

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Actividad biocida del extracto hidroalcohólico de hojas de
Ambrosia arborescens Mill “marco” sobre larvas de *Culex
quinquefasciatus*.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGA**

CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. FLORES CISNEROS, KLEINNY SHOUMARA

AYACUCHO – PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bachiller Kleinny Shoumara FLORES CISNEROS

R.D. Nº 079-2014-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, a los veinticinco días del mes de julio de dos mil catorce, siendo las cuatro con cinco minutos, reunidos en el auditorium del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, bajo la presidencia de la Blga. Laura Aucasime Medina por encargo de la Facultad, además de ser miembro del jurado calificador, además está integrado por el Mg. Yuri Olivier Ayala Sulca, miembro asesor, actuado como Secretario Docente el Bigo. Raúl Antonio Mamani Aycachi además de miembro jurado calificador. Se da inicio al acto sustentatorio dando a conocer la documentación que avala el acto. Luego con autorización del Presidente (e) la Bachiller Kleinny Shoumara FLORES CISNEROS da inicio a la exposición de la tesis "Actividad biocida del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" (Fam. Asteraceae) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) presentado por la Bachiller Kleinny Shoumara FLORES CISNEROS, con el que pretende obtener el título profesional de Bióloga con mención en la Especialidad de Microbiología, disponiendo de un tiempo de cuarenta minutos de acuerdo al Reglamento de la Facultad de Ciencias Biológicas.

La señorita sustentante inició su exposición con los respectivos agradecimientos a la Universidad, sus asesores y familiares en general, luego desarrolló la exposición.


Concluida la exposición la Sra. Presidente (e) solicitó a los miembros del jurado formular las preguntas correspondientes, los que fueron replicados por la sustentante.

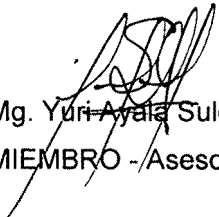
A continuación se solicitó a la señorita sustentante y público asistente a abandonar por unos minutos el auditorium con la finalidad que el jurado calificador haga la deliberación de la calificación respectiva. Obteniéndose los siguientes resultados.

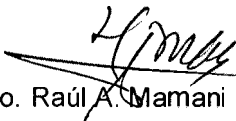
MIEMBRO JURADO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	PROMEDIO
Bigo. Laura Aucasime Medina	17	17	17

Mg. Yuri O. Ayala Sulca	17	17	17
Bigo. Raúl A. Mamani Ayacachi	17	17	17

Habiendo obtenido un promedio con la nota de (17) siendo aprobado de lo que dan fe los miembros del jurado, firmando la conformidad al pie del presente el acto de sustentación, concluyendo siendo las seis y veinte minutos de la tarde.


Biga. Laura Aucasime Medina
PRESIDENTE (e)-Jurado


Mg. Yuri Ayala Sulca
MIEMBRO - Asesor


Bigo. Raúl A. Mamani Aycachi
MIEMBRO- Jurado

DEDICATORIA

Primeramente a Dios y a mis padres a quienes les debo la vida. Agradezco el cariño y comprensión de mis padres, quienes me han sabido formar con buenos sentimientos, hábitos y valores, que me ayudó a salir adelante buscando siempre el mejor camino. Gracias madre mía, siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga por haberme formado profesionalmente preparándome para ser una profesional exitosa, con valores y principios garantía de una sólida formación profesional.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología, a todos los docentes que durante toda mi formación académica me brindaron su amistad, apoyo y me condujeron en el camino de la investigación, la sensibilidad social y a cultivar los valores.

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

Expresar mis sinceros agradecimientos a todos mis compañeros de estudio por haber compartido durante nuestra permanencia en la UNSCH los estudios, las dificultades, la alegría y felicidad, a quienes estuvieron cerca apoyándome en los momentos más difíciles de mi vida, mis más sincero agradecimiento, nombrarlos cometería el error de olvidar a alguno de ellos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. Los aceites esenciales de origen vegetal en el control de insectos de insectos vectores	7
2.2.2. Biomoléculas de plantas con actividad insecticida	10
2.2.3. Morfología e importancia de los mosquitos culícidos	13
2.3. Bases teóricas	16
2.3.1. Sustancias biocidas	16
2.3.2. Los insecticidas y su clasificación	16
2.3.3. Insecticidas de origen vegetal	17
2.3.4. Evaluación de la toxicidad de los bioinsecticidas	18
2.3.5. Características botánicas y ecológicas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco"	19
2.3.6. Composición química de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco"	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Zona de estudio	24
3.2. Población y muestra	27
3.2.1. Población	27
3.2.2. Muestra	27
3.2.3. Unidad de análisis	27
3.3. Metodología y recolección de datos	27
3.3.1. Colecta y mantenimiento del material biológico	27
3.3.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" y las diluciones para el bioensayo	29

3.3.3. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill “marco”	30
3.3.4. Evaluación de la actividad biocida de las diluciones del extracto hidroalacohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill “marco”	30
3.3.5. Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀)	31
3.4. Diseño de investigación	32
3.5. Análisis de datos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	38
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
ANEXO	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill “marco” a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.	34
Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill “marco” (Anexo 3).	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> (61).	15
Figura 2. Lugar de colecta de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> . Pileta de almacenamiento de agua de los laboratorios de la Escuela de Biología, Ciudad Universitaria (FCB-UNSCH)	25
Figura 3. Lugar de colecta de hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco". Distrito de Vinchos (anexo de Anchaq-huasi), Huamanga – Ayacucho.	26
Figura 4. Concentración letal media (CL ₅₀) del efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , en 24 horas de evaluación.	35
Figura 5. Mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> por concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco", a las 24 horas de evaluación.	36

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página	
Anexo 1	Figura 6. Secuencia de extracción de las sustancias hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" y preparación de las diluciones para el bioensayo.	58
Anexo 2	Figura 7. Esquema de caracterización de los aceites esenciales y demás componentes hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar).	59
Anexo 3	Figura 8. Tamizaje fitoquímico de los componentes hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco".	60
Anexo 4	Tabla 3. Análisis de varianza ($P \leq 0,05$) de la mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> en relación a la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco".	61
Anexo 5	Tabla 4. Prueba post hoc de Tuckey de comparación de medias ($P \leq 0,05$) de la mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> en relación a la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco".	61
Anexo 6	Figura 9. Caracterización botánica de la planta de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco". <i>Herbarium Huamangensis</i> . Laboratorio de Botánica. FCB-UNSCH.	62
Anexo 7	Figura 10. Extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> (solución madre).	63
Anexo 8	Figura 11. Pesado de la solución madre del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> para la preparación de las diluciones experimentales.	63
Anexo 9	Figura 12. Diluciones del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> , listas para los ensayos de biotoxicidad.	64

Anexo 10	Figura 13. Pruebas de biotoxicidad del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> .	64
Anexo 11	Figura 14. Vasos experimentales conteniendo larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	65
Anexo 12	Figura 15. Recuento de la mortalidad de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	65
Anexo 13	Tabla 5. Matriz de consistencia.	66

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 biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" (Fam. Asteraceae) en larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. La metodología consistió en preparar un extracto hidroalcohólico de las hojas de *A. arborescens* (60 000 mg/L), a partir del cual se produjeron las siguientes diluciones: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L, concentraciones con las cuales se evaluó la mortalidad bajo condiciones ambientales, en 10 larvas de *Cx. quinquefasciatus* colocadas en vasos descartables conteniendo 95 mL de agua limpia de clorada y 5 mL del producto biocida. Cada dosis fue evaluada por quintuplicado con su respectivo control. Las lecturas se llevaron a cabo luego de 24 horas. Se calculó la concentración letal media (CL₅₀) 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. Mortalidades de 54 a 58 % de larvas son reportadas a las concentraciones de 9,0 a 10,0 mg/L del extracto hidroalcohólico a un volumen de 5 mL por 100 mL de agua de criadero, estadísticamente similares según la prueba de comparación de medias de Tuckey ($P < 0,05$). La concentración letal media (CL₅₀) fue establecida en 8,84 mg/L, reportándose a los alcaloides y los glicósidos (+++), como los más abundantes. Con moderada presencia (++) los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. El efecto tóxico de la planta probablemente esté relacionada a la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos y esteroides y a la complejidad de los productos trazas.

Palabras Claves: Concentración letal media, extracto hidroalcohólico, *Culex quinquefasciatus*, *Ambrosia arborescens*.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas no solo tienen aplicación curativa, sino también preventiva en el control de enfermedades y plagas, en este sentido los vegetales con propiedades biocidas dentro de la concepción del manejo ecológico de plagas es un medio para prevenir la presencia de estos organismos dañinos (1). Estudios fitoquímicos del género *Ambrosia* describen la presencia de terpenos y flavonoides como los compuestos representativos (2). *Ambrosia arborescens* Mill. "marco" contiene una serie de alcaloides con acción, inmediata contra hongos y bacterias. También se conoce por experiencias en comunidades rurales de Ecuador que el cocimiento de las hojas y flores de esta planta muestran excelente actividad insecticida contra las pulgas (3).

El uso de insecticidas sintéticos en el control de mosquito ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia (4, 5), efectos indeseables sobre los organismos (6) e impactos negativos en el ambiente (7). En América se demostró la resistencia en especies como *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. darlingi* y *An. vestitipennis* a carbamatos, piretroides y organofosforados; éste último grupo químico es responsable de la resistencia en más de veinte especies de mosquitos a nivel mundial (8).

Frente a este panorama, los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, son consideradas alternativas válidas sobre los plaguicidas sintéticos convencionales en el control de insectos (9, 10). En la presente investigación proponemos el uso del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” para el control de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, mosquito importante en la transmisión de las filariosis, encefalitis, entre otras, cada año (11), planteándonos los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” (Fam. Asteraceae) en larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.

1.2. Objetivos específicos

- a) Determinar la actividad biocida de las diluciones: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”, estableciendo el promedio y porcentaje de mortalidad de larvas de III instar del mosquito *Cx. quinquefasciatus* a las 24 horas de iniciado el experimento, en condiciones de laboratorio.
- b) Establecer la concentración letal media (CL₅₀) del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”, mediante la prueba de análisis Probit a las 24 horas, evaluando la mortalidad de larvas de *Cx. quinquefasciatus*.
- c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” (Fam. Asteraceae) a fin de establecer las características químicas del producto biocida.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

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 vectores. La mayoría de las investigaciones que se realizan actualmente sobre el uso de sustancias de origen vegetal para el control de mosquitos, están enfocadas a encontrar especies con alto potencial en la eliminación de larvas de mosquitos para poder implementar estrategias de control y manejo integrado de mosquitos, haciendo un mejor uso de los recursos naturales y reducir el uso de los insecticidas organosintéticos (12).

En los últimos años, los aceites esenciales de origen vegetal se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga (10), así por ejemplo, se han experimentado en ácaros (13) e insectos, principalmente coleópteros (14), isópteros (15), himenópteros (16), dípteros (17) y homópteros (18) con notables y significativos resultados. Grainge y Ahmed (19), refieren que las plantas y sus derivados, han mostrado actividad biocida en ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos, entre éstos los mosquitos de la familia

Culicidae, grupo en el que se encuentran *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, entre otros.

Diversos autores han demostrado las actividades fumigantes de los aceites esenciales del género *Eucalyptus* contra *Sitophilus oryzae* (20). Asimismo, los aceites esenciales de tres especies del género, *Eucalyptus staigeriana*, *E. citriodora*, y *E. globulus*, muestran actividad insecticida relevante frente a huevos, larvas y adultos de *Lutzomyia longipalpis*, un tipo de mosquito díptero transmisor de la leishmaniosis (21).

Entre las plantas que han mostrado notable efecto sobre las larvas de mosquitos se encuentra el género *Annona*, como *A. bullata* (Rich), *A. densicoma* (Mart.), *A. glabra* (L.), *A. muricata* (L.) y *A. squamosa* (L.), tóxicas a larvas de mosquito *Aedes aegypti* (L.) y *A. cherimola* (Mill) activa contra *Aedes aegypti* y *Anopheles* spp. De estas plantas se han extraído nueve principios activos pertenecientes a las acetogeninas y a los alcaloides, los cuales se encuentran principalmente en la corteza y la semilla; aunque también se han encontrado en la raíz, el fruto y en la hoja. Los disolventes que se han utilizado para la extracción de sus principios activos han sido varios: agua, etanol, acetona, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo y hexano, lo que denota que varias sustancias activas están inmiscuidas en esta actividad, desde las muy polares que se extraen con agua hasta las no polares que se extraen con hexano (22, 23).

El tarragón mexicano (*Tagetes lucida*) tiene amplias aplicaciones en América Latina debido a sus propiedades plaguicidas y nematocidas. Por ejemplo, la combustión de la planta se utiliza artesanalmente en las zonas rurales de México para la fumigación de casas y corrales infestados con pulgas y para ahuyentar moscas y mosquitos: *Culex* sp., *Aedes* sp., *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae) (24). De hecho, la actividad repelente contra mosquitos es la más importante, y

la que ha sido estudiada en mayor extensión: compuestos orgánicos aislados de los aceites esenciales de la planta son altamente efectivos, por ejemplo, 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 (LD₅₀) en contra de larvas de *Anopheles stephensi* (concentraciones entre 43 y 58 ppm) (25).

Ramos-Casilla *et al.* (26) al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que a la concentración letal media (CL₅₀) equivalente a 20,39 ppm y a la concentración letal noventaicinco (CL₉₅) equivalente a 41,64 ppm, después de 24 horas 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 sesquiterpenolactonas 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* mostraron 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.

Mariños *et al.* (27) realizaron siete 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 de 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 % y 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 fue 93 y 90%.

El género *Ambrosia*, perteneciente a la familia Asteraceae, contiene cerca de 35 a 40 especies de plantas herbáceas muchas de ellas con alto potencial biocida entre las que se encuentra *Ambrosia arborescens* Mill “marco”, por lo que es considerada como una maleza nociva anual, originaria de América del Norte (28). Invade los campos de cultivo y reducen la productividad de estos (29). Es utilizado como té en el tratamiento de la neumonía, fiebre, náuseas, calambres intestinales, diarrea y trastornos menstruales. La composición química de los aceites esenciales de la planta *Ambrosia* ha sido estudiada en los últimos años y recientemente se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como la ambrosina, compuestos fenólicos, isabelina, lactonas, psilostachyna y sesquiterpenos (30).

Estudios llevados a cabo por Pérez-Pacheco *et al.* (31), demostraron que el extracto acuoso de la planta *Ambrosia artemisiifolia* no tiene efecto larvicida en el control de *Culex quinquefasciatus* Say, a las dosis de 5, 15 y 25%. No obstante, Kvist y Alarcón (32) reportaron 75 registros de plantas con propiedades insecticidas en Ecuador, entre las que resaltaron varias especies de *Ambrosia*, utilizado principalmente para eliminar pulgas y diversas especies de escarabajos. Investigaciones recientes indican que algunos aceites esenciales presentes en las plantas (Ej. *Ambrosia arborescens* Mill motivo de la presente investigación) y, en particular, los monoterpenos presentes en plantas de la Fam. Asteraceae, actúan sobre los receptores de la octopamina, lo cual los convierte en productos altamente selectivos dado que este tipo de receptores no está presente en los

vertebrados. De esta manera, el sistema octopaminérgico presente en los insectos se convierte en un blanco biorracional para su control, por lo que su uso en el control de larvas de insectos resulta ser una alternativa viable (25).

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, además de causar diversas molestias, son vectores de agentes causales de enfermedades humanas con gran importancia en salud pública, como por ejemplo la malaria y el dengue. Su control se ha efectuado tradicionalmente con insecticidas organosintéticos, los cuales han ocasionado daños al ambiente, intoxicado a las personas expuestas y desarrollo de resistencia en los insectos. En respuesta a esta problemática se considera necesaria la búsqueda de alternativas de solución con menos riesgos y con bajo costo económico y ambiental, como el uso de extractos vegetales; uno de los métodos de control más antiguos de plagas de insectos (31).

