectos tóxicos y mutagénicos en conejos, áfidos, nematodos, abejas, caracoles, langostas, gusanos y escarabajos.<sup>50</sup> Los síntomas y trastornos tóxicos en peces son muy variados. La mayoría de los venenos o alteraciones son específicos de los órganos; según esto se distingue sustancias irritantes de los epitelios, venenos sanguíneos y venenos nerviosos. Los primeros son los que provocan la irritación de las mucosas, tanto internas como externas (boca, intestino), con subsiguiente formación de mucus, enrojecimiento y hemorragias. Los venenos sanguíneos provocan hemólisis y anemia mientras que los venenos nerviosos originan en los peces los movimientos descoordinados, reacciones de huida o marcadas manifestaciones paráliticas. En todos los casos el veneno penetra a través de la superficie externa de los peces, donde deja sentir sus efectos.<sup>50</sup>

La presencia de flavonoides y alcaloides, les confiere la actividad antibacteriana, actividad antifúngica en el caso de los alcaloides. La mayor resolución de inhibición se debe, al flavonoide y al alcaloide; con similar o igual poder de inhibición contra bacterias Gram positivas (*Staphiloccus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 9341) y bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*), la acción antimicrobiana se debería a que los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos.<sup>53</sup>

La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos. Dosis comprendidas entre 11 a 25 mg/kg de peso corporal en niños y dosis de 25 a 46 mg/kg de peso corporal en adultos producen graves intoxicaciones. Los síntomas de envenenamiento son: midriasis, calambres, cianosis, parálisis respiratoria, dolores estomacales violentos, vómitos e incluso coma.<sup>50</sup>

### **2.3.3. Familia Culicidae (Insecta: Diptera): características e importancia**

Los mosquitos culícidos (Insecta: Diptera) son una familia de dípteros nematóceros conocidos vulgarmente como zancudos en algunas partes de América. Incluye, entre otros, los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Sabethes*, *Culiseta* y *Haemagogus*.<sup>54, 55</sup> Los mosquitos son los más abundantes de los numerosos tipos de artrópodos hematófagos que molestan al hombre, otros mamíferos y aves. Su población actual se calcula en aproximadamente 3 500 especies descritas pertenecientes a la familia Culicidae (orden Diptera) encontrándose entre sus miembros a especies excesivamente agresivas durante el día, aunque la mayoría de los mosquitos se alimentan de noche. El descubrimiento de nuevas especies así como cambios en la sistemática y las dificultades en la aceptación de algunos taxones no hace imposible reflejar cifras exactas.<sup>55</sup> Sus ataques no están limitados a animales homeotermos, ya que hay citas de su alimentación sobre peces, reptiles y anfibios y se sabe que transmiten patógenos a diversos grupos de animales incluyendo al hombre.<sup>54,55</sup> La familia Culicidae (conocidos comúnmente como “mosquitos” o “zancudos”), se divide en tres subfamilias: Anophelinae, Culicinae y Toxorhynchitinae. Es de particular interés la subfamilia Culicinae, cuyas larvas están provistas de un sifón largo en el octavo segmento abdominal,

generalmente con un pecten bien desarrollado y uno o varios penachos de sedas y son de vida acuática. Las pupas son grandes, presentan pequeñas trompetas respiratorias y son muy activas al nadar. Los adultos, con palpos maxilares pequeños en relación al tamaño de la proboscis en las hembras y son largos en los machos. El escutelo es trilobulado con sedas en cada lóbulo, el abdomen cubierto por escamas anchas, casi siempre de posición horizontal. Los huevecillos son depositados en grupos flotantes compactos en la superficie del agua o individualmente arriba del agua. El género *Culex*, incluye un número de vectores comprobados y potenciales de arbovirus y malaria aviar. Generalmente prefieren alimentarse de aves, aunque la estenoxicidad es poco común. Pasan el invierno como hembras inseminadas en diapausa, preparándose para la hibernación, disminuyendo su alimentación de sangre y la hipertrofia del tejido adiposo en respuesta a las temperaturas frías y días más cortos.

**a) El mosquito *Culex quinquefasciatus***

*Culex quinquefasciatus*, es un insecto que acompaña al proceso de urbanización desarrollado por el hombre; la hembra de estos mosquitos colocan los huevos sobre el agua de los criaderos donde posteriormente se desarrollan las larvas en aguas procedente de los drenajes o las lluvias, letrinas de pozos abiertos, recipientes de desecho doméstico conteniendo agua, plantas bromelias, etc. Las lagunas de oxidación de aguas negras son particularmente atractivas para la oviposición cuando el recuento de bacterias coliformes aumenta lo suficiente.<sup>54</sup> Estos insectos se pueden reproducir prácticamente en cualquier tipo de agua estancada, dulce o salobre, limpias o contaminadas, aguas en botes de hojalata, llantas de carro y avión; huellas de cascos, hoyos en los árboles, depósitos en las copas de las hojas; las márgenes de arroyos, lagos y embalses de agua,<sup>54</sup> pudiendo ser halladas en la ciudad de Ayacucho, valles interandinos y la selva del río Apurímac colonizando en el estado larvario diversos tipos de ambientes desde criaderos naturales hasta los artificiales como contenedores, principalmente tachos de plástico, baldes, botellas descartables desprovistas de tapa, charcas, pozos de cemento, pozas de oxidación, etc. que almacenan agua temporal y putrefacta con abundante materia orgánica en descomposición.<sup>56</sup>

**b) Posición taxonómica de *Culex quinquefasciatus***

*Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), habita en regiones tropicales y subtropicales y abarca hasta las isotermas de 20 grados centígrados,<sup>57</sup> abundan principalmente en América y África tropical, Medio y Lejano Oriente, sur de Asia,

Nueva Guinea, Australia y el sur de Estados Unidos, aunque existen zonas de intergradación (Norteamérica, norte del Japón, sur oriente de Australia, Medio Oriente, área central de Argentina, entre los 30 y los 33 grados de latitud sur, y África donde se han reportado híbridos.<sup>58</sup> La amplia distribución de *Cx. quinquefasciatus* tanto en el hemisferio norte como en el sur expone a esta especie a una variedad de climas y condiciones que son un reto para su supervivencia. En el Perú, *Cx. quinquefasciatus* se distribuye por casi todo el territorio nacional desde los 0 hasta los 3 000 msnm.<sup>17</sup>

Por cerca de 50 años dos nombres diferentes de grupos específicos (*Culex quinquefasciatus* Say 1823 y *Cx. fatigans* Wiedemann, 1828) se han sugerido para la ubicación taxonómica, ambas son popularmente conocidas como tropicales (Southern House Mosquitos).<sup>59</sup> *Culex (Culex) quinquefasciatus* forma parte del complejo Pipiens de *Culex*. El mismo que está formado por *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y algunas formas intermedias, ejemplares híbridos.<sup>60</sup>

La taxonomía de *Culex quinquefasciatus*, descrita por Say en 1823 y propuesta por Forattini,<sup>61</sup> para esta especie, es la siguiente:

Reino : Animalia  
Phylum : Arthropoda  
Clase : Insecta  
Orden : Diptera  
Suborden : Nematocera  
Superfamilia : Culiciodea  
Familia : Culicidae  
Subfamilia : Culicinae  
Tribu : Culicini  
Género : *Culex*  
Especie : *Culex quinquefasciatus* (Say 1823)

### **c) Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus***

Los insectos de tipo Culicidae son holometabólicos, eso quiere decir que presentan metamorfosis completa en su ciclo evolutivo, pasando desde la fase de huevo, larva, pupa y adulto. En los culícidos ocurren 4 estadios larvales. Con excepción de la última fase del ciclo de vida, todas las demás ocurren en ambiente acuático y se denominan formas inmaduras. Las colecciones acuáticas donde ocurren y viven estas fases reciben el nombre de criaderos. Tanto los huevos, como las larvas y las pupas tienen un hábitat en común, el ambiente acuático (Figura 2).

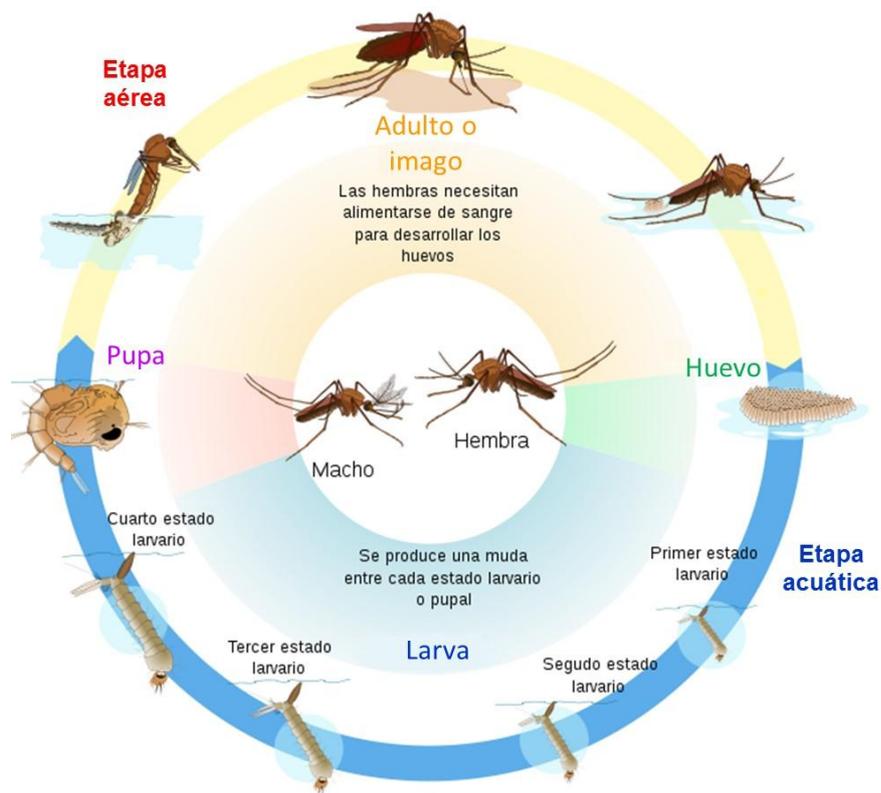


Figura 2. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*.<sup>62</sup>

- Huevos.-** Las hembras grávidas depositan los huevos por encima de la superficie del agua; en estos casos, los huevos embrionan inmediatamente y eclosionan en un corto período y para el caso de *Culex quinquefasciatus* se depositan en forma grupal formando una especie de balsa que flota, los huevos no presentan movilidad y están sujetos a las variaciones del medio ambiente y pueden presentar adaptaciones diferentes. La hembra deposita los huevos en agua estancada, preferiblemente en horas nocturnas, al principio son blanquecinos, pero al cabo de 1-2 horas se tornan oscuros debido a la oxidación del exocórrion. El periodo de desarrollo embrionario y consecuentemente la incubación de los huevos para *Culex* es de aproximadamente 1 a 1,5 días.<sup>55</sup>
- Larva.-** Esta fase es esencialmente acuática y dotada de gran movilidad, la alimentación es a base de microorganismos como bacterias, hongos, protozoarios y detritos orgánicos animales o vegetales. Las larvas pueden triturar y morder diferentes alimentos raspar superficies de objetos e ingerir cuerpos voluminosos como crustáceos. La duración de los diferentes estadios larvales no es la misma. De acuerdo a las variaciones específicas de cada fase se puede decir que el segundo y el tercer estadio son más

