



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES
VEGETALES SOBRE *Aedes Aegypti***

CRISTHIAN ANTOLIN OJEDA OVIEDO

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES
VEGETALES SOBRE *Aedes Aegypti***

CRISTHIAN ANTOLIN OJEDA OVIEDO

Tutora: PROF. DRA. NILSA GONZALEZ BRITEZ

**Co-tutores: PROF. DR. NELSON ALVARENGA, PROF. DRA.
SILVIA CABALLERO**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Ojeda Oviedo, Cristhian Antolin

Actividad larvicida de extractos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti* / Cristhian Antolin Ojeda Oviedo; tutora: Nilsa Elizabeth González Brítez; cotutores: Nelson Luis Alvarenga Sosa; Silvia Beatriz Caballero de Colombo.- - San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xix, 109 ; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. *Aedes aegypti* 2. *Ruta chalepensis* 3. *Cymbopogon citratus* 3. *Annona sp* 4. *Jatropha curcas* 5. Larvicidas I. Título

CDD (ed. 18ª) 633.898
Oj2a



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. NILSA ELIZABETH GONZALEZ BRITZ, DOCENTE
INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE
LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Actividad larvicide de extractos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Cristhian Antolin Ojeda Oviedo** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los días 20 del mes de mayo de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Nilsa González Britz



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL PROF. DR. NELSON LUÍS ALVARENGA SOSA, DOCENTE
INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Actividad larvicide de extractos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Cristhian Antolin Ojeda Oviedo** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los días 20 del mes de mayo de 2021.

Co-Tutor: Prof. Dr Nelson Alvarenga



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. SILVIA BEATRIZ CABALLERO DE COLOMBO,
DOCENTE INVESTIGADORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Actividad larvicide de extractos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **Cristhian Antolin Ojeda Oviedo** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los días 20 del mes de mayo de 2021.

CoTutora: Prof. Dra. Silvia Caballero



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE
LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Actividad larvicide de extractos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante **CRISTHIAN ANTOLIN OJEDA OVIEDO** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. DRA. NILSA ELIZABETH GONZALEZ BRITZ** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 4 días del mes de Junio del 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédica



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Cristhian Antolin Ojeda Oviedo

Aprobado el 14 de junio del 2021

Tribunal examinador:

Dra. Gladys Antonieta Rojas de Arias, Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Asunción, Paraguay.

Dra. María Luisa Kennedy Rolón, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción (FCQ-UNA), San Lorenzo, Paraguay.

Dra. Edith Alba Luz Segovia Corrales, Centro Multidisciplinario de Innovaciones Tecnológicas (CEMIT), San Lorenzo, Paraguay.

Dr. Jorge Arístides Miret Riquelme, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS-UNA), San Lorenzo, Paraguay.

Prof. Dra. Nilsa Elizabeth González Brítez

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ

DEDICATORIA

A Dios, mis padres, hermanos y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Primero y principalmente a mis tutores del trabajo, a la Dra. Nilsa González Brítez, Dr. Nelson Alvarenga y la Dra. Silvia Caballero, por su paciencia, profesionalismo y enseñanzas, sin su ayuda no habría sido posible realizar este trabajo.

A los investigadores del área del Insectario, Departamento de Medicina Tropical, pasantes y compañeros de maestría, cada uno fue importante en este camino de dos años.

A los docentes de la maestría, por su dedicación a las ciencias, y una mención especial a mis padres, hermanos y amigos, por su apoyo incondicional y palabras de aliento.

ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES VEGETALES SOBRE *AEDES AEGYPTI*

Cristhian Ojeda Oviedo*, **Nilsa González Britez**** **Nelson Alvarenga***** **Silvia
Caballero******

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

*** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**** Departamento de Bioquímica de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

Las arbovirosis, transmitidas por *Aedes aegypti*, producen patologías que afectan seriamente la población mundial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad larvicida de extractos etanólicos de *Ruta chalepensis*, *Cymbopogon citratus*, *Annona sp* y *Jatropha curcas* en larvas L3- L4 de *Ae. aegypti*. Mediante ensayos tipo dosis-respuesta se evaluó la mortalidad de larvas de cepas Rockefeller y salvajes de San Pedro y Central. La especie *R. chalepensis* fue la que presentó mejor actividad larvicida con CL50 entre 161,4 y 215,0 mg/L ($p > 0,05$), seguido por *J. curcas* con valores de 217 y 229 mg/L ($p > 0,05$), y por último *Annona sp* con valores de 371,5 a 505 mg/L ($p > 0,05$). Los valores de FR50 obtenidos para los extractos evaluados son < 3 , indicando alto grado de susceptibilidad en cepas salvajes de *Ae. aegypti*. Adicionalmente, mediante el uso de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas, se logró identificar compuestos alcaloides, cumarinas, flavonoides y acetogeninas en los diferentes extractos etanólicos.

Palabras claves: -*Aedes aegypti* - *Ruta chalepensis* - *Cymbopogon citratus* - *Annona sp* - *Jatropha curcas* -Larvicidas.

LARVICIDE ACTIVITY OF EXTRACTS OF FOUR VEGETAL SPECIES ON *AEDES AEGYPTI*

Cristhian Ojeda Oviedo*, **Nilsa González Britez**** **Nelson Alvarenga***** **Silvia Caballero******

***Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Universidad Nacional de Asunción**

***** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****** Departamento de Bioquímica de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad
Nacional de Asunción**

ABSTRACT

Arboviruses, transmitted by *Aedes aegypti*, produce pathologies that seriously affect the world population. The aim of this work was to evaluate the larvicidal activity of ethanolic extracts of *Ruta chalepensis*, *Cymbopogon citratus*, *Annona sp* and *Jatropha curcas* in L3-L4 larvae of *Ae. aegypti*. By means of dose-response type tests, the mortality of larvae of Rockefeller and wild strains of San Pedro and Centra was evaluated. The species *R. chalepensis* was the one that presented the best larvicidal activity with LC50 between 161.4 and 215.0 mg / L ($p > 0.05$), followed by *J. curcas* with values of 217 and 229 mg / L ($p > 0.05$), and finally *Annona sp* with values from 371.5 to 505 mg / L ($p > 0.05$). The FR50 values obtained for the evaluated extracts are <3 , indicating a high degree of susceptibility in wild strains of *Ae. aegypti*. Additionally, through the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry, it was possible to identify alkaloid, coumarin, flavonoid and acetogenin compounds in the different ethanolic extracts.

Keywords: -*Aedes* - *Ruta chalepensis* - *Cymbopogon citratus* - *Annona sp* - *Jatropha curcas* -Larvicides.

INDICE DE CONTENIDO

I. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	2
1.2 Biología del vector	3
1.3 Distribución geográfica.....	7
1.4 Trasmisión viral	10
1.5 Arbovirosis.....	11
1.6 Métodos de control vectorial	14
1.7 Resistencia a insecticidas	16
1.8 Alternativas para el control vectorial	18
II. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo general.....	25
2.2 Específicos:	25
2.3.1 Hipótesis nula:	25
2.3.2 Hipótesis alternativa:.....	25
III. METODOLOGÍA	26
3.1 Diseño:	27
3.2 Muestras de estudio:	27
3.3 Tipo de muestreo:	27
3.4 Área de estudio:	28
3.5 Trabajo de campo.....	29
3.6 Recolección de muestra:	29
3.7 Material vegetal y obtención de extractos etanólicos:	29
3.8 Trabajo de Laboratorio	30
3.9 Metodología de obtención de <i>Aedes aegypti</i> , estadios L3 y L4.....	30
3.10 Pre test con larvas L3 y L4.....	31
3.11 Ensayos biológicos de dosis respuesta con larvas de <i>Ae. aegypti</i>	32
3.12 Perfiles cromatográficos de extractos con mejor actividad larvicida:	33
3.13 Variables del trabajo	34

3.14 Consideraciones éticas	35
3.15 Gestión y análisis de los datos	35
IV. RESULTADOS	37
4.1 Curvas dosis respuesta	38
4.2 Concentraciones Letales de extractos	41
4.3 Factores de resistencia	43
4.4 Análisis estadísticos	44
4.5 Metabolitos secundarios presentes en los extractos.....	47
V. DISCUSIÓN.....	51
VI. CONCLUSIÓN.....	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII. ANEXOS.....	70
8.1 Anexo 1	71
8.2 Anexo 2	72
8.3 Anexo 3	73
8.4 Anexo 4	74
8.5 Anexo 5	85
8.6 Anexo 6	87
8.7 Anexo 7	88
8.8 Anexo 8	89
8.9 Anexo 9	91
8.10 Anexo 10.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larva de mosquito <i>Aedes aegypti</i>	4
Figura 2. Mosquito adulto de <i>Ae. aegypti</i> , macho y hembra	5
Figura 3. Fisionomía del mosquito adulto de <i>Ae. aegypti</i>	6
Figura 4. Mapa de predicción de la distribución mundial de <i>Ae aegypti</i>	9
Figura 5. Ciclo de infección de arbovirosis por <i>Ae. aegypti</i>	10
Figura 6. Esquema de funciones protectoras de metabolitos en plantas	19
Figura 7. Estructuras de diferentes isómeros de terpenoides	20
Figura 8. Compuestos fenólicos encontrados en plantas	21
Figura 9. Principales alcaloides descubiertos con actividad biológica	22
Figura 10. Curva dosis- respuesta de <i>Ruta chalepensis</i> en larvas L3-L4 de <i>Ae. aegypti</i>	38
Figura 11. Curva dosis- respuesta de <i>Jatropha curcas</i> en larvas L3-L4 de <i>Ae. aegypti</i>	38
Figura 12. Curva dosis- respuesta de <i>Annona sp</i> en larvas L3-L4 de <i>Ae. aegypti</i>	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores CL50 y CL90 en mg/L de extractos etanólicos utilizados para las diferentes cepas de <i>Ae. aegypti</i>	41
Tabla 2. Valores FR50 de cada extracto vegetal	42
Tabla 3. ANOVA de dos factores	44
Tabla 4. Prueba Pos hoc de Bonferroni	45
Tabla 5. Compuestos identificados en el extracto etanólico de <i>Annona sp</i>	47
Tabla 6. Compuestos identificados en el extracto etanólico de <i>J. curcas</i>	48
Tabla 7. Compuestos identificados en el extracto etanólico de <i>R. chalepensis</i>	49

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

AChE: Acetilcolinesterasa

°C: grados Celsius

Gl: grados de libertad

GTS: glutatión S transferasa

Ho: hipótesis nula

H1: hipótesis alternativa

L3 y L4: Estadio larval 3 y 4

LC/MSMS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem

mg/L: miligramos por litro

min: minutos

MSPBS: Ministerio De Salud Pública y Bienestar Social

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAO: Organización Panamericana de la Salud

PPM: partes por millón

SENEPA: Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

El mosquito *Aedes aegypti*, Linneo, 1762, (Diptera, Culicidae), es un insecto que actúa como vector principal del virus del Dengue y otros arbovirus de importancia clínica, la persistencia de estas enfermedades ocasiona grandes problemas de salud pública a nivel mundial. Ante la falta de vacunas efectivas contra estas patologías o bien la disponibilidad de las ya existentes, se opta por estrategias dirigidas a la eliminación de criaderos y/o el uso de insecticidas químicos, siendo esta última la más utilizada (1).