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. Los aceites esenciales de origen vegetal en el control de insectos vectores

En la actualidad se definen como “aceites esenciales” a las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides. El conocimiento y la utilización de estos preparados se

remonta a varios siglos antes de Cristo, por lo que no es de extrañar que desde su aparición hasta la acepción que hoy en día se reconoce, hayan sufrido grandes cambios (33).

El origen de la palabra "aceite esencial" se cree que proviene del nombre acuñado en el siglo XVI por el alquimista suizo Paracelso von Hohenheim, el cual denominó a los componentes efectivos de los medicamentos como *quinta essentia* (34). Los aceites esenciales consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de las plantas. Pueden estar localizados en la raíz, hojas, tallos, flores, pelos y sistema vascular de la planta (25). Los aceites esenciales son fácilmente extraíbles, ecoamigables al ser biodegradables y son fácilmente catabolizados en el ambiente (35). Asimismo, no persisten en el suelo y en el agua (36), y poseen baja o no toxicidad hacia vertebrados (peces, aves y mamíferos principalmente) (37).

Entre los principales métodos de extracción de los aceites esenciales se encuentran la hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, hidrofusión, extracción con dióxido de carbono y microondas (38). La composición química de un determinado aceite esencial puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e inclusive en los diferentes órganos de la misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo (39). Los aceites esenciales básicamente contienen monoterpenos (C10) (constituyen aproximadamente el 90% de las mezclas) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y bioactividad característicos de la planta de la cual provienen (28).

La resistencia de las plagas (cruzada y no cruzada), contaminación ambiental (cuerpos de agua, suelos y entornos urbanos) y problemas toxicológicos

asociados con los insecticidas sintéticos han conducido a la necesidad de encontrar alternativas más efectivas y amigables con la salud de los seres humanos y el ambiente. Además, la lucha contra la contaminación ambiental y sus efectos sobre la salud del hombre y de los sistemas ecológicos se constituye en uno de los más serios retos de nuestro mundo moderno. Como consecuencia, los aceites esenciales son algunos de los productos naturales con actividad biológica presentes en las plantas, que ofrece una oportunidad para descubrir insecticidas nuevos y eficientes para el control de plagas (41, 42).

Los primeros intentos para caracterizar la actividad sobre el control de plagas de los aceites esenciales, bajo condiciones *in vitro*, comenzaron en la década de los 90 (43). Al mismo tiempo, el interés en el uso de los aceites esenciales ha ganado impulso en la última década, debido a sus actividades insecticidas, fumigantes y de contacto, y a las menores restricciones en los mecanismos de aprobación ligados a su uso a lo largo de la historia de la humanidad (44).

Por su parte, en lo concerniente a la resistencia, se ha encontrado que los aceites esenciales son particularmente útiles contra especies de insectos que presentan esta característica. A diferencia de los plaguicidas sintéticos basados en productos químicos individuales, los aceites esenciales son mezclas complejas 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 (45).

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 (46, 44).

2.2.2. 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 predación de insectos y animales (47). Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas (48). Por lo tanto en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de plaguicidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana.

Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de organismo frente a los cuales son eficaces: funguicidas, herbicidas, insecticidas, molusquicidas, nematocidas, rodenticidas (49). 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 (50).

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 (51).

b) Terpenoides.- Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de vegetales (52). 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 (53).

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 cianohidrinas, ésteres de cianohidrina y ésteres de monoterpenoides, fue probada mediante aplicación por aspersión 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 cianohidrinas 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 (41).

d) Aceites esenciales.- Araujo *et al.* (54) 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, presentó 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 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 $\mu\text{mol/g}$ (55). En este mismo estudio, se demostró que la presencia de insaturaciones 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 (56). Los alcaloides derivados del tropano contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario que lo confiere alta toxicidad, actuando como fitoaloxinas 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 (57).

De los frutos 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*, observando que el compuesto más tóxico para la primer 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 (58). También se ha reportado el uso efectivo de alcaloides de quinolina y quinolona para evitar el crecimiento de larvas *Colletotrichum* sp. (56).

2.2.3. Morfología e importancia de los mosquitos culícidos

Los mosquitos culícidos (Insecta: Diptera) son artrópodos conocidos vulgarmente como zancudos en algunas partes de América. Incluye, entre otros, los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Sabethes*, *Culiseta* y *Haemagogus* (59, 60).

Los mosquitos son los más abundantes de los numerosos tipos de artrópodos hematófagos que molestan al hombre, otros mamíferos y aves. Su población actual se calcula en aproximadamente 3 500 especies descritas reportándose 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 (60, 61).

El género *Culex*, incluye un número de vectores comprobados y potenciales de arbovirus y malaria aviar. Generalmente prefieren alimentarse de la sangre 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 (59, 60).

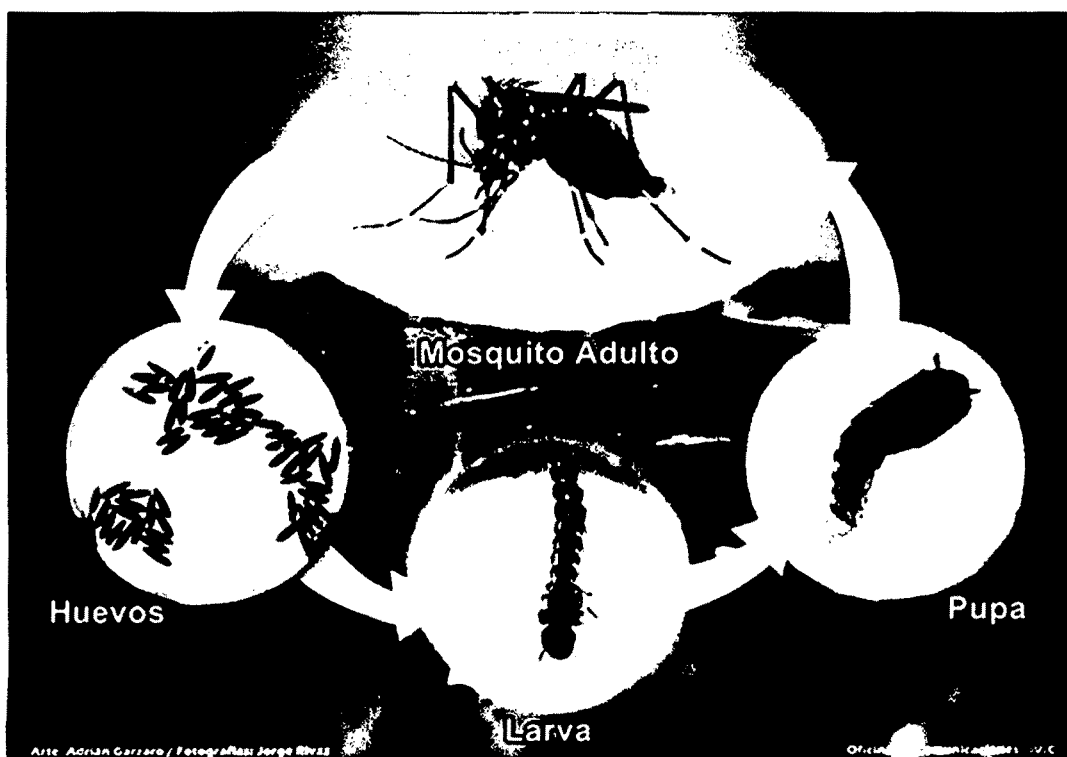


Figura 1. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* (61).

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 (59), pudiendo ser halladas en la ciudad de Ayacucho colonizando en el estado larvario diversos tipos de 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 (62).

2.3. BASES TEÓRICAS

2.3.1. Sustancias biocidas

Son sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Son agentes que matan a organismos. Son sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos (63).

2.3.2. Los insecticidas y su clasificación

Etimológicamente, deriva del latín y significa literalmente matar insectos (64). 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 (65). Según la FAO-1986 (8), 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 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 (66).

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 (67).

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** o **botánicos** (derivados y extraídos directamente de plantas) (65).

2.3.3. Insecticidas de origen vegetal

Son insecticidas naturales elaborados a partir de plantas y sus derivados (3). Las plantas consideradas insecticidas, desarrollaron sustancias llamadas aleloquímicos, como mecanismo de defensa contra insectos (65), regulando así la presencia de insectos fitófagos, que actúan como atrayentes, estimulantes, repelentes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición (64). Los

insecticidas vegetales no deben ser considerados inocuos, por la gran cantidad de metabolitos tóxicos, 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 (64).

2.3.4. Evaluación de la toxicidad 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 (67).

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) (67).

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 (67). 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 (67).

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 (CL₅₀ ó CL₉₅) (68).

2.3.5. Características botánicas y ecológicas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

a) Caracterización taxonómica

Fuente: “Herbarium Huamangensis”, Museo de Historia Natural de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNSCH (Anexo 6).

DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
SUBCLASE	:	Asteridae
ORDEN	:	Asterales
FAMILIA	:	Asteraceae
GÉNERO	:	Ambrosia
ESPECIE	:	<i>Ambrosia arborescens</i> Mili.
NOMBRE VULGAR	:	“marco, marku, altamisa”

b) Descripción botánica de la Familia Asteraceae y el género *Ambrosia*

La familia Asteraceae o compuesta, son plantas de hábito muy variado. Son tan numerosas que comprenden alrededor de la décima parte del total de fanerógamas conocidas. Sus especies se encuentran distribuidas por todo el mundo y adaptadas a las más diversas condiciones de vida. Abarca aproximadamente más de 1 000 géneros y más de 20 000 especies (69).

El género *Ambrosia* comprende a plantas herbáceas o arbustivas pertenecientes a la familia de las Asteraceae, nativas de Norte y Sudamérica, desde donde se han difundido a Europa. Comprende una treintena de especies de plantas anuales o perennes, que crecen en especial en regiones llanas, poco húmedas y arenosas. Varias de las especies de *Ambrosia* producen grandes cantidades de polen, que por su difusión anemocórica, es uno de los principales causantes de fiebre del heno (2). Por ejemplo el uso en la zona andina del marco (*Ambrosia peruviana*) como barrera viva contra algunas plagas (1).

La ambrosía lleva el nombre del delicioso manjar que comían los dioses griegos para alcanzar la vida inmortal. Se desconoce por qué se le dio el nombre a la planta. Quizás se debe a que a los caballos no les gusta comerla (70).

c) *Ambrosia arborescens* Mill “marco“

Sinonimia Botánico: *Ambrosia arborescens* Brandeg, *Ambrosia artemisioides* Willd, *Ambrosia frutescens* Lam, *Ambrosia fruticosa* Medik, *Franseria artemisioides* Willd, *Franseria conwayi* Rusby, *Gaertneria artemisioides* (Willd.) Kuntze, *Xanthium artemisioides* (Willd.) Delpino, *Xanthium fruticosum* LF (71).

Arbusto de 1-1,5 m de altura, rústico, verde y poco lignificado (72), sufrútices o hierbas; toda la planta presenta glándulas, aromáticas. Hojas alternas, pinnatisectas. Flores masculinas y femeninas en cabezuelas separadas a menudo en la misma planta. Cabezuelas masculinas en espigas o racimos

terminales; involucreo cupuliforme, brácteas lateralmente connatas; receptáculo con páleas. Flores masculinas modificadas, cáliz o vilano ausente, corola hialina, campanulada, 5-lobulada; estambres 5 alternado con los lóbulos de la corola; pistilodio reducido. Cabezuelas femeninas en grupos axilares en las hojas y sosteniendo los racimos masculinos; brácteas unidas y formando un receptáculo en forma de vaso; ápices de las brácteas espiniscentes, brácteas arregladas en varias formas o dispersas en el involucreo durante la fructificación; páleas ausentes; una a pocas flores. Flores femeninas reducidas, perianto ausente, androceo ausente; ovario maduro obovado, estilo corto, estigma lobulado, superficies estigmáticas papilosas, excertas a través de los ápices espinosos del involucreo. Aquenios prismáticos, con pelos uniseriados, formando complejos con el involucreo (2).

Ambrosia aparece a lo largo de las regiones templadas del hemisferio norte y en el norte de Sudamérica. Prefieren los suelos arenosos, poco fértiles, ligeramente alcalinos, y son fuertemente fotófilas. Se dan espontáneamente a la vera de los caminos, en ruderales y a la orilla de ríos de llanura (2). La mayoría de las 30 especies de *Ambrosia* son originarias de Norteamérica y Sudamérica. Fue importada accidentalmente a Europa en la década de 1940 y a partir de entonces se ha propagado extensamente por gran parte de ese continente (70).

Ampliamente distribuida en la sierra y también en la costa peruana. Es una especie ruderal pero prefiere la cercanía de las fuentes de agua y los suelos arenosos, así como la orilla de los caminos y carreteras. Se halla con frecuencia en la zona de adyacencia de muros, viviendas y cercos vivos (72). También a lo largo de las regiones templadas del hemisferio norte y en el norte de Sudamérica (2).

d) Propiedades y usos de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Propiedades medicinales: antiinflamatorio, antirreumático, fracturas y lesiones (2, 73), contra dolores de cabeza y migraña, baños vaginales, fiebre, estreñimiento, desórdenes de la próstata (2). Normaliza la falta o suspensión de la menstruación (3). Pero en gestantes no es recomendable en infusión y/o cocimiento por peligros de abortos, sin embargo recomiendan en el momento del parto porque facilita el proceso expulsivo del feto (73). El zumo, tomado evita la formación de abscesos internos de origen traumático (74), desinflama y alivia dolores de hemorroides externas (75, 74) y también empleado por los incas para la conservación de los cadáveres (75).

Además se reconoce sus propiedades biocidas contra insectos actuando como repelente contra las garrapatas (2), en el control de pulgas, colocando las ramas de la planta debajo de la cama para ahuyentarlas (74). También fueron realizados estudios en el control de larvas de *Aedes aegypti* con débil efecto biocida (76).

2.3.6. Composición química de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Vera (2), caracterizó y constató la presencia de las lactonas sesquiterpénicas: damsina ($C_{15}H_{20}O_3$), coronifilina ($C_{15}H_{20}O_4$), psilostachina ($C_{15}H_{20}O_5$), psilostachina C ($C_{15}H_{20}O_4$), dihidrocoronofilina ($C_{15}H_{22}O_4$) y 5 compuestos fenólicos: benzil β -D-glucopiranosido ($C_{13}H_{18}O_6$), ácido salicílico ($C_7H_6O_3$), p-hidroxiacetofenona ($C_8H_8O_2$) y dos de ellos son flavonoides: 3',4',5,7-tetrahidroxi-3,6,8-trimethoxy flavona ($C_{18}H_{16}O_9$), limocitrina ($C_{17}H_{14}O_8$). De Leo *et. al.* (84), caracterizó seis compuestos: eudesm-11 (13)-en-4 β , 9 β -diol, 5R, 16-dihidroxi-3-oxoisopimar-9(11)-eno, 15S, 16-dihidroxi-3-oxoisopimar-9(11)-eno, 1 α -hidroxi-7-oxo-iso-anhydrooplopanone, 10 α -hidroxi-11,13-dihidro-5-epi-psilostachyin, y 4 β -hidroxipseudoguaian-12,6-olida-4-O- β -D-glucopiranosido y 12 sesquiterpenos

conocidos. Camacho (3), relacionó al shiromool y coronopilina como los metabolitos responsables de la actividad insecticida y antibacteriana de la planta; la psilostachina es un antiascariosis y la damsina como un efectivo antitumoral y molusquicida (babosas).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el distrito de Ayacucho, ubicado políticamente en la provincia de Huamanga - región Ayacucho. Teniendo como centros de investigación el laboratorio de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) y el laboratorio de Toxicología de la Escuela de Farmacia y Bioquímica, ubicado en la Ciudad Universitaria de la (Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) y como lugar de colecta del material biológico:

- Larvas de *Culex quinquefasciatus*: pileta de almacenamiento de agua temporal ubicado a un costado de los laboratorios de la Escuela de Formación Profesional de Biología, Ciudad Universitaria (FCB-UNSCH) (Coordenadas: 13°8'45.04" S; 74°13'16.24" O; 2791 msnm) (Fig. 2).
- Hojas de la planta *Ambrosia arborescens* Mill "marco", recolectadas en el distrito de Vinchos (anexo de Anchaq-huasi), provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a 3151 msnm (Coordenadas 13°10'27.33" S; 74°12'10.58" O; 2761 msnm) (Fig. 3).