breves que el primero y el periodo más largo corresponde al cuarto, esto se debe a que en la última fase ocurren las transformaciones titulares destinadas a la formación del futuro adulto. En líneas generales la duración del ciclo del periodo larval de culicinos varía alrededor de 8 a 10 días en condiciones normales.<sup>61</sup> A medida que las larvas crecen y se desarrollan deben mudar su exoesqueleto tres veces, pasando en consecuencia por cuatro estadios larvales. Las larvas de primer estadio (las que emergen del huevo) son pequeñas, pero a medida que pasan por los sucesivos estadios larvales van aumentando de tamaño, hasta alcanzar en el cuarto estadio aproximadamente entre 0,5 y 1,5 cm (dependiendo de las especies). Cuando la larva de cuarto estadio muda, pasa al estado de pupa. Se acostumbra a realizar los ensayos con larvas del III o IV estadio, ya que estas muestran mayor resistencia a los larvicidas y son las últimas etapas larvarias en que toma alimento, antes de surgir la pupa y el insecto hematófago.<sup>61, 55</sup>

- **Pupa.-** El estadio pupal corresponde a un periodo de transición en el cual ocurren profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto y al cambio del hábitat acuático al terrestre. La duración en general es de 2 días bajo condiciones normales.<sup>61, 63</sup> Durante esta etapa ciertos órganos son destruidos como el canal digestivo y otros son reemplazados y reconstruidos por diferentes tipos de células indiferenciadas.<sup>63</sup> Al cabo de dos días en promedio, el caparazón de la pupa se rompe (denominado exuvia) y sale el mosquito adulto.<sup>55</sup>
- **Adulto.-** Los adultos de Culicinos son de hábitat terrestre. En cuanto a que la función primaria de las larvas es alimentación para el crecimiento, la de los adultos reside en la reproducción y dispersión. Entran en una etapa inicial denominada de abrigo en la cual son débiles, buscan sitios para refugiarse y permanecen en reposo. Posteriormente desarrollan su cuerpo elongado, largas patas que le dan estabilidad aerodinámica y largas alas para que puedan desarrollar los movimientos aéreos.<sup>63, 61</sup>

#### **2.3.4. Insecticidas de origen vegetal**

Este grupo de insecticidas está constituido por extractos de plantas, o por partes de ellas (flores, hojas o raíces) finamente molidas, que tienen efecto insecticida. Son productos relativamente caros y, en la mayoría de los casos, el efecto insecticida se debe a la presencia de ciertas sustancias tóxicas en la planta.<sup>64</sup>

Entre las sustancias tóxicas están alcaloides (nicotina en hojas de tabaco, anabasina en toda la planta de *Anabasis*, veratrina en la semilla de cebadilla, rianodina en los tallos y raíces de *Ryania*, estricnina en la semilla de *Strycnos*, etc.). También hay compuestos que no son alcaloide, (piretrina en las inflorescencias de *Pyrethrum*, rotenona de las raíces de *Derris* y del barbasco, *Lonchocarpus*, y azaridachtina de las semillas del nim o margosa).<sup>64</sup>

Las plantas consideradas con propiedades insecticidas, desarrollaron sustancias llamadas aleloquímicos como un mecanismo de defensa contra los insectos,<sup>65</sup> regulando así la presencia de los fitófagos, actuando ya sea como atrayentes, estimulantes, repelentes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición.<sup>66</sup> Los insecticidas vegetales no deben ser considerados inocuos, esto por la gran cantidad de metabolitos tóxicos y porque una molécula se debe a la naturaleza de su estructura química y no al origen, en su totalidad. Por ello la diferencia entre lo que mata y lo que cura es la dosis.<sup>66</sup>

### **2.3.5. Efecto toxico de los bioinsecticidas**

La toxicidad de los insecticidas o de cualquier tóxico a un organismo, se expresa usualmente en términos de  $DL_{50}$  (dosis letal media); este valor representa la cantidad de tóxico por unidad de peso que mata 50% de los animales empleados en la prueba. La  $DL_{50}$  comúnmente se expresa en  $mg\ kg^{-1}$  y ocasionalmente en mg por animal.<sup>21</sup>

En los casos en que no se sabe la cantidad de tóxico que entra en contacto con el insecto, pero si se sabe cuál es la cantidad de insecticida que rodea al organismo, se usa el término  $CL_{50}$  (concentración letal media), concentración del compuesto tóxico que mata a un 50% de los animales expuestos, en un periodo específico (generalmente 24 h).<sup>21</sup>

La evaluación de la toxicidad de los plaguicidas, puede hacerse en insectos y animales superiores, para inferir sus riesgos en el hombre. Hay muchas formas de administrar insecticidas para evaluar toxicidad. El método comúnmente empleado para insectos, es la aplicación tópica, en la que el insecticida se disuelve en un solvente volátil e inocuo, como acetona. En los insectos, se puede administrar con un inyetable en el abdomen a nivel intersegmentario evitando dañar el cordón nervioso abdominal. El método de contacto o de exposición residual, es otra forma de dejar al insecto expuesto al insecticida.<sup>21</sup>

Para expresar la susceptibilidad de cualquier población de insectos a cualquier veneno, se grafican las unidades Probit del porcentaje de mortalidad, contra una

escala logarítmica de la dosis. En forma empírica, se ha observado que en muchos procesos bioquímicos y fisiológicos, incrementos iguales en efecto son producidos sólo cuando el estímulo se incrementa logarítmicamente.<sup>21</sup>

Para el análisis de la línea dosis-Probit, es necesario que exista una distribución normal de la respuesta tóxica. El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal que tiene como objetivo conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de un tóxico) y una variable dependiente (la respuesta=mortalidad) para una especie y una exposición determinada. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades Probit (eje Y) y la concentración del tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% ó 95% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta ( $CL_{50}$  ó  $CL_{95}$ ).<sup>67</sup>

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Área de estudio

#### 2.1.1. Ubicación política

Región : Ayacucho

Provincia : Huamanga

Distrito : Ayacucho

Los lugares de muestreo del material biológico y el laboratorio de investigación, fueron los siguientes:

- Lugar de recolección del material biológico: a) semillas de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”. Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. b) Larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, colectadas en las lagunas de maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totora”-Ayacucho.
- Laboratorio de Zoología, ubicado en la Unidad de Laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria - UNSCH.

#### 2.1.2. Ubicación geográfica

- Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho (Coordenadas UTM: 582936.56 m E; 8515222.08 m S; 3688 msnm) (Figura 3).
- Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totora”-Ayacucho. (Coordenadas UTM: 585697.33 m E; 8546992.71 m S; 2626 msnm) (Figura 4).
- Laboratorio de Zoología. Unidad de los Laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria - UNSCH. (Coordenadas UTM: 584425.95 m E; 8546618.55 m S; 2791 msnm)



Figura 3. Georeferenciación del lugar de muestreo de las semillas de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi" Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.



Figura 4. Georeferenciación y ubicación del lugar de colecta de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.

## **2.2. Población y muestra**

### **2.2.1. Población**

Semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, procedentes de la comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a 3 690 msnm (Figura 3).

### **2.2.2. Muestra**

Cinco kilogramos de semillas secas de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”.

### **2.2.3. Unidad de análisis**

Vasos plásticos descartables conteniendo una dilución de 100 mL de agua potable declorada más el volumen de extracto hidroalcohólico y 10 larvas de III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

## **2.3. Metodología y recolección de datos**

### **2.3.1. Recolección y mantenimiento del material biológico**

#### **a) Semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”.**

Las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, fueron colectadas de plantas sembradas en terrenos de cultivo con antecedentes de limitada actividad agrícola y de productos de autoconsumo. Las semillas, fueron colocadas en bolsas de papel y etiquetadas con las características geográficas de la zona de recolección y posteriormente transportadas hasta el laboratorio de Zoología. Partes representativas de la planta fueron prensadas utilizando una prensa de madera portátil con la finalidad de llevar a cabo la identificación taxonómica (Anexo 2).

El material vegetal en el laboratorio fue almacenado en un ambiente limpio, con buena ventilación y a temperatura ambiente hasta su secado completo que ocurrió en un periodo de 15 días. Previamente las semillas fueron lavadas con una solución de agua e hipoclorito de sodio (mezcla de 1000:1). El molido de las semillas secas se realizó utilizando una licuadora a alta velocidad, la harina obtenida fue tamizada a través de un tambor cernidor N° 200 a fin de lograr un diámetro homogéneo de las partículas y permitir, de este modo, un mejor macerado hidroalcohólico de las semillas de la planta.