El uso frecuente de insecticidas químicos, puede llevar al riesgo latente de desarrollo de fenómenos de resistencia sobre poblaciones naturales de mosquitos, lo que ocasiona que se aumente la dosis de aplicación de estos compuestos, posibilitando así una posible contaminación en el ambiente, con la acumulación residuos tóxicos (2).

Considerando estos aspectos, el uso de insecticidas de origen vegetal, representan una buena alternativa para el control vectorial, accesible y con bajo costo de producción, varias familias de plantas poseen actividad insecticida reconocida, la mayoría de plantas medicinales crecen con facilidad y son de disponibilidad inmediata. Además, siendo los compuestos activos que de ellas se extraen biodegradables, lo cual los hace más amigables y sustentables con la naturaleza en relación a sus contrapartes sintéticas (3).

En nuestro país, es frecuente el uso de insecticidas químicos como estrategia de control vectorial, pero ante el peligro de aparición de resistencia incipiente en algunas poblaciones naturales de *Ae. aegypti*, su utilización se vería afectada, viéndose la necesidad de investigar nuevos compuestos que sean igualmente efectivos, y que no hayan sido utilizados de manera prolongada como insecticidas, para evitar el fenómeno de resistencia (3).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó la actividad larvicida que presentaron extractos etanólicos de 4 especies de plantas, sobre ejemplares de *Ae. aegypti* de la cepa Rockefeller, criada netamente en el laboratorio y que es utilizada

preferentemente en ensayos tipo dosis respuesta, como cepa de control susceptible. Adicionalmente se evaluó la respuesta en cepas salvajes de *Ae. aegypti*.

Los resultados obtenidos buscan demostrar que productos naturales extraídos a partir de plantas presentes en el Paraguay, presentan componentes activos, para su uso como alternativas de control de vectores, así como, servir de base científica para futuras investigaciones, ante la escasa información existente en relación a esta línea de estudio.

1.2 Biología del vector

Ae. aegypti pasa por varias etapas para llegar a la forma adulta, la cuales son: huevo, cuatro estadios larvarios, pupa y la madura (4).

Los huevos de *Ae. aegypti* son de aproximadamente 1 milímetro de largo, tienen forma alargada parecida a un cigarro, las hembras los depositan en las paredes de recipientes, por encima del nivel del agua. En condiciones de temperatura óptima (25-30°C), una vez que se produzca el desarrollo embrionario completo eclosionan a las 48 horas, soportan largos periodos de tiempo disecados, hasta aproximadamente 1 año, y si vuelven a tener contacto con el agua siguen siendo viables para eclosionar (5).

Las etapas de larva y pupa transcurren netamente en el agua, las larvas se alimentan de materia orgánica presente en el medio de desarrollo, estas tienen la cabeza ovalada y la zona abdominal segmentada, poseen también un sifón lateral que les permite respirar cuando se colocan en la superficie del agua (5). A continuación, se muestra un esquema de la estructura y morfología larval de *Ae. aegypti*:

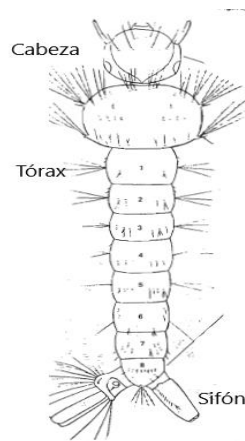


Figura 1. Larva de mosquito *Ae. aegypti* tomado de PAHO 1986 (6).

Las larvas se diferencian en cuatro estadios larvales (L1-L4), el primero es cuando emerge del huevo, en esta etapa las larvas (L1) son casi imperceptibles al ojo humano, tanto la cabeza y tórax son muy translucidos, después que se hayan alimentado por uno o dos días, pasan a L2, en esta etapa ya se pueden apreciar mejor, ya que la cabeza y el tórax ya son más oscuros, y las larvas son de mayor tamaño; esto se va sucediendo hasta llegar a L4, si se dan las condiciones óptimas para el desarrollo (comida y temperatura), el desarrollo de larva a pupa, dura aproximadamente 5 días, pero la media normal ronda entre 7 y 14 días (7).

La siguiente etapa es la metamorfosis, para llegar a la etapa adulta del mosquito, se pasa por un estado denominado pupa, estas ya no se alimentan, se diferencian de otras especies, porque son bastante sensibles a estímulos externos, y son muy móviles en el agua. En cuanto a morfología, son parecidos a una "coma", una vez transcurridos uno a dos días, ya emergen los mosquitos adultos (8).

El mosquito adulto posee un abdomen puntiagudo, presenta coloración oscura y tiene bandas de color blanco en las bases de los tarsos, esta característica es la que la diferencia de otras familias de mosquitos. Existe dimorfismo sexual en el adulto, se puede diferenciar al macho, ya que presenta menor tamaño y mayor cantidad de cerdas en las antenas, en comparación a las hembras de esta especie, en la figura 2 se pueden observar las diferencias existentes en ambos sexos, y una descripción más detallada de las partes del mosquito adulto(figura 3) (8).

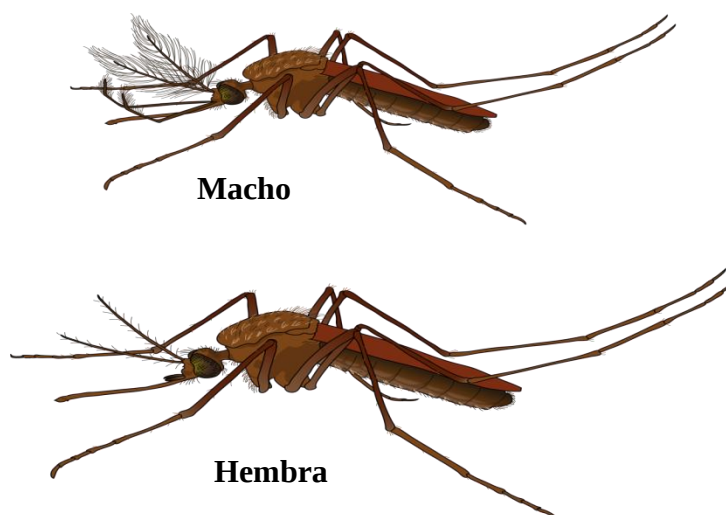


Figura 2. Mosquito adulto de *Ae. aegypti*, macho y hembra. Imagen modificada de: <https://www.pinterest.es/pin/584482857860896312/>.

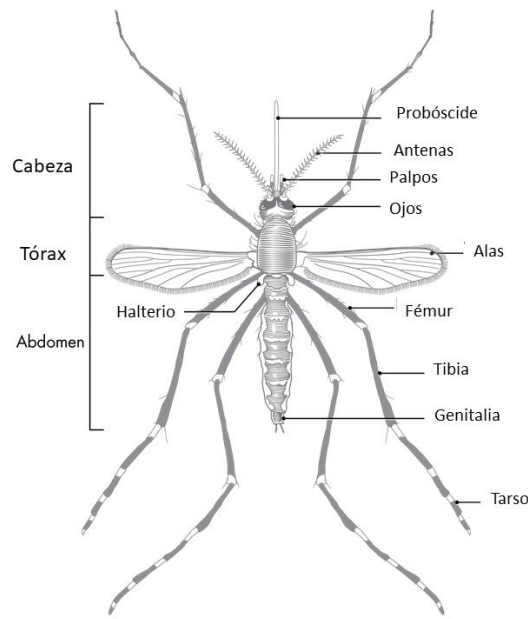


Figura 3. Fisionomía del mosquito adulto de *Ae. aegypti*. Imagen tomada de: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/what-is-a-mosquito.html>.

Los mosquitos adultos se alimentan principalmente de carbohidratos provenientes del néctar de las plantas. Durante la ovoposición, la hembra es capaz de alimentarse de sangre, teniendo preferencia por la humana y ocasionalmente de animales. Normalmente realizan las picaduras por las mañanas, pero también se menciona que realizan esta actividad por las tardes, antes del anochecer (9).

Entre las 24 horas, después de haber emergido, ya son capaces de aparearse, esto ocurre durante el vuelo de estos mosquitos, y una sola inseminación ya puede fertilizar a todos los huevos que desarrollan las hembras a lo largo de su vida. Las hembras necesitan la ingestión de sangre para la ovoposición, colocan sus huevos sobre superficies sólidas, en lugares oscuros y a corta distancia del agua. Pasan alrededor de 3 días desde la ingestión de sangre y la ovoposición (4).