Figura 2. Lugar de colecta de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Pileta de almacenamiento de agua de los laboratorios de la Escuela de Biología, Ciudad Universitaria (FCB-UNSCH).

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de la planta *Ambrosia arborescens* Mill “marco, libres de plaguicidas y mantenidas naturalmente por los campesinos agricultores del distrito de Vinchos (anexo de Anchaq-huasi), provincia de Huamanga – Ayacucho (Fig. 3).

3.2.2. Muestra

5 Kg de hojas secas de la planta *Ambrosia arborescens* Mill “marco”, previamente identificadas en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2.3. Unidad de análisis

Larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*, recolectadas de la pileta de almacenamiento de agua temporal (Fig. 2).

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Colecta y mantenimiento del material biológico

a) Hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco“

Las hojas de la planta fueron recolectadas en horas de la mañana y cuidadosamente colocadas en bolsas de papel, etiquetadas con las características geográficas de la zona de recolección de la muestra para posteriormente transportarlas y almacenarlas en un ambiente apropiado para su secado correspondiente. Partes representativas de la planta fueron prensadas utilizando una prensa de madera portátil con la finalidad de llevar a cabo la identificación taxonómica.

El material vegetal una vez en el laboratorio de Zoología fue almacenado en un ambiente limpio, con buena ventilación y a temperatura ambiente hasta su secado completo. Previamente se procedió al lavado de las hojas de la planta con una solución de agua e hipoclorito de sodio (mezcla de 1000:1),

posteriormente fueron colocadas las hojas sobre papel absorbente limpio, cambiando el papel inicialmente a la hora y luego cada 24 horas y removiendo el vegetal para evitar su descomposición por un periodo de 15 días. La muestra desecada fue molida utilizando un mortero con su respectivo pilón y luego tamizado a través de un tambor cernidor N° 200 para homogenizar el diámetro de las partículas y permitir su posterior macerado.

b) Larvas de *Culex quinquefasciatus*

Las larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, fueron colectadas utilizando un *dipper* muestreador de 350 mL de capacidad. El material biológico colectado, fue trasladado hasta el laboratorio de Zoología (FCB, Ciudad Universitaria- UNSCH), utilizando para ello baldes de plástico de dos litros de capacidad con tapa hermética; una vez en el laboratorio las larvas fueron separadas por morfotipos y posteriormente se llevó a cabo la identificación taxonómica de los insectos y la separación de los ejemplares para las pruebas experimentales.

Las larvas seleccionadas de *Cx. quinquefasciatus* fueron mantenidas en una pecera de vidrio de cinco litros de capacidad (tamaño: 50 x 40 x 40 cm), conteniendo tres litros de agua procedente del criadero larval (pileta de almacenamiento de agua de los laboratorios de la Escuela de Biología. Fig. 2) mezclada con agua limpia en proporción 1:1, y acondicionada en la sala de investigación del laboratorio de Zoología a temperatura ambiente y un fotoperiodo de 14:10 (día-noche). Las larvas del mosquito fueron alimentadas con alimento para peces tropicales tipo hojuelas hasta alcanzar el III instar de desarrollo (promedio: 1,0 a 1,2 cm de tamaño), necesarias para las pruebas experimentales.

3.3.2.Preparación del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” y las diluciones para el bioensayo

El extracto fue preparado a partir de las hojas de la planta *A. arborescens* previamente secadas, molidas y pesadas. 60 g del tamizado de las hojas fue macerada en 200 mL de alcohol al 95% durante tres días en constante agitación; el extracto obtenido fue filtrado y destilado a presión reducida en un rotaevaporador a temperatura controlada de 40 °C, el producto filtrante final fue recogido en una botella de vidrio de color ámbar y almacenado en refrigeración a 4 °C, al residuo del filtrado se le añadió 200 mL de alcohol al 95% permitiendo su maceración por dos días a fin de lograr una mayor cantidad de producto extraíble. Se procedió en forma similar que el caso anterior, lográndose una cantidad adicional de extracto alcohólico. Finalmente ambos extractos fueron reunidos y el excedente del alcohol presente en la muestra fue evaporado utilizando un equipo de baño María a temperatura menor de 40 °C hasta llegar a una concentración alcohólica de un grado (igual a 0°).

A partir de la solución madre hidroalcohólica producida (60 000 mg/L), se prepararon cuatro diluciones de 2, 5, 8 y 11 mg/L del producto biocida, que fueron utilizados para realizar una prueba piloto, que consistió en evaluar el efecto tóxico en volúmenes diferentes de aplicación (1, 3, 5 y 10 mL), en recipientes y condiciones experimentales similares a las pruebas definitivas a las que fueron sometidas las larvas del mosquito.

Habiéndose determinado el rango de concentraciones y el volumen apropiado donde se logró la mayor mortalidad de larvas en la prueba piloto, se procedió a preparar las siguientes diluciones del producto biocida: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L, concentraciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes menores presentes en la dilución, con las cuales

fueron llevadas a cabo las pruebas de dosis mortalidad de larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus* (Ver Anexo 1).

3.3.3. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Obtenido 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 compuestos químicos (screening fitoquímico preliminar) a fin de relacionar la presencia de dichos componentes con las características biocidas de la planta. El análisis de los aceites esenciales y las sustancias hidroalcohólicas y su identificación correspondiente se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Miranda y Cuellar (77) y Lock (78) (Anexo 2). Para el tamizaje fitoquímico se contó con la colaboración de la Sección Química Orgánica Aplicada a la Farmacia del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quienes nos apoyaron en la confirmación de los componentes químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” (Anexo 3).

3.3.4. Evaluación de la actividad biocida de las diluciones del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Para este propósito los ensayos se realizaron en vasos plásticos descartables de 7,0 cm de ancho por 7,5 cm de alto (capacidad: 100 mL). La población de larvas de III estadio necesarias para el desarrollo de las pruebas fueron concentradas previamente en una bandeja plástica conteniendo agua limpia de clorada, utilizando una pipeta plástica (pipeta de Pasteur, Plastibrand®). Fueron separadas 10 larvas de III instar por vaso para cada una de las dosis a evaluar

(7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 y 10 mg/L), al que previamente se le añadió 95 mL de agua limpia de clorada y luego completada al volumen de 100 mL adicionándole cinco mililitros del producto biocida. Cada dosis fue evaluada por quintuplicado con su respectivo control tomando en cuenta las normas planteadas por la WHO (79) para este tipo de experimentos.

Las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo 24 horas después del inicio del experimento (80). Las larvas fueron declaradas muertas cuando no reaccionaron al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical (81). Se tomó en cuenta, por precaución, la lectura de mortalidad de larvas en el control que para el caso fue de cero, no siendo necesaria, por consecuencia, la corrección de la mortalidad a través de la fórmula propuesta por Abbott en 1925 (67).

3.3.5. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀), se utilizó el método de análisis Probit con la ayuda del paquete estadístico MINITAB 16. El método Probit nos permitió estimar el CL₅₀ ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia (67).

El método de 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 tóxico) y una variable dependiente (la respuesta = mortalidad) para una especie y a 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_{50}) (68).

3.4. Diseño de investigación

El diseño experimental fue adecuado a un factorial de A x B; donde A=larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*, B=diluciones del extracto hidroalcohólico.

3.5. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en las pruebas de capacidad biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" en el control de larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*, se calculó la mortalidad para cada dosis formulada a través de la aplicación de la siguiente ecuación:

a) Porcentaje de mortalidad larvaria

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

Con la finalidad de establecer si existen diferencias estadísticas en las mortalidades generadas en cada una de las dosis del producto biocida evaluado, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0,05$). En vista de haberse hallado significancia para la respuesta evaluada y a fin de determinar a qué concentración ocurrió la mayor mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus*, se procedió a realizar la prueba post hoc de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de 5% ($P \leq 0,05$), utilizando el procedimiento del paquete estadístico SPSS 15.

Adicionalmente se elaboraron cuadros y gráficos estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión de la mortalidad hallada en cada dosis de producto evaluado.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.

Concentración (mg/L)	Densidad larval inicial (No)	Mortalidad de larvas por repetición					\bar{x} mort.	% de mort.
		I	II	III	IV	V		
7,0	10	3	3	3	3	2	2,8	28
7,5	10	4	5	4	4	4	4,2	42
8,0	10	4	5	5	4	4	4,4	44
8,5	10	5	5	4	5	4	4,6	46
9,0	10	5	5	6	6	5	5,4	54
9,5	10	5	6	6	5	6	5,6	56
10,0	10	5	6	6	6	6	5,8	58

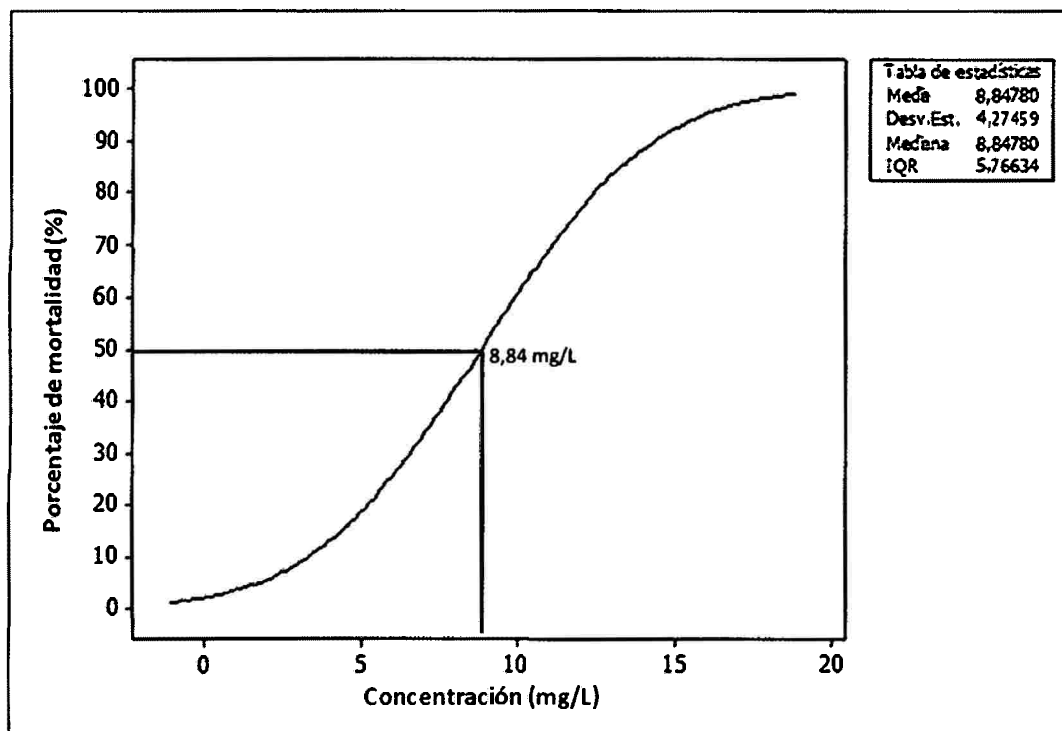


Figura 4. Concentración letal media (CL₅₀) del efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, en 24 horas de evaluación.

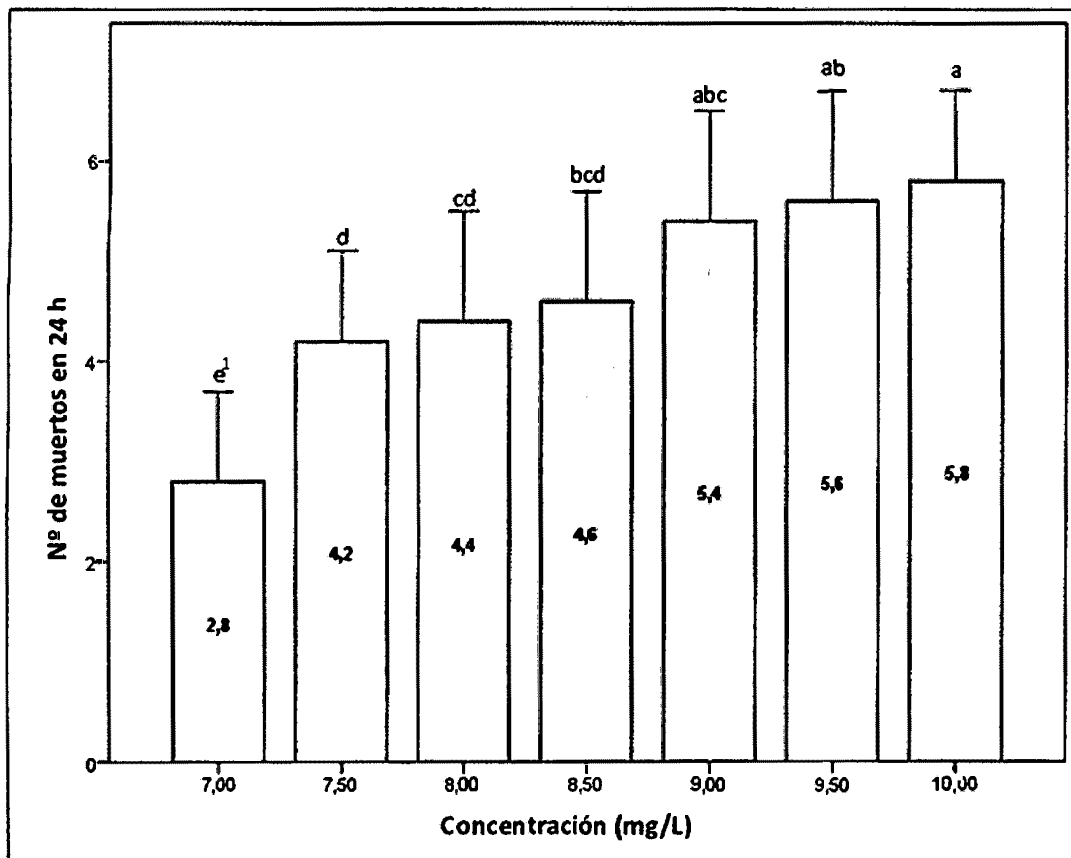


Figura 5. Mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* por concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco, a las 24 horas de evaluación.

¹ Medias signadas con letras diferentes en las columnas difieren entre sí por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" (Anexo 3).

Componentes químicos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	(+++)	Abundante
Triterpenos y esteroides	(++)	Moderado
Saponinas	(++)	Moderado
Compuestos fenólicos	(+)	Trazas
Taninos	(++)	Moderado
Aminoácidos libres	(+)	Trazas
Quinonas	(+)	Trazas
Lactonas sesquiterpénicas	(+)	Trazas
Glicósidos	(+++)	Abundante
Flavonoides	(++)	Moderado

V. DISCUSIÓN

La Tabla 1, reporta la mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* al ser sometido a distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* "marco". Según los resultados, podemos apreciar que la mortalidad larval alcanzó los máximos valores a partir de la concentración 7,5 a 10,0 mg/L del extracto evaluado, logrando eliminar entre el 42 al 58 % del total de larvas evaluadas por concentración.

Al efectuar el corte y realizar la interpolación en la recta de dosis mortalidad de Probit (Fig. 4), a fin de encontrar la respuesta y determinar la concentración del tóxico que pueda causar una mortalidad del 50 % de la población de larvas de *Culex quinquefasciatus* con un límite de confianza al 95%, la concentración letal media (CL₅₀) fue establecida en 8,84 mg/L de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* "marco", como la más recomendable para la población de larvas del mosquito culícido presente en la ciudad de Ayacucho.