#### **b) Recolección de huevos y crianza de *Culex quinquefasciatus***

Los huevos de los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, fueron colectados en las lagunas de maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totora” utilizando para ello un *dipper* muestreador de 350 mL de capacidad. Los huevos, con características típicas de barquillas (Anexo 3),

fueron trasladados hasta el laboratorio de Zoología (FCB, Ciudad Universitaria-UNSCH), utilizando para ello baldes de plástico de 2 L de capacidad con tapa hermética; una vez en el laboratorio, los huevos fueron colocados en bandejas de plástico conteniendo agua procedente del lugar de colecta de los huevos diluida con agua de cloración del servicio público (proporción 1:3), para luego cada 24 horas ser cambiado el agua de los recipientes con agua potable de cloración, a fin de evitar la descomposición y/o aparición de patógenos oportunistas que pudieran perjudicar la crianza. Transcurrido aproximadamente un día y medio, se logró la emergencia de las primeras larvas, las mismas que fueron alimentadas con alimento balanceado para peces tropicales hasta alcanzar el III estado de desarrollo larval (promedio: 1,0 a 1,2 cm de tamaño), que ocurrió aproximadamente a los 9 días de iniciada la crianza. Esta crianza fue hecha con la finalidad de lograr una generación de larvas del mismo periodo estacional necesarias para las pruebas de biotoxicidad. De las bandejas de crianza fueron seleccionadas algunas larvas, las que posteriormente fueron utilizadas en la caracterización taxonómica y confirmación de la especie de mosquito (Anexo 4). Las larvas de III estadio de *Culex quinquefasciatus* seleccionadas para las pruebas experimentales fueron mantenidas en una pecera de vidrio de 5 L de capacidad (tamaño: 50 x 40 x 40 cm), conteniendo tres litros de agua potable de cloración. Toda la crianza de huevos y larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, así como el desarrollo de las pruebas experimentales fueron hechas a una temperatura media de 24,3° C (mínima y máxima de 22,1 a 26,5° C), humedad relativa media ambiental de 58,5% (oscilante entre 55 a 62 % de HR) y un fotoperiodo de 12:12 (día-noche). Para la determinación de estos parámetros se utilizó un equipo portátil Thermo Hygrometer®. El procedimiento fue adecuada a las normativas propuestas por Pérez *et al.*,<sup>68</sup> sobre manejo de especies en insectarios.

### **2.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de las semillas del “tarwi” y formulación de las diluciones para las pruebas de toxicidad**

El extracto hidroalcohólico, se preparó a partir del material vegetal previamente secado, molido y pesado. 40 g del tamizado de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, fueron macerados en un litro de alcohol al 95% durante 3 días con frecuente agitación; el extracto obtenido fue filtrado y destilado a presión reducida en un rotaevaporador a temperatura controlada de 40° C, el extracto obtenido fue recogido en una botella de vidrio de color ámbar y almacenado en

refrigeración a 4° C, al residuo del filtrado se les añadió 500 mL de alcohol al 95% permitiendo una maceración adicional de dos días. Se procedió en forma similar que el caso anterior, lográndose una cantidad adicional de extracto hidroalcohólico. Finalmente el extracto producido y el excedente del alcohol presente en la muestra fueron evaporados a temperatura menor de 40° C hasta llegar a una concentración alcohólica de un grado (igual a 0° de alcohol), con lo que se llegó a producir una solución madre de 40 000 mg/L.

Dos pruebas preliminares fueron hechas a fin de determinar las concentraciones ideales con las cuales llevar a cabo el experimento del efecto biotóxico de las semillas de la planta. La primera prueba consistió en evaluar las diluciones de 5000, 10 000 y 15 000 mg/L a volúmenes de 5 y 10 mL por unidad experimental (vasos con un volumen de 90 o 95 mL de agua más el extracto, haciendo un volumen total de 100 mL, con 10 larvas de III estadio de *Cx. quinquefasciatus*); al hallarse mortalidades próximas al 100% en la primera prueba sobre todo en las concentraciones superiores a 10 000 mg/L, se optó por realizar una segunda prueba piloto considerando las diluciones de 2 000, 5 000 y 10 000 mg/L con similares volúmenes de agua, extracto hidroalcohólico y número de larvas. Sobre la base de los resultados hallados después de las 24 horas de efectuada la segunda prueba piloto y habiéndose demostrado en las diluciones de 5 000 y 10 000 mg/L, mortalidades superiores al 70%, se tomó la decisión de desarrollar la prueba confirmatoria de mortalidad utilizando las diluciones de 3 000, 4 000, 5500, 7 000, 9 000 y 11 000 mg/L, a un volumen de 10 mL de extracto hidroalcohólico, 90 mL de agua de clorada y 10 larvas de III estadio por unidad experimental, con cuatro repeticiones (diluciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes menores presentes en los extractos hidroalcohólicos obtenidos), un control consistente en un producto comercial (Temefos®), a la misma dilución del extracto evaluado, en dos repeticiones y, un blanco que fue solo agua de clorada más las larvas del mosquito (Ver Anexo 5).

### **2.3.3. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”**

Obtenidos los aceites esenciales y demás sustancias hidroalcohólicas solubles presentes en las semillas de la planta en estudio, se llevó a cabo la identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar) a fin de relacionar la presencia de alguno de sus componentes con las características

tóxicas de la planta. El análisis de los componentes de cada aceite y su identificación correspondiente fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Farmacia (Facultad de Ciencias de la Salud-UNSCH), siguiendo los procedimientos descritos por Miranda y Cuellar<sup>69</sup> y Lock de Ugaz.<sup>70</sup> (Anexo 6).

#### **2.3.4. Evaluación de la toxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”**

Para este propósito los ensayos se realizaron en vasos plásticos descartables de 7,0 cm de ancho por 7,5 cm de alto (capacidad: 200 mL), las mismas que correspondieron a las unidades experimentales. La población de larvas de III estadio necesarias para el desarrollo de las pruebas fueron concentradas previamente en una bandeja de plástico conteniendo agua limpia declorada; utilizando una pipeta plástica (pipeta de Pasteur plastibrand®), fueron separadas 10 larvas de III estadio por vaso para cada una de las diluciones a evaluar (3000, 4 000, 5 500, 7 000, 9 000 y 11 000 mg/L), previamente se incorporó 90 mL de agua potable declorada, para luego ser completada al volumen de 100 mL con 10 mL adicionales de la dilución del extracto a evaluar, lo que correspondió al volumen total donde fueron colocadas las larvas del mosquito. Cada dilución fue evaluada por cuadruplicado con su respectivo control (Temefos®), a la misma dilución del producto formulado evaluado, en dos repeticiones, con su correspondiente blanco, tomando en cuenta las normas planteadas por la WHO<sup>71</sup> para este tipo de experimentos.

Las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo a las 24 horas posteriores al inicio del experimento.<sup>21</sup> Las larvas fueron declaradas muertas cuando no reaccionaron al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical.<sup>72</sup> Por precaución se observó si hubo mortalidad de larvas en el blanco. En vista de no hallarse mortalidad larval, no fue necesario realizar la corrección de los resultados del bioensayo a través de la fórmula propuesta por Abbott en 1925.<sup>21</sup>

#### **2.3.5. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)**

Para el cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y sus respectivos límites de confianza al 95% se utilizó el método Probit con la ayuda del paquete estadístico MINITAB 16, para lo cual previamente fue elaborada una base de datos de los resultados de mortalidad halladas en las pruebas experimentales. El método de análisis Probit permitió estimar el CL<sub>50</sub> ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia.<sup>21</sup>

El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal, con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración del tóxico) y una variable dependiente (la respuesta = mortalidad larval) para una especie y una exposición determinada. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades Probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL<sub>50</sub>).<sup>67</sup>

#### **2.4. Diseño de investigación**

El diseño experimental fue adecuado al tipo aleatorio simple, donde el factor manejado fueron las diluciones (3 000, 4 000, 5 500, 7 000, 9 000 y 11 000 mg/L), del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi"

#### **2.5. Análisis de datos**

Con los datos obtenidos en las pruebas del efecto toxico del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", en el control de larvas de III estadio de *Culex quinquefasciatus*, fue calculada la mortalidad para cada dilución formulada a través de la aplicación de la siguiente ecuación:

#### **Porcentaje de mortalidad larvaria**

$$\% \text{ Mortalidad larvaria} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de larvas muertas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de larvas expuestas}} \times 100$$

Se elaboraron tablas y figuras estadísticas del tipo descriptivo de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de establecer la tendencia de distribución de los resultados de mortalidad obtenidos en las pruebas de toxicidad en el control de larvas de III estadio del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, los datos fueron sometidos a un análisis de Kolmogorov-Smirnov ( $P < 0,05$ ), demostrándose que estas se ajustan a una distribución normal, por lo que se llevó a cabo el Test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) a las medias de los porcentajes de mortalidad en relación a las concentraciones evaluadas a fin de categorizar las respuestas evaluadas. Finalmente se realizó el análisis de varianza a las variables evaluadas, a fin de determinar la tendencia que muestran las diluciones evaluadas en relación a las mortalidades larvales halladas, utilizando el procedimiento del paquete estadístico SPSS 15.

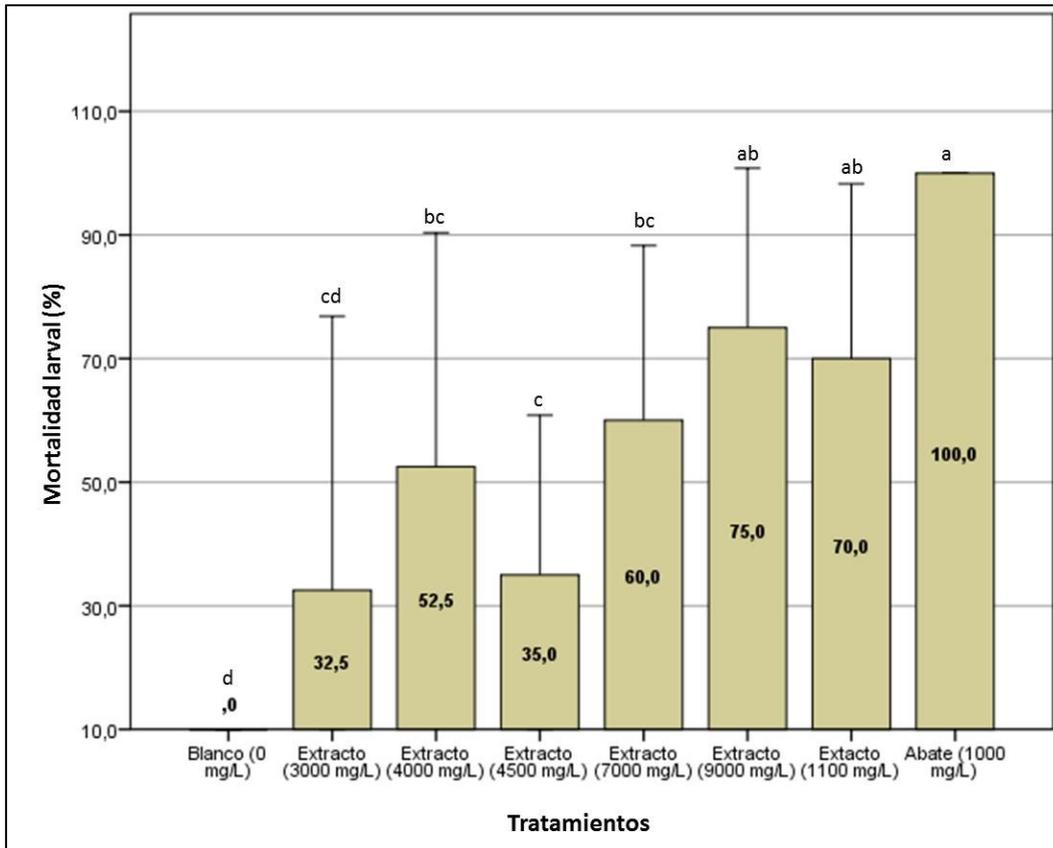
### **III. RESULTADOS**

Tabla 4. Número y porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" a diferentes diluciones, en 24 horas de evaluación.