El radio de vuelo de estos mosquitos, depende de algunos factores, ya que la media de vuelo de las hembras es de entre los 50 y 100 metros, que pueden variar si no encuentran en su entorno, los alimentos necesarios o bien los potenciales criaderos, estos pueden migrar hasta una distancia aproximadamente de 3 kilómetros, en busca de recursos (6).

En condiciones de laboratorio, los mosquitos adultos pueden sobrevivir hasta 6 meses, este período de vida es menor cuando se encuentran en condiciones naturales, ya que influyen factores como cambios de temperatura, presencia de depredadores, entre otros; aproximadamente la mitad de una población natural de mosquito muere en la primera semana, y la casi el 95% antes del primer mes de vida adulta (10).

Existen varios linajes de cepas de *Ae. aegypti*, criadas y mantenidas en laboratorios, estas son utilizadas para ensayos biológicos, y son consideradas como cepas control en las investigaciones científicas. Una de la más utilizada, es la cepa Rockefeller, qué según los registros, corresponde a un linaje de 130 años, desde su primer almacenamiento y reproducción; no obstante, existen otras cepas de este vector, que se han utilizado en diferentes trabajos, citando algunos como: Orlando, JHU (Jhons Hopkins University), NIH (Universidad de Notre Dame) y Liverpool. Estas cepas se diferencian en la procedencia de origen, pero, tienen en común un riguroso proceso de selección y mejoramiento de colonias, siendo consideradas como controles en trabajos de susceptibilidad (11).

1.3 Distribución geográfica

La dispersión del mosquito está determinada por la necesidad de encontrar fuentes de alimentación cercanas, así también como sitios propicios para la ovoposición. Algunos estudios indican que la presencia de recipientes en ciertos lugares, es la determinante principal para que ocurra la dispersión de los mosquitos de un sitio a otro (12).

Lo mencionada anteriormente, corresponde a un tipo de dispersión activa, pero también existen dispersiones pasivas, mediante el transporte accidental de mosquitos por medio del hombre, formas maduras o inmaduras presentes en cargas de barcos u otro medio, propician la migración masiva de estos vectores a diferentes partes del mundo(12).

Se cree que la principal vía de entrada del mosquito al continente americano fue mediante la contaminación de depósitos de agua en embarcaciones, esto tuvo lugar en el siglo XIX, luego de la erradicación de este vector en varios países del continente, se produjo una reinfestación mediante mercancías contaminadas con huevos de mosquitos (13).

El ancestro de la forma doméstica del mosquito *Ae. aegypti* habitaba la zona de África subsahariana, estos insectos utilizaban el hueco de los árboles como criaderos y las hembras adultas se alimentaban de sangre animal, estas especies ancestrales aún se encuentran presentes, reconocida como la subespecie *Ae. aegypti formosus*, esta presenta características totalmente selváticas (14).

Anterior a la formación del desierto del Sahara, importantes tramos de lagos y arroyos tenían lugar en este sitio, *Ae. aegypti formosus* poseía entonces un lugar propicio para cumplir su ciclo de vida. El proceso de sequía en esta zona conllevó al aislamiento de estos insectos, con el pasar del tiempo y el aumento de la actividad antropofílica, esta especie tuvo que adaptarse al cambio ambiental sufrido, utilizando recipientes de agua como potenciales criaderos y la alimentación de sangre humana por parte de las hembras adultas (15).

Investigaciones de genómica poblacional de ancestros salvajes de *Ae. aegypti* respaldan estas teorías de domesticación, estudios recientes demuestran que especies domésticas presentes en Asia y América provienen de África, donde se habrían adaptado a la actividad humana y se extendió a diferentes partes del mundo(16). Mediante la actividad comercial de embarcaciones europeas hacia el continente americano, y el desplazamiento de esclavos provenientes de África, se introdujo al mosquito *Ae. aegypti* en el Nuevo mundo (17).

Algunos estudios sobre distribuciones globales de este vector, han concluido que la temperatura es la condición climática más determinante, en cuanto a la migración y establecimiento del mosquito; pero también, factores como índice de vegetación y urbanidad, inciden pero en menor magnitud (18). En un estudio sobre distribución de géneros de *Aedes*, *Kraemer et al. 2015* elaboraron mapas geográficos, donde se indican áreas, donde la temperatura es óptima para el desarrollo de este vector. A continuación, se muestra un mapa de distribución global de las poblaciones de *Ae. aegypti*, registrado en el mencionado trabajo (figura 4) (19).

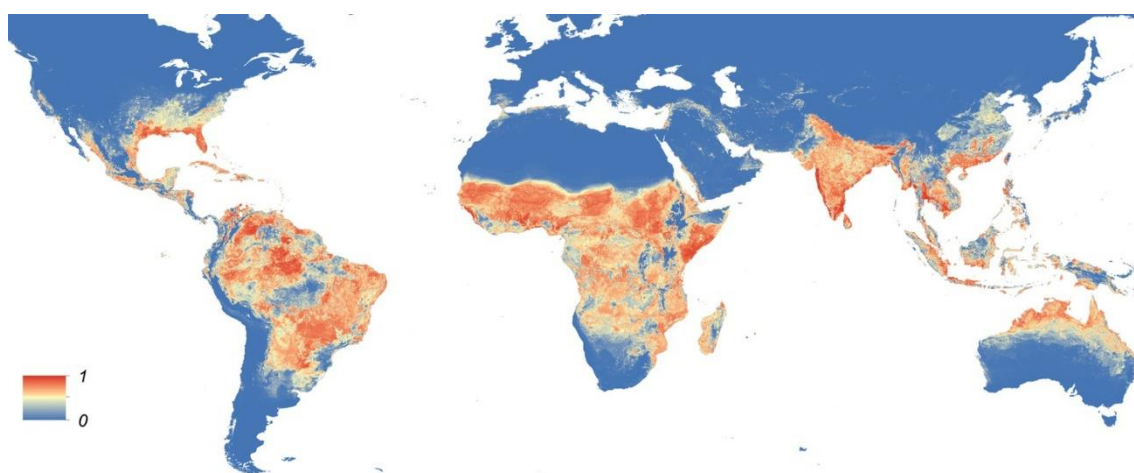


Figura 4. Mapa de predicción de la distribución mundial de *Ae. aegypti*, en rojo la probabilidad de ocurrencia, y en azul la no ocurrencia. *Kraemer et al. 2015*.

Actualmente *Ae. aegypti* se distribuye en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, las condiciones ambientales de temperatura y humedad de estos lugares favorecen el desarrollo de esta especie (20).

1.4 Trasmisión viral

En el continente americano la transmisión ocurre entre humanos y mosquitos, en otros continentes como África o Asia la transmisión también ocurre entre animales y mosquitos, constituyéndose también en una zoonosis. Las hembras adquieren el virus al ingerir sangre de personas infectadas, estos virus posteriormente se concentran en gran cantidad en las glándulas salivales de los mosquitos (Período extrínseco de incubación PEI), y una vez que vuelvan a alimentarse trasmiten el virus a otras personas (15).

Las personas al infectarse con el virus, pasan por un período denominado PII (Período intrínseco de incubación) de aproximadamente 5 días, y posteriormente la aparición de síntomas característicos, donde la concentración del virus en la sangre es bastante alta (figura 5). La eficacia de infectividad del vector, depende de PEI y PII, y factores ambientales como la temperatura (21).

Durante el ciclo gonadotrófico de *Ae. aegypti*, puede picar varias veces, entonces se encuentra en contacto con varios hospedadores. Si un mosquito realiza varias picaduras sobre la misma persona, se aumenta la carga viral con que se infecta a esta persona, aumentando de esa manera la transmisión de arbovirosis (22).

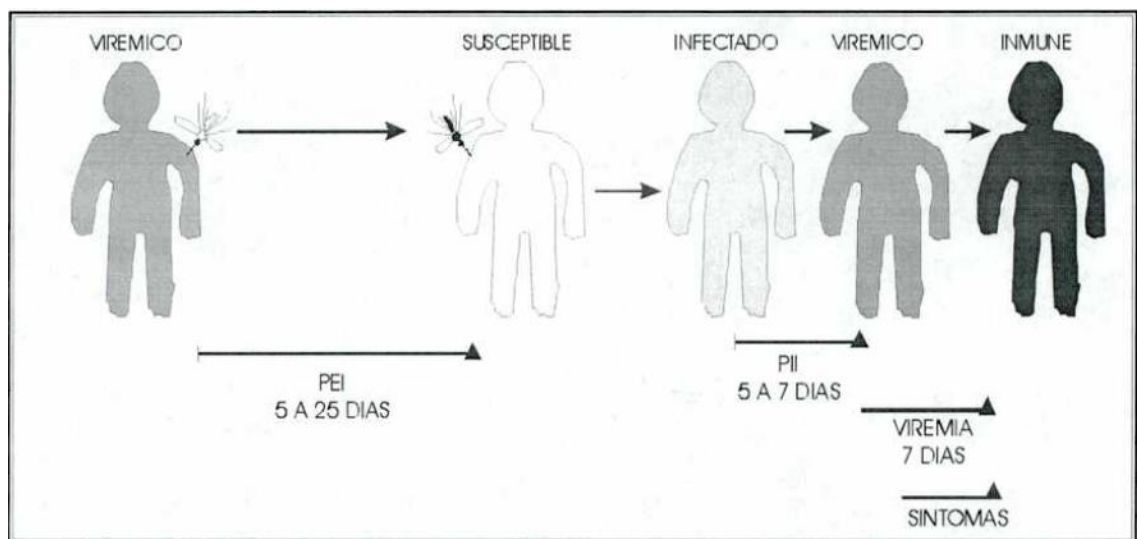


Figura 5. Ciclo de infección de arbovirosis por *Ae. aegypti*. Carbajo, A. 2003 (23).

1.5 Arbovirosis

Zika

Es una enfermedad que presenta tropismo cutáneo, hasta el momento no se reportaron casos de fiebre hemorrágica y fatalidad, pero se ha vinculado a complicaciones neurológicas; los síntomas como la fiebre, cefalea, conjuntivitis y erupción cutánea, son las manifestaciones clínicas más, este virus origina del síndrome de Guillain- Barré en las personas adultas, y causante de microcefalia en recién nacidos (24).