En la literatura científica revisada y que circula al alcance de nuestra realidad, no se encuentran reportes precisos sobre qué concentración de la planta en estudio (*Ambrosia arborescens* "marco"), es la más recomendable en el control de insectos de importancia médica, sin embargo investigaciones recientes indican que algunos aceites esenciales (ej. monoterpenos) presentes en la planta,

estarían involucrados en el control de larvas de varios insectos, característica atribuible a la presencia del sistema octopaminérgico receptor de los monoterpenos presente en los insectos y blanco biorracional para su control (25). Trabajos desarrollados en otras realidades y con diferentes plantas, podrían ayudarnos a entender la aplicabilidad del control biocida de los extractos de origen vegetal comparativamente con los hallados en la presente investigación.

Por ejemplo, Ramos-Casilla *et al.* (26) al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que la concentración letal media (CL₅₀) fue equivalente a 20,39 ppm, en tanto que la concentración letal noventaicinco (CL₉₅) 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 sesquiterpenlactonas la actividad larvicida hallada. Al comparar con los resultados encontrados en la presente investigación, resulta que *Ambrosia arborescens* “marco”, alcanzó el CL₅₀ a una concentración menor (8,84 mg/L = 8,84 ppm/L) en 24 horas de evaluación, lo que resulta alentador y notablemente superior a los resultados reportados para el extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*. En este punto debemos indicar que tanto *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. 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 biocida estudiado, seguramente podría ser funcional para ambos grupos de insectos en la concentración propuesta.

Mariños *et al.* (27), al evaluar la capacidad biocida de *Lonchocarpus utilis* “barbasco” en una población de 7000 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 reportadas para *Lonchocarpus utilis* "cube o barbasco" y comparar con el efecto biocida del extracto de *Ambrosia arborescens* "marco" en la mortalidad generada en las larvas de los zancudos, podrían deberse a las condiciones como fueron evaluados ambos extractos; Mariños *et al.* (27), no demuestran con claridad como procedieron para establecer las concentraciones ideales para hallar las mortalidades reportadas, mucho menos reportan pruebas estadísticas que validen dichos resultados, por lo que resulta ser poco fiable la citada investigación para el análisis del efecto biocida que pretendemos demostrar.

Araujo *et al.* (54), 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, presentó actividad insecticida 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 transmisor del virus

del dengue y la fiebre amarilla, utilizaron concentraciones de 250 y 500 mg/L reportando una efectividad de 99 y 100 % de mortalidad.

Frente a los resultados reportados en las diferentes investigaciones tomadas en cuenta para la discusión y en las que se evaluó el efecto tóxico sobre los insectos, los resultados hallados en la presente investigación resultan ser muy alentadores, puesto que en todos los casos la concentración tóxica utilizada y que mató a un 50% de las larvas de los mosquitos culícidos expuestos en un periodo de 24 horas, es menor, lo que repercutiría en forma indirecta en la optimización de los recursos botánicos, ahorro de tiempo y dinero, que finalmente determinan el éxito de un producto en el control de insectos de interés médico.

La Figura 5, nos reporta los promedios de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* y los resultados del análisis de la prueba post hoc de comparación de medias de Tuckey ($P \leq 0,05$) en relación a cada una de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* "marco", evaluados. Según los resultados podemos apreciar que las mayores mortalidades (5,4 a 5,8 larvas muertas de 10 larvas sometidas a prueba en 24 horas evaluación), se alcanzó a las densidades de 9,0(abc) a 10,0 mg/L(a) del producto biocida evaluado. La prueba post hoc de comparación de medias de Tuckey ($P \leq 0,05$), pone de manifiesto a este nivel, que pese a encontrarse diferencias numéricas en las mortalidades generadas en las citadas concentraciones, estadísticamente son similares, es decir que no hay diferencias en el número de larvas muertas a partir de la concentración 9,0 mg/L e incluso pudiendo ser incluida en este análisis la concentración 8,5 mg/L(bcd). De este resultado podríamos afirmar, que si se quiere generar una mortalidad superior a 50 % de larvas de mosquitos culícidos en criaderos larvales naturales o

artificiales de la ciudad de Ayacucho, bastaría tan solamente con utilizar un volumen de 5 mL del producto biocida por cada 100 mL de agua contenida en un criadero larval a una concentración de 9,0 mg/L.

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta *Ambrosia arborescens* "marco" (Tabla 2), demuestra que los principales productos activos de la planta son los alcaloides y los glicósidos (+++), reportados como los más abundantes. Con moderada presencia (++) se documenta a los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. Otros compuestos son considerados como trazas.

La acción tóxica del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* "marco" sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, probablemente se deba a la presencia de los alcaloides, compuesto que muestra una estructura química variable, y que por definición se dice que son biomoléculas que posee un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de 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 (56). Muchas de estas moléculas son las que causan intoxicaciones en humanos y animales. 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 (82). 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 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 (57). 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*, observando 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 (58).

Biomoléculas más importantes que los glicósidos (azúcares substanciales en el metabolismo de la planta), resultan ser los triterpenos y esteroides cuando se analiza el efecto tóxico de las plantas, en caso de *Ambrosia arborescens* "marco, los triterpenos y esteroides están presentes en moderada cantidad(++), algunos de sus derivados representan al igual que los alcaloides productos que pueden desarrollar actividad tóxica en insectos y otros grupos de animales. Se tiene reportado por ejemplo que, los brassinoesteroides (triterpeno de 30 carbonos), es un componente de la membrana bajo la forma de fitoesteroles, algunas son fitoalexinas, varias son 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 (83).

Los esteroides y esteroles son producidos a partir de terpenos precursores. Se encuentra documentado, por ejemplo que ésteres de cianohidrina y ésteres de monoterpenoides, fueron probadas mediante aplicación por aspersion 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 monoterpénoides, 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 (41). La actividad insecticida y acaricida de monoterpénos 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 (53). Araujo *et al.* (54) 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, presenta actividad insecticida y determinaron que los componentes mayoritarios en el aceite esencial asociado a la actividad biofuncional fueron los monoterpénos; 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 %.

Es probable que en caso de la planta *Ambrosia arborescens* "marco, los triterpenos estén desarrollando acción sinérgica conjuntamente con los alcaloides para generar el efecto tóxico demostrado en larvas de *Culex*

quinquefasciatus presentes en los criaderos naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho.

Sin embargo, debemos mencionar que los aceites esenciales extraídos de las plantas como *Ambrosia arborescens* "marco, consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de los vegetales, que pueden estar localizados en pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal (25), 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 (39), por lo que el efecto tóxico demostrado en caso de *A. arborescens* "marco" 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 (45). Los aceites esenciales básicamente contienen monoterpenos (C10) (constituyen aproximadamente el 90 % de las mezclas) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y bioactividad característicos de la planta de la cual provienen (40). Estos aceites esenciales son sustancias ecoamigables al ser biodegradables y son fácilmente catabolizados en el ambiente (35). Asimismo, no persisten en el suelo y en el agua (36), y poseen baja o no toxicidad hacia vertebrados (peces, aves y mamíferos principalmente) (37). 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 (46, 44).

Finalmente, *Ambrosia arborescens* Mili "marco", además de ser reconocida en el departamento de Ayacucho por sus propiedades curativas y medicinales de uso folclórico y cultural para malestares estomacales e intestinales, mal funcionamiento de los ovarios entre otros atributos medicinales, se demostró en la presente investigación que tiene efecto biocida sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, además de actuar como repelente contra las garrapatas tal como lo reporta Vera (2), en el control de pulgas al colocar las ramas de la planta debajo de la cama para ahuyentarlas (74). También fue utilizado en el control de larvas de *Aedes aegypti* con débil efecto biocida (76). Camacho (3), relacionó al shiromool y coronopilina como los metabolitos responsables de la actividad insecticida y antibacteriana de la planta; la psilostachina es un antiascariosis y la damsina como un efectivo antitumoral y molusquicida en "babosas".

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* "marco", a un volumen de 5 mL por 100 mL de agua de criadero y a las concentraciones de 9,0 a 10,0 mg/L, tienen efecto biocida sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, produciendo una mortalidad de 54 a 58 % de la población larval, en condiciones de laboratorio.
2. En la concentración letal media (CL₅₀), 5 mL del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* "marco" a la concentración de 8,84 mg/L diluido en 100 mL de agua de criadero, demostró tener efecto biocida sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* produciendo una mortalidad de 50 % de larvas.
3. El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta *Ambrosia arborescens* "marco", demostró poseer alcaloides y glicósidos (+++), como los más abundantes. Moderada presencia(++) se reportó a los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. Otros compuestos fueron considerados como trazas. El efecto tóxico de la planta fue relacionada a los alcaloides, triterpenos, esteroides y a la complejidad de los metabolitos secundarios identificados.

VII. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo pruebas de biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las partes vegetativas de la planta *Ambrosia arborescens* "marco", por separado, a fin de establecer que parte de la planta resulta ser más tóxica y efectiva para el control de larvas de mosquitos e insectos de importancia médica.
2. Efectuar el estudio fitoquímico completo de la planta, a fin de determinar los principios activos que resultan ser los tóxicos responsables de estar generando la mortalidad larval en los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, y a partir de ella evaluar la posibilidad de su extracción y aislamiento a fin de establecer el efecto biotóxico en pruebas de laboratorio y campo.
3. Realizar un listado regional de plantas nativas con efecto biotóxico en insectos de importancia médica y agrícola, a fin de realizar el estudio fitoquímico preliminar y evaluar la toxicidad del extracto hidroalcohólico de las plantas sobre los insectos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomero OL. Uso de plantas con propiedades repelentes e insecticidas. En Arning I, Velázquez H. (eds.). Plantas con potencial biocida: metodologías y experiencias para su desarrollo. Gráfica Sttefany. Lima. 2000.
2. Vera S. Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: *Ambrosia arborescens* Sangolquí. [Tesis de pregrado]. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 2008.
3. Camacho VDP. Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de *Sambucus nigra* L., *Franseria artemisioides* W. y *Tagetes zipaquirensis* H. en *Ctenocephalides canis*. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2011. 95 pp.
4. Klein TA, Lima JB, Tada MS, Miller R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1991; 45: 463-470.
5. Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. Acta Tropica. 2011; 118: 37-44.
6. Miranda JEM, Navickiene HMD, Nogueira-Couto RH, De Bartolo S, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). Apidologie. 2003; 34: 409-415.
7. Lin CY, Wu DC, Yu JZ, Chen BH, Wang CL, Ko WH. Control of silverleaf whitefly, cotton aphid and kanzawa spider mite with oil and extracts from seeds of sugar apple. Neotropical Entomology. 2009; 38: 531-536.
8. OMS (Organización Mundial de la Salud). 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 (Serie de Informes Técnicos Nº 818). Ginebra. 1992.
9. Bazán-Calderón J, Ventura-Flores R, Kato MJ, Rojas-Idrogo C, Delgado-Paredes GE. Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). Anales de Biología. 2011; 33: 135-147.

10. 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.
11. Das NG, Goswami D, Rabha B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. Journal of Vector Borne Diseases. 2007; 44: 145-148.
12. Sánchez MC, González N, González E. Efecto larvicida de extractos acuosos vegetales sobre *Aedes aegypti*. Manejo Integrado de Plagas, 1997; 45: 30-33.
13. Choi W, Lee S, Park H, Anh Y. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(2): 553-558.
14. Papachristos DP, Stamopoulos DC. Repellent Toxic and Reproduction Inhibitory Effects of Essential Oils Vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 2002; 38(2): 117-128.
15. Peterson C, Ems-Wilson J. Catnip essential oil as a barrier to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Laboratory. J. Econ. Entomol. 2003; 96(4): 1275-1283.
16. Appel GA, Gehret MJ, Tanley MJ. Repellency and toxicity of mint oil granules to red imported fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(2): 575-580.
17. McQuate GT, Keum YS, Charmaine SD, Li QX, Eric BJ. Active ingredients in cade oil that synergize attractiveness of α -ionol to male *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(3): 862-870.
18. Zhang W, McAuslane HJ, Schuster DJ. Repellence of ginger oil to *Bemisia argenifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. J. Econ. Entomol. 2004; 97(4): 1310-1318.
19. Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley y Sons. New York, USA. 1988. 470 pp.
20. Negahban M, Moharrampour S, Sefidkon F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored product insects. J. Stored. Prod. Res. 2007; 43: 123-128.
21. Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA. Chemical composition of *Eucalyptus*

- spp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. Vet. Parasitol. 2010; 167: 1-7.
22. Rodríguez HC, Nieto D. Anonáceas con propiedades insecticidas. In: Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). A. Rebouças São Jose, I. Vilas Boas S., O. Magalhaes M. e T.N. Hojo R. (Eds). Bahia, Brasil. 1997. Pp. 229- 239.
 23. Rodríguez HC. Plantas contra plagas; potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Editado por la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. Texcoco, Estado de México. 2000. 133 pp.
 24. Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE, Gordillo-Martínez AJ. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. Polibotánica. [Internet]. 2010; 30: 193-238. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62114250012>.
 25. Espitia-Yanes CR. 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 posgrado]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2011. 61 pp.
 26. Ramos-Casilla F, Oraday-Cárdenas A, Rodríguez-Tovar ML, Verde-Star MJ, Flores-Suarez A, Ponce-García G. Efecto larvicida del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass, en *Aedes aegypti* (L.). Ciencia UANL; 2007, X(1): 25-28.
 27. Mariños C, Castro J, Nongrados D. Efecto biocida del "barbasco" *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos. Rev. peru. biol. 2004; 11(1): 87-94.
 28. Wan FH, Liu WX, Ma J, Guo JY. *Ambrosia artemisiifolia* and *A. trifida*, In Wan FX, Zheng XB, Guo JY (eds.), Biology and management of invasive alien species in agriculture and forestry. Science Press. Beijing, China. 2005. pp. 662-688.
 29. Weaver SE. Correlations among relative crop and weed growth stages. Weed Sci. 2003; 51: 163-170.
 30. Chalchat JC, Maksimovic ZA, Petrovic SD, Gorunovic MS. Chemical composition and antimicrobial activity of *Ambrosia artemisiifolia* L. J. Essential Oil Res. 2004; 16: 270-273.

31. Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ramírez-Valverde G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 2004; 20(1): 141-152.
32. Kvist LP, Alarcón D. Plantas tóxicas. *In: Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. L. de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, MJ. Macia, H. Balslev (eds.) Herbario QCA y Herbario AAU. Quito y Aarhus. 2008. Pp. 99-104.
33. Palá-Paúl J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género *Eryngium* L., en la península Ibérica. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal I (Botánica). Madrid, España. 2002. 269 pp.
34. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food. Microbiol.* 2004; 94: 223-253.
35. Zygadlo JA, Grosso NR. Comparative study of the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavor Frag. J.* 1995; 10: 113-118.
36. Misra G, Pavlostathis SG. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997; 47: 572-577.
37. Enan E, Beigler M, Kende A. Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors. *En: Proceedings of the International Symposium on Plant Protection*. Gent, Bélgica. 1998.
38. Stefanazzi N. Essential oils, an alternative tool for integrated handling of stored-grain pests. [Tesis de posgrado]. Universidad Nacional del Sur. Argentina. 2010.
39. Shaaya E, Rafaeli A. Essential oils as biorational insecticides-potency and mode of action. *En: Ishaaya, I., Naven, R., Horowitz, R. (Editores), Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer, Berlin, Alemania. 2007; 249-261.
40. Batish D, Singh H, Kohli R, Kaur S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manag.* 2008; 256: 2166-2174.
41. Peterson C, Tsao R, Egger LA, Coats JR. Insecticidal activity of cyanohydrin and monoterpenoid compounds. *Molecules.* 2000; 5: 648-654.
42. Rajendran S, Sriranjini V. Plant products as fumigants for stored product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 2008; 44: 126-135.

43. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88: 308-316
44. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 2006; 51: 45-66.
45. Feng R, Isman MB. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Experientia.* 1995; 51: 831-833.
46. 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.* 2002; 58: 1101-1106.
47. Dixon RA. Progress natural products and plant disease resistance. *Nature.* 2001; 411: 843-847.
48. 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.
49. Evans WC. *Farmacognosia*. Editorial Interamericana. 1991. 45: 692-714.
50. Eugenia-Maggi M. *Insecticidas naturales*. Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales. Agencia Córdoba. Ciencia-Unidad CEPROCOR. Colombia. 2004. Disponible en: <http://www.monografias.com>
51. Hammond DG, Rangel S, Kubo I. Volatile aldehydes are promising broad-spectrum postharvest insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2000; 48, 4410-4417.
52. 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.
53. <http://www.insectariumvirtual.com>
54. 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.
55. Rodríguez-Soana CR, Maynard DF, 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.