Diluciones (mg/L)	Densidad larval inicial (N°)	Mortalidad de larvas por repetición (n = 4)				X̄ mort.	% de mort.
		I	II	III	IV		
<b>3 000</b>	10	3	4	4	2	3,3	33
<b>4 000</b>	10	4	4	5	8	5,3	53
<b>5 500</b>	10	5	4	3	2	3,5	35
<b>7 000</b>	10	6	2	9	7	6,0	60
<b>9 000</b>	10	7	9	8	6	7,5	75
<b>11 000</b>	10	7	8	5	8	7,0	70

Tabla 5. Media y desviación estándar del porcentaje de mortalidad generada en larvas del III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus* a diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

Diluciones (mg/L)	N° de repeticiones	Media	Desv. Estándar	IC (95%)		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
3 000	4	32,50	22,17	-2,78	67,78	0,00	50,00
4 000	4	52,50	18,93	22,38	82,62	40,00	80,00
5 500	4	35,00	12,91	14,46	55,54	20,00	50,00
7 000	4	60,00	14,14	37,50	82,50	40,00	70,00
9 000	4	75,00	12,91	54,46	95,54	60,00	90,00
11 000	4	70,00	14,14	47,50	92,50	50,00	80,00



a, b, c y d: Medias signadas con letras diferentes en las columnas difieren entre sí por la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 5. Promedio y desviación estándar del porcentaje de mortalidad de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", a diferentes diluciones.

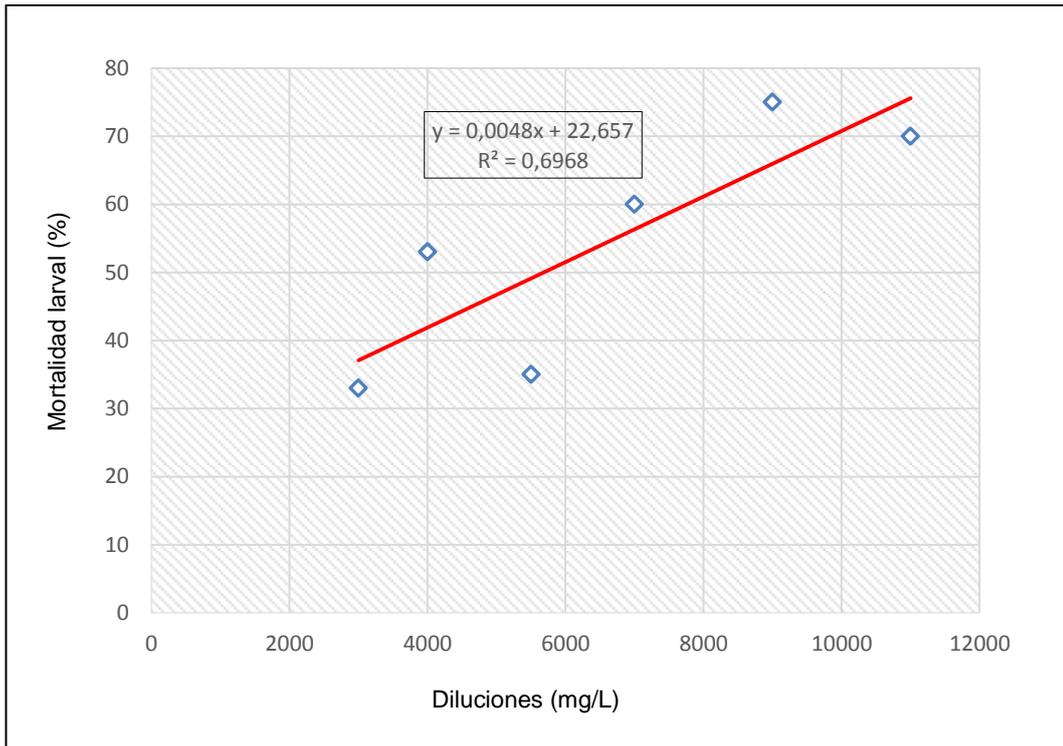
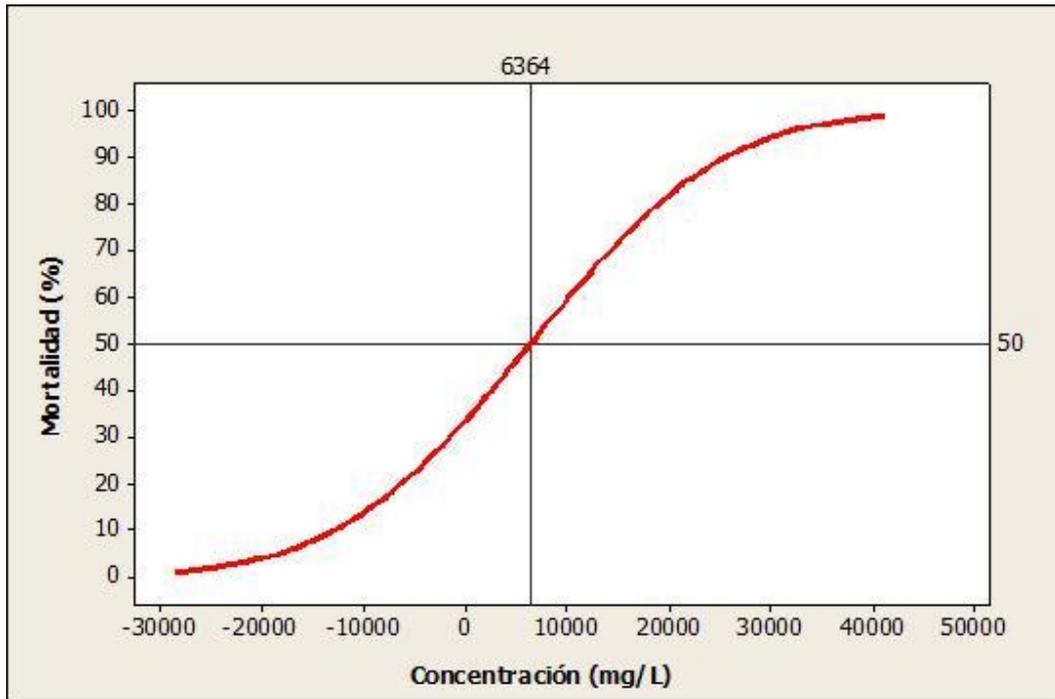


Figura 6. Línea de tendencia del porcentaje de mortalidad de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* generada por efecto de las diluciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".



CL<sub>50</sub> : 6 364,13 (mg/L)  
 IC (95% de la media) : 3 796,15; 27 495,8

Figura 7. Curva de dosis mortalidad para establecer la concentración letal media del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas del III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Tabla 6. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" (Anexos 7 y 11)

Componentes químicos	Resultados	Observaciones
Flavonoides	-	
Alcaloides	+++	Abundante
Taninos	+	Poco
Espuma - Saponinas	+	Poco
Lactonas	+++	Abundante
Aminas	+	Poco

**Leyenda:**

- (+) : Poco
- (++) : Regular
- (+++): Abundante



#### IV. DISCUSIÓN

Los resultados de la mortalidad de larvas de III estadio de *Culex quinquefasciatus* que se reportan en las Tablas 4 y 5, demuestra que las diluciones producidas a partir del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", son efectivas para el control de las larvas del mosquito culicido, generando mortalidades que puede superan el 70% de las larvas expuesta conforme se incrementen las concentraciones en las diluciones. Así se tiene que a la dilución de 9 000 a 11 000 mg/L del extracto hidroalcohólico, los resultados de mortalidad larval oscilaron entre 70 a 75% (D.E.  $\pm$  14,14 y 12,91%), respectivamente, en tanto que los menores valores hallados fueron a las concentraciones de 3 000 a 5 500 mg/L, con 32,5 y 35% (D.E.  $\pm$  22,17 y 12,91%) de mortalidad larval, resultados que claramente denotan la tendencia creciente del efecto tóxico del extracto obtenido, de modo tal que, cuanto mayor sea la concentración del extracto hidroalcohólico en las unidades experimentales, mayor será el número de larvas muertas por efecto del producto hidroalcohólico.

Al comparar los resultados de mortalidad larval reportados en la presente investigación con los desarrollados por otros investigadores, se puede apreciar, por ejemplo,<sup>73</sup> al realizar siete bioensayos en laboratorio para evaluar la capacidad biocida de *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) «barbasco» sobre 7 000 larvas de tercer y cuarto estadio de *Anopheles benarrochi* (Gabaldón, 1941), vector primario de la malaria en Yurimaguas y Loreto, demostró que el polvo de la raíz diluida en agua destilada a las concentraciones de 6,25 y 3,1 g/L y 12 horas pos tratamiento, reportaron mortalidad larval de 98 y 89 % y 86 a 82 % cuando se utilizó agua de criadero. A las 24 horas la mortalidad alcanzó el 99 y 94 % usando agua destilada y con agua de criadero 93 y 90 %. Como podemos apreciar, los resultados que reportan Mariños *et al.*,<sup>73</sup> para *Lonchocarpus utilis* «barbasco» evaluada en el control de larvas de anofeles, sustancialmente no

difieren de los que reportamos en el estudio del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" probada en larvas de *Culex quinquefasciatus*, en este sentido, el extracto de "tarwi", demostró niveles de mortalidad próximos a los reportados en el producto biocida obtenido del «barbasco», planta ampliamente reconocida por su efecto tóxico en distintos sistemas biológicos y considerada como de mediana toxicidad para el ambiente, siendo su principal metabolito secundario, la rotenona, tipo de flavonoide (alcaloide), comercializado en distintas presentaciones en el mercado, para el control de diferentes insectos.