El virus Zika (ZIKV), es del *Flavivirus*, fue aislado por primera vez de un mono denominado Rhesus, y posteriormente del mosquito *Aedes africanus*, en 1954 se detectó el primer caso de Zika en humanos en Nigeria, desde entonces los casos de esta enfermedad se centran mayormente en África y Asia, sin embargo, en 2015 se registró la transmisión viral en el nordeste de Brasil, seguido por su propagación a otras zonas de este país y otros 48 países del continente. El ZIKV puede transmitirse de forma sexual, pero la vía vectorial por picadura de mosquitos sigue siendo la más importante, y de mayor propagación (25,26).

Chikungunya

El virus chikungunya (CHIKV), pertenece al género *Alphavirus*, en 1953 fue aislado por primera vez en humanos en Tanzania, entre los años 1960-1970, se produjeron los primeros brotes registrados en África y Asia, luego de un largo de período de tiempo sin que se registren nuevos casos, para el 2005 se detectó una nueva variante del CHIKV, que produjo pequeños brotes en el sudeste asiático (27).

En el año 2013 la Organización Mundial de la Salud (OMS), recibe la notificación de los primeros casos autóctono de CHIKV en el continente americano, actualmente la cifra de casos sospechosos es de aproximadamente 1.7 millones de personas (28).

Fiebre Amarilla

El virus de la Fiebre amarilla (FV), pertenece al género *Flavivirus*, produce una enfermedad aguda hemorrágica, y es transmitido por mosquitos de los géneros *Aedes*, *Haemagogus* o *Sabethes*, casi el 90% de los casos reportados a nivel mundial son provenientes de África, 34 países de este continente son considerados endémicos, así también, 10 países del continente americano, a pesar de la existencia de una vacuna desde 1930, sigue siendo un problema de salud pública en todos los países del mundo, donde se encuentra presente el vector y las condiciones de transmisibilidad (29).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), informa que en la actualidad existe gran transmisión selvática, en países como, Brasil, Argentina, Venezuela y Colombia. En nuestro país se habían registrado casos autóctonos de la enfermedad en 2008, luego de más de 100 años sin la presencia de la enfermedad, esto preocupó a las autoridades locales, que emplearon estrategias para evitar una epidemia en nuestro país, que consistía principalmente en control vectorial, ante la gran densidad de mosquitos transmisores, y programas de vacunación. A pesar que no se registran casos nuevos hasta la fecha, sigue estando latente el peligro de un nuevo brote en nuestro país (30).

Dengue

El virus causante de la enfermedad Dengue presenta 4 serotipos (DENV1-4), principalmente es transmitido por el mosquito *Ae. aegypti*. La mayoría de los casos de esta enfermedad son asintomáticos, pero también, pueden presentarse cuadros más graves como el dengue grave (DG) o el síndrome de Shock por Dengue (SSD) (31).

Se ha incrementado la incidencia de esta enfermedad en los últimos años, según datos presentados por la OMS, para el 2015 se tenían 3.2 millones de casos de notificados, sin embargo, se estima que el número de infectados puede ser mucho mayor, llegando a 390 millones de infecciones por año a nivel mundial (20).

Los primeros brotes importante de Dengue en el continente americano, tuvieron lugar en el siglo 19, en sitios que presentaban gran movimiento comercial en puertos, como ciudades del Caribe, Centro - Norteamérica, y Sudamérica (32). En el año 1818, en Perú, ocurrió un brote importante de Dengue, afectando a aproximadamente 50000 personas; entre 1827 – 1828, se reportaron brotes de gran magnitud, en zonas del Caribe y el Golfo de México, estos brotes fueron esparciéndose, llegando a Cuba, Colombia, Venezuela, ciudades del Sur de EEUU y México (33).

Una de las primeras iniciativas para el control vectorial de *Ae. aegypti*, tuvo lugar en Cuba en 1901, impulsado por la teoría de que este mosquito era el vector del Dengue como de la fiebre amarilla; otros países también ejecutaron programas enfocados a la eliminación del vector, como el caso de Brasil en 1903, utilizando principalmente la fumigación y la destrucción de criaderos (34).

En 1940, la OPS, tomó la iniciativa para la instalación de programas de control vectorial, a escala del continente americano, el descubrimiento del dicloro difenil tricloroetano (DDT), y su posterior uso en fumigaciones, fue la principal estrategia utilizada para la eliminación del mosquito. Esta organización, trabajo en conjunto con muchos países del continente, proporcionando equipos y personales humanos, esta campaña contribuyó a que para el año 1962, 18 países de América, fueran declarados libres del mosquito *Ae. aegypti* (1).

Lastimosamente, todo lo logrado hasta la fecha mencionada anteriormente, fue decayendo rápidamente, varios son los factores que desencadenaron estos acontecimientos, como la falta de seguimiento de estos programas de control, el rápido crecimiento urbano, la expansión del comercio y transporte, y la progresiva aparición de resistencia a insecticidas que se estaban utilizando en ese momento. Ante lo mencionado anteriormente, hubo una reinfestación en los países que se habían declarado libres del vector, a partir de la década de los 80, se empezó a notar un rápido y creciente aumento de las notificaciones de casos sospechosos de Dengue en la región, como el caso de Brasil, donde en 1986, en Río de Janeiro se habían detectado casos nuevos, y ocurrió una rápida diseminación de la enfermedad en otras zonas del país. También, entre los años 1987-1990, se habían detectado casos nuevos en países como Bolivia, Paraguay, Ecuador y Perú (35).

En el Paraguay, en el año 2000, se reportaron aproximadamente 25000 casos, luego de 10 años de la última vez que se habían notificado casos, desde la primera epidemia de Dengue, en el año 1990. Para el año 2006, aconteció otro gran brote de esta enfermedad, donde se habrían reportado 4200 casos, y para el siguiente año, 25021 casos fueron reportados, con 13 decesos confirmados, siendo los Departamentos Central, Alto Paraná, Cordillera y Guairá, los más afectados; para el 2013, se reportaron 145429 casos, constituyendo la tercera gran epidemia que tuvo lugar en nuestro país. Para lo que fue el período 2020, desde enero hasta junio se confirmaron aproximadamente más de 50000 casos (Figura 6), estas cifras nos indican un déficit en el control vectorial y el constante aumento de las infecciones por año (36,37).

1.6 Métodos de control vectorial

En los años 1946-1963 se iniciaban en el continente americano actividades destinadas a la eliminación del vector, para el año 1962 se había logrado la erradicación de *Ae. aegypti* en 18 países, la paulatina disminución de los programas de control y el desinterés general, ocasionó en 1991 la reinfestación en la mayoría de los países donde la eliminación fue exitosa (36).

La principal causa de la reinfestación de vectores, fue la resistencia que adquirieron los mosquitos frente a los insecticidas químicos, como los organofosforados y carbamatos (38) Debido a esta situación, la utilización de insecticidas para controlar vectores se encuentra regida por la Regulación Internacional de Salud (IHR), que define el uso seguro de procedimientos con insecticidas, lo cual se encuentra en el documento IHR, parte 1, artículo 1 (39). Por otra parte, la OMS cuenta con modelos de posibles riesgos, debido a que los insecticidas pueden afectar a otros organismos diferentes al que se desea controlar. En base a esto, existen reportes previos de efectos de compuestos organofosforados que afectaron a poblaciones de aves en Argentina (1995), donde se envenenaron de forma indirecta a más de 5000 especímenes (2).

En nuestro país, actualmente existen políticas de salud enfocadas a la prevención de enfermedades de transmisión vectorial que mantienen en alerta a las poblaciones mediante ordenanzas departamentales, municipales que se llevan a cabo en conjunto con el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPBS), sin embargo, algunos factores como insuficiencia para la cobertura, aplicación errada de procedimientos por desconocimiento o falta de datos específicos, hace complicada la aplicación exitosa de las medidas de prevención (40).

En Paraguay, al igual que en otros países de Latinoamérica, es frecuente la utilización de insecticidas químicos para el control vectorial, como por ejemplo los larvicidas del grupo de los organofosforados (OF), tal como Temefos® utilizados por su efectiva capacidad larvicida y por su baja toxicidad en animales domésticos y personas. Sin embargo, el problema de su uso es la aparición de resistencia en insectos, el Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA) es el organismo encargado de realizar la vigilancia y control del mosquito *Ae. aegypti*, mediante el programa nacional de control vectorial del dengue (41).

El mecanismo de acción del insecticida es un fenómeno variable, aun cuando una misma especie sea sometida a distintas concentraciones del producto. El monitoreo constante del uso de insecticidas, es una necesidad para cualquier programa de control de vectores (42).

1.7 Resistencia a insecticidas

La resistencia a determinadas sustancias, es la capacidad que poseen los vectores, a soportar ciertas dosis, que a la población normal le sería tóxica. Esta capacidad adquirida, no se desarrolla a la misma velocidad en todas las poblaciones de insectos, ya que dependen de diversos mecanismos, por ello, las nuevas estrategias para evitar la resistencia, es la búsqueda de compuestos que se puedan utilizar de manera indefinida. Actualmente los insecticidas más utilizados son los OF y los piretroides, estos compuestos pueden atacar a los insectos, por vías de contacto, respiratorio y/o ingestión oral (43).

Los OF, fueron desplazando a los organoclorados (OC) en el uso en control de plagas; los primeros a bajas dosis no dejaban residuos tóxicos que persistían por largo tiempo en el ambiente, y no eran tóxicos para personas o animales domésticos. Siendo, el Temefos®, el más utilizado actualmente para el control vectorial de *Ae. aegypti*, por su alta capacidad larvicida (44).

El principal mecanismo de los OF, es el bloqueo de impulsos nerviosos, ya que son análogos de la Acetilcolina, inhibiendo de esa forma a la enzima sináptica Acetilcolinesterasa (Ache), formando enlaces covalentes con la enzima fosforilada, esto genera un efecto negativo en la capacidad neuromotora de las larvas, ocasionando mortalidad en las mismas (38).

