

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las  
hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas  
del mosquito *Culex quinquefasciatus*.**

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

Presentado por la:

**Bach. SAUME TORRES, Denis Mercedes**

AYACUCHO – PERÚ

2016



Con cariño a mis padres, hermanos, a mi amada hija y familiares por su permanente apoyo en mi formación personal y profesional.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas y ser profesional. A los profesores de la Escuela Profesional de Biología, que durante mi carrera universitaria han aportado en mi formación profesional con valores y principios, garantía de mi sólida formación académica y profesional.

A mi asesor, Blgo. MC. Yuri Ayala Sulca, por su dedicación y compromiso con el trabajo de investigación, brindarme su tiempo, conocimientos y guía para el logro de los objetivos planteados en el presente trabajo de tesis.

A todas las personas, amigos y familiares que me motivaron y apoyaron en mi formación profesional y en el desarrollo de la investigación.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
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	9
2.3. Bases teóricas	11
2.3.1. Los insecticidas: características y clasificación	11
2.3.2. Insecticidas de origen vegetal	12
2.3.3. Efecto tóxico de los bioinsecticidas	12
2.3.4. <i>Lupinus paniculatus</i> : taxonomía, características e importancia	13
2.3.5. Composición química de <i>Lupinus</i>	17
2.3.6. Principales biomoléculas de plantas con actividad insecticida	20
2.3.7. Los mosquitos culícidos: taxonomía y morfología	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Área de estudio	29
3.2. Población y muestra	30
3.3. Metodología y recolección de datos	30
3.4. Diseño de investigación	36
3.5. Análisis de datos	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	67



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Composición de metabolitos secundarios de algunas especies de <i>Lupinus</i> (g kg <sup>-1</sup> ). <sup>48</sup>	18
Tabla 2. Número y porcentaje de mortalidad de larvas de estadio III de <i>Culex quinquefasciatus</i> por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.	38
Tabla 3. Media y desviación estándar del porcentaje (%) de mortalidad generada a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, sobre larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	39
Tabla 4. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” (Anexo 4).	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Características botánicas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”. <sup>44</sup>	14
Figura 2. Características morfológicas de <i>Culex quinquefasciatus</i> . <sup>86</sup>	26
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> . <sup>69</sup>	27
Figura 4. Lugar de muestreo de hojas de la planta <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”. Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.	31
Figura 5. Lugar de colecta de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> . Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.	32
Figura 6. Valores máximos, mínimos y promedios del porcentaje de mortalidad generada por el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas del estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	40
Figura 7. Tendencia lineal del porcentaje de mortalidad generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, a concentraciones crecientes, sobre larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	41
Figura 8. Porcentaje de mortalidad acumulada teórica (Probit) de larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.	42



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificación taxonómica de la planta <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”. Herbarium Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.	68
Anexo 2. Características morfológicas de la planta <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.	69
Anexo 3. Posturas de huevos típicos de <i>Culex quinquefasciatus</i> colectados en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totora”- Ayacucho.	70
Anexo 4. Perfil fitoquímico de los componentes hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.	71
Anexo 5. Secuencia de extracción de las sustancias hidroalcohólicas presentes en las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, marcha fitoquímica y preparación de las diluciones para el bioensayo	72
Anexo 6. Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar). <sup>71,72</sup>	73
Anexo 7. Test de Kruskal Wallis para comparar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	74
Anexo 8. Análisis de varianza para la tendencia lineal del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	75
Anexo 9. Concentración letal media (CL50) calculadas mediante la técnica Probit del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	76

Anexo 10. Preparación y acondicionamiento de las unidades experimentales e incorporación de las larvas de estadio III del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> , para las pruebas de biotoxicidad	77
Anexo 11. Preparación de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” a evaluar, en las pruebas de bitoxicidad	78
Anexo 12. Unidades experimentales y distribución de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.	79
Anexo 13. Matriz de consistencia	80

## 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 el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La metodología consistió en preparar un extracto hidroalcohólico de las hojas de *L. paniculatus* (80 000 ppm), a partir del cual se produjeron las siguientes diluciones: 15 000, 17500, 20 000, 22 500 y 25 000 ppm, concentraciones con las cuales se evaluó la mortalidad a una temperatura media de 24,3° C, humedad relativa (H.R.) de 58,5% y un fotoperiodo de 12:12 (día-noche), en 10 larvas de *Cx. quinquefasciatus* colocadas en vasos descartables conteniendo 90 mL de agua limpia de clorada y 10 mL del producto biotóxico. Cada dosis fue evaluada por quintuplicado con su respectivo control blanco experimental (Abate®) y su control. Las lecturas se llevaron a cabo luego de 24 horas. Se calculó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) mediante el método de análisis Probit y el screening fitoquímico preliminar a fin de determinar la composición química de las sustancias hidroalcohólicas presentes en la planta. Mortalidad larval de 38 a 58% (D.E. ± 29,5 y ± 23,87), fueron reportadas a las concentraciones de 22 500 a 25 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, porcentaje de mortalidad es estadísticamente diferente para cada concentración evaluada según la prueba 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 24 073 ppm, reportándose a los alcaloides, compuestos fenólicos y taninos, las lactonas y/o cumarinas, como los más abundantes (+++), seguido de los flavonoides de presencia regular (++) , finalmente los azúcares reductores, antroquinonas y naftoquinonas, esteroides y/o triterpenoides y los cardenolidos, reportados como elementos trazas (+). Se atribuyó a los alcaloides, compuestos fenólicos, lactonas y esteroides y/o triterpenoides, como los metabolitos secundarios responsables de generar el efecto bitóxico de la planta *Lupinus paniculatus* “qera” en larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus*

**Palabras Claves:** Biotoxicidad de *Lupinus paniculatus* , *Culex quinquefasciatus*.



## I. INTRODUCCIÓN

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 están siendo estudiadas con el objetivo de evaluar su actividad repelente, irritante y tóxica frente a diferentes especies de plagas. Así, tenemos que los aceites esenciales de hojas y corteza de *Cryptomeria japonica* demostraron alta actividad larvicida contra *Aedes aegypti*.<sup>1</sup> Los extractos de *Murraya koenigii*, *Coriandrum sativum*, *Ferula asafétida* y *Trigonella foenum*, resultaron ser efectivas para el control de larvas del mosquito *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.<sup>2</sup> Extractos con metanol y etanol de cinco especies de plantas aromáticas, *Aristolochia saccata*, *Annona squamosa*, *Gymnopetalum cochinchinensis*, *Caesalpiniam* sp. y *Piper* sp., al ser evaluadas en su toxicidad sobre larvas de *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* mostraron actividad larvicida, variando los resultados dependiendo de la especie vegetal utilizada.<sup>3</sup>

No se conoce con exactitud la función de los alcaloides en las plantas del género *Lupinus*, parece que el principal propósito es la defensa del vegetal contra insectos, animales herbívoros y patógenos microbianos. Ocasionalmente los agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, en virtud de los efectos que estos han demostrado en áfidos, abejas, escarabajos (en los insectos), nematodos, caracoles, gusanos y conejos,<sup>4</sup> propiedad tóxica de la planta que proponemos su aprovechamiento a través de la utilización del extracto hidroalcohólico obtenido

de las hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, como una alternativa bioecológica, sana y compatible con el ambiente, en el control de las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, presente en los criaderos naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho. La utilización de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxiotóxicos, antiarritmicos e hipoglicemiantes.<sup>5</sup>

Sobre la base de estos conceptos hemos desarrollado la presente investigación, planteándonos los siguientes objetivos:

#### **Objetivo general**

Evaluar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

#### **Objetivos específicos**

- a) Determinar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, sobre larvas de estadio III del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, a las 24 horas de exposición.
- b) Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas de estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.
- c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Los extractos de origen vegetal están constituidos por un conjunto de principios activos, químicamente distintos entre sí, cuyas proporciones son variables. Esto hace que la presión de selección sobre los organismos a controlar no sea siempre la misma, disminuyendo así, las probabilidades de desarrollar resistencia. La utilización de plantas y sus extractos implica una menor contaminación del ambiente dado que son sustancias biodegradables que persisten, por lo general, poco tiempo en el ambiente.<sup>6</sup>

Una alternativa en los países en desarrollo es usar plantas que presenten compuestos químicos secundarios y activos contra las vectores y plagas, muchos de los cuales no han sido adecuadamente evaluados como fuente de sustancias con propiedades insecticidas, molusquicidas, repelentes, deterrentes de oviposición y alimentación, y reguladores del crecimiento.<sup>7</sup>

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 e insecticidas.<sup>8</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>9</sup> No obstante, la escasa información que se tiene sobre la acción de los fitotóxicos se sugieren que estos estarían actuando como sustancias neurotóxicos.<sup>10, 11</sup>

Trabajos de investigación relacionados con la búsqueda de plantas biotóxicas para el control de insectos plaga o vectores de enfermedad, han sido desarrollados en el ámbito internacional. Así se tiene que, Rozo *et al.*,<sup>12</sup> en

Colombia, al evaluar la actividad tóxica de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. sobre larvas de IV estadio del mosquito *Aedes aegypti* (Linneaus), bajo condiciones de laboratorio, utilizando los extractos acuosos en concentraciones de 500 mg L<sup>-1</sup>, 1 500 mg L<sup>-1</sup> y 2 500 mg L<sup>-1</sup> y acetónicos en concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup>, 40 mg L<sup>-1</sup> y 50 mg L<sup>-1</sup>, efectuaron los bioensayos por triplicado, cada uno con 20 larvas, expuestas durante 24 horas a 150 mL de solución. En todos los ensayos biológicos se emplearon grupos control. En la evaluación de los extractos acetónicos, emplearon un control negativo para evitar que la mortalidad de las larvas ocurriera a causa del solvente. Los extractos acuosos mostraron acción moderadamente baja en la mortalidad de larvas, menor del 20%. Por el contrario, en la acción de los extractos acetónicos se observó en 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>, 15% de mortalidad, mientras que a 30 y 40 mg L<sup>-1</sup> se registraron 22 a 38% de mortalidad, en tanto que a 50 mg L<sup>-1</sup> la mortalidad fue del 95,4% con resultados estadísticos altamente significativos. Demostraron que las concentraciones de los extractos acetónicos fueron las más eficientes para el control de los mosquitos seleccionados. Ambos tipos de extractos mostraron efecto tóxico en larvas de *Aedes aegypti*; sin embargo, se observó mayor efecto en los extractos acetónicos en relación con los extractos acuosos de *Eupatorium microphyllum*, lo cual, según los investigadores, constituye una alternativa viable en la búsqueda de nuevos larvicidas a partir de compuestos naturales.

Maciel *et al.*,<sup>13</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 por Sanabria *et al.*,<sup>14</sup> en Paraguay, permitieron demostrar la actividad tóxica de *Annona muricata* (chirimoya); *Bulnesia sarmentoi* (palo santo); *Melia azederach* (paraíso); *Zanthoxylum chiloperone* var. *Angustifolium* (tembetary hú) y *Bixa orellana* (urukú), a fin de evaluar la actividad y eficacia como larvicida, contra larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Dichas larvas, fueron colectadas de diversas zonas de Asunción y el Gran Asunción, durante la epidemia de fiebre amarilla del año 2007. Las semillas de la *Annona muricata* (chirimoya), presentaron una buena actividad larvicida, ya que a la mínima concentración del 5%, han tenido un efecto mortal para las larvas, comparable al observado en los controles positivos (que contenían temefos 1%). En cambio, *M.*

*aezsederach* (paraíso) y *Z. chiloperone* (tembetary hú) no mostraron actividad larvicida a esa dosis, ni aún a otras superiores. Por otro lado *B. sarmientoi* (palo santo) y *B. orellana* (urukú), presentaron cierto efecto larvicida, eliminando al 18% de larvas a las 72 horas post-exposición. Dichos investigadores observaron una marcada diferencia de actividad, entre el extracto de semillas chirimoya con los demás extractos probados.

Espitia Yanes,<sup>15</sup> al estudiar los compuestos orgánicos aislados de los aceites esenciales de la planta *Tagetes lucida*, demostró que el 5E-ocimenoneno a 40 ppm es efectivo contra larvas de *Aedes aegypti* en 24 horas, y las fracciones de etil acetato con éter de petróleo fueron tóxicas (LD<sub>50</sub>) en contra de larvas de *Anopheles stephensi* (entre concentraciones de 43 y 58 ppm).

Ramos Casilla *et al.*,<sup>16</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.

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>17</sup>

Cárdenas Castro *et al.*,<sup>18</sup> al evaluar 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, estimaron la CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> por la prueba de Probit, que a

la concentración de 300 mg/L el porcentaje de mortalidad de larvas fue del 98% para *Anopheles albimanus*. En *Culex quinquefasciatus* estuvo entre el 86 % y 95%. 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 fue de 209,91 mg/L. El extracto acuoso de *R. graveolens* mostró tener efecto tóxico para larvas de las dos especies de mosquitos, lo cual sugiere que esta planta podría ser una alternativa promisoriosa para el control de los referidos insectos.

Agrela *et al.*,<sup>19</sup> evaluaron en Venezuela el efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Las larvas de *Ae. Aegypti*, correspondieron a cepas certificadas Rockefeller y Mario Briceño Iragorry (MBI). Demostraron que el mayor efecto tóxico se obtuvo con el extracto metanólico obtenido a partir de las semillas que generó 100% de mortalidad a 25 mg/L para la cepa Rockefeller y 50 mg/L para la cepa MBI, en 24 horas post-exposición. Las concentraciones letales (CL<sub>50</sub>) fueron las siguientes: a) extracto metanólico preparado a partir de las semillas CL<sub>50</sub> = 5,7mg/L para Rockefeller y CL<sub>50</sub> =9,9 mg/L para MBI; b) extracto metanólico de las hojas CL<sub>50</sub>= 22,8mg/L para Rockefeller y para MBI CL<sub>50</sub>= 26,2 mg/L. Los resultados sugieren que el efecto tóxico de los extractos metanólicos preparados a partir de la semilla y de la hoja del aguacate sobre *Ae. aegypti*, mostrar potencialidad de estos productos como agentes de control químico.

Trabajos desarrollados por Brophy y Castro,<sup>20</sup> demostraron que a la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de 500 mg del extracto metanólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet al 10% p/v, evaluado en 40 ratas albinas, manifestaron efectos como convulsiones y posteriormente la muerte de los roedores posiblemente debido al alto contenido en alcaloides como: esparteína, lupinina, entre otros.

