

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de
Lupinus mutabilis "tarwi" sobre larvas de *Culex*
quinquefasciatus.

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

Presentado por la:

Bach. HUAMÁN CAMPOS, Nataly Cinthia

AYACUCHO – PERÚ

2015

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga por brindarme la formación académica que me permitió ser una nueva profesional competente, con valores y principios, garantía de mi sólida formación académica y profesional.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología, a los docentes que supieron brindarme la formación académica y personal, por su apoyo y sus consejos que 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 compartida durante los cinco años de estudios, que me ayudaron a salir adelante.

Expreso 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 sinceros agradecimientos, nombrarlos cometería el error de olvidar a alguno de ellos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	6
2.3. Bases teóricas	8
2.3.1. Principales biomoléculas de plantas con actividad insecticida	8
2.3.2. Los insecticidas: características y clasificación	11
2.3.3. Insecticidas (bioinsecticidas) de origen botánico	12
2.3.4. Efecto tóxico de los bioinsecticidas	12
2.3.5. Características de <i>Lupinus mutabilis</i> Swwet	13
2.3.6. Los mosquitos culícidos: morfología e importancia	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Área de estudio	21
3.2. Población y muestra	24
3.2.1. Población	24
3.2.2. Muestra	24
3.2.3. Unidad de análisis	24
3.3. Metodología y recolección de datos	24
3.4. Diseño de investigación	27
3.5. Análisis de datos	27
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	36
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet. ⁶²	14
Tabla 2. Composición química de alcaloides presentes en semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> . ⁶⁴	17
Tabla 3. Mortalidad (N° y %) de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.	33
Tabla 4. Media y desviación estándar del porcentaje de mortalidad generada a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, sobre larvas del III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	34
Tabla 5. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características botánicas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. ⁶³	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ⁷³	20
Figura 3. Lugar de muestreo de hojas de la planta <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho.	23
Figura 4. Lugar de colecta de larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> . Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.	24
Figura 5. Porcentaje de mortalidad (media, máxima y mínima) generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, a concentraciones crecientes, sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	35
Figura 6. Tendencia lineal del porcentaje de mortalidad generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, a concentraciones crecientes, sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	36
Figura 7. Tendencia de la curva del porcentaje de mortalidad en relación al efecto generado por las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi” en larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> , a las 24 horas de evaluación.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Secuencia de extracción de las sustancias alcohol solubles presentes en las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, marcha fitoquímica y preparación de las diluciones para el bioensayo. ⁵⁷	58
Anexo 2. Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar). 74,75	59
Anexo 3. Prueba de Kruskal Wallis para la comparación de las medias de la mortalidad (%) generada por las concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	60
Anexo 4. Análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad (%) generada por concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”, sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	61
Anexo 5. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (análisis de Probit) de larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> generada por las concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	62
Anexo 6. Tamizaje fitoquímico de los componentes hidroalcohólicas solubles presentes en las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	63
Anexo 7. Certificación taxonómica de la planta <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”. Herbarium Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH.	64
Anexo 8. Fotografía de las características morfológicas de la planta <i>Lupinus paniculatus</i> “qera”.	65
Anexo 9. Unidades experimentales con agua de criadero e incorporación de las larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> para las pruebas de biotoxicidad.	66

Anexo 10. Preparación de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	67
Anexo 11. Unidades experimentales y distribución de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	68
Anexo 12. Unidades experimentales conteniendo larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> y las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> “tarwi”.	69
Anexo 13. Matriz de consistencia	70

RESUMEN

Los productos naturales de origen vegetal con actividad insecticida, son alternativas válidas para el control de insectos de importancia médica en sustitución de los plaguicidas sintéticos convencionales, ya que no generan resistencia, efectos indeseables sobre los organismos e impactos negativos en el ambiente. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La metodología consistió en preparar un extracto hidroalcohólico de las hojas de *L. mutabilis* (80 000 ppm), a partir del cual se produjeron las siguientes diluciones: 2000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 30000 ppm, concentraciones con las cuales se evaluó la mortalidad a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa (H.R.) de $57 \pm 3\%$, en 10 larvas de *Cx. quinquefasciatus* colocadas en vasos descartables conteniendo 90 mL de agua limpia de clorada y 10 mL del producto biotóxico. Cada dosis fue evaluada por cuatruplicado con su respectivo control. Las lecturas se llevaron a cabo luego de 24 horas. Se calculó la concentración letal media (CL_{50}) mediante el método de análisis Probit y el screening fitoquímico preliminar a fin de determinar la composición química de las sustancias hidroalcohólicas presentes en la planta. Mortalidad larval de $70 \pm 8,16$ a $75 \pm 12,91 \%$, fueron reportadas a las concentraciones de 20 000 a 30 000 ppm, del extracto hidroalcohólico a un volumen de 10 mL por 100 mL de agua de criadero, porcentaje de mortalidad estadísticamente diferente para cada concentración evaluada según la prueba de comparación de medias de Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$), dependiente del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio. La concentración letal media (CL_{50}) fue establecida en 17 470 ppm, reportándose a los fenoles y taninos pirogalotánicos (+++), como los más abundantes. De moderada presencia (++) los flavonoides y triterpenos. Los alcaloides como trazas (+). El efecto biotóxico de la planta probablemente esté relacionada con la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos, algunos tipos de fenoles y taninos, y a la complejidad de los productos trazas.

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

I. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales de origen vegetal, con actividad insecticida potencial, son considerados alternativas válidas sobre los plaguicidas sintéticos convencionales en el control de una amplia variedad de insectos-plagas.¹ El uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control de los mosquitos ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia,² efectos indeseables sobre organismos no específicos y la vida silvestre³ e impactos negativos en el medio ambiente.⁴ Frente a esta problemática, los aceites extraídos de diversas plantas son una de las alternativas viables que últimamente están siendo estudiadas con el objetivo de evaluar su actividad repelente y toxica frente a diferentes especies de plagas. Así, tenemos que los aceites esenciales de hojas y corteza de *Cryptomeria japonica* demostraron alta actividad larvicida contra *Aedes aegypti*.⁵ Los extractos de *Murraya koenigii*, *Coriandrum sativum*, *Ferula asafétida* y *Trigonella foenum*, fueron efectivas en el control de larvas del mosquito *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.⁶ Extractos con metanol y etanol de cinco especies de plantas aromáticas: *Aristolochia saccata*, *Annona squamosa*, *Gymnopetalum cochinchinensis*, *Caesalpinia* sp. y *Piper* sp., al ser evaluadas en su toxicidad sobre larvas de *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* mostraron actividad larvicida, variando los resultados dependiendo de la especie vegetal utilizada.⁷

Las leguminosa andina *Lupinus mutabilis* “tarwi” a parte de las bondades nutritivas que contienen sus semillas, presentan sustancia antinutritivas que limitan el uso directo en la alimentación humana y animal. Entre estas sustancias se encuentran los alcaloides, que confieren al grano, hojas y tallos de la planta un carácter tóxico y sabor amargo. En el “tarwi”, los alcaloides son de tipo quinolizidínico y se distribuyen en la planta particularmente en las ramas y semillas.⁸ No se conoce con exactitud la función de los alcaloides en la planta, parece que el principal propósito es la defensa del vegetal contra insectos,

animales herbívoros y patógenos microbianos. Ocasionalmente los agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, en virtud de los efectos que estos han encontrado en conejos, en insectos (áfidos, abejas, escarabajos), nemátodos, caracoles y gusanos,⁹ propiedad tóxica de la planta que proponemos su aprovechamiento a través de la presente investigación, como una alternativa bioecológica, sana y compatible con el ambiente en el control de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La utilización de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematicidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxiotóxicos, antiarrítmicos e hipoglicemiantes.¹⁰

Por lo que nos planteamos los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

1.2. Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", sobre larvas de III instar del mosquito *Cx. quinquefasciatus* a las 24 horas de exposición.
- b) Determinar la concentración letal media (CL₅₀) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.
- c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

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 de importancia en salud pública, como por ejemplo la malaria, las filariosis, leishmaniosis, fiebre amarilla, el dengue, entre otras. Su combate se ha efectuado tradicionalmente con insecticidas organosintéticos, los cuales han ocasionado daños al ambiente, intoxicado a las personas expuestas y desarrollando 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.¹¹

En los últimos años, los aceites esenciales de origen vegetal, se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga.¹² El efecto biotóxico de estos extractos, han sido demostrados experimentalmente sobre ácaros¹³ e insectos, principalmente coleópteros,¹⁴ isópteros,¹⁵ himenópteros,¹⁶ dípteros¹⁷ y homópteros,¹⁸ con resultados que superaron en muchos caso el 50% de mortalidad del total de especímenes sometidos a tratamiento.

Se ha demostrado experimentalmente en condiciones de laboratorio, la actividad tóxica de aceites esenciales de plantas del género *Eucalyptus* en el control de *Sitophilus oryzae*.¹⁹ Maciel *et al.*,²⁰ reportó que los aceites esenciales de tres especies del género *Eucalyptus*: *E. staigeriana*, *E. citriodora*, y *E. globulus*, mostraron actividad insecticida relevante frente a huevos, larvas y adultos de *Lutzomyia longipalpis*, un tipo de mosquito díptero transmisor de la leishmaniosis.

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 fue utilizada artesanalmente en zonas rurales de México para la fumigación de casas y corrales infestados con pulgas, y para ahuyentar moscas y mosquitos como *Culex* sp., *Aedes* sp., *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae).²¹ 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 *Tagetes lucida*, demostraron ser altamente efectivas, así por ejemplo, el 5E-ocimenoneno a 40 ppm es efectivo contra larvas de *Aedes aegypti* en 24 horas, y las fracciones de etil acetato en mezcla con éter de petróleo fueron tóxicas contra larvas de *Anopheles stephensi* (CL₅₀ en concentraciones de 43 y 58 ppm).²²

Ramos Casilla *et al.*,²³ al evaluar el efecto larvicida del extracto del hueso de *Persea americana* en larvas de *Aedes aegypti* demostraron en condiciones de laboratorio, luego de 24 h de evaluación, que a la concentración letal media (CL₅₀) equivalente a 20,39 ppm y a la CL₉₅ equivalente a 41,64 ppm, buen efecto larvicida sobre los estadios 3° tardío y 4° temprano de *Ae. Aegypti*, 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* tienen 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. Cárdenas Castro *etal.*,²⁴ al evaluar la toxicidad del extracto acuoso de *Ruta graveolens* sobre larvas de cuarto instar de *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* a las concentraciones de 50, 100, 300 y 500 mg/L, en 60 larvas por concentración y un control (20 larvas), al tiempo de exposición de 24 horas a una temperatura de 28 ± 2°C, estimaron por la prueba de Probit el CL₅₀ y CL₉₅, encontraron que a la concentración de 300 mg/L el porcentaje de mortalidad de larvas fue del 98% para *An. albimanus* y en *Cx. quinquefasciatus*, la mortalidad estuvo entre el 86 y 95%. La CL₅₀ para larvas de *An. albimanus* en la colonia Barranquilla (Colombia) fue de 143,79 mg/L; mientras que para la de Cartagena fue de 109,73 mg/L. En larvas de *Culex quinquefasciatus* en la colonia Sibaté, la CL₅₀ fue de 148,79 mg/L; mientras que para la de Villavicencio se estimó en 209,91 mg/L. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* mostró tener efecto tóxico para larvas de las dos especies de mosquitos, lo cual sugiere que esta planta podría ser una alternativa promisoriosa para su control.