De igual forma Huamán Campos,<sup>18</sup> al llevar a cabo estudios de biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* demostró mortalidad larval de  $70 \pm 8,16$  a  $75 \pm 12,91$  %, a las concentraciones de 20 000 a 30 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, porcentaje de mortalidad estadísticamente diferente para cada concentración evaluada según la prueba de comparación de medias de Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ), dependiente del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio.

En este punto es clara la diferencia de los resultados que reporta Huamán Campos,<sup>18</sup> para el extracto obtenido de las hojas, con los de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi"; el extracto obtenido de las semillas demostró ser más tóxico a menores concentraciones que el producto obtenido de las hojas, esto debido probablemente a la composición química que puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie de planta, e inclusive en los diferentes órganos de la planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo.<sup>74</sup>

El estudio de los extractos de plantas para el control de plagas tiene una larga data, algunas han tenido éxito siendo incorporadas en el mercado de los productos bioinsecticidas bajo nominaciones comerciales, nuestro interés es la de contribuir a la inmensa lista de plantas con uso biocida, en este caso proponiendo al extracto obtenido de las semillas del "tarwi" como una alternativa bioecológica cuyos resultados reportados en la presente investigación, demuestran a esta planta como una alternativa de grandes posibilidades frente a los reportes que se tienen de otras investigaciones. En este sentido, por ejemplo, los resultados obtenidos por Cárdenas Castro *et al.*,<sup>9</sup> en la evaluación de la toxicidad del extracto acuoso de *Ruta graveolens* sobre larvas de cuarto estadio

de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus*, reportaron 98% de mortalidad en larvas del mosquito *Anopheles albimanus*, en tanto que en *Culex quinquefasciatus* la mortalidad estuvo entre 86 y 95% a la concentración de 300 mg/L, en 60 larvas por concentración evaluada en cinco repeticiones, al tiempo de exposición de 24 horas y a una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Vidal *et al.*,<sup>15</sup> estudiaron el efecto tóxico de los extractos etanólicos foliares de *Argemone subfusiformis* “cardo santo” y *Tagetes patula* “marigold” sobre larvas IV y pupas de *Aedes aegypti*. En larvas, se registró 100% de mortalidad con 76,8 y 153,6 mg/L del extracto de *A. subfusiformis* a las 12 horas de exposición, mientras que en pupas el mismo porcentaje de mortalidad se alcanzó con 153,6 mg/L a las 24 horas. De otro lado, el 92% y 77% de mortalidad en larvas y pupas respectivamente se registró con el extracto de *T. patula* al emplear 153,6 mg/L del extracto a las 48 horas.

Flores Cisneros,<sup>16</sup> evaluó la actividad biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* “marco” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* que habitan criaderos larvales de la ciudad de Ayacucho (Perú), demostró que, a la concentración de 9 a 10 mg/L del extracto hidroalcohólico producido, generaron mortalidad larval del 54 al 58%.

En esta perspectiva, el estudio de la toxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus*, resulta ser una alternativa válida, pudiendo utilizarse el extracto producido a una dilución de 9 000 a 11 000 mg/L, a fin de generar mortalidad larval entre 70 a 75%.

Al realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $P < 0,05$ ) a los resultados del porcentaje de mortalidad larval halladas en cada una de las diluciones del extracto hidroalcohólico evaluado, se demostró que estas se ajustan a una distribución normal, en virtud de lo cual se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P < 0,05$ ) a los porcentajes de mortalidad en relación a las concentraciones evaluadas llegándose a categorizar las respuestas de la siguiente manera: las mayores mortalidades de las larvas de *Cx. quinquefasciatus* fueron halladas a las diluciones de 9 000 a 11 000 mg/L del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” [mortalidad larval de 70 a 75% (ab)], estadísticamente similares, pudiendo incluso ser comparable a los resultados que se reportan en la dilución 7 000 mg/L, donde se alcanzó una mortalidad larval de 60% (bc); es decir que si quisiéramos obtener

una mortalidad larval que supere el 60% de larvas, bastaría con agregar a un criadero larval de los mosquitos culícidos una dilución de 7 000 a 9 000 mg/L del extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", para alcanzar dichos resultados estadísticamente significativos (Tabla 5, Figura 5). En cuanto a las menores mortalidades, estas fueron reportadas a las diluciones de 3 000 a 4 500 mg/L [mortalidad larval de 32,5(cd) a 35%(c)], con similares resultados, estadísticamente justificados. En resumen, se demostró que los porcentajes de mortalidad en las larvas de III estadio de *Culex quinquefasciatus*, son dependientes del incremento de las diluciones del producto biotóxico en el medio, es decir que a un incremento de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", se espera mayores porcentajes de mortalidad larval en las unidades experimentales.

Al realizar el ajuste de los datos del porcentaje de mortalidad larval obtenidas en cada una de las diluciones evaluadas a una tendencia lineal, se halló que el valor del índice de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,6968 (Figura 6), lo que se interpreta estadísticamente como que la variación de la mortalidad de las larvas está explicada en un 69,68% por la variación de las concentraciones de los extractos, reforzando plenamente los resultados hallados en la Figura 5. Así mismo, al realizar el análisis de varianza ( $P < 0,05$ ) con la finalidad de determinar si el ajuste de la línea de tendencia es el adecuado, se halló significancia a dicho análisis corroborando que el ajuste, estadísticamente, es el adecuado (Anexo 9).

Por otro lado al comparar los resultados de mortalidad reportados para las diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" en relación al Temefos®, larvicida de uso comercial para el control de larvas de mosquitos, se puede evidenciar que el producto comercial es distantemente más eficiente a menor concentración (1 000 mg/L), generando 100% de mortalidad en las larvas de *Culex quinquefasciatus*, dilución próxima a los 3 000 mg/L del extracto hidroalcohólico de las semillas de "tarwi" evaluado, donde fue reportada la menor mortalidad en las larvas del mosquito culícido (Figura 5). El Temefos® es un plaguicida organofosforado sintetizado químicamente, de efecto no sistémico que actúa por contacto e ingestión. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. Se utiliza principalmente como larvicida e insecticida, a una concentración de 1 000 ppm, que garantiza la mortalidad larval en los programas de control vectorial.<sup>75</sup>

Al efectuar el corte y realizar la interpolación en la curva de dosis mortalidad de Probit (Figura 7, Anexo 10), con la finalidad de determinar la concentración del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* que pueda producir una mortalidad del 50% de la población de larvas de *Culex quinquefasciatus* a un límite de confianza del 95%, se estableció en 6 364 mg/L como la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) recomendable para el control de larvas del mosquito culícido presentes en los criaderos larvales de la ciudad de Ayacucho.

Revisada la literatura científica que circula al alcance de nuestra realidad y en el panorama internacional, se encuentran reportes que abordan el efecto tóxico de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”, sobre todo relacionado con los alcaloides, que son metabolitos secundarios tóxicos para varios sistemas biológicos.<sup>36-39,33,50</sup> Se conoce que en el agua proveniente del desamargado del chocho existe 3,53% (P/V) de alcaloides los mismos que al ser vertidos a los ríos, acequias, etc, provocan contaminación en el ambiente ocasionando la muerte de algunas especies por la gran toxicidad que poseen.<sup>40</sup> El agua procedente de las semillas remojadas o del primer hervor de las semillas se usa como insecticida en fumigaciones contra diversas plagas, garrapatas y piojos de animales.<sup>34</sup> Es precisamente estos antecedentes que han motivado el desarrollo de la presente investigación con la finalidad de evaluar el efecto tóxico en insectos de interés médico como los abordados en la presente investigación. Al respecto, entre los antecedentes más cercanos relacionados con evaluación de la toxicidad de las semillas de la planta, se tiene, por ejemplo los desarrollados por Ayala *et al.*,<sup>17</sup> quienes al estudiar la toxicidad de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostraron que a un volumen de 5 mL en 100 mL de agua de criadero y a la concentración de 5 000 ppm, el extracto hidroalcohólico de la planta produjo efecto biotóxico sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, generando una mortalidad de 75%, siendo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) estimada en 1 776 ppm como las más recomendables para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho, valores relativamente inferiores a los que reportamos en la presente investigación. Esta diferencia podría ser atribuible a la composición química que varía en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, lugar de procedencia, condiciones de cultivo, e inclusive en los diferentes órganos de una misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo.<sup>74</sup>

Huamán Campos,<sup>18</sup> en estudios de biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* demostró mortalidad larval de  $70 \pm 8,16$  a  $75 \pm 12,91$  %, a las concentraciones de 20 000 a 30 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, porcentaje de mortalidad estadísticamente diferente para cada concentración evaluada según la prueba de comparación de medias de Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ), dependiente del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fue establecida en 17 470 ppm. Si comparamos los resultados de mortalidad larval de los mosquitos culícidos al ser confrontado con el extracto obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” evaluada en la presente investigación, las diferencias saltan a la vista, es decir que las diluciones del extracto hidroalcohólico de las semillas del “tarwi”, son distantemente más tóxicas que las que proceden de las hojas de la planta. Al respecto Martínez,<sup>33</sup> señala que la mayor cantidad de alcaloides de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”, responsable de la toxicidad, se concentra especialmente en las semillas.

El estudio fitoquímico realizado al extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostró que los principales metabolitos activos correspondieron a los alcaloides y las lactonas, reportados como los más abundantes (+++), seguido de los taninos, saponinas y aminos, de poca presencia (+) (Tabla 6).