Por otro lado, Flores y Simeon,<sup>21</sup> en México, al evaluar el efecto biológico de los alcaloides quinolizidínicos de semillas de *Lupinus campestris* sobre *Aedes aegypti*, considerando como una alternativa para el control de estos mosquitos, el uso de los metabolitos secundarios (MS) biodegradables y efectivos. Reportó como antecedente que los alcaloides β eritroidina y erisovina de la Fabaceae *Erythrina americana* presentó actividad larvicida. Así mismo demostró que la

esparteína, alcaloide presente en semillas de *Lupinus*, tener efecto insecticida sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, no habiéndose demostrado evidencia de su efectivizado sobre larvas de *Aedes aegypti*. Por lo que el referido investigador, propuso evaluar el efecto biológico que presenta la esparteína sobre el mosquito *Ae. aegypti*. Para este estudio utilizó la cepa de *Ae. aegypti* de la Secretaria de Salud de Iguala, Guerrero (México). La esparteína fue diluida en metanol a 1ppm, aplicando de esta solución 1 ml en 20 larvas del tercer instar presentes en 25 mL de agua del grifo, las larvas fueron evaluadas durante 10 días por la metodología propuesta por la WHO. Los resultados mostraron que por un lado, la esparteína prolongó el tiempo de la muda del tercer al cuarto instar por cinco días y un día el estado biológico de pupa-adulto y además ocasionó malformaciones en las partes de las agallas, pecten, sifón y abdomen en las larvas del tercer instar, con lo cual impidió que la larva realizara movimientos dentro del agua y prevalecieron las larvas en la profundidad del recipiente ocasionando la muerte. Este trabajo es una primera evidencia de que la esparteína, derivado de los metabolitos secundarios de las semillas de *Lupinus*, pueden ser una alternativa para el control de las larvas de los mosquitos *Aedes aegypti*.

En el Perú, también se han desarrollado trabajos de investigación en plantas con efecto biotóxico para el control de insectos de importancia médica. Pérez y Iannacone<sup>22</sup>, al evaluar extractos obtenidos por decocción de *Paullinia clavigera* var. *bullata* e infusión de *Tradescantia zebrina*, en el control del Estadio III larval de *Anopheles benarrochi*, principal vector de la malaria en Ucayali, reportaron mortalidades superiores al 50% en la población larval a las concentraciones letal medias (CL<sub>50</sub>) de 0,81% a 0,86%, en 24 h de exposición.

Mariños *et al.*,<sup>23</sup> al realizar 7 bioensayos en laboratorio para evaluar la capacidad biocida de *Lonchocarpus utilis* "barbasco" sobre 7000 larvas de tercer y cuarto estadio de *Anopheles benarrochi*, vector primario de malaria en Yurimaguas y Loreto (Perú); evaluaron la actividad biocida en 5 dosis del polvo de la raíz diluida en agua destilada (6,25; 3,1; 2,1; 1,0 y 0,15 g/L). Utilizaron 1 mL del homogenizado como inóculo por dosis. Posteriormente determinaron la eficacia y susceptibilidad de las larvas llevando a cabo lecturas cada hora hasta las 24 horas después del tratamiento, encontrando a las dosis de 6,25 y 3,1 g/L una mortalidad de 98 y 89% cuando utilizaron agua destilada y 86 a 82% cuando el producto se mezcló con agua de criadero. A las 24 horas la mortalidad alcanzó el 99 y 94 % usando agua destilada y con agua de criadero de 93 a 90 %.

Flores Cisneros,<sup>24</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>25</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 5000 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>27</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<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 (+). El efecto biotóxico de la planta probablemente esté relacionada con la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos, algunos tipos de fenoles y taninos, y a la complejidad de los productos trazas.

En esta perspectiva, utilizar el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, planta que se desarrolla en forma silvestre en la zona alto andina de la región de Ayacucho, de hojas con sabor amargo y desagradable que la hacen inapetente para los animales por la presencia de alto contenido de alcaloides. Por referencias de algunos pobladores andinos se sabe que podrían tener efecto biotóxico sobre los insectos, para el caso particular, sobre *Culex quinquefasciatus*, mosquitos que abundan en la ciudad de Ayacucho, produciendo picaduras dolorosas, con escozor y prurito, que genera incomodidad en el poblador principalmente de las zonas periféricas a la ciudad,<sup>27</sup> propuesta que en caso de mostrar resultados positivos, podría ser una alternativa viable de bajos costos económicos y compatible con el ambiente.

## 2.2. MARCO CONCEPTUAL

- a) **Metabolitos secundarios de plantas:** son moléculas de bajo peso molecular sintetizado por las plantas, que por definición no son requeridos en procesos fisiológicos normales. Estos pueden ser producidos y almacenados en glándulas, ductos, resiníferos, adióblastos y células especializadas. Existe una amplia variación en la composición química de los metabolitos secundarios, entre especie de plantas; y esta variación es el resultado de una presión de selección ocasionada por factores físicos y químicos de origen biótico y abiótico.<sup>28</sup>
- b) **Sustancias biotóxicas:** son sustancias químicas sintéticas o de origen natural o de microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer control sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Son agentes que matan a organismos. Sustancias activas y preparados que contienen un sin número de metabolitos secundarios, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer control sobre cualquier organismo nocivo.<sup>29</sup>
- c) **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>30</sup>
- d) **Larvas:** son las fases juveniles de las especies con desarrollo indirecto y que son radicalmente diferente del adulto en aspectos como tamaño, forma

externa, e incluso anatomía interna y fisiología. Las diferencias guardan relación con las diferencias ecológicas, tanto en cuanto a hábitat como en cuanto a los recursos que utilizan para su alimentación.<sup>31</sup>

**e) *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 patógenos como la filaria *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>32</sup>

#### **f) Plantas del genero *Lupinus***

Son plantas de tallo erecto, que habitualmente miden entre 5 dm y 2 m de altura. Sus hojas están formadas por un número impar de folíolos y su aspecto es semejante al de una mano. En las especies silvestres y las cultivadas con propósitos ornamentales, las flores se reúnen en largas y vistosas inflorescencias, sin embargo, las especies cultivadas para la alimentación suelen tener inflorescencias más pequeñas y poco notorias. Los colores de los pétalos varían desde el blanco al azul intenso, con predominio de tonos azulados y rosados. Su fruto es una legumbre que contiene semillas con forma de esfera achatada. Los alcaloides presentes en la planta (esparteína, lupinina, lupanidina, etc) se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales.<sup>33</sup>

**g) 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 período de exposición determinado. El valor de la CL<sub>50</sub> se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen (µm/L, mg/L, ppm, etc.).<sup>34</sup>

**h) 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  $CL_{50}$  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>35</sup>

## **2.3. BASES TEÓRICAS**

### **2.3.1. Los insecticidas: características y clasificación**

Los insecticidas constituyen un grupo de sustancias químicas muy diversas, de características toxicológicas propias, las que generalmente están asociadas a la naturaleza química del producto, su origen, modo de acción y nivel tóxico.<sup>36</sup> Etimológicamente el término insecticida, deriva del latín y significa literalmente matar insectos.<sup>37</sup> Los insecticidas son sustancias con propiedades biocidas para los insectos. Su efecto sobre la fisiología de estos organismos es complejo y tiene una serie de reacciones físico-químicas que afectan a una especie de insecto en particular.<sup>40</sup> Según la FAO-1986,<sup>38</sup> un insecticida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización, producción de alimentos, productos agrícolas, también aquellos que se administre a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.<sup>39</sup>

Ya en la época helenística se describe el uso de diferentes productos para ahuyentar las moscas y las momias eran tratadas con diferentes esencias para protegerlas de la acción de sus cuerpos. Tomaban cenizas y las combinaban con grasa de cerdo para repeler a estos insectos. El desarrollo de la botánica y los descubrimientos de nuevas plantas para su utilización industrial y productiva en los siglos XVII y XVIII, llevó al descubrimiento de propiedades insecticidas en esencias vegetales como el tabaco y el piretro. No fue hasta el siglo XX con el desarrollo exponencial de la industria de síntesis química cuando se comienzan a producir y diseñar productos insecticidas de síntesis o sintéticos. A partir del tercer tercio del siglo XX y comienzos del siglo XXI y debido a los problemas de toxicidad inespecíficos de los insecticidas sintéticos se comienzan a desarrollar productos menos tóxicos y más específicos.<sup>34</sup>

Los insecticidas pueden dividirse de acuerdo a sus componentes químicos y propiedades, en insecticidas: *inorgánicos* (origen mineral), *orgánicos* (origen natural como artificial), *microbiales* (constituidos por bacterias, virus u hongos; son altamente específicos. Ejm: *Bacillus thuringiensis Berliner*), *vegetales* (derivados y extraídos directamente de plantas).<sup>40</sup>

### **2.3.2. 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>36</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>36</sup>

Las plantas consideradas con propiedades insecticidas, desarrollaron sustancias llamadas aleloquímicos como un mecanismo de defensa contra los insectos,<sup>40</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>37</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>37</sup>

### **2.3.3. 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>34</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>34</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 inyectable 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>34</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>34</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>41</sup>

#### **2.3.4. *Lupinus paniculatus*: taxonomía, características e importancia**

##### **a) Taxonomía**

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. 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>42</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>43</sup> Según Aucasime,<sup>44</sup> para Ayacucho, se han reportado especies del género *Lupinus*, que corresponden a las especies de *Lupinus mutabilis*, *L. paniculatus*, *L. mollendoensis*, *L. microphyllus*, *L. montanus* entre otros. La taxonómica de la planta, motivo de la investigación, planteada en 1988 por Cronquis y descrita por Aucasime,<sup>44</sup> la caracterizó de la siguiente manera (Anexo 1):

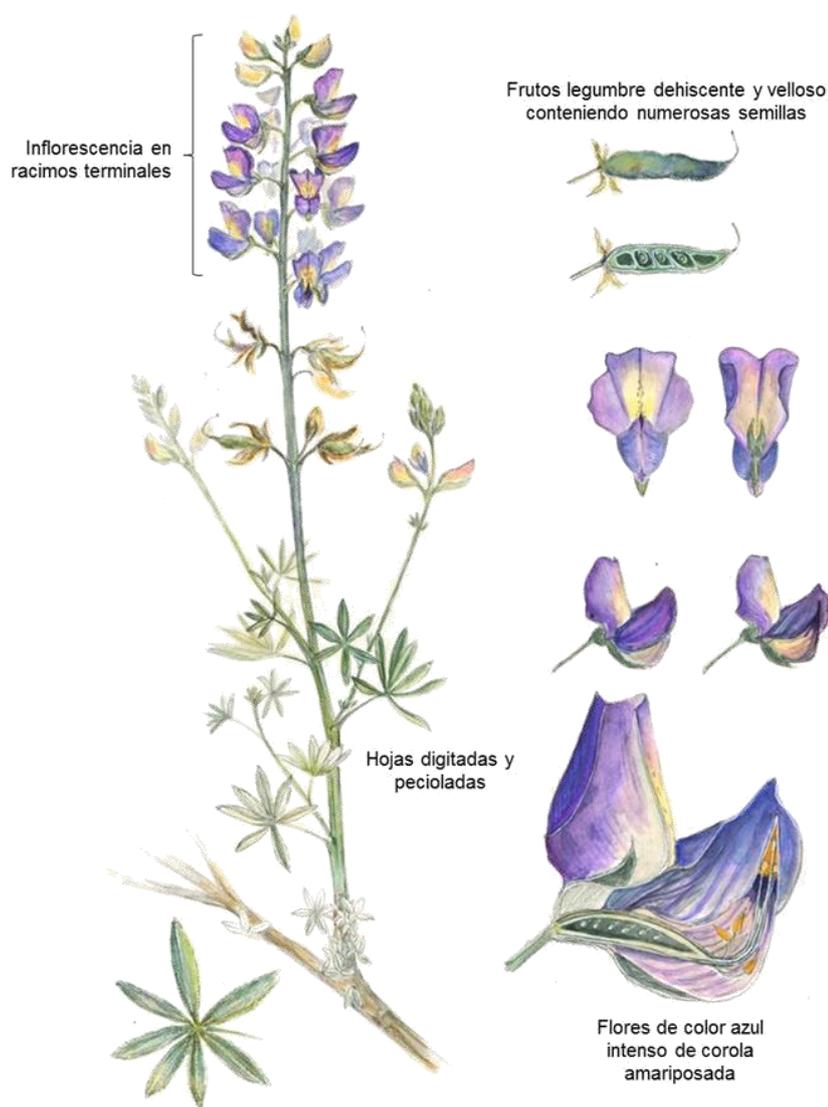


Figura 1. Características botánicas de *Lupinus paniculatus* "qera".<sup>44</sup>

División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Subclase : Rosidae  
Orden : Fabales  
Familia : Papilionaceae  
Género : Lupinus  
Especie : *Lupinus paniculatus*  
N.V. : “qera”

#### **b) Características botánicas**

*Lupinus paniculatus* “qera”, es una planta sub-arbustiva de más o menos un metro de alto de tallos ramificados; hojas digitadas largamente pecioladas, formado por 8 a 10 folíolos angostos de 12 mm de largo aproximadamente y acuminado en el ápice, densamente vellosos. Inflorescencia en racimos terminales; flores vistosas de un color azul intenso, sépalos unidos en la base ligeramente pubescentes, corola amariposada, bisexual y pentámera con el estandarte ovalado de color azul intenso provisto de franjas amarillo – naranja en el centro, alas y quilla de igual tamaño que el estandarte; con 10 estambres unidos formando el tubo estaminal que rodea al ovario; ovario alargado de 8 mm de largo con el estilo delgado y curvado provisto de pelos largos. Fruto legumbre dehiscente y vellosa conteniendo numerosas semillas (Figura 1). La planta en Ayacucho, crece desde los 2 600 msnm en terrenos secos, bordes de carreteras, terrenos pobres y abandonados.<sup>44</sup>

#### **c) Importancia**

Dentro de la familia Papilionaceae, uno de los géneros de importancia es *Lupinus* L., con alrededor de 200 especies en el continente americano y por lo tanto con mayor diversidad genética que las especies europeas, que cuenta aproximadamente con 100 especies; de las cuales, hasta ahora han sido domesticadas solamente cuatro especies; tres de ellas *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* que tienen su centro de origen en la región del mediterráneo y *L. mutabilis* Sweet en Sud América.<sup>42</sup>

*Lupinus paniculatus*, es una planta con alto contenido de alcaloides como la lupanina, por lo que el poblador rural andino de Ayacucho la utiliza como planta medicinal, las hojas en infusión son tomadas para curar las úlceras y afecciones hepáticas, el agua procedente de las semillas remojadas son utilizadas como bioinsecticidas. Así mismo, las semillas contienen un alto porcentaje de

proteínas que para ser consumidas se deben de remojar en agua corriente por lo menos 2 a 3 días para quitar los alcaloides que le confieren sabor amargo a las semillas.<sup>44</sup>

Según Jacobsen y Mujica,<sup>45</sup> 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 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. eriucladus*. Los usos de cada uno de los parientes silvestres son clasificados en: alimenticios, medicinales, rituales, culturales, en transformación, forraje y combustible.