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

Los aceites esenciales de diversas plantas brasileñas, *Alpinia zerumbet*, *Syzygium jambolana*, *Ocimum americanum*, *Hytis suaveolens*, entre otras, fueron evaluadas positivamente en el control de larvas de *Aedes aegypti*.²⁶ Asimismo, extractos obtenidos por decocción de *Paullinia clavigera* var. *bullatae* infusión de *Tradescantia zebrina* se ensayaron en el control del III estadio larval de *Anopheles benarrochi*, principal vector de la malaria en Ucayali - Perú²⁷ y los extractos de aceites esenciales de *Capsicum annum* (Solanaceae), *Piper nigrum* (Piperaceae) y *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) sobre el estadio adulto de *Anopheles gambiae*, vector de la malaria.²⁸

En esta perspectiva, utilizar el extracto hidroalcohólico de hojas y semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, planta que es cultivada por el poblador alto andino de la región de Ayacucho, cuyas semillas son aprovechadas en la alimentación popular previo desamargado en agua corriente, por la presencia de alto contenido de alcaloides que le confieren sabor amargo y desagradable, desecho líquido rico en metabolitos secundarios que no es aprovechado al igual que las restantes partes vegetales de la planta. Por referencias bibliográficas se sabe que podrían tener efecto biotóxico sobre los insectos, para el caso particular, sobre los mosquitos *Culex quinquefasciatus* que abundan en la ciudad de Ayacucho, produciendo picaduras dolorosas, con escozor y prurito, que genera incomodidad en el poblador principalmente de las zonas periféricas a la ciudad, propuesta que podría ser una alternativa viable de bajos costos económicos y compatible con el ambiente para el control de vectores de enfermedades.

Ayala *et al.*,²⁹ al evaluar el efecto tóxico de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Ruta graveolens* “ruda” y semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”,

sobre larvas del III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* demostraron que, mortalidades de 72,5 y 75 % respectivamente, fueron halladas a la concentración de 5 000 mg/L para los dos extractos evaluados, resultados estadísticamente similares ($\alpha < 0,05$). La concentración letal media (CL₅₀) para los extractos hidroalcohólicos producidos fue establecida en 3583 mg/L para *R. graveolens* y de 1776 mg/L para *L. mutabilis*, siendo los fenoles y/o taninos y alcaloides los productos químicos más abundantes (+++) en ambas plantas. Con moderada presencia (++) los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides; atribuyéndose la toxicidad hallada en ambos extractos de las plantas evaluadas, a la actividad sinérgica de los alcaloides, triterpenos y esteroides y a la complejidad de los productos trazas.

En cuanto a la toxicidad de los alcaloides de *Lupinus mutabilis*, trabajos desarrollados por Brophy y Castro,³⁰ demostraron que a la dosis efectiva media (DE₅₀) de 500 mg del extracto metanólico de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet al 10% p/v, evaluado en 40 ratas albinas, manifestaron efectos como convulsiones y posteriormente la muerte de los roedores posiblemente debido al alto contenido en alcaloides como: esparteína, lupinina, entre otros.

2.2. Marco conceptual

a) Metabolitos secundarios de las plantas: son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. El reconocimiento de las propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas.³¹

b) Sustancias biotóxicas: son sustancias químicas sintéticas o de origen natural o de microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer control sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Son agentes que matan a organismos. Sustancias activas y preparados que contienen un sin número de metabolitos secundarios, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer control sobre cualquier organismo nocivo.³²

- c) Extracto hidroalcohólico:** consisten en la obtención de la fracción no volátil de los principios activos presentes en las plantas, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante un líquido solvente, que para el caso es una mezcla de alcohol etílico, que disuelta las sustancias activas contenidas en una planta afines molecularmente a ella.³³
- d) Larvas:** las larvas son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (con metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto. Las larvas difieren siempre muy significativamente de los adultos, en aspectos como tamaño, forma externa, e incluso anatomía interna y fisiología (desarrollo de sus funciones). Las diferencias guardan relación con las diferencias ecológicas, tanto en cuanto a hábitat como en cuanto a los recursos.³⁴
- e) *Culex quinquefasciatus*:** mosquito díptero nematócero, considerado como una especie acentuadamente antropofílica asociado frecuentemente al hábitat humano tanto urbano como rural. Esta especie se ha relacionado con la transmisión de filarias como *Wuchereria bancrofti* y *Dirofilaria immitis*, virus del oeste del Nilo y de los virus causantes de la encefalitis de San Luis y la encefalitis equina venezolana, entre otros. En áreas donde no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por parte de esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por las altas densidades de población que alcanzan.³⁵
- f) *Lupinus mutabilis* “tarwi”:** *Lupinus mutabilis* Sweet es una leguminosa oriunda de los Andes Sudamericanos y del Mediterraneo. Las semillas desamargadas y en cocimiento son utilizadas por el poblador andino con fines alimenticios y como planta medicinal. Esta leguminosa es promisoría y puede crecer en suelos pobres. El *Lupinus* ha sido tradicionalmente considerado de gran valor nutritivo por su alto contenido de proteínas (38,9%), grasa (17,1 %), calorías (411 cal/100 g), y alcaloides (3,5%-4,2%) que no permiten su consumo directo, debiendo previamente eliminarse éstos. El producto líquido del desamargado es utilizado por pequeños agricultores para combatir a las garrapatas en el ganado ovino y en camélidos sudamericanos, asimismo se utilizan como reguladores del crecimiento o fertilizante en los cultivos de maíz, trigo, soya y papa.³⁶
- g) Concentración letal media (CL₅₀):** proporción o concentración calculada estadísticamente de una sustancia tóxica presente en un medio, que se

espera que produzca la muerte de al menos un 50% de individuos de una población susceptible, durante la exposición o en un periodo determinado, bajo un conjunto de condiciones definidas y después de un período de exposición determinada. El valor de la CL₅₀ se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen ($\mu\text{m/L}$, mg/L , ppm, etc.).³⁷

h) Método de análisis Probit: El Probit se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad de un organismo al ser expuesto a un tóxico. Dicho método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables a los fenómenos físicos peligrosos. El método de análisis Probit permite estimar la CL₅₀ ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit.³⁸

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Principales biomoléculas de plantas con actividad insecticida

Las plantas, en conjunto, producen más de 100 000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Estos son, normalmente, no esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. Semejante diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano, o la depredación de insectos y animales.³⁹ Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas.⁴⁰ Por lo tanto, en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de plaguicidas más seguros para el medioambiente y la salud humana.⁴¹ Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de organismo frente a los cuales son eficaces: funguicidas, herbicidas, insecticidas, molusquicidas, nematocidas, rodenticidas.⁴² 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.⁴³

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-pental 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.⁴⁴

b) Terpenoides

Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de vegetales. Están formados por una estructura base de isopreno y, cuando tienen elementos adicionales, comúnmente oxígeno, son llamados terpenoides. La actividad insecticida y acaricida de monoterpenos polihalogenados obtenidos de la alga roja *Plocamium cartilagineum* ha sido demostrada contra insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de azúcar o cebolla.⁴⁵

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.⁴⁶

d) Aceites esenciales

Araujo *et al.*,⁴⁷ 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 bifuncional fueron los monoterpenos; 3-careno y 1,8-cineolo. Esta actividad se determinó realizando dos pruebas: una en la que comprobaron diferentes concentraciones del extracto obtenido contra la mosca blanca *Bemisia argentifolii*, plaga común de frutos comestibles de valor comercial como el melón y la sandía, obteniendo 93% de efectividad a concentraciones de 2000 mg/L. La otra prueba fue realizada contra larva del mosquito *Aedes aegypti*, vector de transmisión del dengue y la fiebre amarilla, cuando usaron concentraciones de 250 y 500 mg/L la efectividad fue de 99 y 100%.

e) Furanos

La actividad insecticida de 2-pentadecilfurano y 2-heptadecilfurano, dos compuestos furánicos comúnmente presentes en el “aguacate” (*Persea americana* Mill), fue probada *in vitro* contra la larva en la primera etapa de desarrollo de *Spodoptera exigua*, plaga común en árboles frutales de “aguacate”, mostrando un 100% de efectividad al suministrar *in vitro* en su dieta, concentraciones mínimas de 2 $\mu\text{mol/g}$, mientras que para larvas del último estadio se observó el 100% cuando se usaron 3 $\mu\text{mol/g}$.⁴⁸ 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.⁴⁹ Los alcaloides derivados del tropano contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario que le confiere alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides aporfinos y acetogeninas anonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla.⁵⁰

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 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.⁵¹ También se ha reportado el uso efectivo de alcaloides de quinolina y quinolona para evitar el crecimiento de larvas *Colletotrichum* sp.⁴⁹

Los alcaloides quinolizidínicos son un grupo importante de compuestos naturales que se concentran principalmente en tallos y semillas de plantas del género *Lupinus* (Fabaceae).⁵² Estos metabolitos secundarios son un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia.⁵² Muchos agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, en virtud de los efectos que éstos han encontrado en conejos, áfidos, abejas, escarabajos (en insectos), nematodos, caracoles y gusanos.⁹ La utilización de los alcaloides como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, se fundamenta en su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, del RNA transmisor, depresores del sistema nervioso central, oxitotóxicos, antiarritmicos e hipoglicemiantes.¹⁰

2.3.2. Los insecticidas: características y clasificación

Etimológicamente, deriva del latín y significa literalmente matar insectos.⁵³ 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.⁵⁴ Según la FAO-1986,⁵⁵ un insecticida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización, producción de alimentos, productos agrícolas, también aquellos que se administre a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.⁵⁶

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.³⁷

Los insecticidas pueden dividirse de acuerdo a sus componentes químicos y propiedades, en insecticidas: *inorgánicos* (origen mineral), *orgánicos* (origen natural como artificial), *microbiales* (constituidos por bacterias, virus u hongos; son altamente específicos. Ejm: *Bacillus thuringiensis Berliner*), *vegetales* (derivados y extraídos directamente de plantas).⁵⁴

2.3.3. Insecticidas (bioinsecticidas) de origen botánico

Son insecticidas naturales, derivados de plantas.³³ Las plantas consideradas insecticidas, desarrollaron sustancias llamadas aleloquímicos, como mecanismo de defensa contra insectos,⁵⁴ regulando así la presencia de insectos fitófagos, que actúan como atrayentes, estimulantes, repelentes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición.⁵³ 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.⁵³

2.3.4. Efecto toxico de los bioinsecticidas

La toxicidad de los insecticidas o de cualquier tóxico a un organismo, se expresa usualmente en términos de DL₅₀ (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 DL₅₀ comúnmente se expresa en mg kg⁻¹ y ocasionalmente en mg por animal.³⁷

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 CL₅₀ (concentración letal media), concentración del compuesto tóxico que mata a un 50% de los animales expuestos, en un periodo específico (generalmente 24 h).³⁷

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.³⁷

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.³⁷

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).⁵⁷

2.3.5. Características de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Lupinus mutabilis Sweetes una leguminosa anual, de la cual se utiliza en la alimentación el grano, conocido como “chocho” en el norte de Perú y Ecuador, “tarwi” en el centro del Perú y “tauri” en el sur del Perú y Bolivia (“chuchus” en Cochabamba, Bolivia). Esta especie es pariente de los lupinos o altramuces originarios del viejo mundo que aún hoy son cultivados en Europa mediterránea, especialmente en España e Italia, pero que tienen un número cromosómico diferente.⁴²

Es originaria de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú. Ha sido cultivada en el área andina desde épocas preincaicas. A pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores climáticos adversos en las zonas donde se siembra, el cultivo y consumo de esta especie está disminuyendo progresivamente debido a la falta de difusión de sus formas de uso y a la promoción de su consumo. Otro factor que afecta su consumo es el fuerte sabor amargo que caracteriza a sus granos, debido a su alto contenido de alcaloides. Por esta razón, se requiere de un proceso de lavado previo a su consumo para eliminar dichas sustancias; esto constituye una desventaja frente a otras leguminosas introducidas.⁵⁸

Esta planta presenta una gran variabilidad morfológica y de adaptación ecológica en los Andes, por lo cual se ha sugerido que puede incluirse a tres subespecies.^{59,60}:

- *Lupinus mutabilis*, “chocho” (norte de Perú y Ecuador), de mayor ramificación, muy tardío, mayor pilosidad en hojas y tallos, algunos ecotipos se comportan como bianuales, tolerantes a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, “tarwi” (centro y sur de Perú), de escasa ramificación, medianamente tardío, algo tolerante a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, “tauri” (altiplano de Perú y Bolivia), de menor tamaño (1-1,40 m) con un tallo principal desarrollado, muy precoz, susceptible a la antracnosis.