Los alcaloides son los principales metabolitos tóxicos sintetizados por *Lupinus mutabilis* “tarwi”, siendo la 1-lupanina, d1-lupanina e hidroxilupanina, el principal componente alcaloide que se distribuyen en toda la planta, concentrándose especialmente en la semilla.<sup>33</sup> Este alcaloide quinolizidinico, representa entre el 27 a 74%, responsable del amargos en las semillas,<sup>47</sup> la planta la utiliza como defensa contra las plagas fitófagas, tiene actividad antibacteriana, antinematocida, contra lepidópteros y coleópteros, también produce inhibición de las actividades moduladoras, inhibe la síntesis de proteínas, además posee actividad antiarrítmica, hipotensora, y actividad hipoglicemiante.<sup>50</sup> El efecto tóxico observado en las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, probablemente esté relacionado con éste metabolito secundario (al ser el más abundante conjuntamente con las lactonas), responsables de producir la mortalidad larval evaluada en la presente investigación. Al respecto, se ha demostrado que las lactonas macrocíclicas (LM) son endectocidas eficientes en el control de endo y

ectoparásitos.<sup>76</sup> Un tipo de lactonas son las avermectinas (ejemplos: ivermectina, doramectina, eprinomectina, abamectina) y las milbemicinas (ejemplo: moxidectina), son activas para el control de nematodos y artrópodos a dosis bajas en la mayoría de los animales domésticos.<sup>77</sup> Se absorben por todas las vías debido a su alta liposolubilidad y se distribuyen ampliamente en los tejidos, tales como la luz intestinal, grasa y piel.<sup>78,77</sup> Las LM producen su efecto antiparasitario al incrementar la permeabilidad de la membrana celular por los iones de cloro (Cl<sup>-</sup>), con la consecuente hiperpolarización y parálisis de la musculatura faríngea y somática de los parásitos.<sup>79,80</sup>

Huamán Campos,<sup>18</sup> al evaluar el efecto tóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, reportó a los fenoles y taninos pirogalotánicos (+++), como los más abundantes. De moderada presencia (++) los flavonoides y triterpenos. Los alcaloides como trazas (+). Atribuyó el efecto biotóxico de la planta probablemente a la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos, algunos tipos de fenoles y taninos, y a la complejidad de los productos trazas hallados en las hojas de la planta. Resultados notablemente diferentes a los que reportamos en la presente investigación, en la que demostramos que los alcaloides y las lactonas, son probablemente, las moléculas tóxicas responsables de generar la mortalidad hallada en las larvas del mosquito culícido, al ser estos los metabolitos más abundantes hallados en las semillas del “tarwi”, corroborada esta afirmación por los reportes planteados líneas arriba por otros investigadores. Los resultados hallados en la presente investigación alcanzar solidez si comparamos con los reportados por Ayala *et al.*,<sup>17</sup> quienes al analizar los componentes químicos presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostraron que los alcaloides (+++) son los más abundantes, seguido de los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides con moderada presencia (++).

Es probable que los taninos, saponinas y aminos, reportados como de poca presencia (+) en el extracto hidroalcohólico producido a partir de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” (Tabla 6), estén desarrollando acción sinérgica para generar el efecto tóxico demostrado en larvas de *Culex quinquefasciatus* presentes en los criaderos larvales naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho. Los aceites esenciales extraídos de las semillas de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”, consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de los vegetales, pueden estar localizados en pelos,

sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal,<sup>7</sup> cuya composición química puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e inclusive en los diferentes órganos de una misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo,<sup>74</sup> por lo que el efecto tóxico demostrado en caso del extracto obtenido de las semillas de *L. mutabilis* “tarwi” sobre larvas de los mosquitos culícidos, no es posible ser atribuida a una o dos sustancias presentes con mayor abundancia en relación a otras, sino a la complejidad de los productos hallados, que a diferencia de los plaguicidas sintéticos basados en productos químicos individuales, los aceites esenciales son mezclas de compuestos que contienen muchas sustancias trazas que actúan de manera sinérgica como una defensa estratégica, por lo que dificultan el desarrollo de la resistencia en las plagas.<sup>81</sup> Finalmente, es poca la información disponible sobre el modo de acción de los aceites esenciales en los insectos. Sin embargo, algunos aceites o sus constituyentes producen síntomas específicos que sugieren que estarían actuando como neurotóxicos.<sup>4</sup>

## V. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” son tóxicas, generan mortalidad larval en *Culex quinquefasciatus* “zancudo” de 70 a 75% a las diluciones de 9 000 a 11 000 mg/L, los menores valores de mortalidad (32,5 y 35%), fueron reportados a las diluciones de 3 000 a 5 500 mg/L a las 24 horas de exposición, lo que sugiere que a mayor concentración del extracto hidroalcohólico en las unidades experimentales, mayor será la mortalidad larval por efecto del extracto obtenido.
2. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” fue estimada en 6 364 mg/L, como la necesaria para generar mortalidad larval de 50% de la población de larvas de *Culex quinquefasciatus* “zancudo” expuestas al producto tóxico a 24 horas, con un límite de confianza de 95%.
3. El *screening* fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, sugiere que los principales productos biotóxicos responsables de la mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* “zancudo” son los alcaloides y las lactonas, reportados como los más abundantes (+++). En menor concentración fueron halladas los taninos, saponinas y aminas (+).



## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda purificar los metabolitos tóxicos más importantes hallados en el extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, a fin de establecer su potencial efecto de mortalidad en modelos biológicos referenciales, como alternativa al uso de los plaguicidas sintéticos.
2. Evaluar la residualidad del extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, a fin de establecer el tiempo de permanencia en el ambiente y sus posibles efectos en sistemas biológicos sensibles.
3. Probar el extracto hidroalcohólico obtenido de las semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, en plagas de interés agrícola a fin de reducir la aplicación de plaguicidas químicos de gran efecto contaminante y residual en el ambiente.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fradin MS, Day JF. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England J. Med.* 2012; 347(1):13-18.
2. Benzi V, Stefanazzi N, Ferrero A. Bioactivity of essential oils from leaves and fruits of aguieribay (*Schinus molle* L.) in the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean J. Agric. Res.* 2009; 9 (2): 154-159.
3. Kotyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 2012; 58: 1101-1106.
4. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 2008; 51: 45-66.
5. Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 2010; 167: 1-7.
6. Villavicencio Nieto MA, Pérez Escandón BE, Gordillo Martínez AJ. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica.* 2010; 30: 193-238. Disponible en: <http://redaly.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdf/Red.jsp?iCve=62114250012>.
7. Yanes CR. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de Espitia aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (*Cymbopogon citratus* y *Tagetes Lucida*) utilizados contra *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). [Tesis de Maestría]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2011; 61 Pp.
8. Ramos Casilla F, Oraday Cárdenas A, Rodríguez Tovar ML, Verde Star MJ, Flores Suarez A, Ponce García G. Efecto larvicida del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass, en *Aedes aegypti* (L.). *Ciencia UANL*; 2007, X(1): 25-28.
9. Cárdenas Castro E, Lugo Vargas L, Roza Bautista A. Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 y *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), en condiciones experimentales. *Entomotropica.* 2010; Abril, 25(1): 11-18.
10. Aouinty B, Oufara S, Mellouki F, Mahari S. Évaluation préliminaire de l'activité larvicide de es extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) y *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2007; 10(2): 67-71.
11. Choochote W, Chaithong U, Kamsuket K, et al. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of Three *Piper* spp. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2007; 48(1):33-37.
12. Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J.Vector Ecol.* 2006; 31(1):138-144.
13. Pérez D, Iannacone J. Efecto biocida de sacha yoco (*Paullinia clavifera* var. *bullata* Simpson) (Sapinaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú. *Ecología Aplicada.* 2007; 3(1,2): 64-72.

14. Bazán Calderón J, Ventura Flores R, Kato MJ, Rojas Idrogo C, Delgado Paredes GE. Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). *Anales de Biología*. 2011; 33: 135-147.
15. Vidal J, Carbajal A, Sisniegas M, Bobadilla M. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Rev. peru. biol.* 2009; 15(2): 103- 109.
16. Flores Cisneros K. Actividad biocida del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2014. 67 Pp.
17. Ayala Y, Carrasco C, Enciso E, Portal E, Colos P. Efecto biocida del extracto alcohólico de *Lupinus mutabilis* y *Ruta graveolens* en larvas de *Culex quinquefasciatus*. Instituto de Investigación de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2014. 57 Pp.
18. Huamán Campos N. Biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2015. 67 Pp.
19. Rojas Barrios ER, García González R, Morales Medrano AJ. Actividad de extractos vegetales sobre larvas de insectos de importancia en entomología médica. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala. 2010. 104 Pp.  
<http://www.ropana.cl/toxivet/Toxicidad.htm>
20. Lagunes TA, Villanueva JJA. Toxicología y manejo de insecticidas. Escuela de Postgraduados. Centro de Ecología y Acarología. México. 1994. 257 Pp.  
[http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos\\_secundarios\\_de\\_las\\_plantas](http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas)
21. Camacho VDP. Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de *Sambucus nigra* L. *Franseria artemisioides* W, y *Tagetes zipaquirensis* H en *Ctenocephalides canis*. [Tesis de Grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Biológicas. Riobamba, Ecuador. 2011. 140 pp.
22. Gámez Rojas CM, Ramírez Riveros EJ. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de La Salle. Colombia, 2008. 208 Pp.
23. Castañeda CB, Manrique MR, Ibáñez VL, Gamarra CF, Galan LD, Quispe HP. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (“tarwi”, “chocho”), en animales de experimentación. [En línea]. [Acceso 04 de mayo de 2015]. Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3\\_Vol2\\_N1-2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3_Vol2_N1-2.pdf)
24. Aguilar FJ. Parasitología Médica. 3ª Ed. Litografía Delgado, S.A. Guatemala. 1997. 366 Pp.
25. Badii M, et al. Diversidad y relevancia de los mosquitos. *CULCyT*. 2006; 3(13): 4-16.
26. Salazar M, Moncada LI. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica* 2004; 24:385-92.  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Larva>