*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 *c 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>46</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>43</sup>

Lupinus como género presentan una serie de sustancias tóxicas, sobre todo en su forma silvestre, como el caso de alcaloides que le confieren un sabor amargo.<sup>47</sup> La ingestión de estas plantas provoca un efecto morboso al que se le denomina lupinosis, el cual consiste en una forma de paraplejia 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>43</sup> La sintomatología de la lupinosis es pérdida de apetito, paraplejia o cuadriplejia espástica con temblor, trastornos respiratorios, hematuria, obnubilación y muerte por asfixia. No se ha aclarado si los principales tóxicos varían estacionalmente.<sup>43</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>43</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>43</sup>

### **2.3.5. Composición química de Lupinus**

Dada la versatilidad en la literatura y las controversias existentes para las especies del género Lupinus, más aún si se tiene en cuenta que existe poca información sobre la composición química de las especies, se ha tratado de resumir sobre la base de la información disponible, el análisis composicional proximal de algunas especies de Lupinus, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de metabolitos secundarios de algunas especies de *Lupinus* (g kg<sup>-1</sup>).<sup>48</sup>

Componentes	Especies del género <i>Lupinus</i>		
	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. mutabilis</i>
Total de alcaloides (mg kg-1)	<100	200	500
Oligosacáridos (%)	6,7	5,2	11,87
Saponinas (mg kg-1)	Nd	573	4,33 (%)
Taninos condensados (%)	0,01	<0,01	0,02
Inhibidores de tripsina (mg g-1)	0,13	0,14	0,29
Fitatos (%)	0,79	0,58	0,96

Nd = no determinado

Las semillas de *Lupinus* 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 *Lupinus*, 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 *Lupinus* 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%). En las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet se han detectado también hormonas vegetales.<sup>49</sup>

#### a) Alcaloides de los *Lupinus*

En el género *Lupinus* 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 semillas. Las semillas de *Lupinus* de la variedad dulce tienen bajos contenidos de alcaloides, son una buena fuente de nutrientes, debido al contenido de proteínas, lípidos, fibra dietética, minerales y vitaminas.<sup>49</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. Los alcaloides son extremadamente difíciles de definir porque no representan un grupo de compuestos homogéneos, sea desde el punto de vista químico, bioquímico y fisiológico. Sin embargo los alcaloides son sustancias nitrogenadas básicas y de acción farmacológica potente. Solubles en solventes lipófilos y sus sales en disolventes hidrófilos.<sup>49</sup>

Los alcaloides quinolizidínicos son un grupo importante de compuestos naturales que se concentran principalmente en tallos y semillas de plantas del género *Lupinus*.<sup>50</sup> Estos metabolitos secundarios son un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia.<sup>50</sup> Muchos agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, en virtud de los efectos que estos han encontrado en conejos, áfidos, abejas, escarabajos (en insectos), nematodos, caracoles y gusanos.<sup>4</sup> La utilización de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxiotóxicos, antiarrítmicos e hipoglicemiantes.<sup>5</sup>

Se han reportado la existencia de diferentes tipos de alcaloides quinolizidínicos presentes en granos de *Lupinus*, entre los que destacan: esparteína, lupinina y lupanina; los cuales se emplean para controlar insectos, ectoparásitos y parásitos intestinales de animales.<sup>51</sup> Los alcaloides quinolizidínicos poseen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivíricas, demostrado en condiciones de laboratorio. Así por ejemplo, la esparteína, lupinina y la lupanidina, son alcaloides quinolizidínicos que actualmente están siendo utilizados para controlar garrapatas y parásitos gastrointestinales, tales como lombrices en los animales domésticos. *Lupinus* utiliza alcaloides quinolizidínicos como defensa contra depredadores, 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>43</sup>

#### **b) Compuestos fenólicos y taninos**

En el campo de la agricultura la lupanina (un tipo de compuesto fenólico presente en plantas de *Lupinus* sp.) puede ser usada como herbicida, así como un buen repelente de insectos. Entre los flavonoides, es reconocido los rotenoides que tienen uso como insecticidas. La rotenona es una sustancia de origen vegetal utilizada antiguamente como insecticida. Desde 2007 no es utilizada como tal y está catalogada como toxina ambiental. Este insecticida vegetal polivalente se extrae de raíces de plantas tropicales leguminosas, las

cuales son tóxicas para los animales de sangre fría y ligeramente tóxica para los animales de sangre caliente y el hombre. Actúa por contacto e ingestión. La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH-ubiquinona reductasa), bloquea pues la respiración celular, efecto que se manifiesta con parálisis y posterior muerte del individuo afectado. Una aplicación de la rotenona en la investigación es el estudio del efecto que tienen los radicales libres acumulados en el interior de la célula, debido precisamente al bloqueo de la cadena respiratoria. Esto provoca un estrés oxidativo a partir del cual se puede realizar distintos experimentos.<sup>52</sup>

Los compuestos fenólicos y taninos, denominados a veces impropriamente polifenoles, son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Tienen distribución muy amplia en las plantas, pueden encontrarse en todo el vegetal, incluidas la raíz, el tallo o las hojas de las plantas. Ha sido reportado en más del 60% de las especies de plantas donde se ha investigado su presencia. Cumplen función estructural a nivel de pared celular de las plantas, actúan como moléculas de defensa al ataque de patógenos y plagas, finalmente son los responsables de darle el pigmento característico y aroma a las flores. Los compuestos fenólicos derivan principalmente del metabolismo de la fenilpropanoide y fenilpropanoide-acetato. Los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Los compuestos fenólicos son producidos por la planta para protegerse de los herbívoros (insectos o vertebrados) o de las radiaciones UV u otras situaciones de estrés físico. Otro papel a parte de este es el ser atrayentes de animales polinizadores y/o diseminadores de semillas, el actuar como señales químicas entre plantas y microorganismos simbióticos y el ejercer una función estructural, por el efecto de las ligninas en el soporte mecánico de las plantas.<sup>53</sup>

### **2.3.6. Principales biomoléculas de plantas con actividad insecticida**

Las plantas, en conjunto, producen más de 100 000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente, no esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. Semejante diversidad química es consecuencia del proceso

evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano, o la depredación de insectos y animales.<sup>54</sup> Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas.<sup>55</sup> Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de plaguicidas más seguros para el medioambiente y la salud humana.<sup>56</sup> Sin lugar a dudas los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales constituyen una muy interesante alternativa de control de insectos además de que sólo se han evaluado muy pocas plantas en relación a la fuente natural que ofrece el planeta, por lo que las perspectivas futuras en cuanto a investigación, son aún mayores.<sup>57</sup>

#### **a) Aldehídos**

Son compuestos de cadena lineal saturada o insaturados cuyo grupo funcional carbonilo es el responsable de la actividad insecticida. Algunos de los aldehídos que se encuentran comúnmente en las plantas han sido evaluados por su actividad insecticida y fitotóxica contra insectos que atacan frutas, vegetales y granos. Compuestos como el propanol, 2-pentenal y 2-methyl-2-butenal de manera individual, han mostrado un potencial excelente como agentes de control insecticida post-cosecha eliminando 100% de los áfidos que atacan a los granos, ocasionando un daño mínimo o indetectable en las características funcionales de los productos probados.<sup>58</sup>

#### **b) Terpenoides**

Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de vegetales. Están formados por una estructura base de isopreno y, cuando tienen elementos adicionales, comúnmente oxígeno, son llamados terpenoides. La actividad insecticida y acaricida de monoterpenos polihalogenados obtenidos de la alga roja *Plocamium cartilagineum* ha sido demostrada contra insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de Azúcar o cebolla.<sup>59</sup>

#### **c) Ésteres monoterpenoides, ésteres de cianohidrina y cianohidrinas**

Las cianohidrinas de manera natural sirven como mecanismo químico de defensa en las plantas para protegerlas contra insectos y herbívoros. Estas moléculas pueden estar presentes en linaza, yuca, bambú, semillas de haya y almendras. La actividad insecticida de cianhídricas, ésteres de cianohidrina y ésteres de monoterpenoides, fue probada mediante aplicación por asperción sobre moscas adultas (*Musca domestica* L.) y como inhibidores de alimentación

de larvas del mosquito *Aedes aegypti* L., vector de la fiebre amarilla. Se determinó que en *M. domestica* las cianohidrininas y tres de sus ésteres monoterpenoides, fueron efectivos en los diferentes experimentos realizados, obteniendo en todos los casos 100% de efectividad a concentraciones de 100 mg/kg. Para larvas del mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), los compuestos más tóxicos fueron el cloropropionato y pivalato de cianohidrina con los cuales se obtuvieron valores de 100 y 95% de efectividad, respectivamente.<sup>60</sup>

#### **d) Aceites esenciales**

Araujo *et al.*,<sup>61</sup> reportaron que el aceite esencial extraído de las hojas e inflorescencias de *Hyptis martiusii* Benth, arbusto pequeño que crece en abundancia en el noreste de Brasil, ampliamente conocido por su uso medicinal, presento actividad insecticida y determinaron que los componentes mayoritarios en el aceite esencial asociado a la actividad bifuncional fueron los monoterpenos; 3-careno y 1,8-cineolo. Esta actividad se determinó realizando dos pruebas: una en la que comprobaron diferentes concentraciones del extracto obtenido contra la mosca blanca *Bemisia argentifolii*, plaga común de frutos comestibles de valor comercial como el melón y la sandía, obteniendo 93% de efectividad a concentraciones de 2000 mg/L. La otra prueba fue realizada contra larva del mosquito *Aedes aegypti*, vector de transmisión del dengue y la fiebre amarilla, cuando usaron concentraciones de 250 y 500 mg/L la efectividad fue de 99 y 100%.

#### **e) Furanos**

La actividad insecticida de 2-pentadecilfurano y 2-heptadecilfurano, dos compuestos furánicos comúnmente presentes en el “aguacate” (*Persea americana* Mill), fue probada *in vitro* contra la larva en la primera etapa de desarrollo de *Spodoptera exigua*, plaga común en árboles frutales de “aguacate”, mostrando un 100% de efectividad al suministrar *in vitro* en su dieta, concentraciones mínimas de 2  $\mu\text{mol/g}$ , mientras que para larvas del último estadio se observó el 100% cuando se usaron 3  $\mu\text{mol/g}$ .<sup>62</sup> En este mismo estudio, se demostró que la presencia de instauraciones en el anillo furano, aumentó significativamente el efecto en la mortalidad y crecimiento de las larvas de *Spodoptera exigua* en los diferentes estadios.

#### **f) Alcaloides**

Este grupo de biomoléculas se caracterizan por contener nitrógeno en su estructura, el cual dentro del metabolismo normal de las plantas no se

transforman totalmente en proteína vegetal, sino que continúa su circulación en la savia o se fija en algunas partes de la planta, por lo que pueden combinarse con moléculas de azufre formando heterósidos cianogénicos.<sup>63</sup> Los alcaloides derivados del tropano contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario que le confiere alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides aporfinos y acetogeninas anonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla.<sup>64</sup>

### **2.3.7. Los mosquitos culícidos: taxonomía y morfología**

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>65,66</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 3500 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>66</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>65,66</sup> La familia Culicidae (grupo al que pertenecen los mosquitos), se divide en tres subfamilias: Anophelinae, Culicinae y Toxorhynchitinae. 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. *Culex quinquefasciatus*, es un insecto que acompaña al proceso de urbanización, pueden ser encontrados en agua de drenajes y letrinas de pozos abiertos. Las lagunas de oxidación de aguas negras son particularmente atractivas para la oviposición cuando el

recuento de bacterias coliformes aumenta lo suficiente.<sup>65</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>65</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>27</sup>

El estudio de la biología y ecología de los culícidos permite perfeccionar las medidas de control, lo que adquiere gran importancia respecto a especies que se comportan como vectores de distintas familias de virus que afectan al hombre y los animales. Sin embargo numerosos aspectos relacionados no solo con la biología y ecología sino también con la taxonomía, hábitos de estos insectos y sobre todo las formas de control permanecen desconocidos o escasamente abordados. Numerosas especies son de hábitos endófilos o con tendencia a la domesticidad, ambos comportamientos importantes en la transmisión de patógenos.<sup>67</sup>

#### **a) Taxonomía**

La taxonómica planteada en 1758 por Linnaeus y descrita por Ayala,<sup>85</sup> la caracterizó de la siguiente manera

Reino : Animalia  
Filo : Arthropoda  
Clase : Insecta  
Orden : Diptera  
Suborden : Nematocera  
Infraorden : Culicomorpha  
Familia : Culicidae  
Género : Culex  
Especie : *Culex quinquefasciatus*

#### **b) 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 (Fig. 2). 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 (Fig. 2).

- **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 exocórior. El periodo de desarrollo embrionario y consecuentemente la incubación de los huevos para *Culex* es de aproximadamente 1 a 1,5 días.<sup>66</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>67</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 larvianas en que toma alimento, antes de surgir la pupa y el insecto hematófago. Son tubulares y ágiles, con cabeza redondeada, tórax abultado y abdomen alargado están provistas de un sifón largo en el octavo segmento abdominal, generalmente con un pecten bien desarrollado y uno o varios penachos de sedas. <sup>67,66</sup>

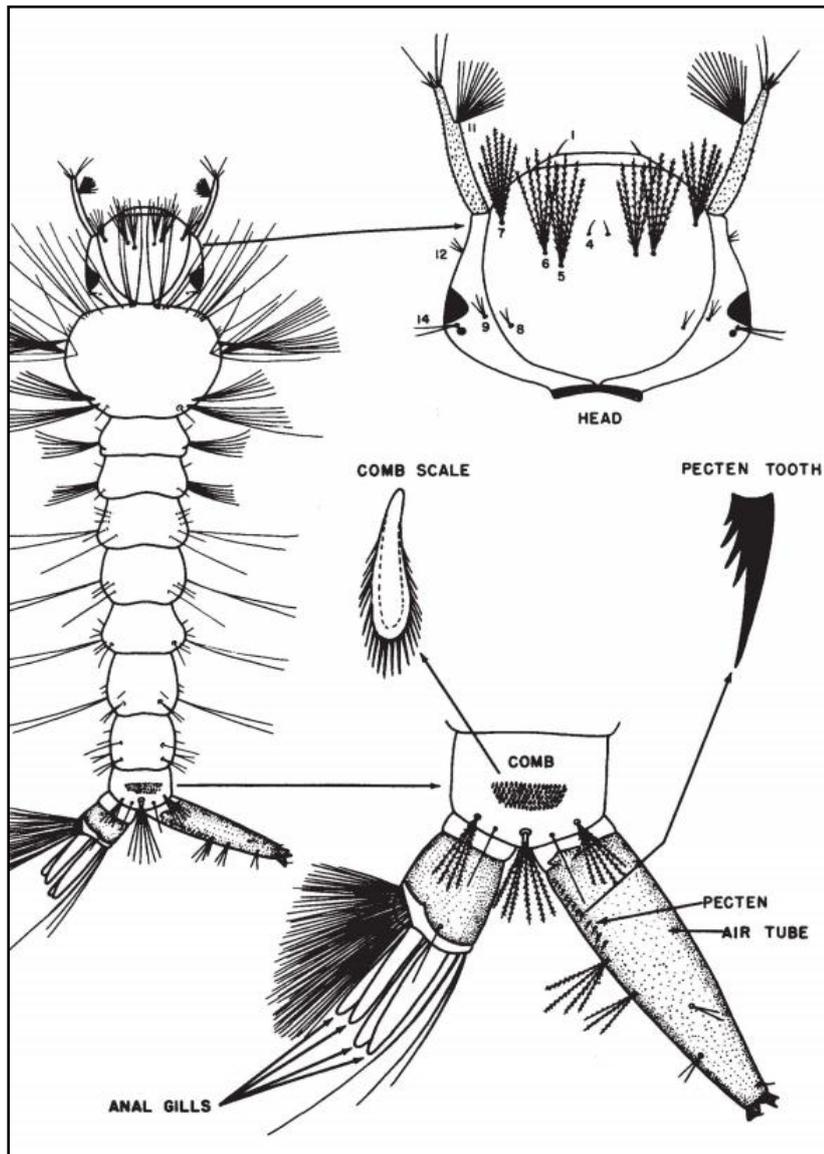


Figura 2. Características morfológicas de *Culex quinquefasciatus* <sup>86</sup>

- **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. Las pupas son grandes, presentan pequeñas trompetas respiratorias y son muy activas al nadar. La duración en general es de 2 días bajo condiciones normales. <sup>67,68</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>68</sup> Al cabo de dos días en promedio, el caparazón de la pupa se rompe (denominado exuvia) y sale el mosquito adulto.<sup>66</sup>

- **Adulto.-** Los adultos de culícidos 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. 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.