Restos de semillas de “tarwi” se han encontrado en tumbas de Nazca (100-500 años a C). Algunas pinturas estilizadas de esta planta están representadas en cerámicas tiawanaquenses (500 - 1000 dC) de las regiones altoandinas.⁶¹

Tabla 1. Clasificación de *Lupinus mutabilis* Sweet, descrita por Cronquis (1988) y caracterizada taxonómica por Aucasime.⁶³

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

a) Características botánicas

Lupinus mutabilis “tarwi”, es una planta herbácea, anual erguida de hasta dos metros de alto, tallos poco ramificados, hojas digitadas largamente pecioladas formado por ocho folíolos oval-lanceoladas de color verde claro villosos. Inflorescencias en racimos; flores vistosas de un color que varía entre rojo y azul, con manchas amarillas, bisexuales, heteroclamídeas, pentámeras y zigomorfas; sépalos soldados en la base ligeramente pubescentes, corola amariposada, con el pétalo grande, ovalado que viene a ser estandarte, dos pétalos laterales simétricos denominados alas y dos internos unidos en la parte anterior y libres en la parte superior que forma la quilla o carina; androceo formado por diez

estambres monodelfos, todos soldados formando el tubo estaminal que rodea el ovario; gineceo de ovario súpero unicarpelar, unilocular y multiseminado y con el estilo delgado y curvado. Fruto legumbre dehiscente, viloso, de aproximadamente 10 cm de largo conteniendo numerosas semillas ovoides.⁶³

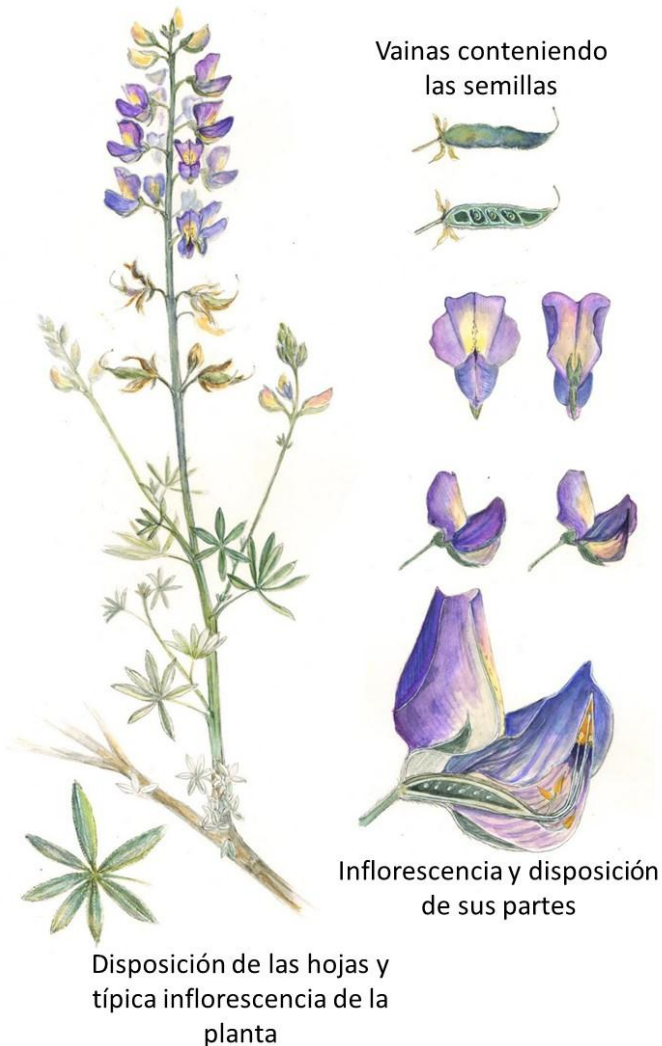


Figura 1. Características botánicas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".⁶³

b) Alcaloides del *Lupinus mutabilis* "tarwi"

Las semillas de "tarwi" ocupan uno de los primeros lugares entre los alimentos nativos con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial. Sin embargo, el grano requiere un tratamiento previo a su consumo para eliminar las sustancias antinutricionales que contiene, tales como alcaloides. Se han reportado la existencia de diferentes tipos de alcaloides quinolizidínicos presentes en granos de tarwi, entre los que destacan: esparteína, lupinina y lupanina; los cuales se emplean para controlar insectos, ectoparásitos y parásitos intestinales de animales.⁶⁴

Los alcaloides quinolizidínicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas lotoideas, siendo los *Lupinus* los más ricos en este tipo de alcaloides que están basados en un anillo bicíclico de quinolizidina.^{65,59} En *Lupinus mutabilis* se han encontrado 25 alcaloides quinolizidínicos de los cuales 19 se han identificado hasta la presente (Tabla 2).⁵⁹

El principal propósito de los alcaloides del “tarwi” es la defensa de la planta,⁹ contra animales herbívoros (nematodos, insectos, vertebrados).⁶⁰

Ocasionalmente los agricultores utilizan esta propiedad para el control de plagas, ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, tienen efectos tóxicos y mutagénicos en conejos, insectos: áfidos, abejas, langostas, escarabajos, entre otros; nematodos, caracoles, gusanos y escarabajos.⁴⁰ Jacobsen y Mujica,⁶² manifiestan que el agua producto del desamargado del “tarwi” es utilizado como un producto biocida. Se ha demostrado por ejemplo que es un excelente repelente de insectos, controla el desarrollo de pulgones, trips y la pulguilla saltona de la papa (*Epitrix subcrinita*), así como al gorgojo de los Andes en el cultivo de papa (*Premnotripes solani*). Con la ayuda de un aspersor se aplica en los rastrojos de los cultivos para evitar la puesta de huevos por gorgojos adultos y de esta manera evitar su ataque desde estadios iniciales del cultivo de papa. El agua hervida del tarwi amargo es utilizado como repelente de distintas plagas que atacan al cultivo de papa, oca, habas, tales como chupadores, laceradores de hojas tiernas, perforados y principalmente al gorgojo de los Andes que ataca a los tubérculos de papa (siendo repelente para estos insectos).

Aunque los alcaloides son ampliamente reconocidos en el área de la medicina, en términos de química ecológica, los alcaloides en el género *Lupinus* representan un importante sistema químico de defensa contra microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos), y contra otras especies de plantas que causan competencia.⁶⁰

Tabla 2. Composición química de alcaloides presentes en semillas de *Lupinus mutabilis*⁶⁴

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

La lupanina, esparteína, 13 – hidroxilupanina, angustifolina, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Los dos primeros alcaloides poseen actividad antifúngica mientras que la lupinina, lupanina, 13 – oxoesparteína y esparteína, tienen actividad insecticida, reprimiendo en los insectos el deseo de alimentación, de esta manera eliminan su supervivencia. Posee utilidad práctica comercial, gracias a sus aplicaciones en medicina y en el campo industrial.⁹

2.3.6. Los mosquitos culícidos: morfología e importancia

Los mosquitos culícidos (Insecta: Diptera) son una familia de dípteros nematóceros conocidos vulgarmente como zancudos en algunas partes de América. Incluye, entre otros, los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Sabethes*, *Culiseta* y *Haemagogus*.^{67,68} Los mosquitos son los más abundantes de los numerosos tipos de artrópodos hematófagos que molestan al hombre, otros mamíferos y aves. Su población actual se calcula en aproximadamente 3500 especies descritas pertenecientes a la familia Culicidae (orden Diptera) encontrándose entre sus miembros a especies excesivamente agresivas durante el día, aunque la mayoría de los mosquitos se alimentan de noche. El descubrimiento de nuevas especies así como cambios en la sistemática y las dificultades en la aceptación de algunos taxones no hace imposible reflejar cifras exactas.⁶⁸ Sus ataques no están limitados a animales homeotermos, ya que hay citas de su alimentación sobre peces, reptiles y anfibios y se sabe que transmiten patógenos a diversos grupos de animales incluyendo al hombre.^{67,68} La familia Culicidae (grupo al que pertenecen los mosquitos), se divide en tres subfamilias: Anophelinae, Culicinae y Toxorhynchitinae. En los culícidos ocurren 4 estadios larvales y según lo manifestado por Forattini,⁶⁹ en la que a excepción de la última fase del ciclo de vida (el adulto), todas las demás fases ocurren en el ambiente acuático y se denominan formas inmaduras. El ambiente acuático donde ocurren y viven estas fases recibe el nombre técnico de criaderos. Tanto los huevos, como las larvas y las pupas tienen un hábitat en común, el ambiente acuático. Las larvas están provistas de un sifón largo en el octavo segmento abdominal, generalmente con un pecten bien desarrollado y uno o varios penachos de sedas y son de vida acuática. Las pupas son grandes, presentan pequeñas trompetas respiratorias y son muy activas al nadar. Los adultos, con palpos maxilares pequeños en relación al tamaño de la proboscis en las hembras y son largos en los machos. El escutelo es trilobulado con sedas en cada lóbulo, el abdomen cubierto por escamas anchas, casi siempre de posición horizontal. Los huevecillos son depositados en grupos flotantes compactos en la superficie del agua o individualmente arriba del agua. El género *Culex*, incluye un número de vectores comprobados y potenciales de arbovirus y malaria aviar. Generalmente prefieren alimentarse de aves, aunque la estenoxicidad es poco común. Pasan el invierno como hembras inseminadas en diapausa, preparándose para la hibernación,

disminuyendo su alimentación de sangre y la hipertrofia del tejido adiposo en respuesta a las temperaturas frías y días más cortos. *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.⁶⁷

El ciclo de vida desde la eclosión del huevo (alrededor de 48 h. después de ser puesto) es en promedio de 10 días, a las pocas horas (>24 horas) la hembra está en condiciones de picar y oviponer dos a tres días después. *Culex quinquefasciatus* y *Culex pipiens* son especies originalmente ornitófilas, aunque se pueden alimentar de animales, incluido el hombre. La conducta alimentaria de estos insectos está determinada por su fisiología, requiriéndose un alto contenido proteico en la ingesta para la oviposición de las hembras grávidas. Los huevos se depositan en el agua o en las paredes de recipientes que la contengan, por lo que la asociación al medio acuático obliga a este grupo a permanecer en lugares que provean de estas condiciones en las inmediaciones. Las larvas que emergen de los huevos embrionados, cumplen su ciclo larval de 4 estadios en el recipiente original, cada uno de estos culmina con la renovación del exoesqueleto. El siguiente y último estadio larval en el desarrollo acuático del mosquito es la pupa, que se caracteriza por ser móvil, no alimentarse, es de difícil identificación taxonómica, y presenta el mayor número de cambios morfofisiológicos (metamorfosis holometábola).⁷⁰ Finalizado este periodo, emerge del agua el mosquito adulto, no maduro sexualmente, requiere de 10 a 24 horas para completar su desarrollo, convirtiéndose en un insecto volador y sexualmente apto (Figura 2). La etapa adulta es en general muy variable en cuanto a características físicas que permiten su clasificación e identificación.⁷¹

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,⁶⁷ pudiendo ser halladas en la ciudad de Ayacucho, valles interandinos y la selva del río Apurímac colonizando en el estado larvario diversos tipos de ambientes desde criaderos naturales hasta los artificiales como contenedores, principalmente tachos de plástico, baldes, botellas descartables desprovistas de tapa, charcas, pozos de cemento, pozas de oxidación, etc. que almacenan agua temporal y putrefacta con abundante materia orgánica en descomposición.⁷²

El estudio de la biología y ecología de los culícidos permite perfeccionar las medidas de control, lo que adquiere gran importancia respecto a especies que se comportan como vectores de distintas familias de virus que afectan al hombre y los animales. Sin embargo numerosos aspectos relacionados no solo con la biología y ecología sino también con la taxonomía, hábitos de estos insectos y sobre todo las formas de control permanecen desconocidos o escasamente abordados. Numerosas especies son de hábitos endófilos o con tendencia a la domesticidad, ambos comportamientos importantes en la transmisión de patógenos.⁶⁹