Se reportaron que ciertas especies de mosquitos como los pertenecientes a los géneros *Culex* y *Aedes*, presentan cambios conformacionales de la enzima Ache, lo cual le confiere resistencia, entonces la enzima disminuye la afinidad por los OF (45,46). Otro mecanismo, importante de resistencia, es la producción de esterasas, frente a estímulos como la presencia de grandes concentraciones de OF, favoreciendo la mayor degradación de este tipo de compuestos (47).

Otro compuesto bastante utilizado hoy en día es el piriproxifeno, es un regulador de crecimiento en insectos, presenta mimetismo molecular con una hormona juvenil, pertenece al grupo de piridinas, afectan el crecimiento normal de varias especies de

artrópodos, así también la metamorfosis y la emergencia de adultos en el caso de los mosquitos (48).

Si bien, no es muy claro aún el mecanismo que utilizan los insectos para generar resistencia contra piriproxifeno, se ha observado que en cepas resistentes se encuentran elevados los niveles de citocromo P450 y Glutación S-transferasa (GTS), si bien estas enzimas actúan en el metabolismo de piretroides, el piriproxifeno también puede ser un sustrato para este mecanismo, existe por ello, la hipótesis de que actúan en forma sinérgica para disminuir la sensibilidad a este insecticida (49).

Se han reportado insectos que presentan resistencia a piriproxifeno, un estudio habría reportado que una especie de hemíptero presentaba niveles altos de P450 y GST, por el uso periódico de este insecticida en campos agrícolas (50). Otro trabajo reciente, donde se realizaron pruebas de susceptibilidad en poblaciones salvajes de *Ae. aegypti* en Brasil, reportaron resistencia incipiente a piriproxifeno, esto es bastante preocupante ya que en este país se empezó a utilizar este compuesto a partir del 2016 (51).

En un estudio realizado en Brasil, se evaluó el estado de resistencia a Temefos® en poblaciones salvajes de *Ae. aegypti*, durante el período de 2005-2011, el cual se evidencio que la resistencia a este insecticida fue aumentando progresivamente con el tiempo, tanto en larvas como adultos; por lo cual Temefos® ya no fue considerado como primera opción para uso en control vectorial en el Brasil (52).

En Paraguay, existen pocos estudios sobre el perfil de resistencia a insecticidas, una investigación donde se evaluó la susceptibilidad de poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de Ciudad del Este del dpto. de Alto Paraná, frente Temefos®, reportaron resistencia incipiente en larvas de este vector (53); estos resultados abren la posibilidad de que la resistencia a este OF esto podría aumentar progresivamente con el tiempo, considerando que el larvicida Temefos® se usa en nuestro país desde 1991, de manera casi ininterrumpida.

1.8 Alternativas para el control vectorial

Ante la problemática que se origina por el uso de insecticidas químicos, se orientaron varios estudios en la búsqueda de sustancias de origen natural, proveniente de plantas. En Latinoamérica se realizaron varios trabajos evaluando la actividad larvicida de plantas sobre insectos, siendo la especie de mosquito *Ae. aegypti*, la más estudiada. Las familias de plantas como: Asteraceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae y Annonaceae; poseen reconocida acción larvicida probadas mediante moléculas bioactivas que se obtienen a partir de sus extractos (54).

Normalmente para definir la actividad insecticida de un nuevo compuesto, como extractos vegetales o aceites esenciales, se determinan las concentraciones que son letales, es decir, las concentraciones que generen mortalidad en una población de estudio, los valores que normalmente se determinan son la CL50 y CL90, que son concentraciones de compuestos que generan 50 y 90% de mortalidad respectivamente, estos se obtienen de ensayos tipo dosis respuesta, donde se definen las líneas de mortalidad en insectos (54).

Se han reportado cerca de 150 especies de plantas con actividad insecticida sobre diferentes especies de mosquitos objeto de control, estadio larvario utilizado, valores de concentraciones letales y tipos de solventes empleados. De este grupo se han registrado varias especies de plantas con actividad larvicida, de las cuales más del 60% poseen una significativa potencialidad (55).

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos defensivos contra amenazas externas, como el caso de insectos o microorganismos, estos mecanismos incluyen la secreción de enzimas protectoras, o bien el mejoramiento de barreras, como la pared celular, pero, la característica más interesante, es la producción de metabolitos secundarios; estos compuestos de bajo peso molecular, además de poseer capacidad antimicrobiana y/o insecticida, están implicados en varios procesos vitales para las plantas, como la adaptación a un nuevo ambiente, reproducción, entre muchos otros (figura 6) (56).

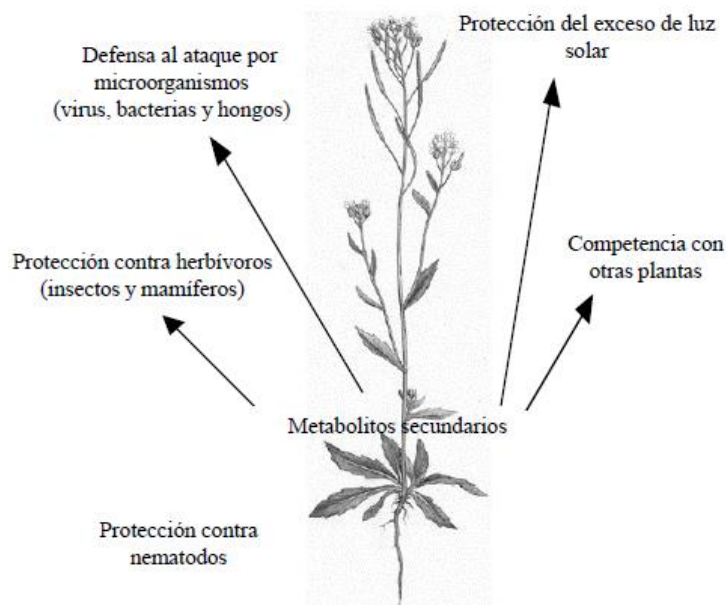


Figura 6. Esquema de funciones protectoras de metabolitos en plantas. Sepúlveda et al. 2003 (56)

Se conocen en la actualidad casi 20.000 metabolitos secundarios, como forma de clasificación general se separan en dos grandes grupos, que son los nitrogenados (alcaloides, glucósidos cianogénicos) y los no nitrogenados (terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenoles). La inmensa variedad que existe de compuestos, se debe a modificaciones en una estructura base, como hidroxilaciones, metilaciones, sustituciones, entre muchas otras sustituciones químicas posibles (3).

Algunos grupos de compuestos, como fenoles y terpenoides, fueron los más estudiados, por presentar una gran cantidad de funciones específicas, de interés científico.

Terpenoides: son también conocidos como isoprenoides, en este grupo de compuestos se encuentran una infinidad de estructuras, tiene como base al 2-metilbutona-1,3 dieno. Se encuentran en gran cantidad en aceites esenciales de varias especies de plantas, le proveen un olor característico, y es común encontrar isómeros en estos extractos (figura 7) (57).

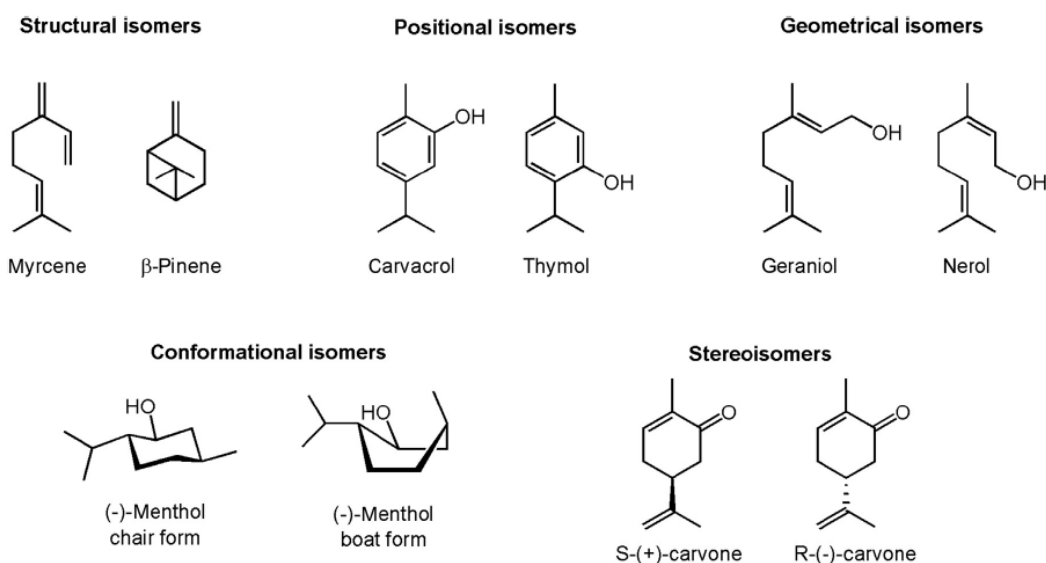


Figura 7. Estructuras de diferentes isómeros de terpenoides. *Ludwiczuk et al. 2017* (57)

Este grupo de compuestos tienen la característica, de presentar una gran variedad de actividad biológica, como pueden ser la actividad antimicrobial, se conocen una variedad de terpenoides que son capaces de actuar contra bacterias gram negativas/positivas, algunos que se pueden nombrar de este grupo son el thymol y carvacrol, que además presentan capacidad antiinflamatoria y antimicótica (57).

En cuanto a actividad antivectorial, específicamente contra *Ae. aegypti*, terpenoides como aletrina y carvona, obtenido de aceites esenciales de plantas presentaron efecto repelente en adultos (58). En estudios con larvas, compuestos obtenidos de plantas, como el limoneno, transatenol y terpineno, demostraron buena actividad larvicida, además de presentar acciones sinérgicas, cuando se combinaban para realizar el mismo efecto (59).