68,67

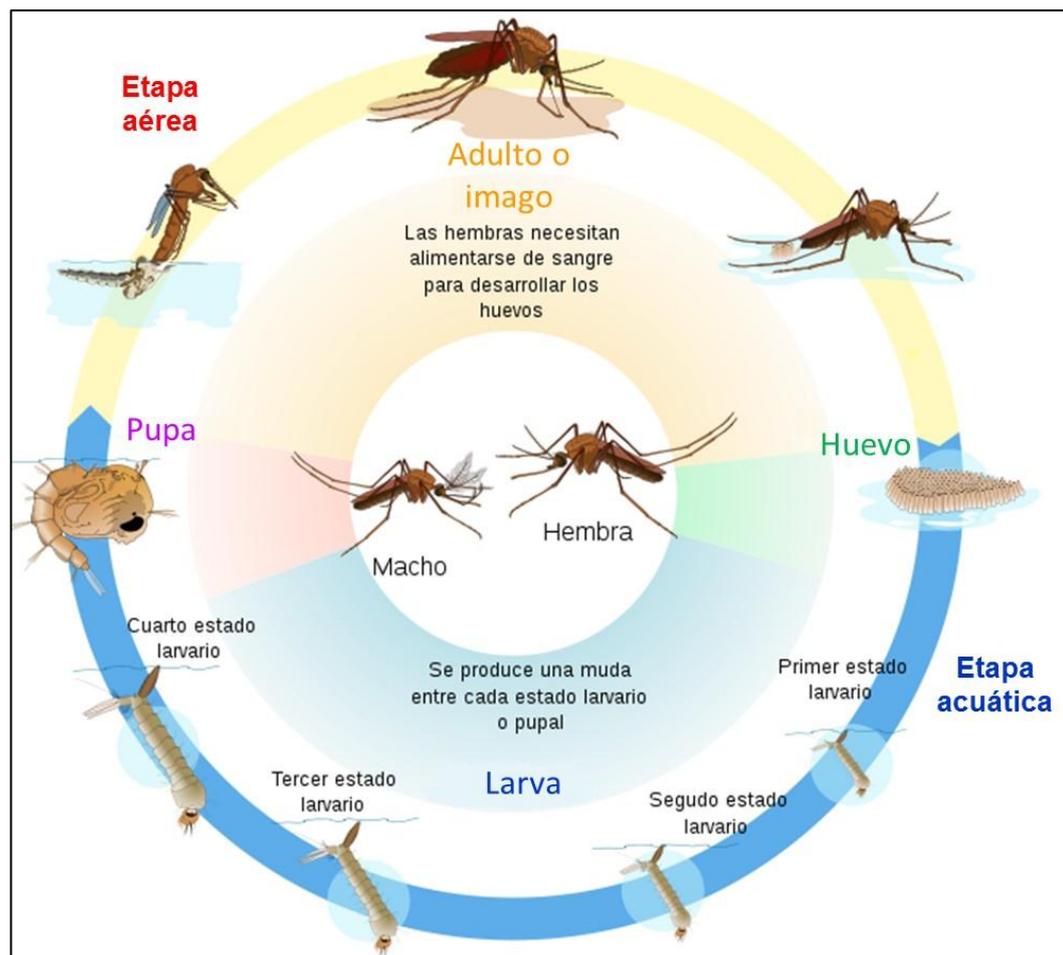


Figura 3. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*<sup>69</sup>



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

##### 3.1.1. Ubicación política

Región : Ayacucho

Provincia : Huamanga

Distrito : Ayacucho

Los lugares de recolección de muestras y centro de análisis, fueron:

- Laboratorio de Zoología, ubicado en la Unidad de Laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria - UNSCH.
- Lugar de recolección del material biológico: a) hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”. 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) “Totorá”-Ayacucho.

##### 3.1.2. Ubicación geográfica

- 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)
- Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho (Coordenadas UTM: UTM: 582936.56 m E; 8515222.08 m S; 3688 msnm) (Figura 3).
- Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Totorá”-Ayacucho. (Coordenadas UTM: 585697.33 m E; 8546992.71 m S; 2626 msnm) (Figura 4).

## **3.2. Población y muestra**

### **3.2.1. Población**

Hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, recolectados en la comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a 3690 msnm (Figura 3).

### **3.2.2. Muestra**

Cinco kilogramos de hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, identificadas en el Herbario Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

### **3.2.3. Unidad experimental**

10 larvas de estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus* colocadas en vasos plásticos descartables conteniendo 90 mL de agua potable declorada y 10 mL de la concentración del extracto hidroalcohólico (Figura 4).

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

### **3.3.1. Recolección y preservación del material biológico**

#### **a) Hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”.**

La recolección de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, fue realizada en horas muy tempranas de la mañana con la finalidad de conseguir las frescas y en las mejores condiciones fisiológicas y anatómicas. Las hojas recolectadas, fueron colocadas cuidadosamente en bolsas de papel y etiquetadas con las características geográficas de la zona de recolección y posteriormente transportadas hasta 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. Previamente las hojas fueron lavadas con una solución de agua e hipoclorito de sodio (mezcla de 1000:1) y, posteriormente colocadas sobre papel absorbente limpio, las mismas que fueron cambiándose inicialmente a la hora y luego cada 24 horas, removiendo las partes vegetales para evitar su descomposición y por un periodo de 15 días. El molido de las hojas desecadas se realizó utilizando un mortero con su respectivo pilón, para luego ser tamizado a través de un tambor cernidor N° 200 homogenizando el diámetro de las partículas y permitir, de este modo, un mejor macerado hidroalcohólico de las hojas de la planta.

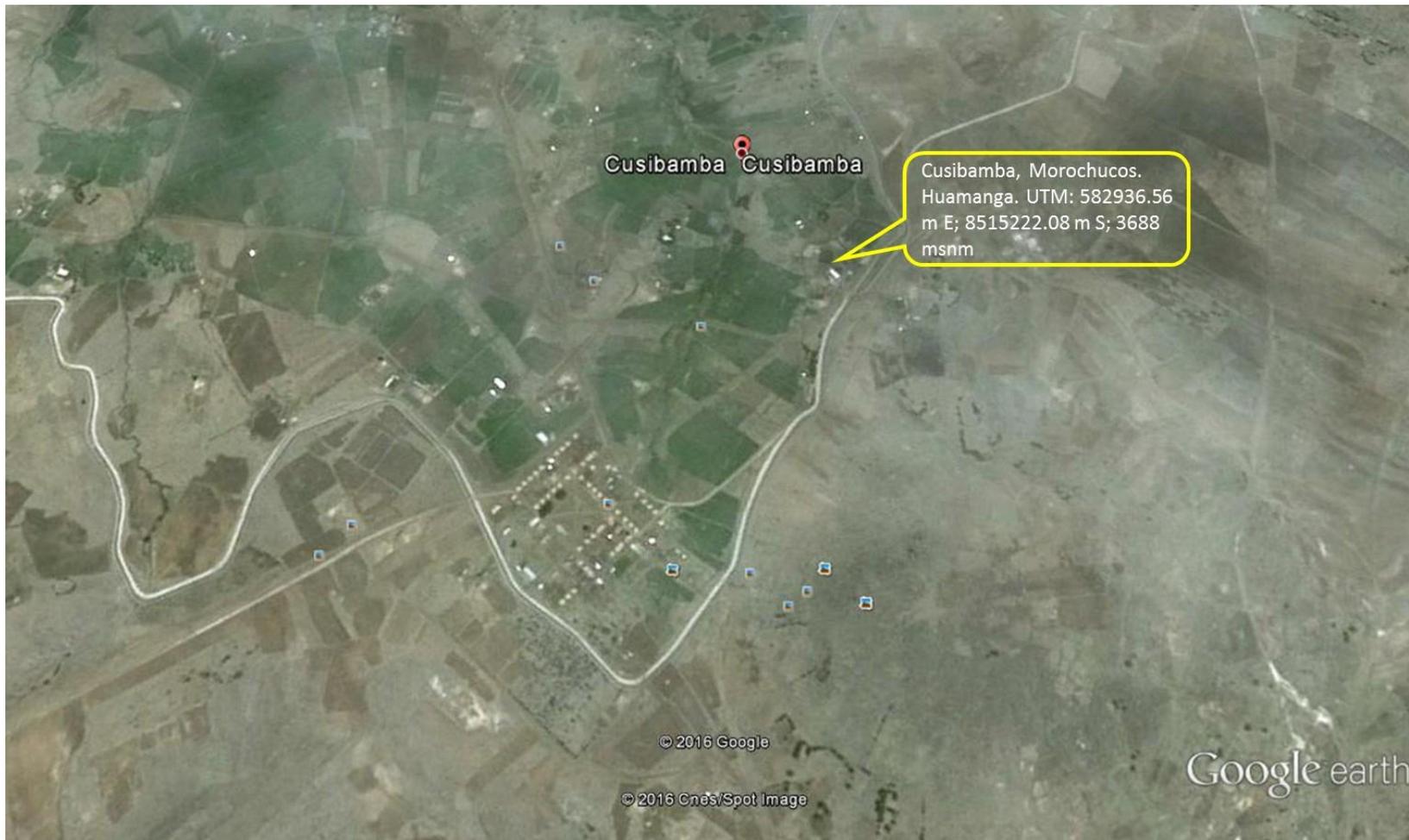


Figura 4. Lugar de muestreo para obtener la población de hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”. Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.



Figura 5. Lugar de colecta de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.

### **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) “Totorá” utilizando para ello un 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 estadio III 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.

Las larvas de estadio III 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 Therma Hygrometer®. El procedimiento fue adecuada a las normativas propuestas por Pérez *et al.*,<sup>70</sup> sobre manejo de especies en insectarios.

### **3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico y diluciones de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”**

El extracto hidroalcohólico, se preparó a partir del material vegetal previamente secado, molido y pesado 100 g del tamizado de las hojas de *Lupinus paniculatus*

“qera”, 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 100 000 partes por millón (ppm). Dos pruebas preliminares fueron hechas a fin de determinar las concentraciones ideales con las cuales llevar a cabo el experimento del efecto biotóxico de la planta. La primera prueba consistió en evaluar las concentraciones de 20 000, 40000 y 80 000 ppm 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 Estadio III de *Cx. quinquefasciatus*); al hallarse mortalidades próximas al 100% en la primera prueba sobre todo en las concentraciones superiores a 40 000 ppm, se optó por realizar una segunda prueba piloto considerando las diluciones de 10 000, 20 000 y 40 000 ppm 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 prueba piloto y habiéndose, demostrado en las diluciones de 20 000 y 40 000 ppm mortalidades superiores al 60%, se tomó la decisión de desarrollar la prueba confirmatoria de mortalidad utilizando las diluciones de 15 000, 17 500, 20 000, 22 500 y 25 000 ppm a un volumen de 10 mL de extracto hidroalcohólico, 90 mL de agua declorada y 10 larvas de estadio III por unidad experimental, con cinco repeticiones (concentraciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes menores presentes en los extractos hidroalcohólicos obtenidos (Anexo 10).

### **3.3.3. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”**

Obtenidos los aceites esenciales y demás sustancias hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas 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 biotóxicas 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>71</sup> y Lock de Ugaz<sup>72</sup> (Anexo 6).

#### **3.3.4. Evaluación de la biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”**

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 Estadio III 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 Estadio III por vaso para cada una de las dosis a evaluar (15 000, 17 500, 20 000, 22 500 y 25 000 ppm), al que previamente se les añadió 90 mL de agua potable declorada, para luego ser completada al volumen de 100 mL con 10 mL adicionales del extracto formulado a evaluar, lo que correspondió al volumen total donde fueron colocadas las larvas del mosquito. Cada dosis fue evaluada por quintuplicado con su respectivo control experimental (Abate®), a las mismas dosis formuladas para el producto biotóxico, en dos repeticiones, con su correspondiente control negativo, tomando en cuenta las normas planteadas por la WHO<sup>73</sup> para este tipo de experimentos.

Las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo a las 24 horas posteriores al inicio del experimento.<sup>34</sup> Las larvas fueron declaradas muertas cuando no reaccionaron al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical.<sup>74</sup> Por precaución se observó si hubo mortalidad de larvas en el control. 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>34</sup>

#### **3.3.5. 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>34</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>41</sup>

### 3.4. Diseño de investigación

El diseño experimental fue adecuado a una evaluación de estímulo creciente, donde el factor manejado fueron las concentraciones (15 000, 17 500, 20 000, 22 500 y 25 000 ppm), del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”

### 3.5. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en las pruebas del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, en el control de larvas de Estadio III de *Culex quinquefasciatus*, fue calculada la mortalidad para cada dosis formulada a través de la aplicación de la siguiente ecuación:

- **Porcentaje de mortalidad larvaria**

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

Adicionalmente fueron elaboradas tablas y figuras estadísticas del tipo descriptivo de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de establecer que dosis del producto biotóxico fue el más eficiente en el control de larvas de estadio III del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, los datos fueron sometidos a un análisis de comparación de medias de Kruskal Wallis con su respectiva desviación estándar ( $\alpha=0,05$ ), entre las dosis formuladas y los porcentajes de mortalidad halladas, utilizando el procedimiento del paquete estadístico SPSS 15.