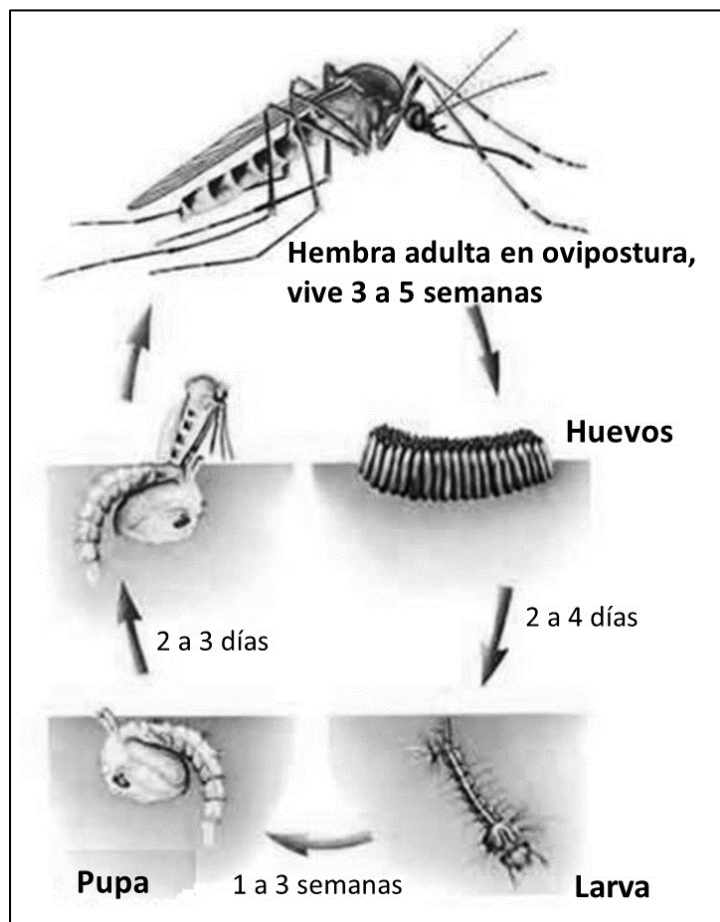


Figura 2. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus*.⁷³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

3.1.1. Ubicación política

La presente investigación fue llevada a cabo en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga - región Ayacucho, teniendo como centros de investigación:

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

3.1.2. Ubicación geográfica

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



Figura 3. Lugar de muestreo de hojas de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi" Comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región Ayacucho.



Figura 4. Lugar de colecta de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Distrito de Jesús de Nazareno - Ayacucho.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”, procedentes de la comunidad de Cusibamba, distrito de Morochucos, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

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

3.2.3. Unidad de análisis

Vasos descartables conteniendo 100 mL de agua deionada más el volumen adecuado de la dilución hidroalcohólica y 10 larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Anexo 10).

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección y preservación del material biológico

a) Hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”.

La recolección de las hojas de la planta *Lupinus mutabilis* “tarwi”, se realizó en horas de la mañana a fin de conseguir las frescas y en las mejores condiciones fisiológicas. Las hojas recolectadas, fueron colocadas cuidadosamente en bolsas de papel y etiquetadas con las características geográficas de la zona de recolección, posteriormente fueron transportadas cuidadosamente hasta el laboratorio de Zoología (FCB-UNSC). 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 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, por separado, con una solución de agua e hipoclorito de sodio (mezcla de 1000:1), posteriormente fueron colocadas las muestras sobre papel absorbente limpio, cambiando el papel inicialmente a la hora y luego cada 24 horas y removiendo las partes vegetales para evitar su descomposición, por un periodo de 15 días. Las muestras desecadas fueron molidas, por separado, 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 en las lagunas de maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

(PTAR) "Totora" utilizando para ello un *dipper* muestreador de 350 mL de capacidad y una red entomológica. El material biológico colectado, fue trasladado hasta el laboratorio de Zoología (FCB, Ciudad Universitaria-UNSCH), utilizando para ello baldes de plástico de 2 L de capacidad con tapa hermética; una vez en el laboratorio las larvas fueron separadas por morfotipos y posteriormente fue llevado a cabo la confirmación taxonómica de la especie de mosquito y la separación de los ejemplares de un mismo porte y tamaño (preferentemente del III instar tardío del insecto) para las pruebas experimentales.

Las larvas seleccionadas de *Culex quinquefasciatus* fueron mantenidas en una pecera de vidrio de 5 L de capacidad (tamaño: 50 x 40 x 40 cm), conteniendo 3 L de agua procedente de las lagunas de maduración de la PTAR-"Totora" mezclada con agua limpia en proporción 1:1, y acondicionadas en la sala de investigación del laboratorio de Zoología a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $57 \pm 3\%$ (therma-hygrometer ®) y un fotoperiodo de 12 horas (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 y diluciones de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi"

El extracto hidroalcohólico fue preparado a partir del material vegetal previamente secado, molido y pesado. 80 g del tamizado de hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" fueron macerados en un litro de alcohol al 95% durante 3 días con frecuente agitación; los extractos obtenidos fueron filtrados y destilados a presión reducida en un rotaevaporador a temperatura controlada de 40°C , los extractos obtenidos fueron recogidos en una botella de vidrio de color ámbar y almacenado en refrigeración a 4°C , al residuo de los filtrados se le añadió 500 mL de alcohol al 95% permitiendo su maceración por dos días. Se procedió en forma similar que el caso anterior, lográndose una cantidad adicional del extracto hidroalcohólico. Finalmente los extractos producidos y el excedente del alcohol presente en las muestras fueron evaporados a temperatura menor de 40°C hasta llegar a una concentración alcohólica de un grado (igual a 0° de alcohol). Las diluciones que fueron utilizadas en los bioensayos de evaluación del efecto biotóxico del extracto de hojas de la planta, fueron preparadas a partir de la solución madre producida [concentración de solución madre inicial de 80 000 partes por millón (ppm)].

Las diluciones formuladas de los productos biotóxicos tanto de las semillas y hojas a evaluar, correspondieron a las siguientes concentraciones: 2000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 30000 ppm, concentraciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes menores presentes en el extracto hidroalcohólico producido, con los cuales fueron llevadas a cabo las pruebas de dosis mortalidad de larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*. Estas dosis fueron establecidas posterior al desarrollo de dos pruebas piloto con concentraciones de 5 000, 10 000, 15 000 y 20 000 ppm en volúmenes de 10 y 5 mL diluidos en 100 mL de agua limpia y declorada conteniendo 10 larvas del mosquito en los vasos experimentales.

3.3.3. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”

Obtenidos los aceites esenciales y demás sustancias hidroalcohólicas solubles presentes en los extractos de las hojas de la planta en estudio, se llevó a cabo la identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar) a fin de relacionar la presencia de alguno de sus componentes con las características biotóxicas de la planta. El análisis de los componentes de cada aceite y su identificación correspondiente fueron realizadas siguiendo los procedimientos descritos por Miranda y Cuellar⁷⁴ y Lock⁷⁵ (Anexo 1, 6).

3.3.4. Evaluación de la biototoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”

Para este propósito los ensayos fueron realizados en vasos plásticos descartables de 7,0 cm de ancho por 7,5 cm de alto (capacidad: 200 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 declorada; utilizando una pipeta plástica (pipeta de Pasteur plastibrand®), fueron separados 10 larvas de III instar por vaso para cada una de las dosis a evaluar (2000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 30000 ppm), al que previamente se les añadió 90 mL de agua potable declorada, para luego ser completada al volumen de 100 mL con 10 mL adicional de cada uno de los extractos formulados. Cada dosis evaluada fue realizado por cuadruplicado con su respectivo control tomando en cuenta las normas planteadas por la WHO⁷⁶, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $57 \pm 3\%$ (thermohygrometer®) (Anexos 8, 9).

Las lecturas de mortalidad fueron llevadas a cabo a las 24 horas posteriores al inicio del experimento.^{77,37} Las larvas fueron declaradas muertas cuando no

reaccionaron al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical.⁷⁸ En el blanco no se reportó mortalidad larval, por lo que no fue necesario llevar a cabo la corrección de los resultados de la biotoxicidad en las pruebas experimentales, a través de la fórmula de Abbott.³⁷

3.3.5. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) y sus respectivos límites de confianza al 95% fue utilizado el método Probit, para lo cual se preparó una base de datos con los resultados de la mortalidad larval hallada en cada una de las dosis evaluadas del producto biotóxico, procediéndose al análisis utilizando el paquete estadístico MINITAB 16. El método de análisis 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.³⁷ El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal, con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de 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 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).⁵⁷

3.4. Diseño de investigación

El diseño experimental fue del tipo aleatorio simple, donde el factor manejado fueron las concentraciones (2000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 30000 ppm), del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis*.

3.5. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en las pruebas del efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", para 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:

- **Porcentaje de mortalidad larvaria**

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

Adicionalmente se elaboraron tablas y figuras estadísticas del tipo descriptivo de tendencia central y de dispersión. Con la finalidad de establecer que dosis del producto biotóxico es más eficiente en el control de larvas de III instar del

mosquito *Cx. quinquefasciatus*, los datos fueron sometidos a un análisis de comparación de medias de Kruskal Wallis con su respectiva desviación estándar ($\alpha=0,05$) entre las dosis formuladas y los porcentajes de mortalidad encontradas, utilizando el procedimiento del paquete estadístico SPSS 15.

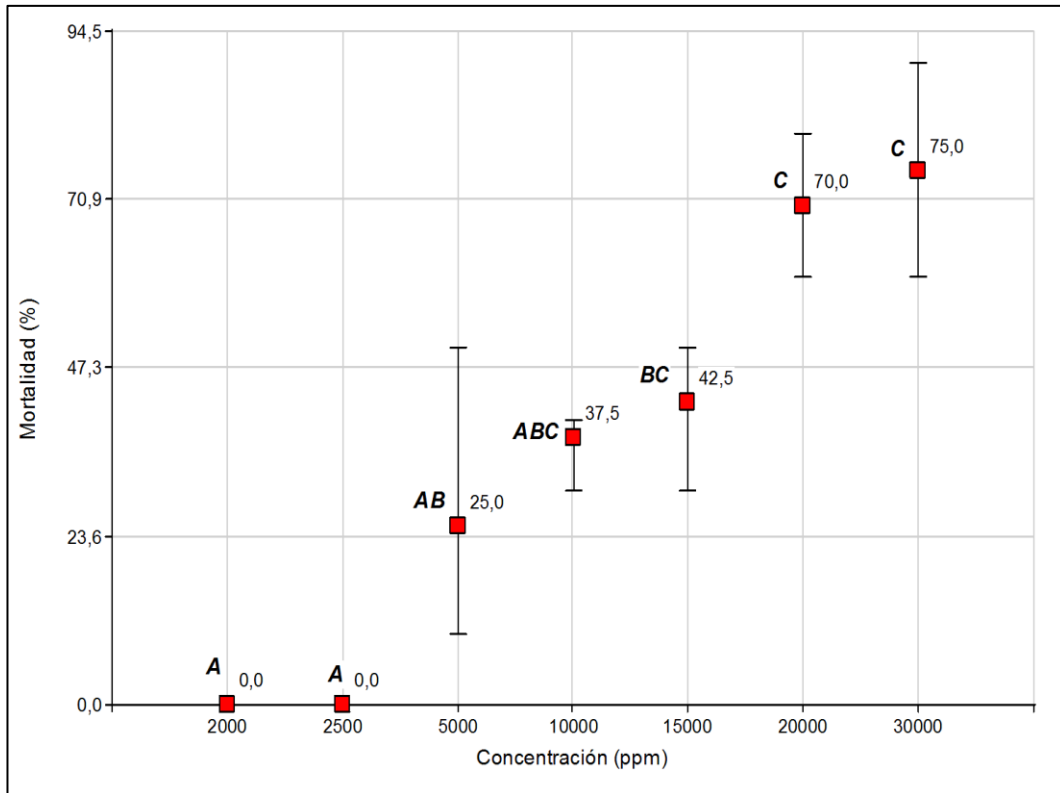
IV. RESULTADOS

Tabla 3. Mortalidad de larvas (N° y %) de *Culex quinquefasciatus* por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" a diferentes concentraciones, en 24 horas de evaluación.