Familias de plantas como Euphorbiaceae y Poaceae, poseen reconocida capacidad insecticida, géneros como *Jatropha* y *Cymbopogon*, demostraron ser efectivos larvicidas y adulticidas contra *Culex* y *Aedes*, esto se debe en gran parte, por la gran cantidad de compuestos terpenoides presentes en extractos con distintos solventes (60,61).

Fenoles: estos compuestos, al igual que los terpenoides corresponden a otro grupo extenso de metabolitos secundarios, presentes en varias especies vegetales, presentan tanto estructuras sencillas o complejas, y dependiendo de su abundancia en plantas, estas pueden tener diversas y específicas actividades biológica (figura 8) (62).

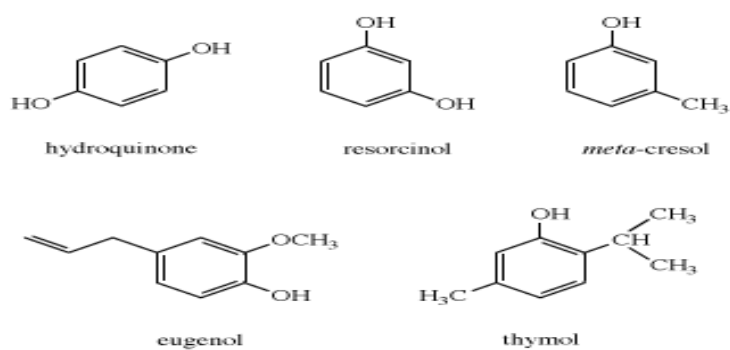


Figura 8. Compuestos fenólicos encontrados en plantas. Aldred 2009 (62)

Compuestos como quinonas, cumarinas y flavonoides, son grupos de compuestos que exhiben diferentes capacidades, como pueden ser acción antitumoral, antiinflamatorio, antimicrobial, antiparasitario, entre muchas otras funciones, representan un grupo extenso de compuestos fenólicos, la producción de los mismos por las plantas dependen de diversos factores, como son los ambientales o bien la presencia constante de organismos que representen algún peligro (62).

Estudios con extractos y aceites esenciales, de especies de la familia Rutaceae, demostraron que presentaban actividad larvica contra *Ae. aegypti*, se determinó que esta capacidad se debía a la gran cantidad de compuestos fenólicos como las quinonas (60,63). Otra familia de plantas, como la Rhamnaceae, también presenta compuestos fenólicos con capacidad larvica, así como la disminución de eclosión de huevos de *Ae. aegypti* en condiciones normales (64).

Alcaloides: se conocen aproximadamente 12.000 estructuras diferentes que son parte de este grupo de compuestos, gran parte de los mismo se encuentran en forma natural en plantas, se diferencian por la presencia de un átomo de nitrógeno en alguna parte de la base estructural, de esa forma se pueden clasificar dentro de un mismo grupo de compuesto parecidos (figura 9) (65).

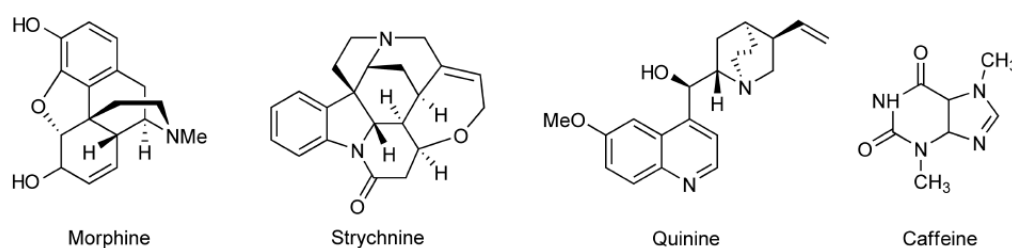


Fig. 9. Principales alcaloides descubiertos con actividad biológica. O'Connor 2010.

Se han aislado compuestos alcaloide de tallos de *Maytenus oblongata*, que presentaban actividad contra larvas de *Ae. aegypti*, aislados de extractos de acetato de etilo (66), también se han reportado que compuestos como limonina y evodol, presentaron efectos larvicidas, estos se detectaron en extractos de plantas de la familia Rutaceae, con la utilización de solventes orgánicos (67).

Se ha realizado un trabajo con plantas presentes cultivadas en nuestro país, especies como *Annona muricata* y *Zanthoxylum chiloperone*, presentaron buena actividad larvicida contra larvas de *Ae. aegypti*, estas cepas de mosquitos se habían recolectado de zonas de Asunción y Gran Asunción, siendo el único antecedente encontrado de productos naturales a partir de plantas con posible potencial antivectorial (68). Si bien este trabajo es un buen antecedente de que productos naturales locales, pueden ser efectivos contra vectores de poblaciones de importancia epidemiológica en nuestro país, se necesita de mayor información para que puedan ser una opción como estrategia de eliminación de estos insectos.

Ante todo, lo expuesto anteriormente, se propuso la realización del presente trabajo, que tuvo por objetivo evaluar la capacidad larvicida de extractos etanolicos de *Ruta chalepensis*, *Cymbopogon citratus*, *Annona sp* y *Jatropha curcas* en *Ae. aegypti*, para lo cual se propuso la realización de ensayos biológicos con larvas de los estadios L3 y/o L4 y diferentes concentraciones de extractos vegetales para determinación de concentraciones letales CL50 y CL90. Para lograr este objetivo se utilizó la cepa Rockefeller del mosquito *Ae. aegypti*, esta es una cepa susceptible de referencia internacional, se utiliza para ensayos de mortalidad en bioensayos tipo dosis respuesta, se comparan sus resultados con las poblaciones salvajes de *Ae. aegypti* que son capturadas de su ambiente natural, exponiéndolas a diferentes concentraciones de extractos etanólicos de las plantas mencionadas.

Se espera que nuestros resultados representen una información completa, sobre el efecto y composición de distintas especies de plantas locales, estas son de fácil acceso, y con metodologías de extracción sencillas, se pueden aprovechar de buena manera los compuestos que presentan actividades biológicas. Los datos generados con este trabajo de tesis serían de gran interés, ante la escasa información existente sobre los efectos de productos naturales contra poblaciones naturales de *Ae. aegypti*, presentes en nuestro país.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad larvica de extractos etanólicos de *Ruta chalepensis*, *Cymbopogon citratus*, *Annona sp* y *Jatropha curcas* sobre larvas de las cepas salvajes y la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*.

2.2 Específicos:

- Establecer la línea de dosis respuesta de la cepa susceptible y salvaje de *Ae. aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de extractos vegetales
- Determinar las concentraciones letales CL50 y CL90 con extractos vegetales sobre cepas Salvajes y Rockefeller de *Ae. aegypti*
- Determinar el factor de resistencia FR50 de los diferentes extractos estudiados sobre las cepas Salvajes de *Ae. aegypti*
- Establecer el perfil cromatográfico de las especies vegetales con mayor actividad larvica mediante métodos cualitativos

2.3 Hipótesis

2.3.1 Hipótesis nula: El uso de diferentes concentraciones de extractos vegetales no se correlaciona al aumento de la mortalidad de larvas.

2.3.2 Hipótesis alternativa: El uso de diferentes concentraciones de extractos vegetales se correlaciona al aumento de la mortalidad de larvas.

III. METODOLOGÍA

3.1 Diseño:

Experimental, empleando ensayos biológicos de tipo dosis respuesta en fase larval de *Ae. aegypti*.

3.2 Muestras de estudio:

Larvas del tercer (L3) y cuarto (L4) estadio de *Ae. aegypti*, cepa salvaje (poblaciones naturales), criadas a partir de huevos que fueron colectados de áreas endémicas de los departamentos Central y San Pedro, y mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en el Laboratorio del Insectario del Dpto. de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

Larvas L3 y L4 de *Ae. aegypti*, cepa de referencia Rockefeller, cuyos ejemplares se encuentran en el Insectario del Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y fueron criados bajo condiciones controladas de laboratorio, como son el mantenimiento de la humedad relativa y la temperatura adecuada.

Las larvas usadas en este trabajo, se mantuvieron a una temperatura de 24- 28°C y una humedad relativa de 75-80%, en bandejas de plástico (39 x 26 x 6 cm), evitando la contaminación con otros insectos mediante el sellado de las mismas, y realizando el recambio del agua de cría diariamente, para evitar la formación de hongos, estas se almacenaron hasta su posterior uso en los ensayos biológicos.

Se excluyeron aquellos insectos:

Que sean de otras especies de mosquitos, estadios larvales diferentes a L3 y L4, y/o larvas que se presenten muertas.

3.3 Tipo de muestreo:

No probabilístico por conveniencia, debido a que el muestreo consistió en seleccionar una casa cada 100 metros, donde fueron colocadas las ovitrampas, según

se haya determinado un micro ecotopo adecuado para el crecimiento de las larvas de los mosquitos.

3.4 Área de estudio:

Se seleccionaron las siguientes áreas de estudio para la colecta huevos de poblaciones salvajes de *Ae. aegypti*: Barrio Primavera (Luque) y Barrio Mariscal López (Santani). Los mismos se seleccionaron en base a la elevada densidad larval que se presenta en los departamentos Central y San Pedro, según reportes realizados por SENEPA, respecto a proporción de criaderos positivos de *Ae. aegypti* por zonas (Ubicación de sitios de muestreo en Anexo 1) (69).

Las zonas de muestreo corresponden a los departamentos de Central (Luque) y San Pedro (Santani), ambos sitios son urbanizados, donde existe considerable movimiento comercial, y desplazamiento de personas, en ambos lugares se encontraron criaderos potenciales, en terrenos baldíos, donde la contaminación con recipientes de plástico y otros materiales incrementa el riesgo latente de mayor densidad vectorial.