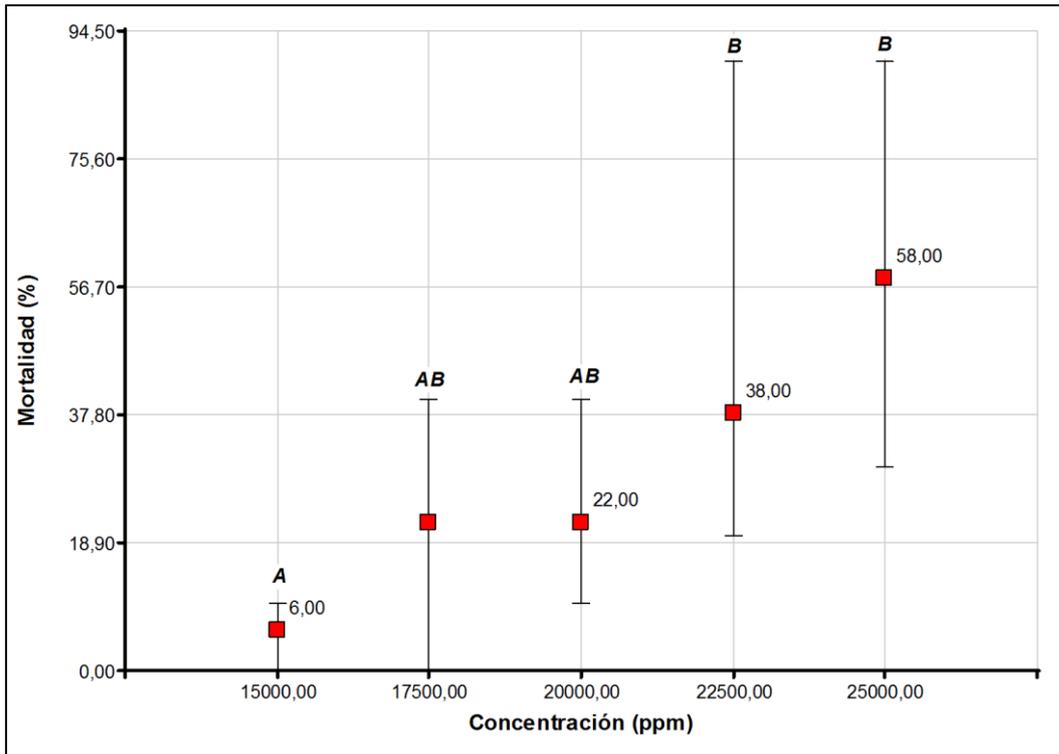
#### **IV. RESULTADOS**

Tabla 2. Número y porcentaje de mortalidad de larvas de estadio III de *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.

Concentración (ppm)	Densidad larval inicial (N°)	Mortalidad de larvas por repetición (n = 5)					x̄ mort.	% de mort.
		I	II	III	IV	V		
15 000	10	0	1	1	0	1	0,6	6,0
17 500	10	2	4	1	0	4	2,2	22,0
20 000	10	1	2	1	4	3	2,2	22,0
22 500	10	2	3	2	3	9	3,8	38,0
25 000	10	3	6	4	7	9	5,8	58,0

Tabla 3. Media y desviación estándar del porcentaje (%) de mortalidad generada a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, sobre larvas de estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Concentración (ppm)	N° de larvas / (Número de repeticiones)	Frecuencia (%)			D.E.
		Media	Mínimo	Máximo	
15 000	10 (n=5)	6	0	10	5,48
17 500	10 (n=5)	22	0	40	17,89
20 000	10 (n=5)	22	10	40	13,04
22 500	10 (n=5)	38	20	90	29,5
25 000	10 (n=5)	58	30	90	23,87



Kruskal Wallis H = 13,04; gl = 4; p = 0,0095

Figura 6. Valores máximos, mínimos y promedios del porcentaje de mortalidad generada por el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas del Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

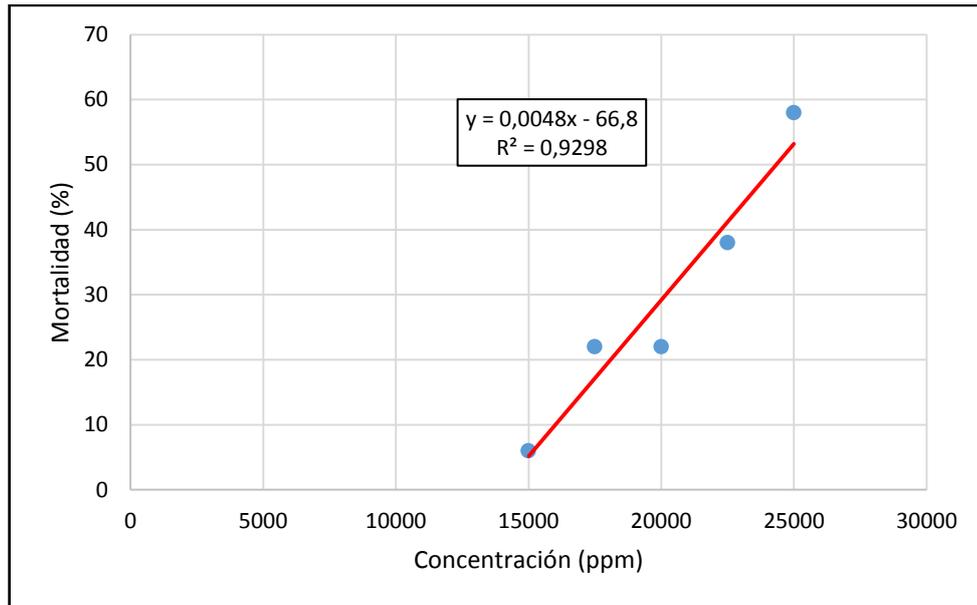


Figura 7. Tendencia lineal del porcentaje de mortalidad (medias) generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, a concentraciones crecientes, sobre larvas de Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

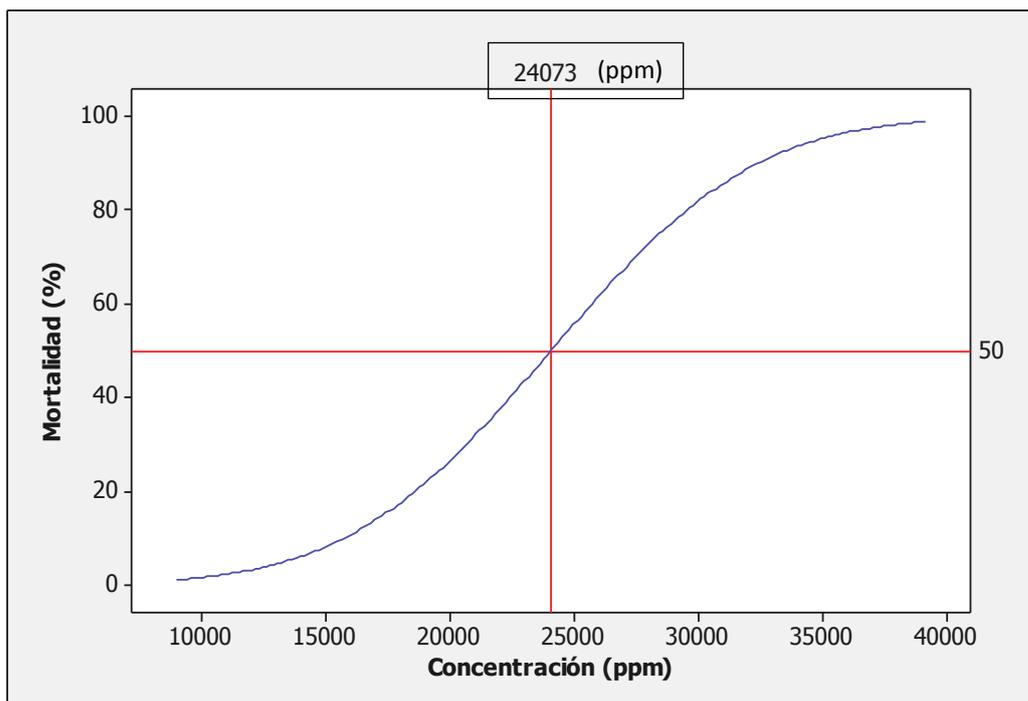


Figura 8. Porcentaje de mortalidad acumulada teórica (Probit) de larvas del Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera".

Tabla 4. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” (Anexo 4).

<b>Componentes químicos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Compuestos fenólicos y taninos	+++	Abundante
Azúcares reductores	+	Trazas
Antroquinonas y naftoquinonas	+	Trazas
Esteroides y/o triterpenoides	+	Trazas
Flavonoides	++	Regular
Alcaloides	+++	Abundante
Lactonas y/o cumarinas	+++	Abundante
Cardenólidos	+	Trazas

**Leyenda:**

- (+) : Trazas
- (++) : Regular
- (+++): Abundante



## V. DISCUSIÓN

La metodología y la técnica de evaluación aplicada en la presente investigación, permitió explorar rápida y fácilmente la actividad biotóxica del extracto hidroalcohólico de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas del Estadio III de *Culex quinquefasciatus*. Los resultados obtenidos en las pruebas de biotoxicidad reportados en la Tabla 2, demostraron que la mortalidad larval (%), mantuvo una tendencia creciente directamente proporcional al incremento de las concentraciones del extracto hidroalcohólico en las unidades experimentales, alcanzando los máximos valores a partir de la concentración de 22 500 a 25 000 ppm, en las que se reportaron mortalidades de 38 a 58% (D.E.  $\pm$  29,5 y  $\pm$  23,87, respectivamente), hallándose los menores valores a la concentración de 15 000 ppm, donde solo se alcanzó un 6% (D.E.  $\pm$  5,48) (Tabla 3).

Por otro lado al comparar los resultados de mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* obtenidos en las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, en relación al Abate® o temefos (producto comercial de efecto larvicida utilizado en programas de control vectorial, empleado en la investigación como blanco experimental y comparativo para los resultados de mortalidad evaluada), se pudo evidenciar que el producto comercial es distantemente más eficiente desde las menores concentraciones hasta las mayores (15 000 a 25 000 ppm), generando en todos los casos una mortalidad de 100% de las larvas del mosquito culícido. El Abate® o temefós 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>

Cuando se efectuó la prueba de Kruskal Wallis ( $P > 0,05$ ), a los porcentajes de mortalidad halladas en las unidades experimentales, en relación a las

concentraciones del extracto hidroalcohólico de la planta evaluada, se pudo establecer que existen diferencias significativas entre ellas (Figura 6, Anexo 7). Establecido los niveles de jerarquía (ranks) de las medias de mortalidad obtenidas en el experimento (Figura 6), la prueba determinó que a las concentraciones de 22 500(B) y 25000(B) ppm, se hallaron las mayores respuestas (38 y 58% de mortalidad larval, respectivamente), mientras que la menor mortalidad, fue a la concentración de 15 000 ppm (con solo 6%). En esta jerarquización, también fueron hallados valores intermedios de mortalidad, por ejemplo, a las concentraciones de 17500(AB) y 20 000(AB) ppm, la mortalidad larval solo alcanzó 22%. Como se observa, estadísticamente la jerarquización de las respuestas determinó que, cuanto menor sea la concentración del producto biotóxico en el medio, las mortalidades serán menores, en tanto que si estas se incrementan, consecuentemente las respuestas de mortalidad también seguirán esta tendencia.

Al realizar el ajuste de los datos del porcentaje de mortalidad (medias) obtenidos en las unidades experimentales, a una tendencia lineal (Figura 7), se encontró que el valor del índice de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,9298, lo que se interpreta estadísticamente, con la variación de las concentraciones del extracto evaluado, a un nivel de confianza de 92.9%. Al efectuar el análisis de varianza ( $P < 0,05$ ) (Anexo 8), está es altamente significativa ( $\alpha = 0,0002$ ) lo cual demuestra que la relación entre las variables evaluadas (concentraciones del producto biotóxico y porcentaje de mortalidad larval), siguen una tendencia lineal creciente, se pudo establecer que el ajuste es el adecuado para la investigación desarrollada, y en consecuencia, como la más adecuada para el experimento.

Al efectuar el estudio de la dosis mortalidad de Probit (Figura 8, Anexo 9), a fin de establecer la concentración ideal del producto biotóxico obtenido de las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera", como la necesaria para controlar y generar una mortalidad larval de 50% de la población de *Culex quinquefasciatus* presente en los criaderos de la ciudad de Ayacucho, a un límite de confianza del 95%, el ajuste de la curva de Probit reportó en 24 073 ppm como la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), ideal para lograr dicho efecto. De este análisis podemos afirmar, que si se quiere producir una mortalidad igual o superior al 50% de larvas de los mosquitos culícidos presentes en los criaderos larvales naturales o artificiales de la ciudad de Ayacucho, bastaría tan solamente con utilizarse un volumen de 10 mL del producto biotóxico de la planta *L. paniculatus* "qera" por cada 100 mL de agua contenida en un criadero larval a una concentración de 24 073 ppm.

En la literatura científica revisada y que circula al alcance de nuestra realidad, no se encuentran reportes precisos sobre el efecto biotóxico de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, en el control de insectos de importancia médica o agrícola, salvo información genérica hecha de manifiesto por los agricultores de la comunidad de Cusibamba (Morochuchos, Huamanga-Ayacucho), lugar donde fue recolectada la planta motivo de estudio, quienes manifiestan que para controlar insectos plaga de la “papa” (*Solanum tuberosum*), utilizan el agua procedente del remojado de las hojas y semillas de la planta; al respecto Aucasime,<sup>44</sup> manifiesta que *Lupinus paniculatus*, es una planta con alto contenido de alcaloides como la lupanina, por lo que el poblador rural andino de Ayacucho la utiliza como planta medicinal, las hojas en infusión son tomadas para curar las úlceras y afecciones hepáticas, el agua procedente de las semillas remojadas son utilizadas como bioinsecticidas.