Concentración (ppm)	Densidad larval inicial (N°)	Mortalidad de larvas por repetición				X̄ mort.	% de mort.	Mort. Abate ®
		I	II	III	IV			
2 000	10	0	0	0	0	0,0	0,0	5
2 500	10	0	0	0	0	0,0	0,0	8
5 000	10	1	2	2	5	2,5	25,0	8
10 000	10	4	4	4	3	3,8	37,5	10
15 000	10	3	5	4	5	4,3	42,5	10
20 000	10	7	6	7	8	7,0	70,0	10
30 000	10	8	6	9	7	7,5	75,0	10

Tabla 4. Media y desviación estándar del porcentaje de mortalidad generada a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", sobre larvas del III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Concentración (ppm)	n	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
2 000	4	0,0	0,0	0	0
2 500	4	0,0	0,0	0	0
5 000	4	25,0	17,32	10	50
10 000	4	37,5	5,0	30	40
15 000	4	42,5	9,57	30	50
20 000	4	70,0	8,16	60	80
30 000	4	75,0	12,91	60	90



Kruskal Wallis $\chi^2 = 24,21$; gl = 6; $p = 0,0004$

A, B y C: Medias signadas con letras diferentes en las columnas difieren entre sí por la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Figura 5. Porcentaje de mortalidad (media, máxima y mínima) generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", a concentraciones crecientes, sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

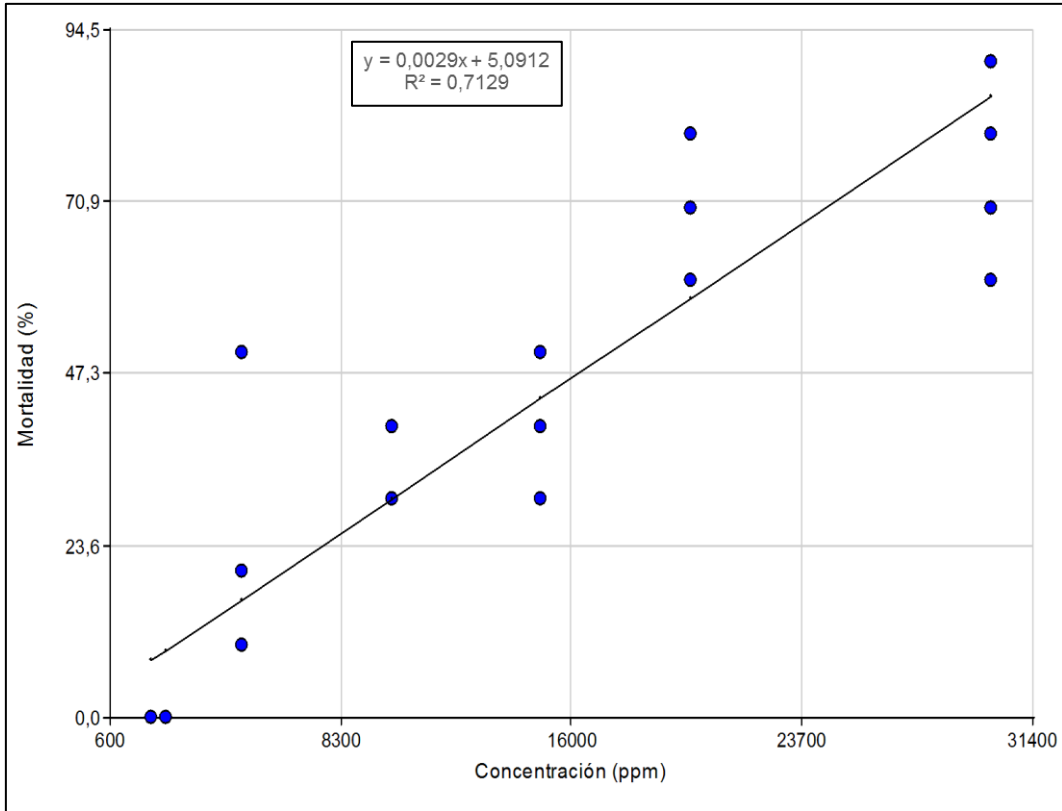


Figura 6. Tendencia lineal del porcentaje de mortalidad generada por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", a concentraciones crecientes, sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

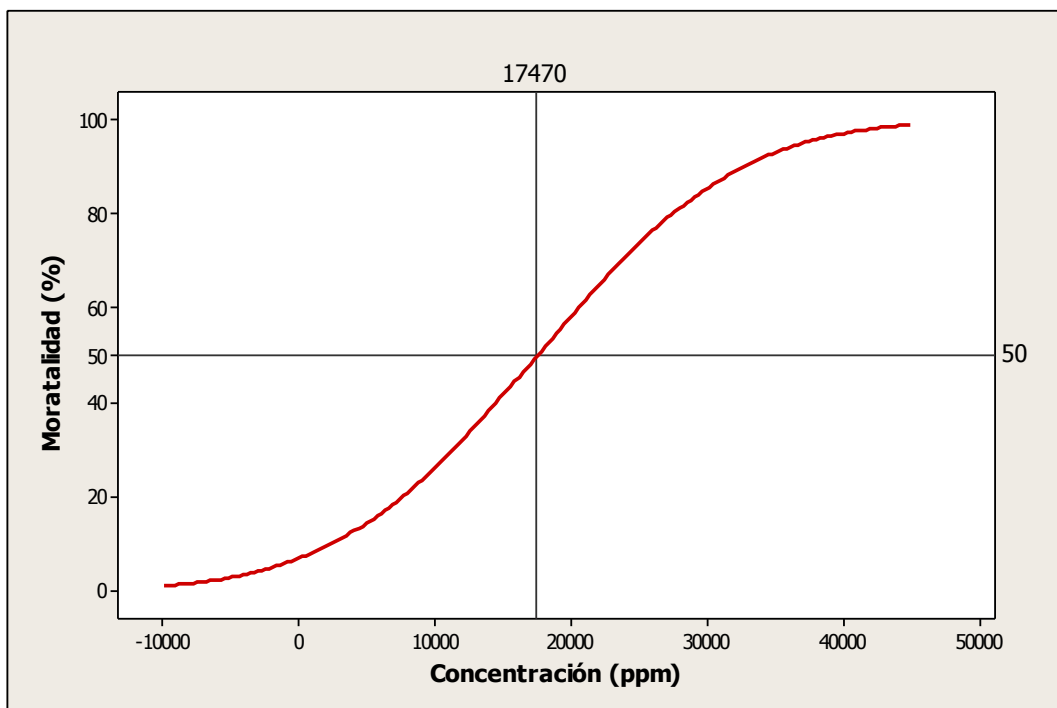


Figura 7. Tendencia de la curva del porcentaje de mortalidad en relación al efecto generado por las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" en larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*, a las 24 horas de evaluación.

Tabla 5. Screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi"

Componentes químicos	Resultados	Observaciones
Fenoles	+++	Regular
Flavonoides	++	Poco
Alcaloides	+	Trazas
Azúcares reductores	-	
Triterpenos	++	Poco
Glicósidos cardiotónicos	-	
Taninos pirogalotánicos	+++	Regular
Espuma - Saponinas	-	
Catequinas	-	
Resina	-	

Leyenda:

- (-) : Ausencia o no determinado
- (+) : Trazas
- (++) : Poco
- (+++): Regular
- (++++): Abundante

V. DISCUSIÓN

La Tabla 3, reporta la mortalidad de las larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus* al ser sometido a distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* "tarwi". Según los resultados, podemos apreciar que la mortalidad larval se incrementó conforme se incrementaron las concentraciones del extracto hidroalcohólico en el medio, alcanzando los máximos valores de mortalidad a partir de la concentración de 20 000 a 30 000 ppm, en la que se logró eliminar entre el 70 (D.E. \pm 8,16) a 75 % (D.E. \pm 12,91) del total de larvas evaluadas (Tabla 4).

Al realizar la prueba de Kruskal Wallis ($P < 0,05$) se halló significancia y al realizar la comparación de medias post hoc ($\alpha > 0,05$) a las concentraciones del extracto hidroalcohólico evaluado y el porcentaje de mortalidad obtenidas, se pudo establecer que existen diferencias significativas para el efecto evaluado ($p < 0,05$; Anexo 3). Al efectuar la categorización de las concentraciones evaluadas en razón de los resultados de mortalidad obtenidas (Figura 5), el análisis estadístico determinó que las mayores respuestas de mortalidad registradas correspondieron a las concentraciones de 20 000(C) y 30 000(C) ppm (70 a 75% de mortalidad, respectivamente), mientras que las menores mortalidades (25 a 42,5%), fueron reportadas a las concentraciones de 5 000(AB) y 15 000(BC) ppm; y con valores de cero a las concentraciones de 2 000(A) a 2 500(A) ppm del producto biotóxico. En este punto la prueba post hoc de comparación de medias de Kruskal Wallis, demostró que los porcentajes de mortalidad en las larvas de III instar de *Culex quinquefasciatus*, son dependientes del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio ($p < 0,05$), es decir que a medida que se incremente las concentraciones del producto biotóxico existe mayores porcentajes de mortalidad larval.

Al realizar el ajuste de los datos del porcentaje de mortalidad obtenidos a una tendencia lineal, se halló que el valor del índice de terminación (R^2) fue de

0,7129, lo que se interpreta estadísticamente como que la variación de la mortalidad de las larvas está explicada en un 71,29% por la variación de las concentraciones de los extractos, reforzando plenamente los resultados hallados en la Figura 5. Así mismo, al realizar el análisis de varianza (Anexo 4) con la finalidad de determinar si el ajuste de la línea de tendencia es el adecuado, se halló significancia a dicho análisis corroborando que el ajuste, estadísticamente, es el adecuado ($p < 0,05$; Figura 6).

Por otro lado al comparar los resultados de mortalidad reportados para las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" en relación al Abate® o temefos, larvicida de uso comercial para el control de larvas de mosquitos, se puede evidenciar que el producto comercial es distantemente más eficiente a las menores concentraciones (1 000 a 2 500 ppm), generando mortalidades entre 50 a 80% de las larvas, concentraciones donde precisamente el formulado a partir del "tarwi", no generó ningún efecto (Tabla 3). El Abate® o temefós es un plaguicida organofosforado sintetizado químicamente, de efecto no sistémico que actúa por contacto e ingestión. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. Se utiliza principalmente como larvicida e insecticida, a una concentración de 1 000 ppm, que garantiza la mortalidad larval en los programas de control vectorial.⁷⁹

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 (*Lupinus mutabilis* "tarwi"), es la más recomendable para el control de insectos de importancia médica, sin embargo al efectuar la interpolación en la recta de dosis mortalidad de Probit (Figura7, Anexo 5), a fin de encontrar la concentración del biotóxico 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 (CL_{50}) fue establecida en 17 470 ppm del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", como la más recomendable para la población de larvas del mosquito culícido presente en la ciudad de Ayacucho. De este resultado se puede afirmar, que si se quiere generar una mortalidad superior al 50 % de larvas de mosquitos culícidos en criaderos larvales naturales o artificiales de la ciudad de Ayacucho, bastaría tan solamente con utilizarse un volumen de 10 mL del producto biocida por cada 100 mL de agua contenida en un criadero larval a una concentración de 17 470 ppm.

Al respecto, Ayala *et al.*,²⁹ al efectuar estudios en semillas de *Lupinus mutabilis* “tarwi”, demostraron que a un volumen de 5 mL por 100 mL de agua de criadero y a la concentración de 5 000 ppm, el extracto hidroalcohólico de la planta produjo efecto biotóxico sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, generando una mortalidad de 75%, siendo la concentración letal media (CL₅₀) estimada en 1 776 ppm como las más recomendables para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho, valores relativamente inferiores a los que reportamos en la presente investigación. Esta diferencia podría ser atribuible al hecho que Ayala *et al.*,²⁹ al efectuar el análisis de la composición química en las semillas de la planta, demostraron que los alcaloides (++++) son los más abundantes, en tanto que los triterpenos, esteroides, saponinas, taninos y flavonoides, fueron reportados con moderada presencia (++) . En este punto, difieren sustancialmente con los componentes y las cantidades que reportamos en el screening fitoquímico preliminar practicado a las hojas del “tarwi”, que reportamos en la presente investigación y que seguramente fue el factor determinante para encontrar tales diferencias (Tabla 5, Anexo 6).