27. Barney Duran VE. Biodiversidad y ecogeografía del género *Lupinus* L. (Leguminosae) en Colombia. [Tesis maestría]. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. 2011. Pp. 81.
28. Gross R. El cultivo y la utilización del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Serie: producción y protección vegetal 36. FAO. Roma, Italia. 1982; 236 Pp.
29. Lezama Asencio PA. Las especies de *Lupinus* L. (Fabaceae) y de sus simbioses en el distrito de Corongo-Ancash. [Tesis doctoral]. Lima. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2010.
30. Martínez, J. Ecología de la semilla de *Lupinus bilineatus* Benth. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ingeniería Forestal. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 2007, Pp. 55.
31. Aucasime L. Descripción botánica de *Lupinus mutabilis* "tarwi". Museo Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2015.
32. Palacios VA, Demetrio SM, Espinoza CL, Herrera MM, Huamancaja CC. Obtención de alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis* (tarwi). [Tesis licenciatura]. Universidad Nacional del Centro del Perú. Junín, Perú. 2004.
33. Jacobsen SE, Mujica A. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. 2006: 458-482. [En línea]. [Última visita 22 de mayo de 2016]. Disponible en:  
<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>
34. Serrano E. Reemplazo parcial de harina de pescado por harina de lupino blanco (*Lupinus albus*) en dietas extruidas para Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos sobre los índices productivos y la composición de Ácidos Grasos en el músculo. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ciencias Acuicultura. Universidad Católica de Temuco. Chile. 2004; Pp. 4-15, 27-64.
35. Kartuzova L, Kurlovich B. Production of Seed. En Kurlovich. Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg Pub. House. 2002.11-38.
36. Arias L. Análisis comparativo de dos métodos de aislamiento y determinación de alcaloides de *Lupinus mutabilis*. [Tesis de Licenciatura]. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2000; 57-60 Pp.
37. Gavilanes M. HACCP para la planta de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y especificaciones de calidad del grano. [Tesis de doctorado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2003. Pp. 92-95.
38. Coloma Ramírez JM. Evaluación "in vitro" de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). [Tesis licenciatura]. Riobamba, Ecuador. Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2009.
39. Ortega ED, Rodríguez A, David A, Zamora-Burbano Á. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. [Tesis licenciatura]. Universidad del Valle. Cali-Colombia. 2009.
40. FAO/OMS/UNU. Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una reunión consultiva conjunta de expertos. Serie Informes Técnicos 724, OMS, Ginebra. 1985.

41. Morón C. Importancia de los cultivos andinos en la seguridad alimentaria y nutrición. Cultivos Andinos-FAO. 2005. [En línea]. [Última visita: 28 de junio de 2016]. Disponible en:  
[http://www.condesan.org/publicación/Libro07/Cap3\\_3.htm](http://www.condesan.org/publicación/Libro07/Cap3_3.htm).
42. Brunetón J. Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia. Traducido por: Ángel Villar del Fresno. Zaragoza. Acribia. 1991. Pp. 357-407.
43. Zamora J, Bernal A, Ruíz M, Hernández S, Escalante A, Vibrans H. Perfil de alcaloides de semilla de *Lupinus exaltus* Zucc. (Fabaceae) y la evolución antigua del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. (México). 2005; (23): 124-129.
44. Mori Nuñez CL, Paz Zegarra R, et al. Eliminación de alcaloides en el tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante lavado con agua a diferentes pH. Universidad Católica de Santa María. Arequipa- Perú. 2008.
45. Groos R. El cultivo y la utilización de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). FAO, GTZ, Roma. 1982. pp. 150-156.
46. Rodríguez S, Martínez A, Millán F, Dávila G. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates. Plant foods for human nutrition. (Mexico). 2005; (60): 99-107.
47. Jarrín P. Tratamiento del agua de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. [Tesis doctoral]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 2003. Pp. 20, 21,81.
48. Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marón. [En línea]. [Última visita: 30 de junio de 2016]. Disponible en:  
[http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/articulos/1990/143/pdf/3cent\\_eno.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/articulos/1990/143/pdf/3cent_eno.pdf)
49. Gamarra C, Galán L, Quispe H. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet. [En línea]. [Última visita: 30 de junio de 2016]. Disponible en:  
[http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3\\_Vol2\\_N1-2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3_Vol2_N1-2.pdf)
50. Fuertes R, Roque M, Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación (Perú). 1998; (1): 1-10.
51. Harwood RF, James MT. Entomología Médica y Veterinaria. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 1987; 615 Pp.
52. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. Parasitology vector biology. Second Edition. Academia Press. San Diego, California USA. 2000; 796 pp.
53. Ayala YO. Capacidad predadora y respuesta funcional de *Notonecta* sp. (Insecta: Hemiptera) frente a larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) en presencia y ausencia de refugios. Informe final de investigación. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas- UNSCH. Ayacucho-Perú. 2009. 50 pp.
54. Savage H, Miller B. House mosquitoes of the USA, *Culex pipiens* complex. Win beats.1995; (6):8-9.
55. Almirón WR, Humeres SG, Gardenal SN. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; (90): 469-73.
56. Belkin J. *Culex quinquefasciatus* or *Cx. fatigans* for the tropical (southern) house mosquito (Diptera: Culicidae). 1977; (79)1: January.
57. Stone A. Correlations in the taxonomy and nomenclature of mosquitos (Diptera: Culicidae). Entomology research. Department of agriculture. Washington, D.C. 1956; (58): 6.

58. Forattini OP. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecciones. Rev. Saúde Pública, Sao Paulo. Brasil. 1999; 32(6): 497-502.  
<http://www.investigacionyciencia.es/files/22643.png>
59. Clements AN. The biology of mosquitoes, Vol. 1, Development, Nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 1992. Pp 509.
60. Cisneros Vera F. Control químico de las plagas agrícolas. Solvima Graf SAC. Diseño e impresión, Lima. Depósito Legal Biblioteca Nacional de Perú N° 2012-08837; 2012. 273 Pp.
61. Lizana RDR. Elaboración y evaluación de extractos del fruto de *Melia azedarach* L. como insecticida natural. [Tesis de Grado]. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. 2005. 96 pp.
62. Ortuño TME. Determinación de la actividad biológica del extracto acuoso de saúco *Sambucus nigra* L. como repelente y/o insecticida en *Lasius niger* L. [Tesis de Grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Biológicas. Riobamba, Ecuador. 2011. 250 pp.
63. Alonso FA. Cálculo de las concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce (*Eulimno gammarustoletanus* y *Polycelis felina*). [En línea]. [Fecha de actualización 26 y 28 de febrero de 2013; acceso 16 de agosto de 2013]. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá. Disponible en:  
<http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>.
64. Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA *et al.* Manual de indicaciones y técnicas para Insectarios. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana, Cuba. 2004.
65. Miranda MM, Cuellar CA. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. Universidad La Habana. La Habana. 2000. 324 Pp.
66. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. Lima. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima. 1994. 145 pp.
67. World Health Organization (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva, Switzerland. 1981. WHO/VBC/81.807. 66 Pp.
68. Consoli R, Laureço de Oliveira R. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editorial Fiocruz. Brasil. 1999; 225 Pp
69. Mariños C, Castro J, Nongrados D. Efecto biocida del «barbasco» *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos. Rev. peru. biol. 2004; 11(1): 87- 94.
70. Misra G, Pavlostathis SG. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997; 47: 572-577.
71. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL). Temefos. Ficha técnica. En Plaguicida con prontuario. 2009. [En línea] [acceso 12 de agosto de 2015]. Disponible en:  
[http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Temefos\\_Enlace\\_84.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Temefos_Enlace_84.pdf)
72. Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G, Alvarez L, Sánchez S, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. J Vet Pharmacol Ther. 1997; 20: 91-99.
73. Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. 3ra ed. MacGrawHill Interamericana, México D.F., México, 2006. Pp. 481-482.
74. Entrocasso D, Parra D, Vottero D, Farías M, Uribe LF, Ryan WG. Comparison of the persistent activity of ivermectin, abamectin, doramectin and moxidectin in cattle. Vet Rec. 1996; 138: 91-92.

75. Mudd AJ, Parker LD. Use of the new molecule moxidectin for the control of parasites in sheep. *Proceed Sheep Vet Soc.* 1995; 18: 139-143.
76. Lifschitz A, Virkel G, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. En: Botana LM, Landoni F, Matín-Jiménez T (eds). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España. 2002; Pp. 545-558.
77. Feng R, Isman MB. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Experientia.* 1995; 51: 831-833.

## **ANEXOS**

## Anexo 1.

Certificación taxonómica de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi". Herbarium Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Ciencias Biológicas, Srta. Zunilda Gloria QUISPE BÁRCENA ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist, A. 1988, y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	FABALES
FAMILIA	:	PAPILIONACEAE
GENERO	:	Lupinus
ESPECIE	:	<b><i>Lupinus mutabilis</i> Swett</b>
N.V.	:	"chocho", "tarhui"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 22 de Setiembre del 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
  
Bga. Laura Angelina Medina  
JEFE

## Anexo 2.

Prensado y elaboración del herbario de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi", para su confirmación taxonómica.



### Anexo 3.

Típica posturas de huevos del mosquito *Culex quinquefasciatus* colectados en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) "Totorá" - Ayacucho.



## Anexo 4.

Certificación taxonómica del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Laboratorio de Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Área Académica de Ecología y Recursos Naturales  
Laboratorio de Zoología

**PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN**  
**No. 002-2015-LZ-AAERN-FCB/UNSCH**

ORDEN DE ANÁLISIS : 004/2015  
SOLICITADO POR : Bach. Zunilda Gloria QUISPE BÁRCENA  
DIRECCIÓN : Laboratorio de Zoología  
MUESTRA : Larvas de mosquitos (zancudos)  
CANTIDAD : 50 individuo  
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA : Muestra proporcionada por la solicitante.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 09 de julio de 2015

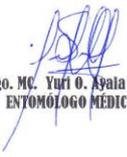
**RESULTADO**

PRUEBA	MÉTODO	RESULTADO
Identificación basada en la nomenclatura taxonómica propuesta por Knight y Stone (1977).	Clave taxonómica dicotómica y pictórica propuesto por CDC, 2002; Darsie Jr. R. 1985; Consoli y Laurenc de Oliveira, 1998	ORDEN : Diptera FAMILIA : Culicidae GENERO : Culex ESPECIE : quinquefasciatus  N.C. : <i>Culex quinquefasciatus</i> Say, 1823 N. Común: "mosquito", "zancudo".