Ayala *et al.*,<sup>25</sup> al efectuar estudios de biotoxicidad del extracto obtenido de semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostraron que a un volumen de 5 mL por 100 mL de agua de criadero y a la concentración de 5 000 ppm, el extracto produjo una mortalidad larval de 75% de la población de *Culex quinquefasciatus*, estableciendo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en 1 776 ppm como la más recomendable para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho, valores relativamente inferiores a los que reportamos en la presente investigación y con mayor efectividad tóxica. Esta diferencia podría ser atribuible al hecho que la composición química de una planta puede variar en diferentes especies, en ejemplares de una misma especie de planta, e inclusive en los diferentes órganos de la anatomía vegetal, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo<sup>76</sup> lo que en alguna manera estaría explicando las diferencias halladas. Además el efecto tóxico que pueda mostrar una planta, 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>77</sup>

En la búsqueda de antecedentes que pudieran ayudarnos a entender el efecto biotóxico de las concentraciones evaluadas del extracto hidroalcohólico de

*Lupinus paniculatus* “qera”, en el control de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, se han encontrado evidencias como las desarrolladas por Ramos *et al.*,<sup>16</sup> que, al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue equivalente a 20,39 ppm, en tanto que la concentración letal noventaicinco (CL<sub>95</sub>) fue de 41,64 ppm, después de 24 horas de evaluación en larvas de los estadios 3° tardío y 4° temprano de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio, atribuyendo a los triterpenos y a la sesquiterpen lactonas la actividad larvicida demostrada; en todo caso en la investigación desarrollada por los referidos investigadores no queda claro cómo es que probaron dichas concentraciones, que por cierto generan resultados distantemente diferentes a los hallados en la presente investigación. Debemos denotar que para las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera”, utilizado en forma de extracto hidroalcohólico, la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue estimada en 24 073 ppm, notablemente diferente a los resultados reportados para el extracto del hueso de *Persea americana* en el control de las larvas de *Aedes aegypti*. En este punto debemos indicar que tanto *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, son mosquitos que pertenecen a la misma categoría taxonómica (Fam. Culicidae, Subfamilia Culicinae), por lo que las proximidades evolutivas y fisiológicas son muy cercanas una de otra, razón válida para asumir que la concentración del producto biotóxico estudiado, seguramente podría ser funcional para ambos grupos de insectos a la concentración propuesta.

Mariños *et al.*,<sup>23</sup> al evaluar la capacidad biocida de *Lonchocarpus utilis* “barbasco” en una población de 7 000 larvas de tercer y cuarto estadio de *Anopheles benarrochi*, vector primario de malaria, en Yurimaguas y Loreto (Perú), determinaron que la eficacia y susceptibilidad de las larvas a las dosis de 6,25 y 3,1 g/L fue con una mortalidad de 98 y 89% cuando utilizaron agua destilada y 86% y 82% cuando el producto se mezcló con agua de criadero. En este caso particular, siendo *Lonchocarpus utilis* una planta reconocida por sus atributos tóxicos (presencia de la rotenona o cube en la raíz de la planta, catalogado como producto altamente tóxico ambiental y para diversas formas de vida), muestra una concentración extremadamente elevada para la mortalidad que reportan los citados investigadores. Las razones para esta alta diferencia en las concentraciones tóxicas reportadas para *Lonchocarpus utilis* “cube o barbasco” en comparación al efecto biotóxico producido por el extracto

hidroalcohólico de *Lupinus paniculatus* “qera”, en las larvas del mosquito culícido, podrían deberse a las condiciones como fueron evaluados ambos extractos. Mariños *et al.*,<sup>23</sup> no demuestran con claridad como procedieron para establecer las concentraciones evaluadas, mucho menos reportan pruebas estadísticas que validen dichos resultados, por lo que resulta ser poco fiable la citada investigación para el análisis del efecto biotóxico que pretendemos demostrar.

Por otro lado, Rozo *et al.*,<sup>12</sup> en Colombia, al evaluar la actividad tóxica de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. sobre larvas de IV estadio del mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus), bajo condiciones de laboratorio, utilizando los extractos acuosos en concentraciones de 500 mg L<sup>-1</sup>, 1 500 mg L<sup>-1</sup> y 2 500 mg L<sup>-1</sup> y acetónicos en concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup>, 40 mg L<sup>-1</sup> y 50 mg L<sup>-1</sup>, efectuaron los bioensayos por triplicado, cada uno con 20 larvas, expuestas durante 24 horas a 150 mL de solución. Los extractos acuosos mostraron acción moderadamente baja en la mortalidad de larvas, menor del 20%. Por el contrario, en la acción de los extractos acetónicos se observó en 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>, 15% de mortalidad, mientras que a 30 y 40 mg L<sup>-1</sup> se registraron 22 a 38% de mortalidad, en tanto que a 50 mg L<sup>-1</sup> la mortalidad fue del 95,4% con resultados estadísticos altamente significativos. Demostraron que las concentraciones de los extractos acetónicos fueron las más eficientes para el control de los mosquitos seleccionados. Ambos tipos de extractos mostraron efecto tóxico en larvas de *Aedes aegypti*; sin embargo, se observó mayor efecto en los extractos acetónicos en relación con los extractos acuosos de *Eupatorium microphyllum*, lo cual, según los investigadores, constituye una alternativa viable en la búsqueda de nuevos larvicidas a partir de compuestos naturales. La diferencia de los resultado de mortalidad larval reportados por Rozo *et al.*,<sup>12</sup> aparte del tipo de extracto evaluado y especie de planta estudiada, radica en que ellos evaluaron la totalidad de la concentración formulada en las unidades experimentales, en nuestro caso las concentraciones probadas fueron diluidas en 90 mL de agua potable declorada, lo que en síntesis, ayudó a una mayor dilución del extracto biotóxico evaluado, hecho que difiere totalmente de la investigación utilizada como comparativo, forma de evaluación del producto biotóxico que probablemente haya influenciado en las diferencias comparativas halladas en los resultados de mortalidad.

La utilización de los productos bitóxicos de origen vegetal para el control de diversas plagas de importancia médica o agrícola, ha sido motivo de muchas investigaciones, que si bien, nos dan idea de las concentraciones probadas, en muchos casos esos resultados no pueden ser inferidos o comparados con los hallados en la presente investigación, debido a diferencias en metodología de evaluación del producto biotóxico, planta evaluada, lugar de colecta de la muestra, tipo de insecto evaluado entre otros, así por ejemplo, Cárdenas Castro *et al.*,<sup>18</sup> al analizar 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  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , estimaron la  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  por la prueba de Probit, que a la concentración de 300 mg/L el porcentaje de mortalidad de larvas fue del 98% para *Anopheles albimanus*. En *Culex quinquefasciatus* estuvo entre el 86 % y 95%. La  $CL_{50}$  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  $CL_{50}$  fue de 148,79 mg/L; mientras que para la de Villavicencio fue de 209,91 mg/L. El extracto acuoso de *R. graveolens* mostró tener efecto tóxico para larvas de las dos especies de mosquitos, lo cual sugiere que esta planta podría ser una alternativa promisoriosa para el control de los referidos insectos.

Estudios similares en Ayacucho (Perú), fueron desarrollados por Flores Cisneros,<sup>24</sup> quien evaluó la actividad biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* “marco” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. Demostró que la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fue de 8,84 mg/L como la necesaria para hallar mortalidad en por lo menos el 50% de las larvas evaluadas, atribuyó esta capacidad biocida a la presencia de alcaloides y glicósidos (+++), metabolitos de los más abundantes en la planta evaluada, probablemente los responsables de la mortalidad hallada. Huamán Campos,<sup>26</sup> al estudiar la biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, halló una mortalidad larval de  $70 \pm 8,16$  a  $75 \pm 12,91$  %, a las concentraciones de 20 000 y 30 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, valores relativamente cercanos a los que reportamos en la presente investigación. Lo que nos anima a suponer que *Lupinus paniculatus* al igual que otras plantas,

desarrolla buena actividad tóxica, las mismas que pueden estar relacionadas con las concentraciones formuladas, tipo de planta y volumen de producto biotóxico evaluado.

Al realizar el estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera" (Tabla 4), se pudo demostrar que los principales productos activos presentes en la planta correspondieron a los alcaloides, compuestos fenólicos y taninos, las lactonas y/o cumarinas, reportados como los más abundantes (+++), seguido de los flavonoides, de presencia regular (++) y finalmente los azúcares reductores, antroquinonas y naftoquinonas, esteroides y/o triterpenoides y los cardenolidos, reportados como elementos trazas (+).

La acción tóxica del extracto hidroalcohólico de *Lupinus paniculatus* "qera" sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, probablemente se deba a la presencia de los alcaloides del tipo quinolizidínicos, compuesto que muestra una estructura química variable, y que por definición se dice que son biomoléculas que poseen un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de los aminoácidos, el cual dentro del metabolismo normal de las plantas, no se transforman totalmente en proteína vegetal, sino que continúa su circulación en la savia o se fija en algunas partes de la planta, por lo que pueden combinarse con moléculas de azufre formando heterósidos cianogénicos.<sup>63</sup> Muchas de estas moléculas son las que causan intoxicaciones en humanos, animales y probablemente en los insectos. La forma más común es la intoxicación por infusiones con hierbas con fines medicinales, siendo esta una causa importante de muerte sobre todo en niños. Su presencia en vegetales hace posible su incorporación accidental en alimentos, creando una vía fácil de intoxicación. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otras al sistema nervioso simpático.<sup>78</sup> Se tiene reportado por ejemplo que, los alcaloides derivados del tropano que contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario le confieren alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides aporfínicos y acetogeninas anonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla.<sup>64</sup> De las frutas de *Piper nigrum* han sido aislados alcaloides de isobutilamida, los cuales fueron probados contra el tercer estadio de la larva de los insectos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, observándose que el compuesto más tóxico

para la primera larva fue la pipericida. En el caso de las larvas de *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, la actividad larvicida fue más pronunciada para retrofractamida A.<sup>79</sup> Por otro lado, Flores y Simeón,<sup>21</sup> en México, al evaluar el efecto biológico de los alcaloides quinolizidínicos de las semillas de *Lupinus campestris* sobre *Aedes aegypti*, teniendo como antecedente que los alcaloides  $\beta$  eritroidina y erisovina de la *Erythrina americana* presentara actividad larvicida y sobre la base de que la esparteína, alcaloide presente en semillas de *Lupinus*, tienen efecto insecticida sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. Propusieron probar este producto en larvas del mosquito *Ae. aegypti*. La esparteína extraída de *Lupinus campestris* fue diluida en metanol a 1 ppm, aplicando de esta solución 1 mL en 20 larvas del tercer instar presentes en 25 mL de agua del grifo, las larvas fueron evaluadas durante 10 días por la metodología propuesta por la WHO. Los resultados mostraron que por un lado, la esparteína prolongó el tiempo de la muda del tercer al cuarto instar de las larvas de *Ae. Aegypti*, por cinco días y un día el estado biológico de pupa-adulto y además ocasionó malformaciones en las partes de las agallas, pecten, sifón y abdomen en las larvas del tercer instar, con lo cual impidió que la larva realizara movimientos dentro del agua y prevalecieron las larvas en la profundidad del recipiente ocasionando la muerte. Este trabajo es una primera evidencia de que la esparteína, derivado de los metabolitos secundarios de las semillas de *Lupinus*, pueden ser una alternativa para el control de las larvas de los mosquitos *Aedes aegypti*.

Otro compuesto que probablemente esté relacionado con la actividad biotóxica del extracto hidroalcolico de *Lupinus paniculatus* "qera" probada sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, corresponda a los compuestos fenólicos y taninos, que para el caso de la planta evaluada, es reportado como un compuesto abundante (+++), tan igual como los alcaloides. Se sabe que muchos de sus derivados son tóxicos para los insectos, así se tiene la lupanina, principal compuesto fenólico presente en plantas del género *Lupinus*, puede ser usada como herbicida, así como un buen repelente de insectos. Otro flavonoides reconocido, son los rotenoides que tienen uso como insecticidas desde la antigüedad. Estos derivados actúan por contacto e ingestión en los organismos afectados. La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH-ubiquinona reductasa), bloquea pues la respiración celular, efecto que se manifiesta con parálisis y posterior muerte del

individuo afectado. Una aplicación de la rotenona, es el efecto que tienen los radicales libres acumulados en el interior de la célula, debido precisamente al bloqueo de la cadena respiratoria. Esto provoca un estrés oxidativo a partir del cual se puede realizar distintos experimentos.<sup>52</sup> Seguramente mucho de lo dicho, este sucediendo en las larvas de *Culex quinquefasciatus*, que a la luz de los resultados, serían los compuestos fenólicos y los alcaloides, los principales productos responsables de la generar mortalidad en las larvas del mosquito estudiado.

Otro producto, considerado también como abundante (+++), en las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera", son las lactonas, cuyo papel en las plantas cobra creciente interés, sobre todo por sus función antibacteriana, fungicida, fitotóxica y actividad alelopática. Se cree que el grupo exometileno de la lactona desempeña un papel esencial en la citotoxicidad porque causa modificaciones estructurales tales como la saturación o adición reflejando la inhibición tumoral y la pérdida de la citotoxicidad. Las lactonas han sido aisladas de numerosas fuentes naturales. Se conocen más de 4 500 registros de derivados lactónicos, que se semejan estructuralmente difiriendo solo en la disposición diferente de sus carbonos. En las plantas predominan los sesquiterpenoides con esqueleto de germacrano, eudesmano y guayano, que has sido halladas sobre todo, en plantas de la familia de las Compuestas (Asteraceae), aunque también se encuentran en umbelíferas (Apiaceae), y en menor grado, en escrofulariáceas, aristoloquiáceas y valerianáceas.<sup>80</sup> En el mismo estatus es reportada las cumarinas, que son lactonas insaturadas. Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales, son conocidos sus efectos sobre el sistema vascular tanto arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes. Estos compuestos presentan un amplio rango de actividad biológica, podemos citar: la acción anticoagulante y antibacterial del dicumarol, la acción antibiótica de la novobiocina, la hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, la acción estrogénica del cumestrol, la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas, etc., se destaca además, el uso de cumarinas como saborizantes y en perfumería.<sup>80,81</sup> En ambos casos, no está clara la función fitotóxica sobre los insectos, sin embargo, sobre la base de la información teórica recogida, podríamos asumir que dichos metabolitos estarían contribuyendo en la

actividad biotóxica demostrada en el extracto hidroalcohólico de *L. paniculatus* al ser evaluada en larvas del mosquito culícido.

En caso de los flavonoides, reportado para *Lupinus paniculatus* "qera", como de regular presencia (++); este compuesto por definición, son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos de excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.<sup>82</sup> Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana, por lo que su presencia en la planta de *L. paniculatus*, seguramente tenga un fin benéfico y de protección, conferirle color y efecto antioxidantes para los organismo que lo consuman, antes que producir algún efecto tóxico.