Comparativamente, otras investigaciones podrían ayudarnos a entender el comportamiento tóxico generado por el extracto hidroalcohólico de las hojas del “tarwi” sobre las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, que discutimos en la presente investigación. Por ejemplo, Ramos Casilla *et al.*,²³ 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 sesquiterpen lactonas la actividad larvicida demostrada.

Al efectuar la comparación con los resultados demostrados en la presente investigación, resulta que *Lupinus mutabilis* “tarwi”, alcanzó el CL₅₀ a una concentración mayor (17 470 ppm) en 24 horas de evaluación, notablemente diferente a los resultados reportados para el extracto del hueso de *Persea americana* en el control de las larvas de *Aedes aegypti*. En este punto debemos indicar que tanto *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 biotóxico estudiado, seguramente podría ser funcional para ambos grupos de insectos a la concentración propuesta.

Mariños *et al.*,²⁵ 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 tóxicas reportadas para *Lonchocarpus utilis* “cube o barbasco” en comparación al efecto biotóxico producido por el extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* “tarwi” en las larvas del mosquito culcideo, podrían deberse a las condiciones como fueron evaluados ambos extractos. Mariños *et al.*,²⁵ no demuestran con claridad como procedieron para establecer las concentraciones evaluadas, mucho menos reportan pruebas estadísticas que validen dichos resultados, por lo que resulta ser poco fiable la citada investigación para el análisis del efecto biocida que pretendemos demostrar.

Araujo *et al.*,⁴⁷ 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, concentraciones del extracto de la planta relativamente inferiores a los que reportamos en la presente investigación, seguramente debido a la diferencia en cuanto a la composición fitoquímica presente en ambas plantas.

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 datos hallados en la presente investigación resultan ser alentadores, puesto que en todos los casos las concentraciones tóxicas

utilizadas y que generaron una mortalidad superior al 50% de las larvas de los mosquitos culícidos expuestos, en un periodo de 24 horas, se encuentran en los rangos aceptables.

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" (Tabla 5), se demostró que los principales productos activos presentes en la planta en cantidad regular son los fenoles y los taninos pirogalotánicos (+++). Con poca presencia (++) se documenta a los flavonoides y triterpenos; finalmente los alcaloides son reportados como elementos trazas (+).

La acción tóxica del extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre las larvas de *Culex quinquefasciatus*, probablemente se deba a la presencia de los alcaloides del tipo quinolizidínicos, compuesto que muestra una estructura química variable, y que por definición se dice que son biomoléculas que 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.⁴⁹ Muchas de estas moléculas son las que causan intoxicaciones en humanos, animales y probablemente en los insectos. La forma más común es la intoxicación por infusiones con hierbas con fines medicinales, siendo esta una causa importante de muerte sobre todo en niños. Su presencia en vegetales hace posible su incorporación accidental en alimentos, creando una vía fácil de intoxicación. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otras al sistema nervioso simpático.⁸⁰ Se tiene reportado por ejemplo que, los alcaloides derivados del tropano que contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario le confieren alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides aporfínicos y acetogeninas anonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla.⁵⁰ De las frutas de *Piper nigrum* han sido aislados alcaloides de isobutilamida, los cuales fueron probados contra el tercer estadio de la larva de los insectos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, observándose que el compuesto más tóxico para la primera larva fue la pipericida. En el caso de las larvas de *Aedes aegypti* y *Ae. togoi*, la actividad larvicida fue más pronunciada para retrofractamida A.⁵¹

Los fenoles y flavonoides son polifenoles de distribución muy amplia en las plantas, se han encontrado en más del 60% de las especies vegetales donde se ha investigado su presencia. Además, aunque con frecuencia se piense que los flavonoides son pigmentos exclusivos de flores y frutos, también pueden encontrarse en todo el vegetal, incluidas la raíz, el tallo o las hojas de las plantas,⁸¹ como es el caso de *Lupinus mutabilis* “tarwi”. Si bien los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes. También de una forma bastante general, los fenoles actúan como inhibidores del crecimiento de las plantas, aunque se han encontrado algunas estructuras, que de forma específica lo activan, al inhibir la degradación de una hormona vegetal que es la auxina. Los fenoles suelen acumularse en las capas más superficiales de los vegetales (por ejemplo las hojas) y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos de la planta. También los fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros, por lo que este tipo de animales se nutren de otras plantas.⁸¹

En el campo de la agricultura la lupanina (un tipo de polifenol) puede ser usada como herbicida, así como un buen repelente de insectos. Entre los flavonoides, es reconocido los rotenoides que tienen uso como insecticidas. La rotenona es una sustancia de origen vegetal utilizada antiguamente como insecticida. Desde 2007 no es utilizada como tal y está catalogada como toxina ambiental. Este insecticida vegetal polivalente se extrae de raíces de plantas tropicales leguminosas, las cuales son tóxicas para los animales de sangre fría y ligeramente tóxica para los animales de sangre caliente y el hombre. Actúa por contacto e ingestión. La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH-ubiquinona reductasa), bloquea pues la respiración celular, efecto que se manifiesta con parálisis y posterior muerte del individuo afectado. Una aplicación de la rotenona en la investigación es el estudio del efecto que tienen los radicales libres acumulados en el interior de la célula, debido precisamente al bloqueo de la cadena respiratoria. Esto provoca un estrés oxidativo a partir del cual se puede realizar distintos experimentos.⁸²

Como pudo observarse, algunos derivados químicos de los fenoles y flavonoides podrían estar implicados, conjuntamente con los alcaloides, en la actividad biotóxica demostrada por el extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* "tarwi" en el control de larvas de *Culex quinquefasciatus*.

En cuanto a los triterpenos reportado en la fitoquímica del "tarwi" como un componente de poca presencia (++) (Tabla 5), se tiene reportado por ejemplo que los brassino esteroides (tipo de triterpeno de 30 carbonos), es un componente de la membrana celular bajo la forma de fitoesteroles, algunas son fitoalexinas, varios actúan como toxinas y "feeding deterrents" (repelentes de la alimentación en insectos), otros son componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas.⁸³ Está demostrado por ejemplo que algunos monoterpenos polihalogenados obtenidos de la alga roja *Plocamium cartilagineum*, tienen actividad insecticida y acaricida, fue comprobado así en el efecto tóxico producido en insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de azúcar o cebolla.⁸⁴ Araujo *et al.*,⁴⁷ reportaron que el aceite esencial extraído de las hojas e inflorescencias de *Hypis 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 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%.

Es probable que en caso del extracto hidroalcohólico producido a partir de las hojas de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi", los alcaloides, flavonoides, fenoles, triterpenos y los taninos pirogalotánicos estén desarrollando acción sinérgica para generar el efecto tóxico demostrado en larvas de *Culex quinquefasciatus* presentes en los criaderos larvales naturales y artificiales de la ciudad de Ayacucho. Debemos mencionar además que los aceites esenciales extraídos de las hojas de la plantas *Lupinus mutabilis* "tarwi", consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de los vegetales, pueden estar

localizados en pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal,²² 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,⁸⁵ por lo que el efecto tóxico demostrado en caso del extracto obtenido de las hojas de *L. mutabilis* “tarwi” sobre larvas de los mosquitos culícidos, no es posible ser atribuida a una o dos sustancias presentes con mayor abundancia en relación a otras, sino a la complejidad de los productos hallados, que a diferencia de los plaguicidas sintéticos basados en productos químicos individuales, los aceites esenciales son mezclas de compuestos que contienen muchas sustancias trazas que actúan de manera sinérgica como una defensa estratégica, por lo que dificultan el desarrollo de la resistencia en las plagas.⁸⁶ 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.⁸⁷

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", produjo una mortalidad larval de $70 \pm 8,16$ a $75 \pm 12,91\%$, a las concentraciones de 20 000 a 30 000 ppm del extracto hidroalcohólico, porcentajes de mortalidad estadísticamente diferentes para cada concentración evaluada ($P < 0,05$), dependiente del incremento de la concentración del producto biotóxico en el medio.
2. La concentración letal media (CL_{50}), fue estimada en 17 470 ppm para el extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" y como necesaria para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus* en la ciudad de Ayacucho.
3. El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" demostró que los fenoles y taninos pirogalotánicos son los que se presentan en cantidad regular (+++), seguido de los flavonoides y triterpenos [poca cantidad (++)], finalmente los alcaloides como trazas (+).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar la fitoquímica completa de la planta *Lupinus mutabilis* "tarwi", a fin de establecer que principios activos son los tóxicos y probables responsables de generar la mortalidad en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. A partir de esta determinación, evaluar la posibilidad de su aislamiento y purificación a fin de establecer el efecto biotóxico en pruebas de laboratorio y campo.
2. Realizar un listado regional de plantas nativas con efecto biotóxico en insectos de importancia médica y agrícola, a fin de realizar los estudios fitoquímicos correspondientes y evaluar la posible toxicidad de los extractos hidroalcohólicos producidos, en insectos de importancia médica y agrícola.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. 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. 2008; 51: 890-896.
3. 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 2007, 34: 409-415.
4. Lin CY, Wu DC, Yu JZ, Chen BH, Wang CL, Ko WH. Control of silver leaf whitefly, cotton aphid and kanzawa spider mite with oil and extracts from seeds of sugar apple. Neotropical Entomology. 2009; 38: 531-536.
5. Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresource. Technology. 2006; 89: 99-102.
6. Harve G, Kamath V. Larvicidal activity of plant extracts used alone and in combination with known synthetic larvicidal agents against *Aedes aegypti*. Indian Journal of Experimental Biology. 2005; 42: 1216-1219.
7. Das NG, Goswami D, Rabha B. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. Journal of Vector Borne Diseases. 2007; 44: 145-148.
8. Arias L. Análisis comparativo de dos métodos de aislamiento y determinación de alcaloides de *Lupinus mutabilis*. [Tesis de Licenciatura]. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2008; 57-60 Pp.
9. Jarrín P. Caracterización y tratamiento del agua del desamargado de chocho, proveniente de la planta piloto de la Estación Santa Catalina. [Tesis de Doctorado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Ecuador. 2008; Pp. 14-24.
10. Mc Cawley E. Cardio active alkaloids, In: The alkaloids, chemistry and physiology. Ed. Manske, R. Academic Press, New York, USA. 2005. 560 Pp.
11. 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.). 2005; 20(1): 141-152.
12. 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.
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. 2006; 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. 2008; 38(2): 117-128.
15. Peterson C, Tsao R, Egglar LA, Coats JR. Insecticidal activity of cyanohydrin and monoterpenoid compounds. Molecules. 2006; 5: 648-654.