3.5 Trabajo de campo

3.6 Recolección de muestra:

Se seleccionaron 30 casas por barrio, donde se colocaron dos ovitrampas (ver Anexo 2) por casa, en lugares húmedos y oscuros en el exterior de las mismas. Se tuvo en cuenta una distancia de 100 metros entre cada vivienda, esto según recomendaciones establecidas por estudios de vigilancia de *Ae. aegypti* realizado en diferentes municipios en Brasil (70). La instalación de ovitrampas se realizó una vez obtenida la autorización por parte de los propietarios de las viviendas (Anexo 3). Las ovitrampas consistieron en planteras pequeñas que contenían agua y tres paletas de madera rugosa para facilitar la adherencia de los huevos. Una vez transcurridos 7 días de la colocación de ovitrampas, se procedió a su recolección y traslado de los huevos obtenidos al laboratorio del Insectario del Dpto. de Medicina tropical del IICS, UNA, para la cría y obtención de colonias parentales de cada barrio.

3.7 Material vegetal y obtención de extractos etanólicos:

Las especies de plantas seleccionadas: *Ruta chalepensis* (ruda), *Cymbopogon citratus* (cedrón kapi'i), *Annona sp.* (chirimoya) y *Jatropha curcas* (piñón manso); se obtuvieron de un vivero, ubicado en las inmediaciones del mercado municipal de la ciudad de San Estanislado, del Dpto de San Pedro (-24.671859122267545, -56.449041541767926). Estas plantas fueron colectadas en abril del 2019. Los órganos vegetales utilizados fueron: tallos y hojas.

La identificación taxonómica fue realizada por la jefa del Herbario Histórico de la Sociedad Científica del Paraguay, los datos de la identificación y descripción de plantas se encuentran en Anexo 4.

Una vez obtenido el material vegetal, se procedió al secado de los órganos seleccionados, posteriormente se pulverizaron hasta la obtención de un polvo fino, este último se dejó en etanol al 98% durante 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a realizar una filtración al vacío, el filtrado posteriormente se concentró con

un rotavapor, obteniendo el extracto crudo, este se almacenó en frascos opacos hasta su uso en bioensayos. El protocolo para obtención de extractos etanólicos está detallado en el Anexo 5 (28).

3.8 Trabajo de Laboratorio

El trabajo de laboratorio se realizó en forma conjunta en el laboratorio del Insectario-IICS y el laboratorio de Fitoquímica- FCQ, para lo cual se contó con un acuerdo entre las instituciones para la realización de las actividades propuestas en el marco del programa de la maestría que fue desarrollado en cada departamento (Anexo 6).

3.9 Metodología de obtención de mosquitos *Ae. aegypti*, estadios L3 y L4 a partir de la colonia de laboratorio.

Los huevos colectados de las salidas de campo, se hidrataron para la obtención de larvas, estas se mantenían a 25°C, y se alimentaban cada 2 días con 0,5g de comida para gato (purina Whiskas®), se desarrollaron hasta el estado de pupa, estas fueron separadas y colocadas en jaulas para cría de mosquitos, transcurridas aproximadamente 48 horas fueron emergiendo los mosquitos adultos, estas jaulas son de aproximadamente 30.5 cm³, tienen la capacidad para albergar aproximadamente 500 mosquitos adultos. Los insectos fueron alimentados con agua azucarada al 10%, hasta el momento de la alimentación sanguínea con ratones.

Para la alimentación sanguínea se utilizaron ratones albinos (BALB/c *Mus musculus*), los cuales fueron inmovilizados con una pequeña dosis de anestesia (ketagal 0,2mL/kg) y de analgésico (xilagal 0,15 mL/kg), aplicados en simultáneo por vía intramuscular, una vez inmovilizados fueron colocados sobre las jaulas por un período de 10 a 15 minutos, repitiendo al día siguiente para lograr la alimentación completa de los mosquitos adultos. Este procedimiento se realizó para lograr la ovoposición de las hembras, los huevos que eran obtenidos de esta fecundación ya correspondieron a la primera generación de mosquitos criados a partir de los parentales de campo (Filial 1 o F1), estos se almacenaron a 22-23°C para su uso posterior en los bioensayos. Protocolo detallado en el Anexo 7.

3.10 Pre test con larvas L3 y L4

Para poder conocer el rango de concentraciones efectivas de cada extracto, se realizó un pre ensayo, para lo cual se siguieron las recomendaciones de la OMS (71). Para ello se hidrataron los huevos F1, obtenidos según el procedimiento citado en la sección anterior, los mosquitos se dejaron crecer en la colonia hasta el estadio larval de L3 y L4.

Una vez seleccionadas las larvas, se separaron en grupos de 20 larvas, cada vaso de ensayo contenía 20 larvas y un volumen final de 100mL de agua con y sin extracto. Para conseguir la concentración de extracto necesario, se fueron realizando las diferentes diluciones a partir de la solución madre (10.000 mg/L), llegando a volumen final con agua. Se utilizaron 5 concentraciones de cada extracto (Anexo 8), para lograr una mortalidad de larvas del 1 al 99 %. Los ensayos fueron realizados por triplicado, en tres días distintos, para minimizar cualquier tipo de error sistemático que pudo ocurrir en las pruebas. La N total utilizada fue de 900 larvas por cada extracto vegetal testado.

Se utilizó como control negativo, el solvente de resuspensión (Etanol:Agua 1:1), realizado con las mismas condiciones de ensayo citadas anteriormente. Este control se realizó de forma paralela al pre test con los diferentes extractos vegetales ensayados.

Una vez que se colocaron las diferentes diluciones de extractos en cada vaso de ensayo, las larvas tuvieron una exposición de 24 horas, pasado este período de tiempo se calcularon los porcentajes de mortalidad para cada concentración de extracto. Según las indicaciones de la OMS, las larvas se consideraron muertas cuando ya no presentaban movilidad luego de un pequeño estímulo físico (ej.: ligeros toques con pipeta Pasteur). La mortalidad observada con el control negativo, fue corregida (de ser necesario) mediante la fórmula de Abbott (sección 3.16). De la misma manera, si el control negativo utilizado presentó un porcentaje de mortalidad superior a 10, se descartó el ensayo y ya no siguió con el análisis de dosis repuesta, esto se consideró siguiendo las recomendaciones de la OMS (71).

Este procedimiento se realizó para las cepas Rockefeller y las cepas naturales de campo (Central y San Pedro), los resultados del Pre test se muestran en Anexo 8.

3.11 Ensayos biológicos de dosis respuesta con larvas de *Ae. aegypti*

Para los ensayos dosis-respuesta se utilizaron 8 concentraciones de cada extracto del vegetal (Ruda, Cedrón kapi'i, Chirimoya y Piñón manso). El rango de concentraciones se definió según los resultados de pre test, detallado anteriormente.

El número de larvas, control negativo, número de réplicas de ensayo, recomendaciones, cálculo de mortalidad y tiempo de exposición, fueron las mismas seguidas en el pre test.

Se utilizó también un control positivo de extracto, este consistió en la colocación 20 larvas de cepa Rockefeller y el agregado de una concentración de extracto correspondiente a la dosis diagnóstica (el doble de concentración que produce el 99% de mortalidad de la cepa Rockefeller), esta dosis se definió para cada extracto según los datos del pre ensayo, este control se utilizó para evaluar la viabilidad del extracto usado en el día, este control se realizó a la par con cada ensayo, por triplicado y evaluándose la mortalidad a las 24 horas, se obtuvo el 100% de mortalidad de larvas en todos los extractos usados.

Por otra parte, se contó con un control positivo utilizando datos de pruebas realizadas previamente con el reactivo Temefos®, este es un larvicida comercial autorizado para su uso en fumigaciones en nuestro país. Estos datos corresponden a investigaciones previas realizadas en el área del Insectario del IICS-UNA; este bioensayo se había realizado sobre poblaciones naturales de Asunción y poblaciones de la cepa Rockefeller. Datos no publicados, pero disponibles de utilización para fines comparativos de esta investigación.

3.12 Perfiles cromatográficos de extractos etanólicos de origen vegetal con actividad larvicida:

Se seleccionaron las plantas que presentaban actividad larvicida y se determinó la presencia de metabolitos secundarios. Para ello, se utilizó el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Las muestras se disolvieron en acetonitrilo grado LC/MS (Merck KGaA, acetonitrilo grado LCMS ®, Alemania) a una concentración de 10 mg / mL y se filtraron con filtro de nailon para muestras de 0,22 µ de diámetro de poro (Microclar®, Argentina).

Posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (Xevo-TQD, Waters Corporation, EE. UU.) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y en las siguientes condiciones: columna Kinetex EVO C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 µm, Phenomenex, EE. UU.), Flujo de 0,3 mL / min, elución en gradiente usando una mezcla de agua (con ácido fórmico al 0,1%, formato de amonio 10 mM) y acetonitrilo (con ácido fórmico al 0,1%, formato de amonio 10 mM). Todos los reactivos fueron de grado LCMS (Merck KGaA, Alemania). Las condiciones de gradiente fueron: inicial 100% manteniendo estas condiciones durante 1 minuto, luego disminuyendo a 0% a los 7,75 minutos y manteniendo esas condiciones hasta 10 minutos, luego aumentando a 50% a los 15 minutos, aumentando nuevamente a 95% a 18 minutos y manteniendo estas condiciones hasta el final (20 minutos).

Las condiciones de trabajo con el espectrómetro de masas fueron: ionización en modo positivo y negativo, voltaje cono en rampa de 18,80 a 30 V, voltaje capilar 3,20 (+) y 3,90 (-) kV respectivamente, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C y flujo de gas de desolvatación 1000 L / Hr.

3.13 Variables del trabajo

Cantidad de larvas de mosquito: número de larvas F1 que se obtuvieron a partir de la cría en el laboratorio, se fueron seleccionando las larvas que se presenten en el tercer y cuarto estadio larvario, la cantidad de larvas por ensayo según recomendaciones de la OMS fue de 20-25 para la cepa silvestre y como cepa control de referencia, Rockefeller. Este procedimiento lo ejecutó el investigador involucrado del trabajo.