56. Oliva A, Kimudini MM, Wedge DE, Harries D, Hale AL, Aliotta G, Duke SO. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 890-896.
57. Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kou RY, Chang YC, Wu YC. New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*. 2000; 63, 746-748.
58. Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 1866-1870.
59. Harwood RF, James MT. *Entomología Médica y Veterinaria*. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 1987. 615 pp.
60. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. *Parasitology vector biology*. Second Edition. Academia Press. San Diego, California USA. 2000.
61. <http://es.wikipedia.org/wiki/Culicidae>
62. Ayala-Sulca YO. 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.
63. 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>
64. Ortuño TME. Determinación de la actividad biológica del extracto acuoso de saúco *Sambucus nigra* L. como repelente y/o insecticida en *Lasius niger* L.". [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Biológicas. Riobamba, Ecuador. 2011. 250 pp.
65. Lizana RDR. Elaboración y evaluación de extractos del fruto de *Melia azedarach* L. como insecticida natural. [Tesis de pregrado]. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. 2005. 96 pp.
66. Velásquez AL. 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.

67. Lagunes TA, Villanueva JJA. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. 1994. 257 pp.
68. Alonso FA. Cálculo de las concentraciones letales 50 (CL₅₀) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce (*Eulimno gammarustoletanus* y *Polycelis felina*). Universidad de Alcalá, Ecuador. [11 y 13 de febrero de 2014; acceso 17 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>
69. Mostacero LJ, Mejia CF. Taxonomía de fanerógamas peruanas. CONCYTEC. Editorial Liberta E.I.R.L. Lima. 1993. 602 pp.
70. Nesse RM, Williams G. *Ambrosia comun* en Página de ciencias. [Internet]. National Science Foundation y el College of Agriculture and Life Sciences de Cornell University. 1994. [Accesado el 02 de octubre del 2012]. Disponible en: <http://www.gardenmosaics.org>
71. <http://www.missouribotanicalgarden.org/>
72. Reynel RR. Plantas para Leña en el Sur-occidente de Puno. Proyecto arbolandino. Puno. 1988.
73. Arteta BMC. Etnobotánica de Plantas Vasculares en el Centro Poblado Llachón, Distrito Capachica, Departamento Puno, 2007 – 2008. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Perú. 2008. 68 pp.
74. Cruz A. Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), matico (*Aristiguetia glutinosa*) y marco (*Ambrosia arborescens*) para neo-fármaco. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2009.
75. Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectiva de desarrollo en la región Los Libertadores Wari. Agencia de Cooperación para la Agricultura (IICA). Proyecto IICA-GTZ "orientación de la investigación agraria hacia el desarrollo alternativo. 1999.
76. Orozco OL, Lentz DL. Poisonous plants and their uses as insecticides in Cajamarca, Perú in Economic Botany. [Internet]. 2005; 59(2): Enero:166-173. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1663%2F0013-0001%282005%29059%5B0166%3APPATUA%5D2.0.CO%3B2?LI=true#page-1>

77. Miranda MM, Cuellar CA. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. Universidad La Habana. La Habana-Cuba. 2000.
78. Lock de UO. Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. Lima. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima. 1994.
79. World Health Organization (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. Geneva, Switzerland. 1981. Pp. 6.
80. Bobadilla AM, Zavaleta G, Franco FG, Pollack L. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller "chirimoya" y *A. muricata* Linneaus "guanabana" sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. Rev. Peru. biol. 2002; 9: 64 -73.
81. Consoli R, Laureço de Oliveira R. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editorial Fiocruz. Brasil. 1998; 224 pp.
82. Robinson T. *The biochemistry of alkaloids*. Second edition. Springer-Verlag NewYork Inc. NewYork 10010, U.S.A.1981. 211 pp.
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. De Leo M, Vera SMB, Naranjo PBF, De Tommasi N, Braca A. Sesquiterpenes and diterpenes from *Ambrosia arborescen* en Phytochemistry. [Internet]. 2010; 71(7): 804-809. [Mayo del 2010; consulta 18 de marzo de 2014]. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=-62257797&sort=v&st=17&view=c&origin=related_art&panel=citeRelatedArt&acct=C000228598&version=1&urlVersion=0&userid=10&md5=28145e6ac4ad83d238a0b616022e0cf8&searchtype=a

ANEXOS

Anexo 1

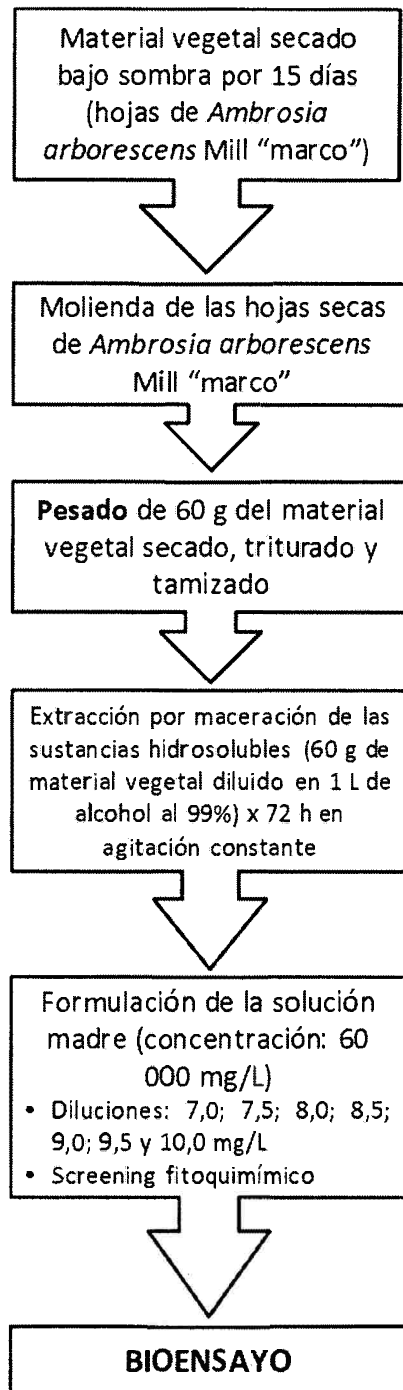


Figura 6. Secuencia de extracción de las sustancias hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" y preparación de las diluciones para el bioensayo.

Anexo 2

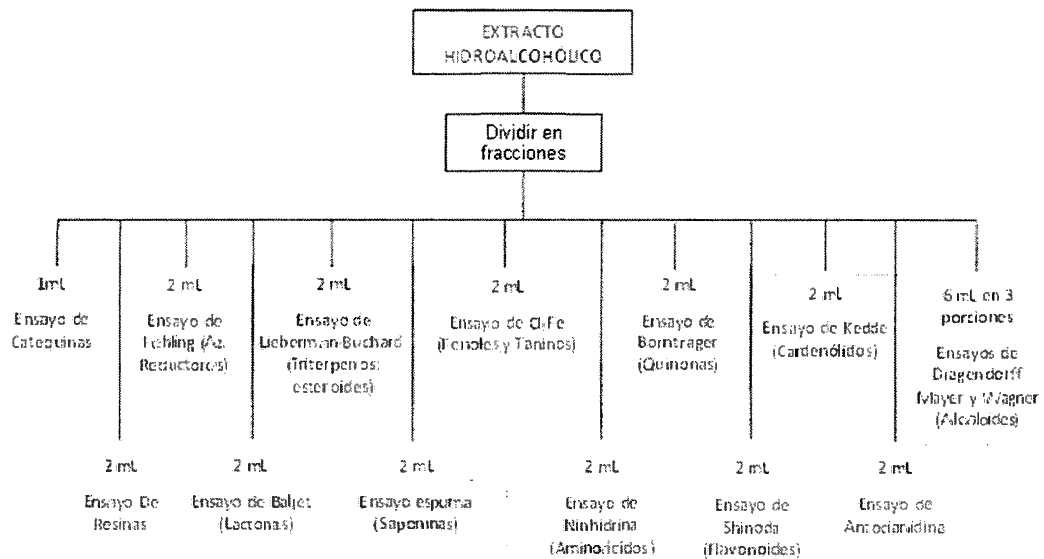



Figura 7. Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes hidroalcohólicos solubles presentes en las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar) (77, 78).

Anexo 3




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

INSTITUTO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y RECURSOS NATURALES+

SECCION QUIMICA ORGANICA APLICADA A LA FARMACIA

TAMIZAJE FITOQUIMICO




Muestra: Extracto hidroalcohólico

ANALITO	RESULTADOS
Alcaloides	+++
Triterpenos y Esteroides	++
Saponinas	++
Compuestos fenólicos	+
Taninos	++
Aminoácidos libre	+
Quinonas	+
Lactonas sesquiterpénicas	+
Glicósidos	+++
Flavonoides	++

Leyenda	(+)	(++)	(+++)	(-)
	Trazas	Cantidad moderada	Cantidad abundante	No detectable

Lima, 09 Septiembre del 2013


Q.F. Fritz Choquesillo Peña
 Jefe Laboratorio Terpenos y Esteroides




Figura 8. Tamizaje fitoquímico de los componentes hidroalcohólicos solubles presentes en las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco".

Anexo 4

Tabla 3. Análisis de varianza ($P \leq 0,05$) de la mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* en relación a la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco".

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Entre las dosis	32,343	6	5,390	20,963	0,000
Interacción dosis- mortalidad	7,200	28	0,257		
Total	39,543	34			

Anexo 5

Tabla 4. Prueba post hoc de Tuckey de comparación de medias ($P \leq 0,05$) de la mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* en relación a la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco".

Concentración (mg/L)	N	Subconjunto para alfa = 0,05				
		e	d	c	b	a
7,00	5	2,80				
7,50	5		4,20			
8,00	5		4,40	4,40		
8,50	5		4,60	4,60	4,60	
9,00	5			5,40	5,40	5,40
9,50	5				5,60	5,60
10,00	5					5,80
Sig.		1,000	0,869	0,056	0,056	0,869

Anexo 6

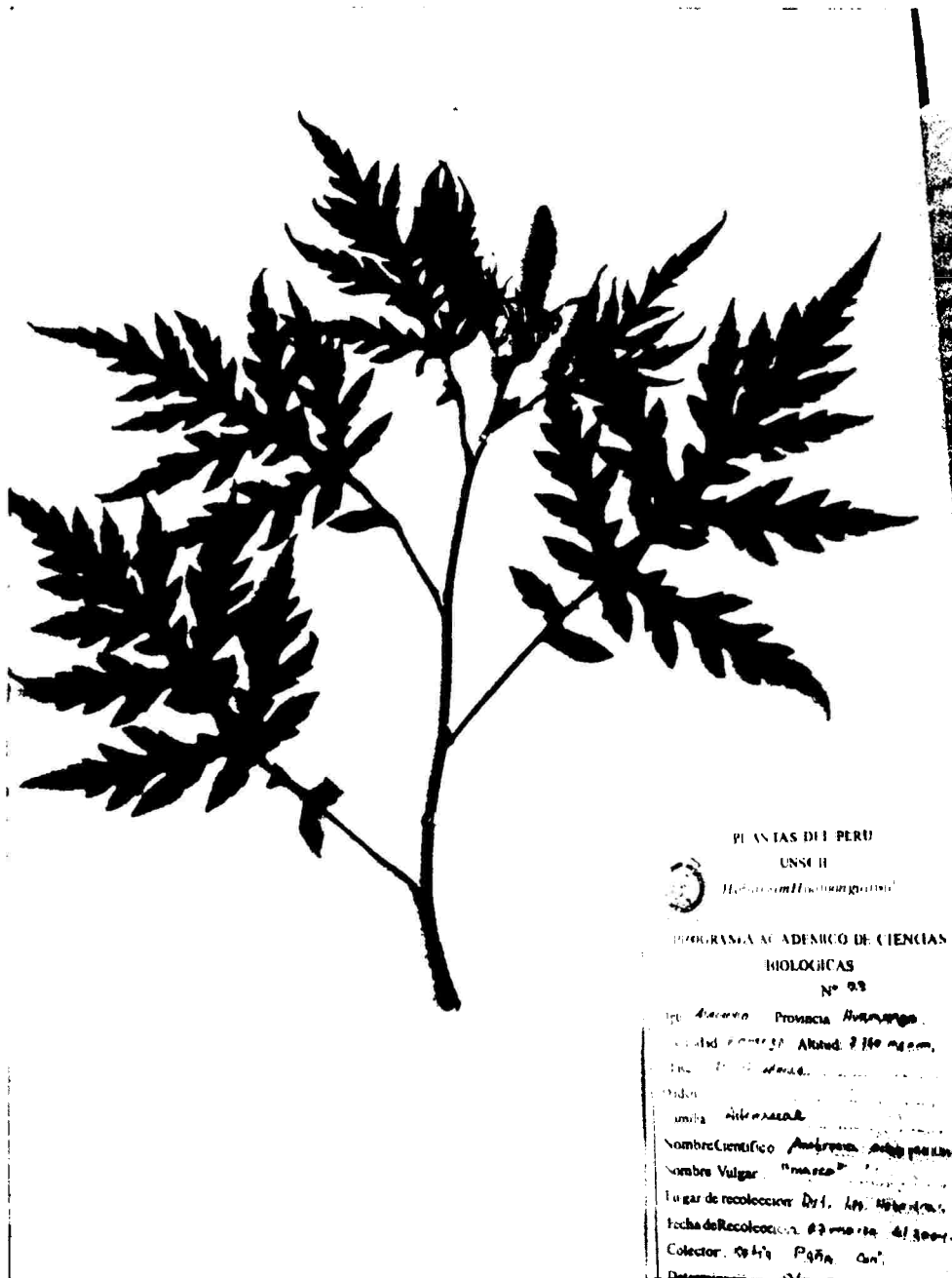


Figura 9. Caracterización botánica de la planta *Ambrosia arborescens* Mill "marco".
Herbarium Huamangensis. Laboratorio de Botánica. FCB-UNSC.

Anexo 7



Figura 10. Extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* (solución madre).

Anexo 8

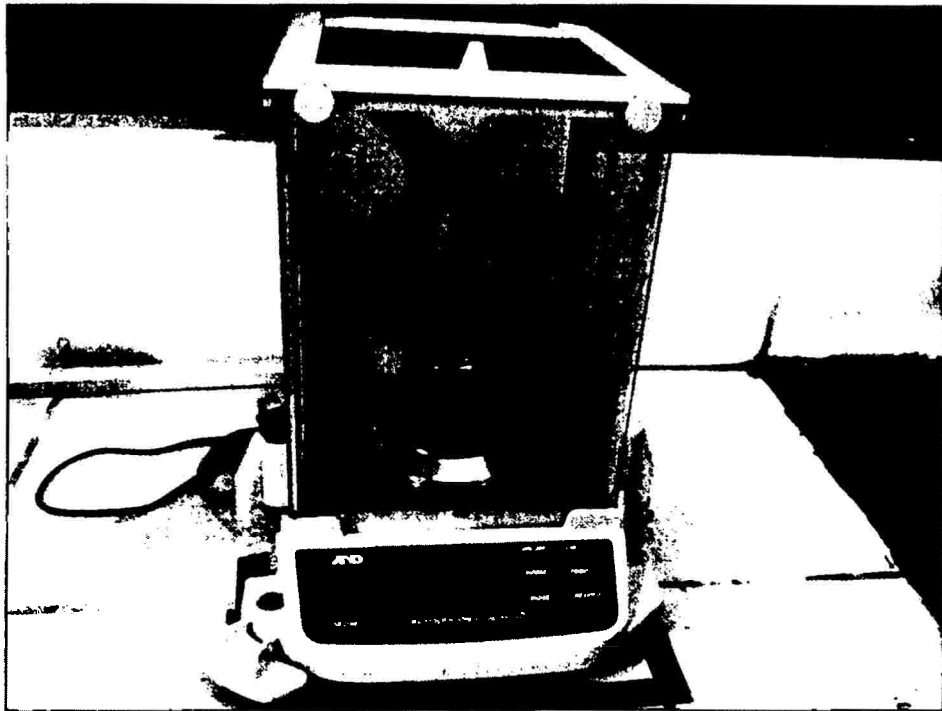


Figura 11. Pesado de la solución madre del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* para la preparación de las diluciones experimentales.