En cuanto a los esteroides y/o triterpenoides reportados en la fitoquímica de la "qera" como un componente traza (+) (Tabla 4), se tiene reportado por ejemplo que los brassinoesteroides (tipo de triterpeno de 30 carbonos), es un componente de la membrana celular bajo la forma de fitoesteroles, algunas son fitoalexinas, varios actúan como toxinas y "feeding deterrents" (repelentes de la alimentación en insectos), otros son componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas.<sup>83</sup> Está demostrado por ejemplo que algunos monoterpenos polihalogenados obtenidos de la alga roja *Plocamium cartilagineum*, tienen actividad insecticida y acaricida, fue comprobado así en el efecto tóxico producido en insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de azúcar o cebolla.<sup>84</sup> Araujo *et al.*,<sup>61</sup> reportaron que el aceite esencial extraído de las hojas e inflorescencias de *Hyptis martiusii* Benth, arbusto pequeño que crece en abundancia en el noreste de Brasil, ampliamente conocido por su uso medicinal, presento actividad insecticida y determinaron que los componentes mayoritarios en el aceite esencial asociado a la actividad biofuncional fueron los monoterpenos; 3-careno y 1,8-cineolo. Esta actividad se determinó realizando dos pruebas: una en la que comprobaron diferentes concentraciones del extracto obtenido contra la mosca blanca *Bemisia argentifolii*, plaga común de frutos comestibles de valor comercial como el melón y la sandía, obteniendo 93 % de efectividad a concentraciones de

2 000 mg/L. La otra prueba fue realizada contra larva del mosquito *Aedes aegypti*, vector de transmisión del dengue y la fiebre amarilla, cuando usaron concentraciones de 250 y 500 mg/L la efectividad fue de 99 y 100%. Antecedentes que nos lleva a suponer, que su presencia en *Lupinus paniculatus* “qera”, probablemente esté relacionada, con potenciar el efecto tóxico de la planta al ejercer sinérgicamente con los componentes mayores (alcaloides y compuestos fenólicos), efecto biotóxico sobre las larvas del mosquito culícido.

En cuanto a los demás productos traza (+), como los azúcares reductores, antroquinonas y naftoquinonas, probablemente estén contribuyendo en proporcionar algún beneficio directo a la planta y que al unirse a los componentes mayores detectados en el análisis fitoquímico, como los alcaloides, compuestos fenólicos y las lactonas y/o cumarinas, en acción sinérgica, estén generando el efecto biotóxico evaluado en el extracto obtenido de las hojas de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, al actuar en las larvas de *Culex quinquefasciatus* presentes en los criaderos larvales naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho. Debemos mencionar además que los aceites esenciales extraídos de las hojas de la plantas *Lupinus paniculatus* “qera”, consiste 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>15</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>76</sup> por lo que el efecto tóxico demostrado en caso del extracto obtenido de las hojas de *L. paniculatus* “qera” 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>77</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>11</sup>

Los resultados obtenidos en la presente investigación, al igual que otras investigaciones desarrolladas para evaluar la actividad biotóxica de plantas de la región de Ayacucho, demuestran el potencial real de varias de estas especies, haciéndose aportaciones importantes para la integración a una lista de plantas con propiedades larvicidas sobre diferentes especies de mosquitos.

## VI. CONCLUSIONES

1. *Lupinus paniculatus* “qera”, demostró ser una planta con propiedades biotóxicas, al generar mortalidad larval de *Culex quinquefasciatus* de 38 a 58% (D.E.  $\pm$  29,5 y  $\pm$  23,87) de la población larval expuesta, a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero y las concentraciones de 22 500 a 25 000 ppm, respectivamente, comprobándose que la mortalidad larval está directamente relacionada al incremento de las concentraciones del extracto hidroalcohólico en las unidades experimentales.
2. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>), fue estimada en 24 073 ppm, a un límite de confianza del 95%, para el extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” como la más recomendable para el control de las larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho.
3. La fitoquímica demostró que los alcaloides, compuestos fenólicos y taninos, las lactonas y/o cumarinas, son los más abundantes (+++), seguido de los flavonoides de presencia regular (++) , finalmente los azúcares reductores, antroquinonas y naftoquinonas, esteroides y/o triterpenoides y los cardenolidos, reportados como elementos trazas (+). Se atribuyó a los alcaloides, compuestos fenólicos, lactonas y esteroides y/o triterpenoides, como los metabolitos secundarios responsables de generar el efecto bitoxico de la planta *Lupinus paniculatus* “qera” en larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus*.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el purificado de las principales moléculas fitotóxicas presentes en la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, a fin de llevar a cabo pruebas de toxicidad en larvas de mosquitos culícidos y recomendar su posible utilización en programas de control vectorial de insectos de importancia médica.
2. Realizar el trabajo de investigación para evaluar las concentraciones de metabolitos secundarios presentes en las diferentes etapas fenológicas del desarrollo de la planta *Lupinus paniculatus* “qera”, así mismo en las diferentes partes de la planta (hojas, tallos, frutos, raíz).



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheng S, Chang H, Chang S, Tsai K, Chen W. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource. Technology.* 2003; 89: 99-102.
2. Harve G, Kamath V. Larvicidal activity of plant extracts used alone and in combination with known synthetic larvicidal agents against *Aedes aegypti*. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2004; 42: 1216-1219.
3. Das N, Goswami D, Rabha B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. *Journal of Vector Borne Diseases.* 2007; 44: 145-148.
4. Jarrín P. Caracterización y tratamiento del agua del desamargado de chocho, proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina. [Tesis de Doctorado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Ecuador. 2003. Pp. 14-24.
5. Mc Cawley E. Cardioactive alkaloids, In: *The alkaloids, chemistry and physiology.* Ed. Manske, R. Academic Press, New York, USA. 2005. 560 Pp.
6. Millán C. Las plantas: una opción saludable para el control de plagas. Global Greengrants Fund. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Edit. Rosgal S.A. Uruguay. 2008. Pp. 101.
7. Iannacone J, Cajachagua C, Dueñas B, Castillo L, Alvarino L, Argota G. Toxicidad de *Agave americana* y *Furcraea andina* (Asparagaceae) sobre *Culex quinquefasciatus* (Diptera) y *Heleobia cumingii* (Mollusca). *Neotrop. Helminthol.* 2013. 7(2): 311-325.
8. Fradin M, Day J. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England J. Med.* 2012; 347(1):13-18.
9. Benzi V, Stefanazzi N, Ferrero A. Bioactivity of essential oils from leaves and fruits of agueribay (*Schinus molle* L.) in the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean J. Agric. Res.* 2009; 9 (2): 154-159.
10. 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.* 2008; 58: 1101-1106.
11. Isman M. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 2006; 51: 45-66.
12. Rozo Á, Zapata C, Felio B. Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Rev. Cienc. Salud.* Bogotá (Colombia); 2008, 6(2) mayo-agosto: 64-73.
13. Maciel M, Morais S, Bevilaqua C, Silva R, Barros R, Sousa R, Sousa L, Brito E, Souza-Neto M. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 2010; 167: 1-7.
14. Sanabria L, Segovia E, González N, Alcaraz P, Vera N de Bilbao. Actividad larvívica de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, Vol. 7(2) Diciembre 2009: 26-31. [En línea]. [Última visita: 30 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v7n2/v7n2a05.pdf>
15. Espitia Yanes C. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de 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.
16. Ramos Casilla F, Oraday Cárdenas A, Rodríguez Tovar M, Verde Star M, 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.
  17. Villavicencio Nieto M, Pérez Escandón B, Gordillo Martínez A. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. Polibotánica. 2010; 30: 193-238. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62114250012>.
  18. 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.
  19. Agrela I, Hidalgo Y, Herrera F. Efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2014. Vol. LIV (2): Agosto-Diciembre, 199-207. [En línea]. [Última visita: 30 de mayo de 2016]. Disponible en: [www.scielo.org/ve/pdf/bmsa/v54n2/art09.pdf](http://www.scielo.org/ve/pdf/bmsa/v54n2/art09.pdf)
  20. Brophy M, Castro M. Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) del efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *Lupinus mutabilis* Sweeten ratas. [Tesis licenciatura]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2009. [En línea]. [Acceso 04 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.medicina.usmp.edu.pe/congresomundial/000data/temlib.htm.2007058>
  21. Flores M, Simeón R. Efecto biológico de los alcaloides quinolizidínicos de semillas de *Lupinus campestris* sobre *Aedes aegypti*. Libro de Resúmenes de la XII Jornadas de Investigación 2015. Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional de México (INP). 2015, 25 de marzo al 27 de mayo. [En línea]. [Última consulta 03 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.ceprobi.ipn.mx/OfertaEducativa/Documents/eventosAcademicos/memorias-mcdpb-2015.pdf>
  22. Pérez D, Iannaccone J. Efecto biocida de sacha yoco (*Paullinia clavigera* 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.
  23. Mariños C, Castro J, Nongrados D. Efecto biocida del “barbasco” *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos. Rev. peru. biol. 2005; 11(1): 87- 94.
  24. 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.
  25. 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.
26. 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.
  27. Ayala Y. Capacidad predatora 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.
  28. Riveros A, Pocasangre L, Rosales F. Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memorias del taller internacional realizado en el CATIE, Turrialba, Costa Rica-27-30 de Agosto de 2002. [En línea]. Disponible en:  
<https://books.google.com.pe/books?id=YeYOAQAIAAJ&pg=PA66&dq=definicion+de+metabolitos+secundarios+en+plantas&>
  29. Séjourné V. Productos biocidas. Nuestros aliados en la salud y la higiene cuando y donde se necesitan—A.I.S.E. [En línea]. Bruselas. 2009. Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/biocides/index.htm>
  30. Camacho V. 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.
  31. [file:///C:/Users/AIDA/Downloads/1639599533.TEMA%20%20Desarrollo%20\[2012\].pdf](file:///C:/Users/AIDA/Downloads/1639599533.TEMA%20%20Desarrollo%20[2012].pdf)
  32. Salazar M, Moncada L. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica* 2004; 24:385-92.
  33. <https://es.wikipedia.org/wiki/Lupinus>
  34. Lagunes T, Villanueva J. Toxicología y manejo de insecticidas. Escuela de Postgraduados. Centro de Ecología y Acarología. México. 1994. 257 pp.
  35. Gámez Rojas C, Ramírez Riveros E. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>-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.
  36. 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.
  37. Ortuño T. 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.
  38. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 15º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial. Ginebra. 1992. Informe Técnico N° 818; 180 Pp.
  39. Velásquez A. Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui* y *Piper asperifolium* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad

- Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Biológicas. Bolivia. 2007.157 pp.
40. Lizana R. Elaboración y evaluación de extractos del fruto de *Meliaazedarach* L. como insecticida natural. [Tesis de Grado]. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. 2005. 96 pp.
  41. Alonso F. 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 *Polycelisfelina*). [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>.
  42. Lezama Asencio P. Las especies de *Lupinus* L. (Fabaceae) y de sus simbiontes en el distrito de Corongo-Ancash. [Tesis doctoral]. Lima. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2010.
  43. 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.
  44. Aucasime L. Descripción botánica de *Lupinus paniculatus* "qera". Museo Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2016.
  45. Jacobsen S, 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>
  46. 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.
  47. Kartuzova L, Kurlovich B. Production of Seed. En Kurlovich. Lupins. Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding. St. Petersburg Pub. House. 2002.11-38.
  48. Porras-Saavedra J, López-López H, Soto-Simental S *et al.*, Evaluación química y digestibilidad in vitro de *Lupinus* spp. del Estado de Hidalgo (Mineral del Chico). [Libro de resúmenes]. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 2013. [En línea]. [Última visita 22 de mayo de 2016]. Disponible en: [http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI\\_GranSem/Norma\\_Vera/9.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI_GranSem/Norma_Vera/9.pdf)
  49. 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.
  50. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003; 64: 3-19.
  51. Hatzold T, Idmalfa I, Gross R, Wink M, Hartmann T, Witte L. Quinozilidina alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31,934-938.

52. Marín L, Juan C. Fitoquímica y Evaluación Biológica de *Polygonum punctatum*". [Tesis de maestría]. Instituto de Química. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia; 2001.
53. Palazón J, Cusidó RM, Morales C. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. Ciencia y Tecnología. Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. [En línea]. [acceso 12 de agosto de 2015]. Disponible en: [http://www.acenologia.com/ciencia55\\_2.htm](http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm)
54. Dorman H, Deans S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 2000; 88: 308-316.
55. Jacobson M. Botanical pesticides: past, present and future. En Insecticides of Plant Origin. Arnason JT, Philogene BJR y Morand PACS. Symposium Series. 1989; 387. 1-10.
56. Ottaway P. The roots of a health diet. Chem Ind. 2001; 22: 42-44.
57. Eugenia Maggi M. 2004. Insecticidas naturales. Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales. Agencia Cordoba. Ciencia-Unidad CEPROCOR. Colombia. Disponible en: <http://www.monografias.com>
58. Hammond D, Rangel S, Kubo I. Volatile aldehydes are promising broad-spectrum postharvest insecticides. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000; 48: 4410-4417.
59. Vardar-Unlu G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M, Dönmez E, Tepe B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and metanol extracts of *Thymus pectinatus*. Fisch. et. Mey. Var. *Pectinatus* (Lamiaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51, 63-67.
60. Peterson C, Tsao R, Egger L, Coats J. Isecticidal activity of cyanohydrin and monoterpenoid compounds. Molecules. 2005; 5: 648-654.
61. Araujo E, Silveira E, Lima MA, Andrade M, Lima MAA. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51, 3760-3762.
62. Rodríguez Soana C, Maynard D, Phillips S, Trumbel JT. Avocadofurans and their tetrahydrofuran analogues: comparison of growth inhibitory and insecticidal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000; 48: 3642-3645.
63. Oliva A, Kimudini M, Wedge D, Harries D, Hale A, Aliotta G, Duke S. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51: 890-896.
64. Chang F, Chen C, Wu P, Kou R, Chang Y, Wu Y. New alkaloids from *Annona purpurea*. Journal of Natural Products. 2000; 63, 746-748.
65. Harwood RF, James MT. Entomología Médica y Veterinaria. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 1987; 615 Pp.
66. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. Parasitology vector biology. Second Edition. Academia Press. San Diego, California USA. 2000; 796 pp.
67. Forattini O. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecciones. Rev. Saúde Pública, Sao Paulo. Brasil. 1999; 32(6): 497-502.
68. Clements A. The biology of mosquitoes, Vol. 1, Development, Nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 1992. Pp 509.
69. <http://www.investigacionciencia.es/files/22643.png>
70. Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA et al. Manual de indicaciones y técnicas para Insectarios. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana, Cuba. 2004.
71. Miranda M, Cuellar C. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. Universidad La Habana. La Habana. 2000. 324 Pp.