**OBSERVACIONES:**

Especie de mosquito díptero alado de ambiente rural y doméstico distribuida en la ciudad de Ayacucho. Altamente hematófago (prefieren la sangre humana) en el estado adulto, cuya actividad alimenticia es al anochecer, alcanzando la máxima densidad de actividad de picaduras a la medianoche; no se ha reportado para Ayacucho como vector de patógenos, sin embargo, es un problema de salud pública principalmente por las picaduras irritantes y dolorosas que genera. En la etapa larvaria se encuentra colonizando criaderos naturales y artificiales de aguas negras y/o residuales producto de la actividad doméstica.

Ayacucho, 14 de julio de 2015.

  
Bigo. MC. Yuri O. Ayala Sulca  
ENTOMÓLOGO MÉDICO

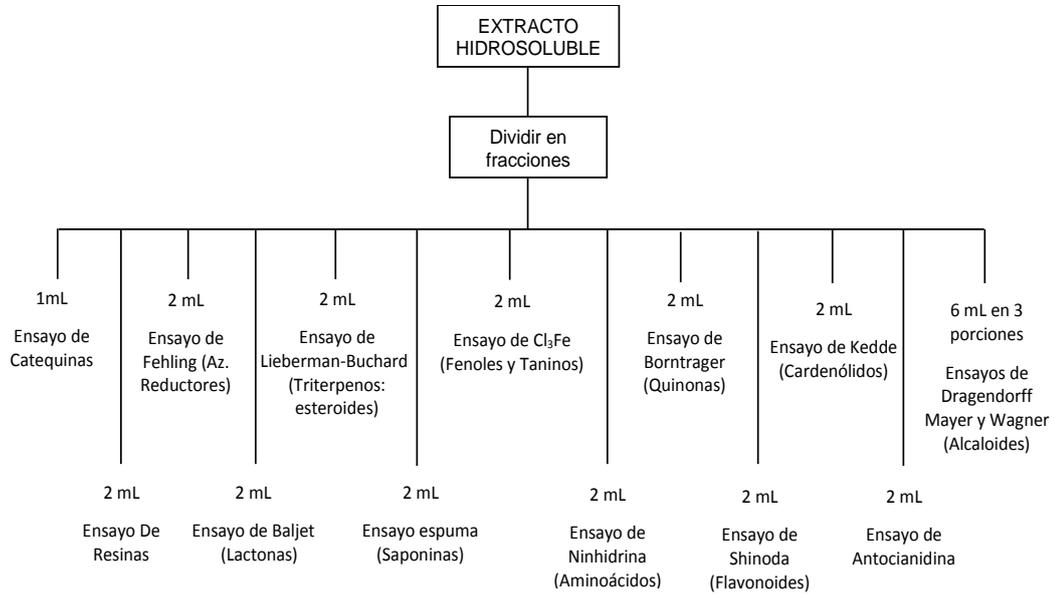
## Anexo 5.

Molido de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", macerado y obtención del extracto hidroalcohólico para la pruebas experimentales de toxicidad.



## Anexo 6.

Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".<sup>69,70</sup>



## Anexo 7.

Perfil fitoquímico de los componentes hidroalcohólicos presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

DETERMINACION CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DEL "TARWI" ( <i>lupinus mutabilis</i> ), EN EL LABORATORIO DE FARMACIA Y BIOQUIMICA.						
N°	METABOLITOS SECUNDARIOS	DETERMINACION DE:	ENSAYO DE:	REACCION, COLOR (+)	REACCION EN LABORATORIO.	RESULTADOS.
1	Flavonoides	Flavonoides	Shinoda	Amarillo, naranja, carmelita o rojo	No hay reacción.	(-)
2	Alcaloides	Alcaloides	Mayer	Precipitado coposo.	Precipitado similar a la leche cortada, coposo	(+++)
3	Alcaloides	Alcaloides	Dragendorff	Precipitado turbio.	Precipitado turbio naranja.	(+++)
4	Fenoles y Taninos	Fenoles y Taninos	Cloruro férico.	Precipitado verde intenso.	Precipitado verde intenso.	Taninos (+)
5	Saponinas	Saponinas	La Espuma.	Precipitado con presencia de espuma, por más de 2 min.	Precipitado con presencia de espuma, por más de 2 min.	(+)
6	Lactonas	Lactonas	Bajjet	Precipitado con coloración o rojo.	Precipitado rojo	(+++)
7	Aminas	Aminas	La Ninhidrina	Precipitado azul violáceo.	Precipitado azul violáceo.	(+)



Edwin C. Enciso Roca.  
Químico-Farmacéutico  
CQFP. 06497

### Anexo 8.

Test de Kolmogorov-Smirnov y Tukey ( $P < 0,05$ ), de los porcentajes de mortalidad larval del III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus* en relación a las concentraciones evaluadas del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra		Larvas muertas a las 24 horas (n°)	Larvas muertas a las 24 horas (%)
N		32	32
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	5,31	53,125
	Desviación estándar	3,167	31,6674
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,121	,121
	Positivo	,110	,110
	Negativo	-,121	-,121
Estadístico de prueba		0,121	0,121
Sig. asintótica (bilateral)		0,200 <sup>c,d</sup>	0,200 <sup>c,d</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

d. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

Tratamientos (HSD Tukey)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Blanco (0 mg/L)	4	0,000			
Extracto (3000 mg/L)	4	32,500	32,500		
Extracto (4500 mg/L)	4		35,000		
Extracto (4000 mg/L)	4		52,500	52,500	
Extracto (7000 mg/L)	4		60,000	60,000	
Extacto (1100 mg/L)	4			70,000	70,000
Extracto (9000 mg/L)	4			75,000	75,000
Abate (1000 mg/L)	4				100,000
Sig.		0,055	0,152	0,353	0,093

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

### Anexo 9.

Análisis de varianza para la tendencia lineal del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas del III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

<b>Factores de varianza</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	26337,500	7	3762,500	19,011	0,000
Dentro de grupos	4750,000	24	197,917		
Total	31087,500	31			

## Anexo 10.

Concentración letal media (CL50) calculadas mediante la técnica Probit para el porcentaje de mortalidad de larvas del III estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus* en relación al efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

Porcentaje	Percentil	Error estándar	IC fiducial de 95,0%	
			Inferior	Superior
1	41093,3	17181,1	23569,7	495910
2	37023,8	15263,6	21446,2	440828
3	34441,8	14047,7	20097,4	405882
4	32499,4	13133,6	19081,7	379594
5	30919,5	12390,5	18254,7	358212
6	29574,7	11758,3	17550,2	340013
7	28395,6	11204,3	16931,8	324057
8	27339,9	10708,5	16377,6	309771
9	26379,7	10257,8	15873,1	296778
10	25495,9	9843,28	15408,1	284819
20	18928,4	6774,62	11929,4	195978
30	14192,7	4590,92	9361,33	131977
40	10146,3	2793,60	7015,15	77442,1
50	6364,13	1417,70	3796,15	27495,8
60	2582,01	1613,49	-26844,0	4970,71
70	-1464,44	3211,14	-80799,0	2044,80
80	-6200,11	5349,61	-144702	-621,232
90	-12767,7	8401,31	-233509	-4134,51
91	-13651,5	8814,74	-245466	-4601,70
92	-14611,6	9264,31	-258456	-5108,39
93	-15667,4	9759,07	-272740	-5664,63
94	-16846,5	10312,1	-288695	-6284,93
95	-18191,3	10943,4	-306892	-6991,37
96	-19771,2	11685,6	-328272	-7820,19
97	-21713,5	12598,8	-354558	-8837,72
98	-24295,5	13813,6	-389502	-10188,5
99	-28365,0	15730,0	-444581	-12314,2

## Anexo 11.

Materiales e insumos para el análisis de los componentes químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".



## Anexo 12.

### Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA	MARCO TEÓRICO
<p><b>Problema principal:</b> ¿Cuál será el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet evaluadas en larvas de III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> en condiciones de laboratorio?</p>	<p><b>Objetivo general:</b> Evaluar el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” sobre larvas de III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> “zancudo” en condiciones de laboratorio.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p>a) Establecer el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” en seis diluciones crecientes, sobre larvas de III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>, a las 24 horas de exposición, en condiciones de laboratorio.</p> <p>b) Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, en el control de larvas de III estadio del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>, expuestas a seis diluciones crecientes, a las 24 horas de exposición.</p> <p>c) Desarrollar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, a fin de determinar los componentes bioquímicos mayores presentes en el producto biocida.</p>	<p>El extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> tiene efecto biocida sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> en condiciones de laboratorio, matando a más del 50% de la población a una determinada concentración (CL<sub>50</sub>), en un espacio y tiempo fijo de exposición.</p>	<p><b>Variable independiente:</b> Concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”</p> <p><b>Indicador:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentraciones: 3000, 4000, 5500, 7000, 9000 y 11000 mg/L.</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b> Efecto tóxico (mortalidad) en larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Número y porcentaje de larvas muertas a las 24 h de exposición</li> <li>• Número de larvas muertas a la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)</li> </ul>	<p><b>Tipo de investigación:</b> Aplicativo</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Básica experimental</p> <p><b>Método:</b> Aplicativo y analítico</p> <p><b>Diseño:</b> El diseño experimental fue adecuado al tipo aleatorio simple, donde el factor manejado fueron las diluciones (3 000, 4 000, 5 500, 7 000, 9 000 y 11 000 mg/L), del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”</p> <p><b>Muestreo:</b> Aleatorio</p> <p><b>Técnicas:</b> Observación Determinación Experimentación</p> <p><b>Instrumentos:</b> Estereoscopio Microscopio Cámara digital Computadora laptop, GPS</p>	<p>Los productos naturales de origen vegetal, con actividad insecticida potencial, son considerados alternativas válidas sobre los plaguicidas sintéticos convencionales en el control de una amplia variedad de insectos-plagas. El uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control de los mosquitos ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia, efectos indeseables sobre organismos no específicos y la vida silvestre e impactos negativos en el medio ambiente. Frente a esta problemática, los aceites extraídos de diversas plantas son una de las alternativas viables que últimamente está siendo estudiada con el objetivo de evaluar su actividad irritante, repelente y toxica frente a diferentes especies de plagas. Las plantas y sus derivados, han mostrado actividad biotóxica en insectos, entre éstos los mosquitos, grupo en el que se encuentran <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae). Utilizar el extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, en el control de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>, que abundan en la ciudad de Ayacucho, produciendo picaduras dolorosas e irritantes, resulta ser una alternativa de bajos costos económicos y compatible con el ambiente.</p>