Anexo 9

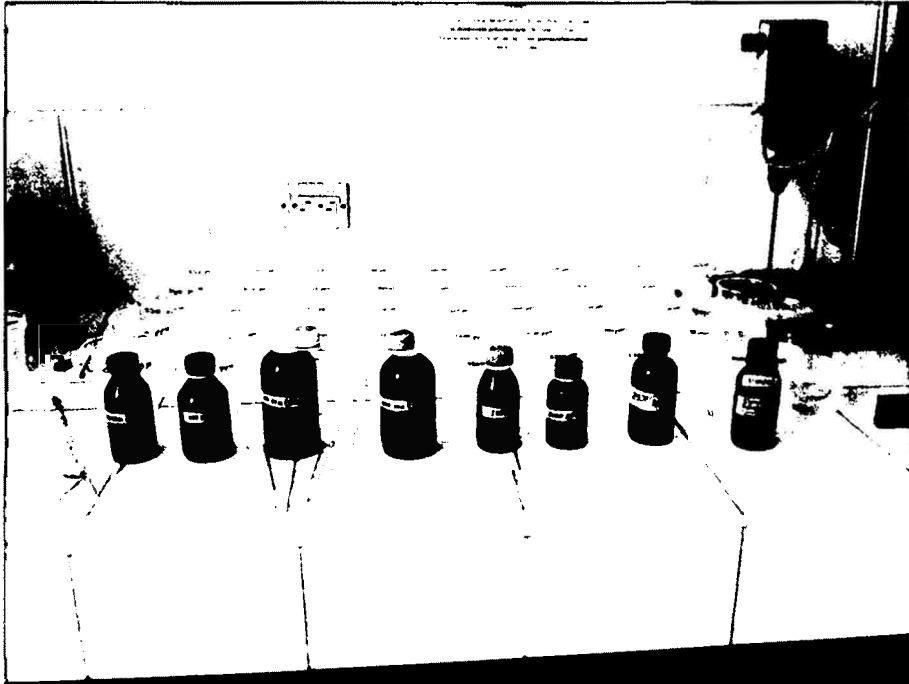


Figura 12. Diluciones del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens*, listas para los ensayos de biotoxicidad.

Anexo 10



Figura 13. Pruebas de biotoxicidad del extracto de *Ambrosio orborescens*.

Anexo 11

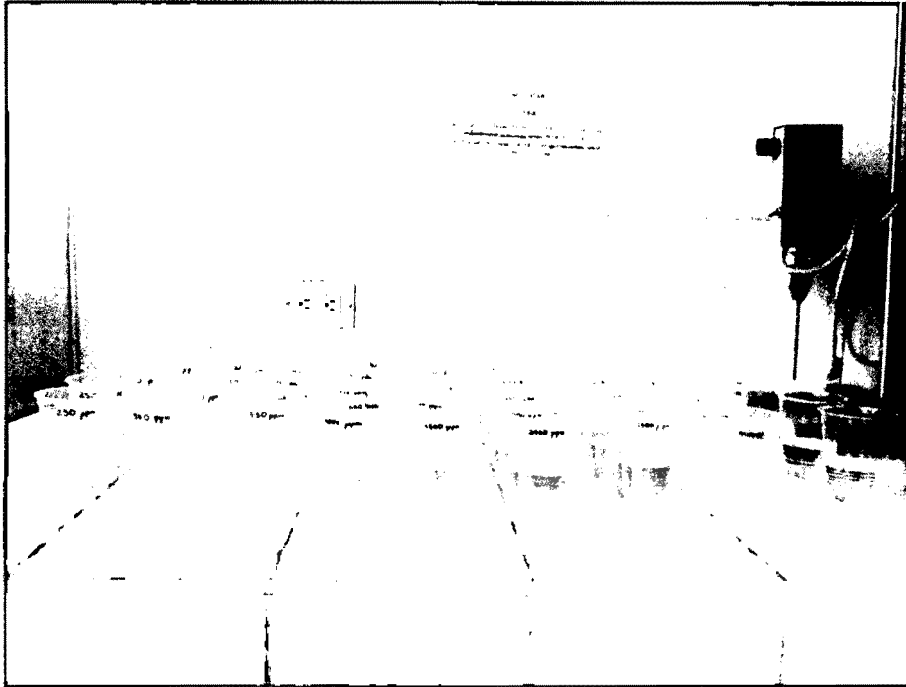


Figura 14. Vasos experimentales conteniendo larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Anexo 12

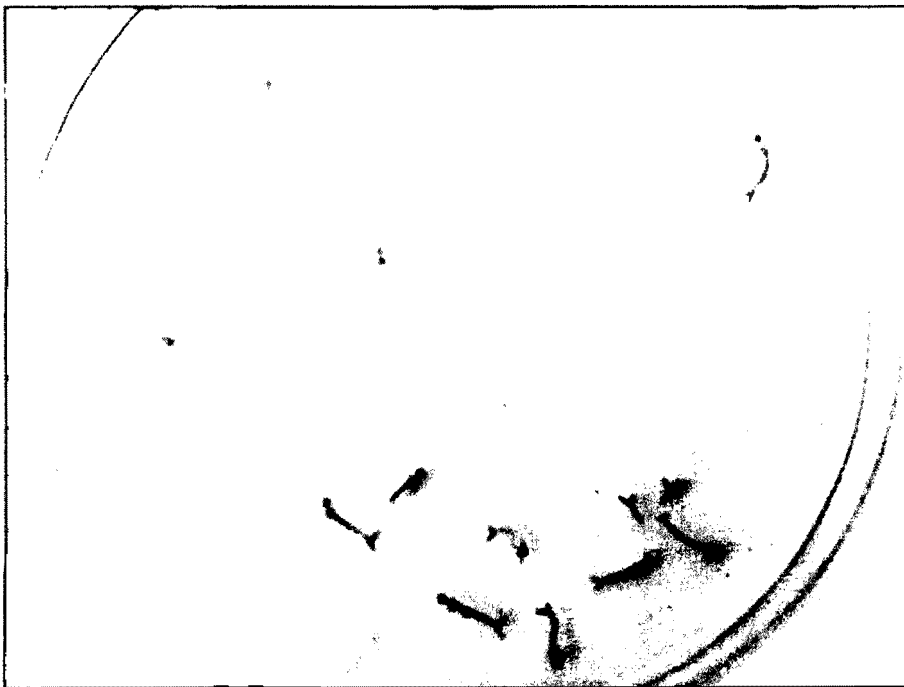


Figura 15.- Recuento de la mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Anexo 13

Tabla 5. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA	MARCO TEÓRICO
<p>Problema principal: ¿Cuál será la actividad biocida del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> "marco" (Fam. Asteraceae) sobre larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae), en condiciones de laboratorio?</p>	<p>Objetivo general: Evaluar el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" (Fam. Asteraceae) en larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Objetivos específicos: a) Determinar la actividad biocida de las diluciones: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco", estableciendo el promedio y porcentaje de mortalidad de larvas de III instar del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> a las 24 horas de iniciado el experimento, en condiciones de laboratorio. b) Establecer la concentración letal media (CL₅₀) del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco", mediante la prueba de análisis Probit a las 24 horas, evaluando la mortalidad de larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i>. c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" (Fam. Asteraceae) a fin de establecer las características químicas del producto biocida.</p>	<p>Las diluciones formuladas a partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill (Fam. Asteraceae) desarrollan actividad biocida en el control de larvas de III instar del mosquito <i>quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.</p>	<p>Variable independiente: Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> "marco" Indicador: • Concentraciones: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L. • Concentración letal media (CL₅₀) Variable dependiente: Larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> <u>Indicadores</u> • Número de larvas muertas en 24 horas • Número de larvas muertas a la concentración letal media (CL₅₀)</p>	<p>Tipo de investigación: Aplicativo Nivel de investigación: Básica experimental Método: Aplicativo y analítico Diseño: El diseño experimental fue adecuado a un factorial de A x B; donde A=larvas de III instar de <i>Culex quinquefasciatus</i>, del B=diluciones del extracto hidroalcohólico. Muestreo: Aleatorio Técnicas: Observación Determinación Experimentación Instrumentos: Estereoscopio Microscopio Cámara digital Computadora laptop GPS</p>	<p>El uso de insecticidas sintéticos en el control de mosquito ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia (4, 5), efectos indeseables sobre los organismos (6) e impactos negativos en el ambiente (7). En América se demostró la resistencia en especies como <i>Anopheles albimanus</i>, <i>An. pseudopunctipennis</i>, <i>An. darlingi</i> y <i>An. vestitipennis</i> a carbamatos, piretroides y organofosforados; éste último grupo químico es responsable de la resistencia en más de veinte especies de mosquitos a nivel mundial (8). Frente a este panorama, los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, son consideradas alternativas válidas sobre los plaguicidas sintéticos convencionales en el control de insectos (9, 10). En la presente investigación proponemos el uso del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill "marco" para el control de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>, mosquito importante en la transmisión de las filariosis, encefalitis, entre otras, cada año (11).</p>

Actividad biocida del extracto hidroalcohólico de hojas de *Ambrosia arborescens* Mili “marco” sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Kleiny Shoumara FLORES CISNEROS ¹ Yuri Olivier AYALA SULCA ²

- 1 Área Académica de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- 2 Área Académica de Ecología y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

Los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, son alternativas válidas para el control de insectos de importancia médica en substitución 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 biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” (Fam. Asteraceae) en larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. La metodología consistió en preparar un extracto hidroalcohólico de las hojas de *A. arborescens* (60 000 mg/L), a partir del cual se produjeron las siguientes diluciones: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 mg/L, concentraciones las cuales se evaluó la mortalidad bajo condiciones ambientales, en 10 larvas de *Cx. quinquefasciatus* colocadas en vasos descartables conteniendo 95 mL de agua limpia de clorada y 5 mL del producto biocida. Cada dosis fue evaluada en quintuplicado con su respectivo control. Las lecturas se llevaron a cabo luego de 24 horas. Se calculó la concentración letal media (CL₅₀) 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. Mortalidades de 54 a 58 % de larvas son reportadas a las concentraciones de 9,0 a 10,0 mg/L del extracto hidroalcohólico a un volumen de 5 mL en 100 mL de agua de criadero, estadísticamente similares según la prueba de comparación de medias de Tuckey (P < 0,05). La concentración letal media (CL₅₀) fue establecida en 8,84 mg/L, reportándose a los alcaloides y los glicosidos (+++), como los más abundantes. Con moderada presencia (++) los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. El efecto tóxico de la planta probablemente esté relacionada a la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos y esteroides y a la complejidad de los productos trazas.

Palabras claves: Concentración letal media, extracto hidroalcohólico, *Culex quinquefasciatus*, *Ambrosia arborescens*.

SUMMARY

Natural products of plant origin with insecticidal activity, are valid alternatives for the control of insects of medical importance in substitution of conventional synthetic pesticides, since they do not generate resistance, undesirable effects on organisms and negative impacts on the environment. The aim of this investigation was to evaluate the biocidal effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Ambrosia arborescens* Mill "frame" (Fam Asteraceae.) III instar larvae of mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. The methodology was to prepare hydroalcoholic extract of the leaves of *A. arborescens* (60,000 mg / L), from which the following dilutions occurred: 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 and 10.0 mg / L, concentrations which mortality was evaluated under ambient conditions at 10 larvae of *Cx. quinquefasciatus* placed in disposable cups containing 95 mL of clean dechlorinated water and 5 mL of biocidal product. Each dose was tested in quintuplicate with level control. The readings were performed after 24 hours. The median lethal concentration (LC50) was calculated by the method of probit analysis and preliminary phytochemical screening to determine the chemical composition of water-alcohol substances in the plant. Mortalities of 54% to 58% of larvae are reported at concentrations of 9.0 to 10.0 mg / L of the hydroalcoholic extract to a volume of 5 mL in 100 mL of water hatchery, statistically similar according to the comparison of means test Tukey (P < 0.05). The median lethal concentration (LC50) was established at 8.84 mg / L, reporting to the alkaloids and glycosides (+++) as most abundant. With moderate presence (++) triterpenes, steroids, saponins, tannins and flavonoids. The toxic effect of the plant is likely related to the synergistic activity of alkaloids, triterpenes and steroids and complexity of the products you trace.

Keywords: Lethal concentration, hydroalcoholic extract, *Culex quinquefasciatus*, *Ambrosia arborescens*.

PRODUCCIÓN

Búsqueda de nuevas alternativas y compuestos biológicamente 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 e insectos vectores. El uso de aceites esenciales de las plantas para el control de mosquitos, están enfocadas a encontrar especies con alto potencial para la eliminación de larvas de mosquitos para poder complementar estrategias de control y manejo integrado de mosquitos, haciendo un mejor uso de los recursos naturales y reducir el uso de los insecticidas sintéticos (1). En los últimos años, los aceites esenciales se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga (2), por ejemplo, se han experimentado en ácaros (3) e insectos, principalmente dípteros (4), isópteros (5), himenópteros (6), coleópteros (7) y homópteros (8) con notables y significativos resultados. Grainge y Ahmed (9), mencionan que las plantas y sus derivados, han mostrado actividad biocida en ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos, entre éstos los mosquitos de la familia Culicidae, grupo en el que se encuentran *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, entre otros.

Diversos autores han demostrado las actividades biocidas de los aceites esenciales del género *Xylocopa* contra *Sitophilus oryzae* (10). Asimismo, los aceites esenciales de tres especies del género, *Xylocopa stangeriana*, *E. citriodora*, y *E. globulus*, muestran actividad insecticida relevante frente a los huevos, larvas y adultos de *Lutzomyia longipalpis*, un mosquito díptero transmisor de la leishmaniasis (11).

Entre las plantas que han mostrado notable efecto sobre las larvas de mosquitos se encuentra el género *Annona*, como *A. bullata* (Rich), *A. densicoma* (Mart.), *A. brasiliensis* (L.), *A. muricata* (L.) y *A. squamosa* (L.), así como las larvas de mosquito *Aedes aegypti* (L.) y *Anopheles* spp. De estas plantas se han extraído nueve principios activos pertenecientes a las acetogeninas y a los alcaloides, los cuales se encuentran principalmente en la corteza y la semilla; aunque también se han encontrado en la raíz, el fruto y en la hoja. Los solventes que se han utilizado para la extracción de los principios activos han sido varios: agua, etanol, acetona, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo y hexano, lo que denota que varias sustancias activas se encuentran inmiscuidas en esta actividad, desde las muy volátiles que se extraen con agua hasta las no volátiles que se extraen con hexano (12, 13).

El tagetón mexicano (*Tagetes lucida*) tiene amplias aplicaciones en América Latina debido a sus propiedades plaguicidas y nematocidas. Por ejemplo, la combustión de la planta se utiliza artesanalmente en las zonas rurales de México para la fumigación de casas y para ahuyentar moscas y mosquitos: *Culex* sp., *Aedes* sp., *Anopheles* sp. (orden: Culicidae) (14). De hecho, la actividad biocida contra mosquitos es la más importante, y la que ha sido estudiada en mayor extensión: compuestos fenólicos aislados de los aceites esenciales de la planta son altamente efectivos, por ejemplo, el 5E-metilenoneno 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 (LD₅₀) en contra de larvas de *Anopheles stephensi* (concentraciones entre 43 y 58 ppm) (15).