72. 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.
73. 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.
74. Consoli R, Laureço de Oliveira R. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editorial Fiocruz. Brasil. 1999; 225 Pp
75. 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)
76. Misra G, Pavlostathis S. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997; 47: 572-577.
77. Feng R, Isman M. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. Experientia. 1995; 51: 831-833.
78. Robinson T. *The biochemistry of alkaloids*. Second edition. Springer-Verlag New York Inc. New York 10010, U.S.A. 1981. 211 Pp.
79. Park II, Lee S, Shin S, Park J, Ahn Y. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50: 1866-1870.
80. Ruiz Reyes E, Suarez M. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Versión electrónica. ISSN: 2221-2450. [En línea]. [Última visita 03 de junio de 2016]. 2015; (46) 1. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/lactonas-sesquiterp%C3%A9nicas-diversidad-estructural-y-sus-actividades-biol%C3%B3gicas-sesquiterpene>
81. Arango Acosta G. Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido shikímico. Universidad de Antioquia. Colombia. [En línea]. [Última visita 03 de junio de 2016]. 2010. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>
82. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 2002; XVII (6): 271-278. ISSN 0212-1611. [En línea]. [Última visita 03 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
83. Wikipedia.com. Terpeno [base de datos en línea]. Fundación Wikimedia, Inc., [actualizado el 29 de noviembre de 2013; acceso 17 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Terpeno>
84. <http://www.insectariumvirtual.com>
85. Ayala Y. Descripción taxonómica de *Culex quinquefasciatus*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2016.
86. [http://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial\\_keys/mosquitoes.pdf](http://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial_keys/mosquitoes.pdf)

## **ANEXOS**

## Anexo 1

Certificación taxonómica de la planta *Lupinus paniculatus* "qera". 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 Biología, Srta. Denis Mercedes, SAUME TORRES, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	FBALES
FAMILIA	:	PAPILIONACEAE
GENERO	:	Lupinus
ESPECIE	:	<i>Lupinus paniculatus</i> Desr.
N.V.	:	"qera"

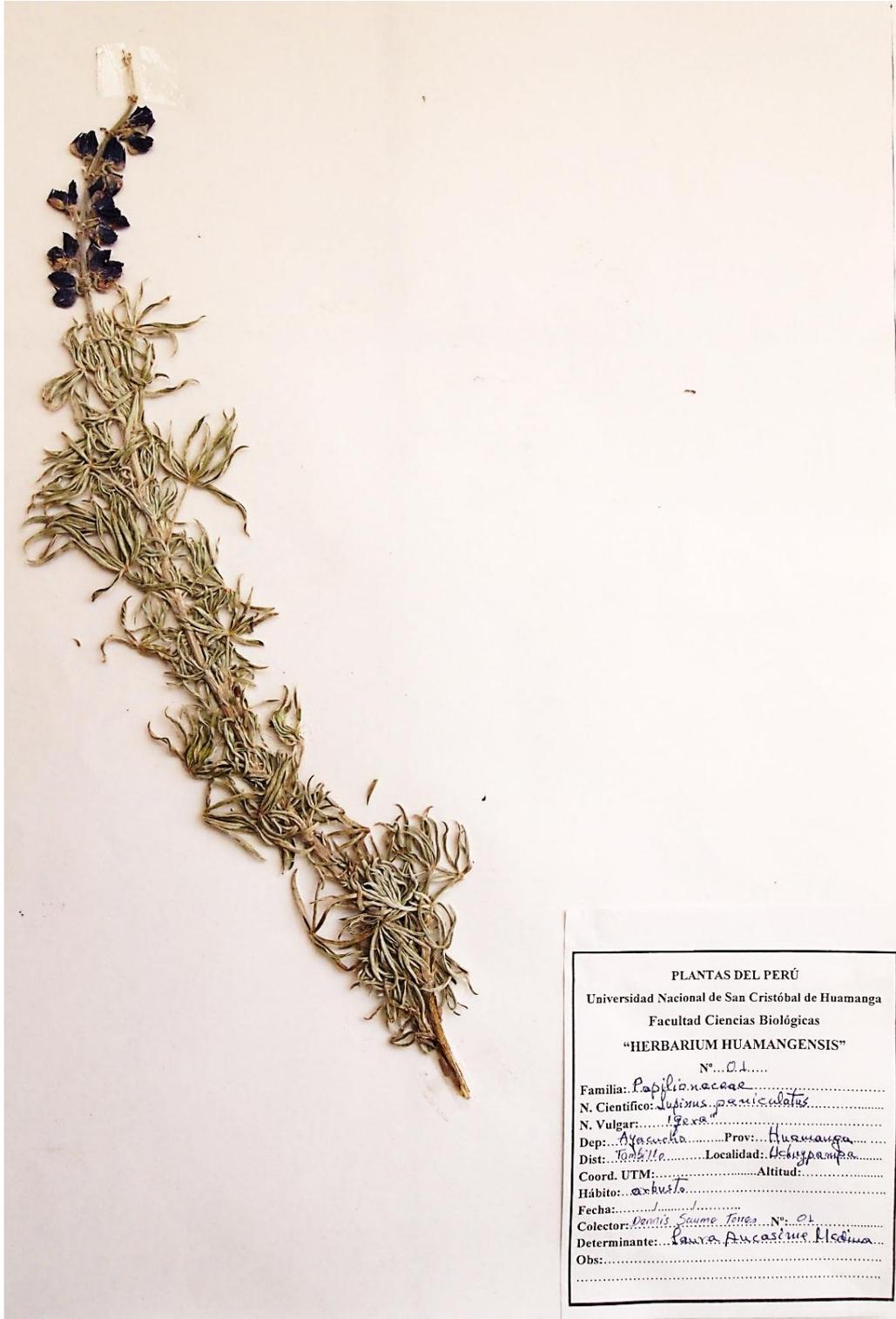
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 25 de Mayo del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
Dr. Lorena Rucahuasi  
JEFE

## Anexo 2

Características morfológicas de la planta *Lupinus paniculatus* "qera".



### Anexo 3

Posturas de huevos típicos de *Culex quinquefasciatus* colectados en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) "Totorá" - Ayacucho.



## Anexo 4

Perfil fitoquímico de los componentes hidroalcohólicos solubles presentes en las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera".



Mg. Q.F. ENRIQUE JAVIER AGUILAR FELICES

Profesor de Farmacognosia

Laboratorios de Farmacia

Av. Independencia S/N – Huamanga. Teléfono: 066-9603457. E-mail: [eaguilarfqf@gmail.com](mailto:eaguilarfqf@gmail.com)

### DA CONSTANCIA:

Que, el Bachiller en Ciencias Biológicas **DENNYS SAUME TORRES** ha solicitado el tamizaje fitoquímico de un extracto acuoso de las hojas de *Lupinus paniculata* "qera" para trabajo de tesis

Dicha muestra ha sido procesada según la metodología descrita por Miranda y Cuellar (2000) y Lock de Ugaz (1994), reportándose los siguientes resultados:

Ensayo	Metabolito Secundario	Observación	Resultado
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos y taninos	Precipitado azul negruzco intenso	+++
Benedict	Azúcares reductores	Coloración roja	+
Börntrager	Antraquinonas y naftoquinonas	Roja en la fase acuosa	+
Lieberman	Esteroides y/o	Verde azulado	+
Burchard	Triterpenoides		
Shinoda	Flavonoides	Coloración roja	++
Mayer	Acaloides	Precipitado blanco	+++
Baljet	Lactonas y/o cumarinas	Coloración roja	+++
Kedde	Cardenolidos	Coloración púrpura	+

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente

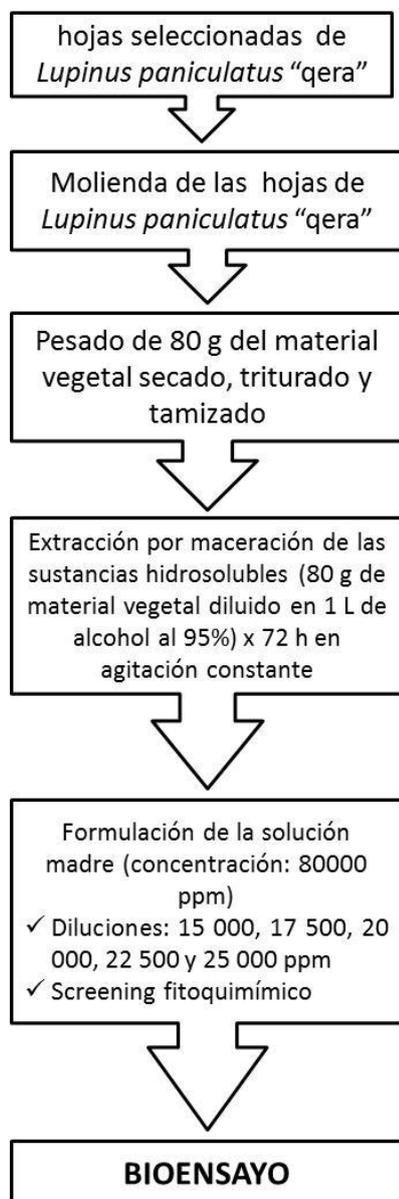
Ayacucho, 09 de mayo de 2016

  
Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices  
Profesor Asociado a DE

cc.  
Archivo.

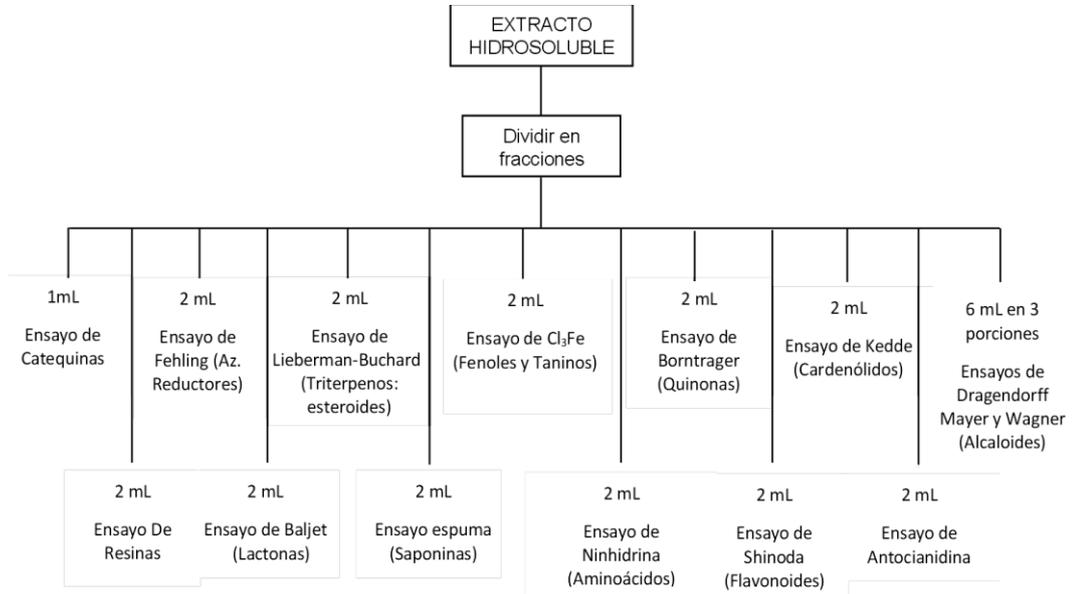
## Anexo 5

Secuencia de extracción de las sustancias hidroalcohólicas presentes en las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera", marcha fitoquímica y preparación de las diluciones para el bioensayo.



## Anexo 6

Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las hojas de *Lupinus paniculatus* "gera", e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar).<sup>71,72</sup>



## Anexo 7

Test de Kruskal Wallis para comparar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas del Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Variable	Concentración (ppm)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Mortalidad (%)	15000	5	6	5,48	10	13,04	0,0095
Mortalidad (%)	17500	5	22	17,89	20		
Mortalidad (%)	20000	5	22	13,04	20		
Mortalidad (%)	22500	5	38	29,5	30		
Mortalidad (%)	25000	5	58	23,87	60		

Trat.	Ranks
15000	4,7 A
17500	11,8 A B
20000	11,9 A B
22500	15,7 B
25000	20,9 B

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

### Anexo 8

Análisis de varianza para la tendencia lineal del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Lupinus paniculatus* “qera” sobre larvas del Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	7200	1	7200	19,75	0,0002
Concentración (ppm)	7200	1	7200	19,75	0,0002
Error	8384	23	364,52		
Total	15584	24			

## Anexo 9

Concentración letal media (CL50) calculadas mediante la técnica Probit del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Lupinus paniculatus* "qera" sobre larvas del Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Porcentaje	Percentil	Error Estándar	IC fiducial de 95%	
			Inferior	Superior
1	9010,59	2123,08	2794,51	12157,9
2	10775,6	1831,04	5438,62	13502,2
3	11895,5	1648,24	7111,25	14360,1
4	12737,9	1512,52	8365,93	15009
5	13423,1	1403,6	9383,54	15539,9
6	14006,4	1312,2	10247	15994,3
7	14517,8	1233,28	11001,7	16395,3
8	14975,7	1163,78	11675	16756,7
9	15392,1	1101,71	12285,1	17087,6
10	15775,4	1045,71	12844,3	17394,6
20	18623,9	689,375	16873,4	19802,2
30	20677,8	575,045	19460,3	21856,6
40	22432,9	638,083	21295,8	23987
50	24073,2	803,282	22769	26220,5
60	25713,6	1021,95	24126,5	28569,7
70	27468,6	1284,4	25519,7	31142,4
80	29522,6	1610,01	27112,5	34190,8
90	32371	2077,72	29289,2	38450,8
91	32754,4	2141,52	29580,5	39025,8
92	33170,8	2211	29896,5	39650,8
93	33628,7	2287,57	30243,6	40338,4
94	34140,1	2373,29	30630,9	41106,7
95	34723,3	2471,3	31072,2	41983,4
96	35408,6	2586,72	31590	43014
97	36251	2728,99	32226	44281,7
98	37370,8	2918,63	33070,3	45967,9
99	39135,9	3218,51	34399,1	48627,6

## Anexo 10

Preparación y acondicionamiento de las unidades experimentales e incorporación de las larvas de Estadio III del mosquito *Culex quinquefasciatus*, para las pruebas de biotoxicidad.



## Anexo 11

Preparación de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* “qera” a evaluar, en las pruebas de bitoxicidad.



## Anexo 12

Unidades experimentales y distribución de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus paniculatus* "qera".



## Anexo 13

### Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA	MARCO TEÓRICO
<p><b>Problema principal:</b> ¿Cuál será el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” a concentraciones crecientes, sobre larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>, en comparación con el estándar comercial Abate®?</p>	<p><b>Objetivo general:</b> Evaluar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p>a) Determinar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, sobre larvas de III instar del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> a las 24 horas de exposición.</p> <p>b) Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p>c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”</p>	<p>El extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” tienen efecto biotóxico sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p>	<p><b>Variable independiente:</b> Concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera” <u>Indicador:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Concentraciones: 15000, 17500, 20000, 22500 25000 ppm</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b> Efecto biotóxico sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>. <u>Indicadores</u></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 media letal (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 de investigación:</b> El diseño experimental será adecuado al tipo aleatorio simple, donde el factor a ser manejado serán las concentraciones (15000, 17500, 20000, 22500 25000 ppm), del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.</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 hojas de <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”, 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>