16. Appel GA, Gehret MJ, Tanley MJ. Repellency and toxicity of mint oil granules to red imported fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). J. Econ. Entomol. 2005; 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. 2005; 97(3): 862-870.
18. Zhang W, McAuslane HJ, Schuster DJ. Repellence of ginger oil to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. J. Econ. Entomol. 2006; 97(4): 1310-1318.
19. 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.
20. 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.
21. Villavicencio Nieto MA, Pérez Escandón BE, Gordillo Martínez AJ. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. Polibotánica. 2010; 30: 193-238. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62114250012>.
22. 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 Maestría]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2011; 61 Pp.
23. 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.
24. Cárdenas Castro E, Lugo Vargas L, Roza Bautista A. Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 y *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), en condiciones experimentales. Entomotropica. 2010; Abril, 25(1): 11-18.
25. Mariños C, Castro J, Nongrados D. Efecto biocida del “barbasco” *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) como regulador de larvas de mosquitos. Rev. peru. biol. 2005; 11(1): 87- 94.
26. Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA y Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008; 99: 541-544.
27. Pérez D, Iannacone J. Efecto biocida de sacha yoco (*Paullinia clavigera* var. *bullata* Simpson) (Sapinaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú. Ecología Aplicada. 2007; 3(1,2): 64-72.
28. Foko GA, Tamesse JL, Fekam F. Adulticidal effects of essential oils extracts from *Capsicum annum* (Solanaceae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Zingiber officinales* (Zingiberaceae) on *Anopheles gambiae* (Diptere-Culicidae), vector of malaria. Journal of Entomology. 2011; 8: 152-163.
29. Ayala Y, Carrasco C, Enciso E, Portal E, Colos P. Efecto biocida del extracto alcohólico de *Lupinus mutabilis* y *Ruta graveolens* en larvas de *Culex quinquefasciatus*. Instituto de Investigación de Biología. Facultad de

- Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2014. 57 Pp.
30. Brophy M, Castro M. Dosis efectiva media (DE50) del efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *Lupinus mutabilis* Sweeten ratas. [Tesis licenciatura]. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2009. [En línea]. [acceso 04 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.medicina.usmp.edu.pe/congresomundial/000data/temlib.htm.2007058>
 31. 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
 32. 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>
 33. Camacho VDP. Determinación de la actividad insecticida del shampoo con extracto de *Sambucus nigra* L. *Franseria artemisioides* W, y *Tagetes zipaquirensis* H en *Ctenocephalides canis*. [Tesis de Grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Biológicas. Riobamba, Ecuador. 2011. 140 pp.
 34. <http://es.wikipedia.org/wiki/Larva>
 35. Salazar M, Moncada LI. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica* 2004; 24:385-92.
 36. Castañeda CB, Manrique MR, Ibáñez VL, Gamarra CF, Galan LD, Quispe HP. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (“tarwi”, “chocho”), en animales de experimentación. [En línea]. [acceso 04 de mayo de 2015]. Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art3_Vol2_N1-2.pdf
 37. Lagunes TA, Villanueva JJA. Toxicología y manejo de insecticidas. Escuela de Postgraduados. Centro de Ecología y Acarología. México. 1994. 257 pp.
 38. Gámez Rojas CM, Ramírez Riveros EJ. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de La Salle. Colombia, 2008. 208 Pp.
 39. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88: 308-316.
 40. 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.
 41. Ottaway PB. The roots of a healthy diet. *Chem Ind.* 2001; 22: 42-44.
 42. Evans WC. *Farmacognosia*. Editorial Interamericana. España. 1991; Cap. 45: Pp. 692-714.
 43. Eugenia Maggi M. 2004. Insecticidas naturales. Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales. Agencia Córdoba. Ciencia-Unidad CEPROCOR. Colombia. Disponible en: <http://www.monografias.com>

44. Hammond DG, Rangel S, Kubo I. Volatile aldehydes are promising broad-spectrum postharvest insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 4410-4417.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Rodríguez Soana CR, Maynard DF, Phillips S, Trumbel JT. Avocado furans and their tetrahydrofuran analogues: comparison of growth inhibitory and insecticidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48: 3642-3645.
49. 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.
50. 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.
51. Park IJK, 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.
52. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003; 64: 3-19.
53. 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 licenciatura]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Biológicas. Riobamba, Ecuador. 2011. 250 pp.
54. Lizana RDR. Elaboración y evaluación de extractos del fruto de *Melia azedarach* L. como insecticida natural. [Tesis de licenciatura]. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. 2005. 96 pp.
55. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. 15º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial. Ginebra. 1992. Informe Técnico N° 818; 180 Pp.
56. 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.
57. 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*). [En línea]. [Fecha de actualización 26 y 28 de febrero de 2013; acceso 16 de agosto de 2013]. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá. Disponible en: <http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>.

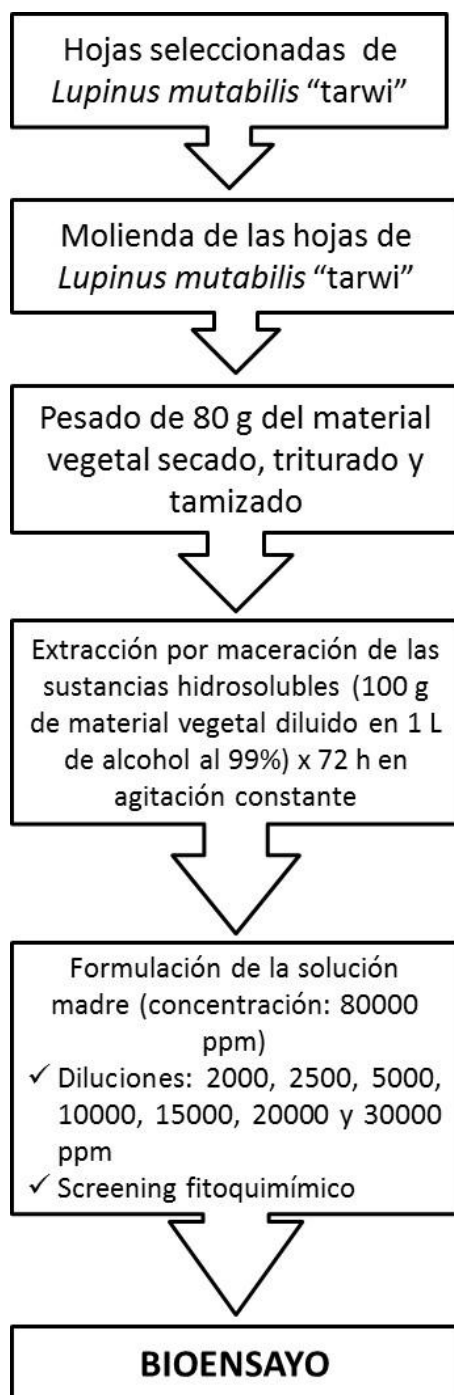
58. Ruiz MA, Sotelo A. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican Wild *Lupinus*. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5336-5339.
59. Gross R. Situación actual de la investigación alimentaria del lupino. Proyecto *Lupinus*. Instituto Nacional de Nutrición. Lima, Perú. 1982. Inf. N° 8:142-167.
60. Tapia ME. El medio, los cultivos y los sistemas agrícolas en los Andes del Sur del Perú. PISA, IICA-CIID. Cusco, Perú. 1982; 102 Pp.
61. Torres F. *Lupinus mutabilis* Sweet. A potent food source from the Andean region. Am. J. Clin. Nutrition. 1976; 25:833.
62. Jacobsen S, Mujica A. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 2006, 458-482.
63. Aucasime L. Descripción botánica de *Lupinus paniculatus* "qera". Museo Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2015.
64. Hatzold T, Idmalfa I, Gross R, Wink M, Hartmann T, Witte L. Quinozilidina alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. J. Agric. Food Chem. 1983, 31,934-938.
65. Belmar R, Nava R. Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. 2010. [En línea]. [acceso 10 de agosto de 2015]. Disponible en:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Produccion_Animal/Alimentacion_Animal/Metabolitos_secundarios.pdf
66. http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas
67. Harwood RF, James MT. Entomología Médica y Veterinaria. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. 1987; 615 Pp.
68. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. Parasitology vector biology. Second Edition. Academia Press. San Diego, California USA. 2000; 796 pp.
69. Forattini OP. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecciones. Rev. Saúde Pública, Sao Paulo. Brasil. 1999; 32(6): 497-502.
70. Forattini O, Kakitani I, La Corte Dos Santos R, Kobayashi K, Ueno H, Fernández Z. Potencial sinantrópico de mosquitos *Kerteszia* e *Culex* (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. Rev Saúde Pública. 2005; 34: 565-9.
71. Viedma M, Baragaño J, Notario A. Introducción a la entomología. Ed. Alambra. España. 2009; 61-74 pp.
72. Ayala YO. Capacidad predatoria 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-UNSH. Ayacucho-Perú. 2009. 50 pp.
73. <http://www.controldepragasbiocontrol.com.br/wpcontent/uploads/2011/11/ciclo-pernilongo.jpg>
74. Miranda MM, Cuellar CA. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. Universidad La Habana. La Habana. 2000. 324 Pp.
75. Lock de UO. Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. Lima. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima. 1994. 145 pp.
76. World Health Organization (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva, Switzerland. 1981. WHO/VBC/81.807. 66 Pp.

77. 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.
78. Consoli R, Laureço de Oliveira R. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Editorial Fiocruz. Brasil. 1999; 225 Pp.
79. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL). Temefos. Ficha técnica. En Plaguicida con prontuario. 2009. [En línea] [acceso 12 de agosto de 2015]. Disponible en: http://www.rap-al.org/articulos_files/Temefos_Enlace_84.pdf
80. Robinson T. *The biochemistry of alkaloids*. Second edition. Springer-Verlag New York Inc. New York 10010, U.S.A. 1981. 211 Pp.
81. Palazón J, Cusidó RM, Morales C. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. Ciencia y Tecnología. Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. [En línea]. [acceso 12 de agosto de 2015]. Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm
82. Marín L, Juan C. Fitoquímica y Evaluación Biológica de *Polygonum punctatum*". [Tesis de maestría]. Instituto de Química. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia; 2001.
83. Wikipedia.com. Terpeno [base de datos en línea]. Fundación Wikimedia, Inc., [actualizado el 29 de noviembre de 2013; acceso 17 de marzo de 2014]. Disponible en:<http://es.wikipedia.org/wiki/Terpeno>
84. <http://www.insectariumvirtual.com>
85. Misra G, Pavlostathis SG. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997; 47: 572-577.
86. Feng R, Isman MB. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. Experientia. 1995; 51: 831-833.
87. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 2006; 51: 45-66.

ANEXOS

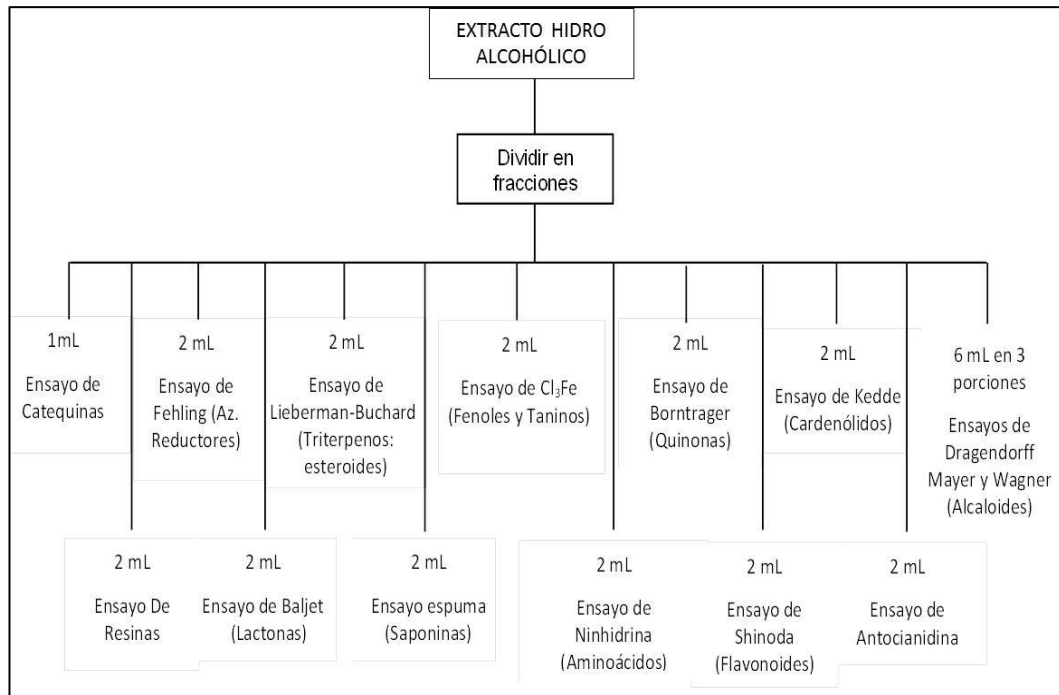
Anexo 1.

Secuencia de extracción de las sustancias alcohol solubles presentes en las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", marcha fitoquímica y preparación de las diluciones para el bioensayo.⁵⁷



Anexo 2.

Esquema de caracterización química de los aceites esenciales y demás componentes alcohol soluble presentes en las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi", e identificación de los componentes químicos (screening fitoquímico preliminar).^{74,75}



Anexo 3.

Prueba de Kruskal Wallis para la comparación de las medias de la mortalidad (%) generada por las concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* "tarwi", sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Variable	Concentración (ppm)	N	Medias	H	p
Mortalidad (%)	2000	4	0,0	24,21	0,0004
Mortalidad (%)	2500	4	0,0		
Mortalidad (%)	5000	4	25,0		
Mortalidad (%)	10000	4	37,5		
Mortalidad (%)	15000	4	42,5		
Mortalidad (%)	20000	4	70,0		
Mortalidad (%)	30000	4	75,0		

Tratamiento	Ranks			
2500	4,5	A		
2000	4,5	A		
5000	12,25	A	B	
10000	14,75	A	B	C
15000	16,5		B	C
20000	24,0			C
30000	25,0			C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha > 0,05$)

Anexo 4.

Análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad (%) generada por concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de *Lupinus mutabilis* "tarwi", sobre larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19566,17	1	19566,17	123,49	<0,0001
Concentración (ppm)	19566,17	1	19566,17	123,49	<0,0001
Error	4119,54	26	158,44		
Total	23685,71	27			



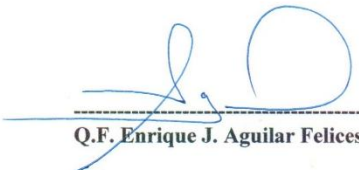
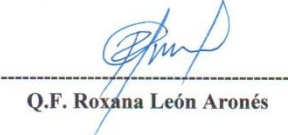
Anexo 5.

Tendencia de mortalidad acumulada teórica (análisis de Probit) de larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* generada por las concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

Porcentaje	Percentil	Error estándar	IC fiducial (95%)	
			Inferior	Superior
1	-9924.96	2864.88	-17049.1	-5267.02
2	-6714.82	2526.50	-12969.9	-2588.92
3	-4678.09	2316.13	-10390.4	-881.182
4	-3145.94	2160.81	-8455.72	409.313
5	-1899.65	2036.77	-6886.61	1463.62
6	-838.861	1933.14	-5554.94	2364.89
7	91.2419	1844.00	-4390.79	3158.59
8	924.038	1765.77	-3351.60	3872.42
9	1681.43	1696.10	-2409.46	4524.59
10	2378.62	1633.38	-1545.06	5127.74
20	7559.26	1229.38	4751.93	9735.92
30	11294.9	1053.49	9053.96	13297.3
40	14486.8	1026.57	12470.4	16599.9
50	17470.2	1113.87	15426.1	19924.2
60	20453.7	1287.90	18200.4	23429.9
70	23645.6	1536.82	21039.6	27309.8
80	27381.2	1876.34	24264.5	31948.3
90	32561.8	2393.22	28644.6	38473.3
91	33259.0	2465.30	29229.0	39356.5
92	34016.4	2544.09	29862.9	40316.8
93	34849.2	2631.28	30558.9	41373.9
94	35779.3	2729.26	31335.0	42555.7
95	36840.1	2841.71	32218.7	43904.9
96	38086.4	2974.67	33255.3	45491.7
97	39618.5	3139.21	34527.5	47444.7
98	41655.3	3359.51	36215.5	50043.9
99	44865.4	3709.64	38870.4	54146.3

Anexo 6.

Tamizaje fitoquímico de los componentes hidroalcohólicos solubles presentes en las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".

	Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD Escuela de Formación Profesional de FARMACIA Y BIOQUÍMICA																							
LOS QUE SUSCRIBEN, DOCENTES DE LA ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA:																								
HACEN CONSTAR																								
Que luego de realizar el screening fitoquímico cualitativo realizado en el laboratorio de Farmacognosia "Jack Harrison Thiel" se puede concluir que la muestra contiene:																								
<table border="1"><thead><tr><th>Metabolitos secundarios</th><th>Gladiolo</th></tr></thead><tbody><tr><td>Fenoles</td><td>+++</td></tr><tr><td>Flavonoides</td><td>++</td></tr><tr><td>Alcaloides</td><td>-</td></tr><tr><td>Azucares reductores</td><td>-</td></tr><tr><td>Triterpenos</td><td>++</td></tr><tr><td>Glicósidos cardiotónicos</td><td>-</td></tr><tr><td>Taninos pirogalotánicos</td><td>+++</td></tr><tr><td>Espuma- Saponinas</td><td>-</td></tr><tr><td>Catequinas</td><td>-</td></tr><tr><td>Resinas</td><td>-</td></tr></tbody></table>			Metabolitos secundarios	Gladiolo	Fenoles	+++	Flavonoides	++	Alcaloides	-	Azucares reductores	-	Triterpenos	++	Glicósidos cardiotónicos	-	Taninos pirogalotánicos	+++	Espuma- Saponinas	-	Catequinas	-	Resinas	-
Metabolitos secundarios	Gladiolo																							
Fenoles	+++																							
Flavonoides	++																							
Alcaloides	-																							
Azucares reductores	-																							
Triterpenos	++																							
Glicósidos cardiotónicos	-																							
Taninos pirogalotánicos	+++																							
Espuma- Saponinas	-																							
Catequinas	-																							
Resinas	-																							
Leyenda: Abundante: ++++ Regular: +++ Poco: ++ Trazas: +																								
 Q.F. Enrique J. Aguilar Felices		Ayacucho 06 de agosto del 2015  Q.F. Roxana León Aronés																						
<hr/> http://www.farmaciauensch.edu.pe - E-mail: direccion@farmaciauensch.edu.pe Av. Independencia S/N - Ciudad Universitaria "Los Módulos" Portal Independencia N° 57 - Apartado 220 - Telf: 066-329626 Ayacucho - Perú																								

Anexo 7.

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



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

C E R T I F I C A

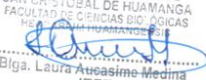
Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. **Nataly Cinthia, HUAMÁN CAMPOS**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

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

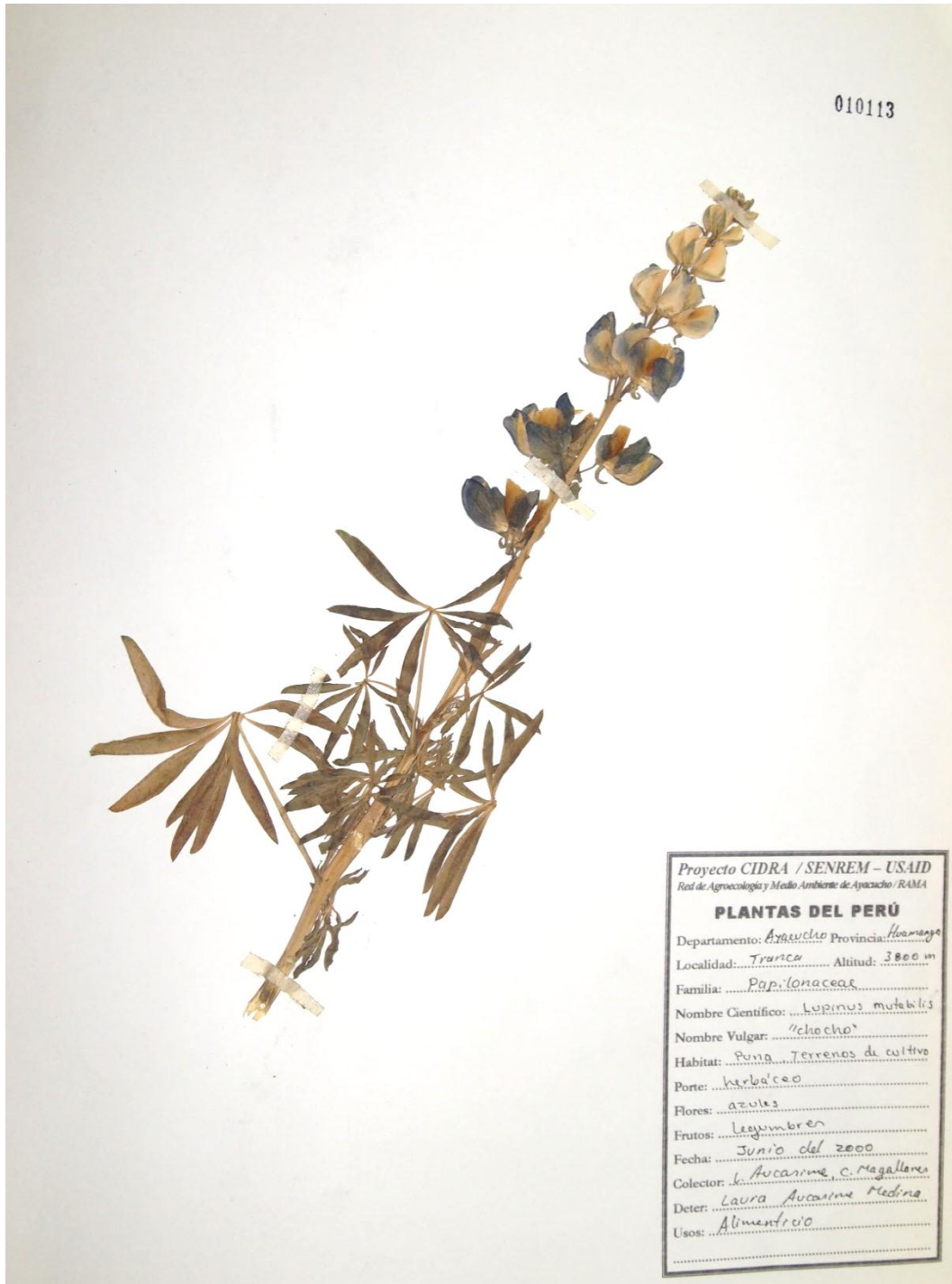
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 22 de Setiembre del 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Biga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 8.

Fotografía de las características morfológicas de la planta *Lupinus paniculatus* "qera".



Anexo 9.

Unidades experimentales con agua de criadero e incorporación de las larvas de III instar del mosquito *Culex quinquefasciatus* para las pruebas de biotoxicidad.



Anexo 10.

Preparación de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".



Anexo 11.

Unidades experimentales y distribución de las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".



Anexo 12.

Unidades experimentales conteniendo larvas de *Culex quinquefasciatus* y las diluciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi".



Anexo 13.
Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA	MARCO TEÓRICO
<p>Problema principal: ¿Cuál será el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi" a concentraciones crecientes, sobre larvas del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>, en comparación con el estándar comercial Abate®?</p>	<p>Objetivo general: Evaluar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi" sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>a) Determinar el efecto biotóxico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi", sobre larvas de III instar del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> a las 24 horas de exposición.</p> <p>b) Determinar la concentración letal media (CL50) del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi" sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p>c) Realizar el screening fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi".</p>	<p>El extracto hidroalcohólico formulados a partir de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi" en concentraciones crecientes, tienen diferente efecto biotóxico sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p>	<p>Variable independiente: Concentraciones crecientes del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi"</p> <p><u>Indicador:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Concentraciones: 500, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000 y 15000 mg/L. <p>Variable dependiente: Efecto biotóxico sobre larvas de III instar del mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>.</p> <p><u>Indicadores</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Número y porcentaje de larvas muertas a las 24 h de exposición Número de larvas muertas a la concentración letal (CL₅₀) 	<p>Tipo de investigación: Aplicativo</p> <p>Nivel de investigación: Básica experimental</p> <p>Método: Aplicativo y analítico</p> <p>Diseño: El diseño experimental fue del tipo aleatorio simple, donde el factor manejado fueron las concentraciones (2000, 2500, 5000, 10000, 15000, 20000 y 30000 ppm), del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Lupinus mutabilis</i>.</p> <p>Muestreo: Aleatorio</p> <p>Técnicas: Observación Determinación Experimentación</p> <p>Instrumentos: Estereoscopio Microscopio Cámara digital Computadora laptop GPS</p>	<p>Los productos naturales de origen vegetal, con actividad insecticida potencial, son considerados alternativas válidas sobre los plaguicidas sintéticos convencionales en el control de una amplia variedad de insectos-plagas. El uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control de los mosquitos ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia, efectos indeseables sobre organismos no específicos y la vida silvestre e impactos negativos en el medio ambiente. Frente a esta problemática, los aceites extraídos de diversas plantas son una de las alternativas viables que últimamente está siendo estudiada con el objetivo de evaluar su actividad irritante, repelente y tóxica frente a diferentes especies de plagas. Las plantas y sus derivados, han mostrado actividad biotóxica en insectos, entre éstos los mosquitos, grupo en el que se encuentran <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae). Utilizar el extracto hidroalcohólico de hojas y semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> "tarwi", en el control de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>, que abundan en la ciudad de Ayacucho, produciendo picaduras dolorosas e irritantes, resulta ser una alternativa de bajos costos económicos y compatible con el ambiente.</p>