Ramos-Casilla *et al.* (16) al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que a la concentración letal media (CL₅₀) equivalente a 20,39 ppm y a la concentración letal noventaicinco (CL₉₅) equivalente a 41,64 ppm, después de 24 horas de evaluación obtuvieron buen efecto larvicida sobre los estadios 3º tardío y 4º 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* mostraron tener efecto larvicida para *Anopheles gambiae*, *Spodoptera exigua* y *Bombix mori*; aislándose del fruto inmaduro el 1, 2, 4, trihidroxihexadeca-16-ino de actividad tóxica para larvas de *Aedes aegypti*, resultando ser éste compuesto más potente que la rotenona.

Mariños *et al.* (17) realizaron siete 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 de 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 % y 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 fue 93 y 90%.

El género *Ambrosia*, perteneciente a la familia Asteraceae, contiene cerca de 35 a 40 especies de plantas herbáceas muchas de ellas con alto potencial biocida entre las que se encuentra *Ambrosia arborescens* Mill "marco", por lo que es considerada como una maleza nociva anual, originaria de América del Norte (18). Invade los campos de cultivo y reduce la productividad de estos (19). Es utilizado como té en el tratamiento de la neumonía, fiebre, náuseas, calambres intestinales, diarrea y trastornos menstruales. La composición química de los aceites esenciales de la planta *Ambrosia* ha sido estudiada en los últimos años y recientemente se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como la ambrosina, compuestos fenólicos, isabelina, lactonas, psilostachyna y sesquiterpenos (20).

Estudios llevados a cabo por Pérez-Pacheco *et al.* (21), demostraron que el extracto acuoso de la planta *Ambrosia artemisiifolia* no tiene efecto larvicida en el control de *Culex quinquefasciatus* Say, a las dosis de 5, 15 y 25%. No obstante, Kvist y Alarcón (22) reportaron 75 registros de plantas con propiedades insecticidas en Ecuador, entre las que resaltaron varias

ecies de *Ambrosia*, utilizado principalmente para ninar pulgas y diversas especies de escarabajos. Investigaciones recientes indican que algunos aceites esenciales presentes en las plantas (Ej. *Ambrosia arborescens* Mill motivo de la presente investigación) en particular, los monoterpenos presentes en plantas la Fam. Asteraceae, actúan sobre los receptores de la opamina, lo cual los convierte en productos altamente selectivos dado que este tipo de receptores está presente en los vertebrados. De esta manera, el sistema octopaminérgico presente en los insectos se convierte en un blanco biorracional para su control, por lo que su uso en el control de larvas de insectos resulta una alternativa viable (15).

Los mosquitos constituyen un grupo de insectos de gran importancia, debido a que muchas de sus especies, además de causar diversas molestias, son vectores de patógenos para los humanos, como por ejemplo la malaria y el dengue. Su control se ha efectuado tradicionalmente con insecticidas organosintéticos, los cuales han ocasionado daños al ambiente, intoxicado a personas expuestas y desarrollo de resistencia en los insectos. En respuesta a esta problemática se considera necesaria la búsqueda de alternativas de solución con bajos riesgos, ambiental y bajos costos económicos, como el uso de los extractos vegetales; uno de los métodos de control más antiguos de plagas de insectos (16), planteándonos como objetivo principal evaluar el efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" en el control de las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y muestra

Obtención

Las hojas de la planta *Ambrosia arborescens* Mill "marco", especie de plaguicidas y mantenidas naturalmente por los campesinos agricultores del distrito de Vinchos (anexo Anchaq-huasi), provincia de Huamanga – Ayacucho se obtuvieron de la siguiente manera:

Se tomaron 100 g de hojas secas de la planta *Ambrosia arborescens* Mill "marco".

Preparación de la muestra

Se tomaron 100 g de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Metodología y recolección de datos

Obtención y mantenimiento del material biológico

Hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco"

Las hojas de la planta fueron recolectadas en horas de la mañana y cuidadosamente colocadas en bolsas de plástico, etiquetadas con las características geográficas de la zona de recolección de la muestra para posteriormente transportarlas y almacenarlas en un ambiente apropiado para su secado correspondiente. Las muestras representativas de la planta fueron prensadas utilizando una prensa de madera portátil con la finalidad de llevar a cabo la identificación taxonómica. El material vegetal una vez en el laboratorio de metodología fue almacenado en un ambiente limpio, con

buena ventilación y a temperatura ambiente hasta su secado completo. Previamente se procedió al lavado de las hojas de la planta con una solución de agua e hipoclorito de sodio (mezcla de 1000:1), posteriormente fueron colocadas las hojas sobre papel absorbente limpio, cambiando el papel inicialmente a la hora y luego cada 24 horas y removiendo el vegetal para evitar su descomposición por un periodo de 15 días. La muestra desecada fue molida utilizando un mortero con su respectivo pilón y luego tamizado a través de un tambor cernidor N° 200 para homogenizar el diámetro de las partículas y permitir su posterior macerado.

b) Larvas de *Culex quinquefasciatus*

Las larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, fueron colectadas utilizando un *dipper* de 350 mL de capacidad. El material biológico colectado, fue llevado al laboratorio, utilizando baldes de plástico de dos litros de capacidad con tapa hermética; una vez en el laboratorio las larvas fueron separadas por morfotipos y posteriormente se hizo la identificación taxonómica separando los mejores ejemplares para las pruebas experimentales.

Las larvas seleccionadas de *Cx. quinquefasciatus* fueron mantenidas en una pecera de vidrio de cinco litros de capacidad (tamaño: 50 x 40 x 40 cm), conteniendo tres litros de agua procedente del criadero larval (pileta de almacenamiento) mezclada con agua potable clorada en proporción 1:1, y acondicionada a temperatura de 27°C, humedad relativa de 75% y un fotoperiodo de 14:10 (día-noche). Las larvas del mosquito fueron alimentadas con alimento para peces tropicales tipo hojuelas hasta alcanzar el III instar de desarrollo (tamaño promedio: 1,0 a 1,2 cm), necesarias para las pruebas experimentales.

Preparación del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" y las diluciones para el bioensayo

El extracto fue preparado a partir de las hojas de la planta *A. arborescens* previamente secadas, molidas y pesadas. 60 g del tamizado de las hojas fue macerada en 200 mL de alcohol al 95% durante tres días en constante agitación; el extracto obtenido fue filtrado y destilado a presión reducida en un rotaevaporador a temperatura controlada de 40 °C, el producto filtrante final fue recogido en una botella de vidrio de color ámbar y almacenado en refrigeración a 4 °C, al residuo del filtrado se le añadió 200 mL de alcohol al 95% permitiendo su maceración por dos días a fin de lograr una mayor cantidad de producto extraíble. Se procedió en forma similar que el caso anterior, lográndose una cantidad adicional de extracto alcohólico. Finalmente ambos extractos fueron reunidos y el excedente del alcohol presente en la muestra fue evaporado utilizando un equipo de baño María a temperatura menor de 40 °C hasta llegar a una concentración alcohólica de grado cero.

A partir de la solución madre hidroalcohólica producida (60 000 mg/L), se prepararon cuatro diluciones de 2, 5, 8 y 11 mg/L del producto biocida, que fueron utilizados para realizar una prueba piloto,

consistió en evaluar el efecto tóxico en volúmenes crecientes de aplicación (1, 3, 5 y 10 mL), en diferentes condiciones experimentales similares a las pruebas definitivas, determinándose el rango de concentraciones y el volumen apropiado donde se logró mayor mortalidad de larvas, posteriormente se decidió a preparar las siguientes diluciones del extracto biocida: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 y 10,0 µg/L, concentraciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes tóxicos presentes en la dilución, con las cuales fueron sometidas a cabo las pruebas de dosis mortalidad de larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*.

Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Con el fin de identificar los aceites esenciales y demás sustancias químicas solubles presentes en las hojas de la planta, se llevó a cabo la identificación de los compuestos químicos (screening fitoquímico preliminar) a fin de relacionar la presencia de dichos compuestos con las características biocidas de la planta. El análisis de los aceites esenciales y las sustancias hidroalcohólicas y su identificación correspondiente se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Miranda y Cuellar (23) y Kaur (24). Para el tamizaje fitoquímico se contó con la colaboración de la Sección Química Orgánica Aplicada de la Farmacia del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Químicas Naturales de la Facultad de Farmacia y Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quienes nos apoyaron en la confirmación de los componentes químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”.

Evaluación de la actividad biocida de las diluciones del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* Mill “marco”

Para este propósito los ensayos se realizaron en vasos descartables de 7,0 cm de ancho por 7,5 cm de alto (capacidad: 100 mL). La población de larvas de III instar necesarias para el desarrollo de las pruebas fueron concentradas previamente en una bandeja petri conteniendo agua potable de clorada, utilizando una pipeta plástica (pipeta de Pasteur Plastibrand®). Se separaron 10 larvas de III instar por vaso para cada una de las dosis a evaluar (7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 y 10 µg/L), al que previamente se le añadió 95 mL de agua potable de clorada y luego completada al volumen de 100 mL adicionándole cinco mililitros del producto biocida. Cada dosis fue evaluada por quintuplicado con el respectivo control tomando en cuenta las normas establecidas por la WHO (25) para este tipo de experimentos.

Las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo 24 horas después del inicio del experimento (26). Las larvas fueron declaradas muertas cuando no reaccionaron al intento de ser tocadas con un puntero romo en la zona cervical (27). Se tomó en cuenta, por precaución, la lectura de mortalidad de larvas en el

control que para el caso fue de cero, no siendo necesaria, por consecuencia, la corrección de la mortalidad a través de la fórmula propuesta por Abbott en 1925 (28).

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀), se utilizó el método de análisis Probit con la ayuda del paquete estadístico MINITAB 16. El método Probit nos permitió estimar el CL₅₀ ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia (28). Es un tipo particular de regresión lineal que tiene como objetivo conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de tóxico) y una variable dependiente (la respuesta = mortalidad) para una especie y a 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 (CL₅₀) (29).

Diseño de investigación

El diseño experimental fue adecuado a un factorial de A x B; donde A=larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*, B=diluciones del extracto hidroalcohólico.

Análisis de datos

Con los datos obtenidos en las pruebas de capacidad biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill “marco” en el control de larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*, se calculó la mortalidad para cada dosis formulada a través de la aplicación de la siguiente ecuación:

a) Porcentaje de mortalidad larvaria

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

Con la finalidad de establecer si existen diferencias estadísticas en las mortalidades generadas en cada una de las dosis del producto biocida evaluado, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza ($P < 0,05$). En vista de haberse hallado significancia para la respuesta evaluada y a fin de determinar a qué concentración ocurrió la mayor mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus*, se procedió a realizar la prueba post hoc de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de 5% ($P < 0,05$), utilizando el procedimiento del paquete estadístico SPSS 15.

Adicionalmente se elaboraron cuadros y gráficos estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión de la mortalidad hallada en cada dosis de producto evaluado.

RESULTADOS

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.

Concentración (mg/L)	Densidad larval Inicial (No)	Mortalidad de larvas por repetición					\bar{x} mort.	% de mort.
		I	II	III	IV	V		
7,0	10	3	3	3	3	2	2,8	28
7,5	10	4	5	4	4	4	4,2	42
8,0	10	4	5	5	4	4	4,4	44
8,5	10	5	5	4	5	4	4,6	46
9,0	10	5	5	6	6	5	5,4	54
9,5	10	5	6	6	5	6	5,6	56
10,0	10	5	6	6	6	6	5,8	58

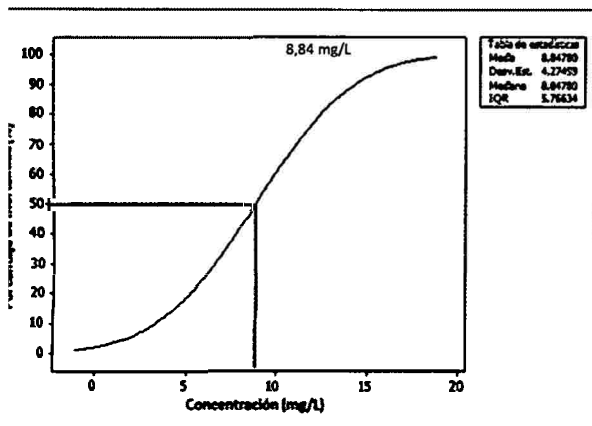


Figura 1. Concentración letal media (CL₅₀) del efecto biocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, en 24 horas de evaluación.

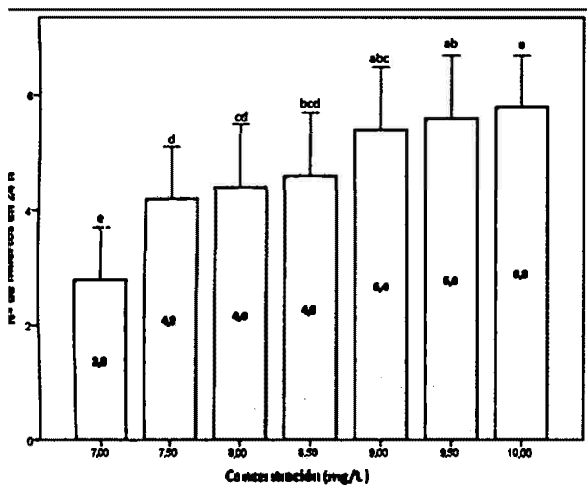


Figura 2. Mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* por concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco", a las 24 horas de evaluación.

Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* Mill "marco".

Componentes químicos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	(+++)	Abundante
Triterpenos y esteroides	(++)	Moderado
Saponinas	(++)	Moderado
Compuestos fenólicos	(+)	Trazas
Taninos	(++)	Moderado
Aminoácidos libres	(+)	Trazas
Quinonas	(+)	Trazas
Lactonas sesquiterpénicas	(+)	Trazas
Glicósidos	(+++)	Abundante
Flavonoides	(++)	Moderado

DISCUSIÓN

La Tabla 1, reporta la mortalidad de las larvas de *Culex quinquefasciatus* al ser sometido a distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* "marco". Según los resultados, podemos apreciar que la mortalidad larval alcanzó los máximos valores a partir de la concentración 7,5 a 10,0 mg/L del extracto evaluado, logrando eliminar entre el 42 al 58 % del total de larvas evaluadas por concentración.

Al efectuar el corte y realizar la interpolación en la recta de dosis mortalidad de Probit (Fig. 1), a fin de encontrar la respuesta y determinar la concentración del tóxico que pueda causar una mortalidad del 50 % de la población de larvas de *Culex quinquefasciatus* con un límite de confianza al 95%, la concentración letal media (CL₅₀) fue establecida en 8,84 mg/L de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* "marco", como la más recomendable para la población de larvas del mosquito culicido presente en la ciudad de Ayacucho.

En la literatura científica revisada y que circula al alcance de nuestra realidad, no se encuentran reportes precisos sobre qué concentración de la planta en estudio (*Ambrosia arborescens* "marco"), es la más recomendable en el control de insectos de importancia médica, sin embargo investigaciones recientes indican que algunos aceites esenciales (ej. monoterpenos) presentes en la planta, estarían involucrados en el control de larvas de varios insectos, característica atribuible a la presencia del sistema octopaminérgico receptor de los monoterpenos presente en los insectos y blanco biorracional para su control (15). Trabajos desarrollados en otras realidades y con diferentes plantas, podrían ayudarnos a entender la aplicabilidad del control biocida de los extractos de origen vegetal comparativamente con los hallados en la presente investigación.

Por ejemplo, Ramos-Casilla *et al.* (16) al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti*, demostraron que la concentración letal media (CL₅₀) fue equivalente a 20,39 ppm, en tanto que la concentración letal noventaicinco (CL₉₅) fue de 41,64 ppm, después de 24

as de evaluación en larvas de los estadios 3° tardío 1° temprano de *Aedes aegypti* en condiciones de oratorio, atribuyendo a los triterpenos y quiterpenlactonas la actividad larvicida hallada. Al comparar con los resultados encontrados en la presente investigación, resulta que *Ambrosia arborescens* “marco”, alcanzó el CL₅₀ a una concentración menor (4 mg/L = 8,84 ppm/L) en 24 horas de evaluación, que resulta alentador y notablemente superior a los resultados reportados para el extracto del hueso de *sea americana* en larvas de *Aedes aegypti*. En este caso debemos indicar que tanto *Cx. quinquefasciatus* le. *aegypti*, son mosquitos que pertenecen a la misma categoría taxonómica (Fam. Culicidae, familia Culicinae), por lo que las proximidades lúctivas y fisiológicas son muy cercanas una de otra, lo que no es válida para asumir que la concentración del extracto biocida estudiado, seguramente podría ser similar para ambos grupos de insectos en la concentración propuesta.

Alfonso et al. (17), al evaluar la capacidad biocida de *Lonchocarpus utilis* “barbasco” en una población de 100 larvas de tercer y cuarto estadio de *Anopheles tritaeniorhynchus*, vector primario de malaria, en Yurimaguas (Perú), determinaron que la eficacia y susceptibilidad de las larvas a las dosis de 6,25 y 3,1 mg/L fue con una mortalidad de 98 y 89 % cuando se usó agua destilada y 86 % y 82 % cuando el extracto se mezcló con agua de criadero. En este caso, *Lonchocarpus utilis* es una planta tóxica por sus atributos tóxicos (presencia de la cubenona o cube en la raíz de la planta, catalogado como producto altamente tóxico ambiental y para varias formas de vida), muestra una concentración relativamente elevada para la mortalidad que reportan los citados investigadores. Las razones para esta alta diferencia en las concentraciones reportadas para *Lonchocarpus utilis* “cube o barbasco” y comparar con el efecto biocida del extracto de *Ambrosia arborescens* “marco” en la mortalidad generada en las pruebas de los zancudos, podrían deberse a las condiciones como fueron evaluados ambos extractos; Alfonso et al. (17), no demuestran con claridad como procedieron para establecer las concentraciones ideales para hallar las mortalidades reportadas, mucho menos realizaron pruebas estadísticas que validen dichos resultados, por lo que resulta ser poco fiable la citada investigación para el análisis del efecto biocida que pretendemos demostrar.

Alfonso et al. (30), reportaron que el aceite esencial obtenido de las hojas e inflorescencias de *Hyptis suaveolens* Benth, arbusto pequeño que crece en abundancia en el noreste de Brasil, ampliamente conocido por su uso medicinal, presentó actividad biocida contra la mosca blanca *Bemisia argentifolii*, una común de frutos comestibles de valor comercial como el melón y la sandía, obteniendo 93 % de actividad a concentraciones de 2000 mg/L. La otra prueba fue realizada contra larva del mosquito *Aedes aegypti*, vector transmisor del virus del dengue y la fiebre amarilla, utilizaron concentraciones de 250 y 500

mg/L reportando una efectividad de 99 y 100 % de mortalidad.

Frente a los resultados reportados en las diferentes investigaciones tomadas en cuenta para la discusión y en las que se evaluó el efecto tóxico sobre los insectos, los resultados hallados en la presente investigación resultan ser muy alentadores, puesto que en todos los casos la concentración tóxica utilizada y que mató a un 50% de las larvas de los mosquitos culicidos expuestos en un periodo de 24 horas, es menor, lo que repercutiría en forma indirecta en la optimización de los recursos botánicos, ahorro de tiempo y dinero, que finalmente determinan el éxito de un producto en el control de insectos de interés médico.

La Figura 2, nos reporta los promedios de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* y los resultados del análisis de la prueba post hoc de comparación de medias de Tuckey ($P < 0,05$) en relación a cada una de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ambrosia arborescens* “marco”, evaluados. Según los resultados podemos apreciar que las mayores mortalidades (5,4 a 5,8 larvas muertas de 10 larvas sometidas a prueba en 24 horas evaluación), se alcanzó a las densidades de 9,0(abc) a 10,0 mg/L(a) del producto biocida evaluado. La prueba post hoc de comparación de medias de Tuckey ($P < 0,05$), pone de manifiesto a este nivel, que pese a encontrarse diferencias numéricas en las mortalidades generadas en las citadas concentraciones, estadísticamente son similares, es decir que no hay diferencias en el número de larvas muertas a partir de la concentración 9,0 mg/L e incluso pudiendo ser incluida en este análisis la concentración 8,5 mg/L(bcd). De este resultado podríamos afirmar, que si se quiere generar una mortalidad superior a 50 % de larvas de mosquitos culicidos en criaderos larvales naturales o artificiales de la ciudad de Ayacucho, bastaría tan solamente con utilizar un volumen de 5 mL del producto biocida por cada 100 mL de agua contenida en un criadero larval a una concentración de 9,0 mg/L.

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta *Ambrosia arborescens* “marco” (Tabla 2), demuestra que los principales productos activos de la planta son los alcaloides y los glicósidos (+++), reportados como los más abundantes. Con moderada presencia (++) se documenta a los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides. Otros compuestos son considerados como trazas.

La acción tóxica del extracto hidroalcohólico de *Ambrosia arborescens* “marco” sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, probablemente se deba a la presencia de los alcaloides, 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 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 (31). Muchas de estas

Alcaloides son las que causan intoxicaciones en humanos y animales. 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, dando una vía fácil de intoxicación. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otros al sistema nervioso simpático (32). Se tiene reportado por ejemplo que, los alcaloides derivados del tabaco que contienen en su estructura moléculas con grupos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario confieren alta toxicidad, actuando como fitoalexinas evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides piperidínicos y acetogeninas anonáceas, han mostrado gran toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla (33). De las frutas de *Piper nigrum* han sido aislados alcaloides de isobutilamida, cuales fueron probados contra el tercer estadio de la vida de los insectos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, observando que el compuesto más activo para la primera larva fue la piperidina. En el estudio de las larvas de *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, la actividad larvicida fue más pronunciada para la piperidina (34).

Las moléculas más importantes que los glicósidos (características substanciales en el metabolismo de la planta), parecen ser los triterpenos y esteroides cuando se analiza el efecto tóxico de las plantas, en caso de *Ambrosia arborescens* "marco", los triterpenos y esteroides están presentes en moderada cantidad (++), algunos de sus derivados representan al igual que los alcaloides productos que pueden desarrollar actividad tóxica en insectos y otros grupos de animales. Se tiene reportado por ejemplo que, los brassinoesteroides (triterpeno de 30 carbonos), es un componente de la membrana bajo la forma de fitoesteroles, algunas son fitoalexinas, varias son toxinas y "feeding deterrents" (elementos de la alimentación en insectos), otros son componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas (35).

Los esteroides y esteroles son producidos a partir de los precursores. Se encuentra documentado, por ejemplo que ésteres de cianohidrina y ésteres de monoterpénoides, fueron probadas mediante aplicación por aspersión sobre moscas adultas (*Musca domestica*) y como inhibidores de alimentación de larvas del mosquito *Aedes aegypti* L., vector de la fiebre amarilla. Se determinó que en *M. domestica* las cianohidrinadas y sus ésteres monoterpénoides, 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 el salato de cianohidrina con los cuales se obtuvieron rendimientos de 100 y 95 % de efectividad, respectivamente. La actividad insecticida y acaricida de los triterpenos polihalogenados obtenidos de la alga *Plocamium cartilagineum* ha sido demostrada

contra insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de azúcar o cebolla (37). Araujo *et al.* (30) 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, presentó actividad insecticida y determinaron que los componentes mayoritarios en el aceite esencial asociado a la actividad biofuncional fueron los monoterpénos; 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 %.

Es probable que en caso de la planta *Ambrosia arborescens* "marco", los triterpenos estén desarrollando acción sinérgica conjuntamente con los alcaloides para generar el efecto tóxico demostrado en larvas de *Culex quinquefasciatus* presentes en los criaderos naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho.

Sin embargo, debemos mencionar que los aceites esenciales extraídos de las plantas como *Ambrosia arborescens* "marco", consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de los vegetales, que pueden estar localizados en pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal (15), 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 (38), por lo que el efecto tóxico demostrado en caso de *A. arborescens* "marco" 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 (39). Los aceites esenciales básicamente contienen monoterpénos (C10) (constituyen aproximadamente el 90 % de las mezclas) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y bioactividad característicos de la planta de la cual provienen (40). Estos aceites esenciales son sustancias ecoamigables al ser biodegradables y son fácilmente catabolizados en el ambiente (41). Asimismo, no persisten en el suelo y en el agua (42), y poseen baja o no toxicidad hacia vertebrados (peces, aves y mamíferos principalmente) (43). Finalmente, es poca la

formación 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 insecticidas (44; 45).

Principalmente, *Ambrosia arborescens* Mili "marco", además de ser reconocida en el departamento de acucho por sus propiedades curativas y medicinales uso folclórico y cultural para malestares estomacales intestinales, mal funcionamiento de los ovarios entre sus atributos medicinales, se demostró en la presente investigación que tiene efecto biocida sobre larvas de *Aedes aegypti* con débil efecto biocida (48). Camacho (49), mencionó al shiromool y coronopilina como los abiolitos responsables de la actividad insecticida y bacteriana de la planta; la psilostachina es un ascariosis y la damsina como un efectivo tumoral y molusquicida en "babosas".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sánchez MC, González N, González E. Efecto larvicida de extractos acuosos vegetales sobre *Aedes aegypti*. Manejo Integrado de Plagas, 1997; 45: 30-33.
- 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.
- Choi W, Lee S, Park H, Anh Y. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(2): 553-558.
- Papachristos DP, Stamopoulos DC. Repellent Toxic and Reproduction Inhibitory Effects of Essential Oils Vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 2002; 38(2): 117-128.
- Peterson C, Ems-Wilson J. Catnip essential oil as a barrier to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Laboratory. J. Econ. Entomol. 2003; 96(4): 1275-1283.
- Appel GA, Gehret MJ, Tanley MJ. Repellency and toxicity of mint oil granules to red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(2): 575-580.
- McQuate GT, Keum YS, Charmaine SD, Li QX, Eric BJ. Active ingredients in cade oil that synergize attractiveness of α -ionol to male *Lactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 2004; 97(3): 862-870.
- Zhang W, McAuslane HJ, Schuster DJ. Repellence of ginger oil to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. J. Econ. Entomol. 2004; 97(4): 1310-1318.
9. Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley y Sons. New York, USA. 1988. 470 pp.
10. Negahban M, Moharramipour S, Sefidkon F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored product insects. J. Stored. Prod. Res. 2007; 43: 123-128.
11. Das NG, Goswami D, Rabha B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. Journal of Vector Borne Diseases. 2007; 44: 145-148.
12. Rodríguez HC, Nieto D. Anonáceas con propiedades insecticidas. In. Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). A. Rebouças São Jose, I. Vilas Boas S., O. Magalhaes M. e T.N. Hojo R. (Eds). Bahia, Brasil. 1997. Pp. 229- 239.
13. Rodríguez HC. Plantas contra plagas; potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Editado por la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. Texcoco, Estado de México. 2000. 133 pp.
14. Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE, Gordillo-Martínez AJ. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. Polibotánica. [Internet]. 2010; 30: 193-238. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62114250012>.
15. Espitia-Yanes CR. 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 posgrado]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2011. 61 pp.
16. Ramos-Casilla F, Oraday-Cárdenas A, Rodríguez-Tovar ML, Verde-Star MJ, Flores-Suarez A, Ponce-García G. Efecto larvicida del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass, en *Aedes aegypti* (L.). Ciencia UANL; 2007, X(1): 25-28.
17. Mariños C, Castro J, Nongrados D. Efecto biocida del "barbasco" *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos. Rev. peru. biol. 2004; 11(1): 87- 94.
18. Wan FH, Liu WX, Ma J, Guo JY. *Ambrosia artemisiifolia* and *A. trifida*, In Wan FX, Zheng XB, Guo JY (eds.), *Biology and management of invasive alien species in agriculture and forestry*. Science Press. Beijing, China. 2005. pp. 662-688.
19. Weaver SE. Correlations among relative crop and weed growth stages. Weed Sci. 2003; 51: 163-170.
20. Chakhat JC, Maksimovic ZA, Petrovic SD, Gorunovic MS. Chemical composition and antimicrobial activity of *Ambrosia artemisiifolia* L. J. Essential Oil Res. 2004; 16: 270-273.
21. Pérez-Pacheco R, Rodríguez-Hernández C, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ramírez-Valverde G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say

- (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 2004; 20(1): 141-152.
- Kvist LP, Alarcón D. Plantas tóxicas. In: *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. L de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, MJ. Macia, H. Balslev (eds.) Herbario QCA y Herbario AAU. Quito y Aarhus. 2008. Pp. 99-104.
- Miranda MM, Cuellar CA. *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales*. Editorial Félix Varela. Universidad La Habana. La Habana-Cuba. 2000.
- Lock de UO. *Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales*. Lima. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima. 1994.
- World Health Organization (WHO). *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/81.807. Geneva, Switzerland. 1981. Pp. 6.
- Bobadilla AM, Zavaleta G, Franco FG, Pollack L. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller "chirimoya" / *A. muricata* Linneaus "guanabana" sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. *Rev. Peru. biol.* 2002; 9: 64 -73.
- Consoli R, Laureço de Oliveira R. *Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil*. Editorial Fiocruz. Brasil. 1998; 224 pp.
- Lagunes TA, Villanueva JJA. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados. México. 1994. 257 pp.
- Alonso FA. *Cálculo de las concentraciones letales 50 (CL50) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en los especies de invertebrados de agua dulce Eulimno gammarustoletanus y Polycelis felina*. Universidad de Alcalá, Ecuador. [11 y 13 de febrero de 2014; acceso 17 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>
- Araujo E, Silveira E, Lima MA, Andrade M, Lima MAA. *Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from Hyptis martusii Benth*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 3760-3762.
- Rodríguez-Soana CR, Maynard DF, 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.
- Robinson T. *The biochemistry of alkaloids*. Second edition. Springer-Verlag New York Inc. New York 10010, U.S.A. 1981. 211 pp.
- Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kou RY, Chang YC, Wu YC. *New alkaloids from Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*. 2000; 63, 746-748.
- Park IK, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. *Larvicidal activity of isobutylamides identified in Piper nigrum fruits against three mosquito species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 1866-1870.
35. 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>
36. Peterson C, Tsao R, Eggler LA, Coats JR. *Insecticidal activity of cyanohydrin and monoterpenoid compounds*. *Molecules*. 2000; 5: 648-654.
37. <http://www.insectariumvirtual.com>
38. Shaaya E, Rafraeli A. *Essential oils as biorational insecticides-potency and mode of action*. En: Ishaaya, I., Naven, R., Horowitz, R. (Editores), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer, Berlin, Alemania. 2007; 249-261.
39. Feng R, Isman MB. *Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, Myzus persicae*. *Experientia*. 1995; 51: 831-833.
40. Batish D, Singh H, Kohli R, Kaur S. *Eucalyptus essential oil as a natural pesticide*. *Forest Ecol. Manag.* 2008; 256: 2166-2174.
41. Zygadlo JA, Grosso NR. *Comparative study of the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina*. *Flavor Frag. J.* 1995; 10: 113-118.
42. Misra G, Pavlostathis SG. *Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997; 47: 572-577.
43. Enan E, Beigler M, Kende A. *Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors*. En: *Proceedings of the International Symposium on Plant Protection*. Gent, Bélgica. 1998.
44. Kotyukovsky M, Rafraeli 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.* 2002; 58: 1101-1106.
45. Isman MB. *Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. *Annu. Rev. Entomol.* 2006; 51: 45-66.
46. Vera S. *Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: Ambrosia arborescens Sangolquí*. [Tesis de pregrado]. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 2008.
47. Cruz A. *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (Matricaria chamomilla), matico (Aristiguetia glutinosa) y marco (Ambrosia arborescens) para neo-fármaco*. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2009.
48. Orozco OL, Lentz DL. *Poisonous plants and their uses as insecticides in Cajamarca, Perú in Economic Botany*. [Internet]. 2005; 59(2): Enero: 166-173. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1663%2F0013-0001%282005%29059%5B0166%3APPATUA%5D2.0.CO%3B2?LI=true#page-1>
49. Camacho VDP. *Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de Sambucus nigra L., Franseria artemisioides W. y Tagetes*

zipaquirensis H. en *Ctenocephalides canis*. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2011. 95 pp.