Porcentaje de mortalidad de larvas L3 y L4 expuestas a los extractos: se realizaron las mediciones según las recomendaciones de la OMS para ensayo con vectores, se utilizaron 8 diluciones del extracto de cada especie vegetal y cada prueba se realizó por triplicado para aumentar la exactitud y reproducibilidad del método. La lectura de las mortalidades se realizó a las 24 horas, posteriormente con el análisis Probit se determinó la CL50 y la CL90. Este procedimiento lo ejecutó el investigador principal del trabajo.

Concentración de extractos vegetales: se utilizaron aproximadamente 200 gramos del polvo de la estructura usada de cada especie vegetal para la extracción etanólica. Una vez obtenidos los extractos secos se procedió a realizar diferentes diluciones para los ensayos tipo dosis- respuesta. El rango de dichas concentraciones fue definido por los resultados del pre ensayo, la unidad de medida utilizada fue mg/L(PPM). Este procedimiento lo ejecutó el investigador principal del trabajo.

Presencia de metabolitos secundarios en los extractos vegetales: se realizó mediante el método de cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas, se basó en la separación de los materiales de gran peso molecular para la detección

selectiva y confirmación de la identidad molecular de cada material presente, mediante espectrómetro de masas. Con este método se determinó de forma cualitativa el perfil de compuestos con actividad fitoquímica de los diferentes extractos. Este procedimiento lo ejecutó el investigador principal del trabajo.

3.14 Consideraciones éticas

En lo que respecta al uso ratones de laboratorio como fuente de alimentación en el insectario, se tuvieron en cuenta los procedimientos que cumplen con los Principios Éticos para el uso de animales en la investigación elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) “Guías de la Investigación Biomédica que utiliza animales”. En cuanto al número de animales se utilizó la cantidad mínima posible y se tomaron todas las precauciones necesarias para evitar sufrimientos innecesarios de estos (32).

Beneficios: la información generada en el estudio puede servir para generar nuevos conocimientos sobre propiedades de plantas de uso común en nuestro país, así como una alternativa para controlar los mosquitos vectores del dengue y otras arbovirosis.

Riesgo: el estudio no representó ningún riesgo para los manipuladores.

3.15 Gestión y análisis de los datos

Se calcularon los porcentajes de mortalidad en *Ae. aegypti* corregida según la fórmula de Abbott:

$$\frac{\% \text{mortalidad test} - \% \text{mortalidad control negativo}}{100 - \% \text{mortalidad control negativo}} \times 100$$

Mediante el análisis Probit, se evaluó la correlación lineal de la mortalidad en relación a concentración de extracto. Se realizaron las curvas dosis-respuesta para cada extracto con cada cepa evaluada, posteriormente se calcularon las concentraciones letales CL50 y CL90.

Se realizó un análisis de ajuste bondad Chi-cuadrado posterior al análisis Probit, esto para evaluar la fiabilidad de los resultados de las concentraciones letales generadas.

Una vez obtenidos los valores de CL50 para la cepa Salvaje y Rockefeller se calculó el factor de resistencia FR50 con la siguiente formula (Bisset et al. 1996):

$$FR50: \frac{CL50 \text{ Salvaje}}{CL50 \text{ Rockefeller}}$$

Este factor nos indicó el grado de susceptibilidad que tienen las poblaciones salvajes (naturales) a un compuesto específico.

Según criterios de Mazarri y Georghiou (34), las cepas con FR50 inferiores a 3 se consideraron no resistentes, cepas con FR entre 3 y 7 con resistencia incipiente y cepas con FR superiores a 7 como resistentes para los diferentes extractos testados.

Por último, se evaluó si existían diferencias significativas entre las cepas estudiadas (Rockefeller, San Pedro y Central) con los extractos utilizados, y también si existían diferencias entre extractos, dependiendo de la especie vegetal perteneciente, esto se realizó mediante un análisis ANOVA de dos vías y una prueba pos hoc de Bonferroni, para ver diferencias intragrupos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (IBM SPSS software), los detalles de cada prueba estadística aplicada y resultados, disponibles en Anexo 9.

IV. RESULTADOS

4.1 Curvas dosis respuesta

Se puede observar las distintas curvas dosis-respuesta del extracto de *Ruta chalepensis* (Fig. 10) para las cepas de *Ae. aegypti* evaluadas, al realizar el análisis Probit de regresión lineal, en todos los casos se tuvo un valor de $p < 0,05$ (Anexo 11), esto indicó que el aumento de la concentración del extracto de *R. chalepensis* (ruda) se correlaciona al aumento del porcentaje de mortalidad en todas las cepas. Para el análisis de bondad de ajuste, en todos los casos se tuvieron valores de $p > 0,05$ (Anexo 9), indicando que los datos experimentales no difirieron de los datos esperados para el análisis utilizado.

La especie *J. curcas* (piñón manso) también presentó actividad larvicida, las concentraciones necesarias para lograr mortalidades del 1 al 99% fueron mayores que las utilizadas con la especie *R. chalepensis* (Fig. 11). En este caso no hay una diferencia apreciable de la mortalidad en la cepa Rockefeller con respecto a las cepas salvajes, como lo observado con *R. chalepensis*, al realizar el análisis Probit, en todos los casos se tuvo un valor de $p < 0,05$ (Anexo 9), y para el ajuste de bondad Chi-cuadrado posterior, un valor de $p > 0,05$. (Anexo 9).

La especie de *Annona sp* (chirimoya), también presentó actividad larvicida (Fig. 12), sin embargo, este extracto requirió de concentraciones altas, para lograr el mismo porcentaje de mortalidad, con los extractos de *J. curcas* y *R. chalepensis*. En este caso se observó que existe una diferencia apreciable entre la cepa Rockefeller y las cepas salvajes, inclusive mayor a lo observado con *R. chalepensis*. Como en los casos anteriores, al realizar el análisis Probit, todas las cepas resultaron en valores de $p < 0,05$ (Anexo 9), y para el ajuste de bondad Chi-cuadrado posterior, un valor de $p > 0,05$.

No se muestran los resultados para el extracto de *C. citratus* (cedrón kapi'i), porque en los ensayos preliminares (pre test), a concentraciones límites de 1.500 mg/L, no ocasionó mortalidad de larvas en cepa Rockefeller y cepas salvajes, a esta concentración, el volumen utilizado para el control negativo (solvente de re suspensión) ya ocasionaba más de 10% de mortalidad, según las recomendaciones

establecidas en el trabajo, ya no se procedió a posteriores ensayos, no pudiendo realizar el análisis posterior de correlación tipo dosis- respuesta.

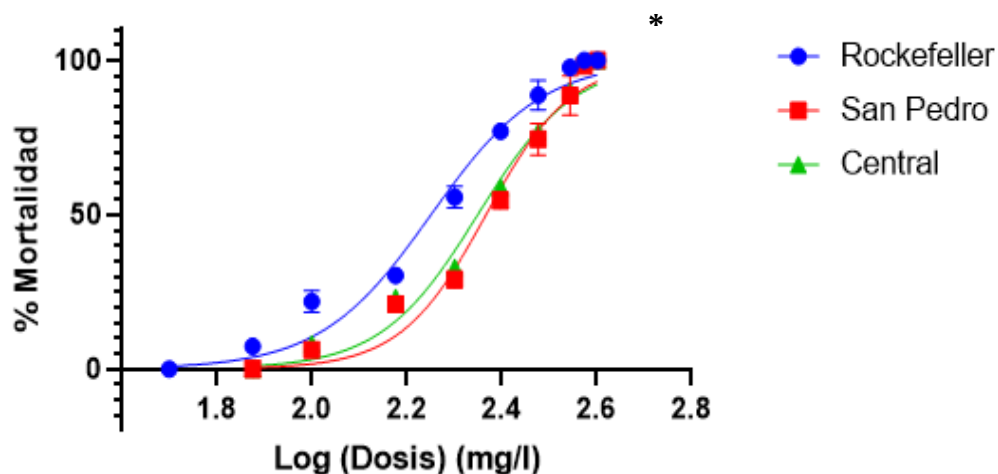


Figura 10. Curva dosis- respuesta de *Ruta chalepensis* (ruda) en larvas L3-L4 de *Aedes aegypti* obtenida mediante análisis Probit. * Sig.: >0,05

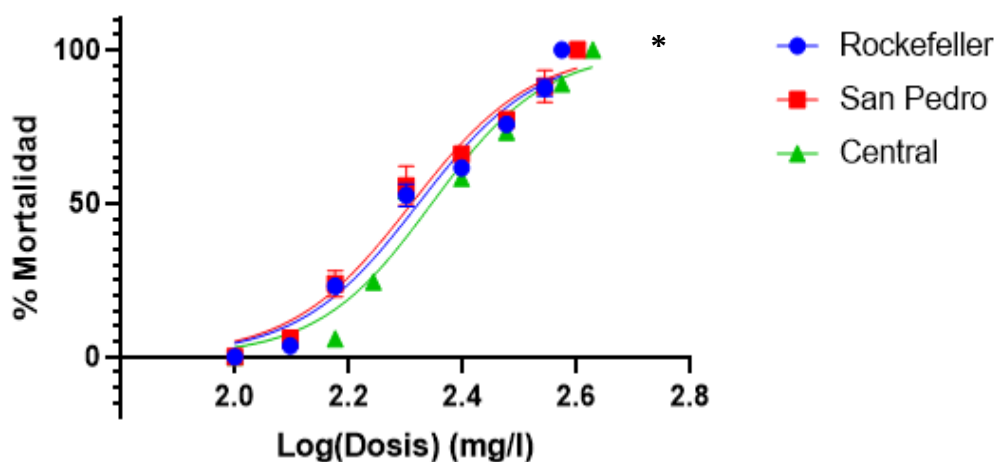


Figura 11. Curva dosis- respuesta de *Jatropha curcas* (piñon manso) en larvas L3-L4 de *Aedes aegypti* obtenida mediante análisis Probit. * Sig.: >0,05

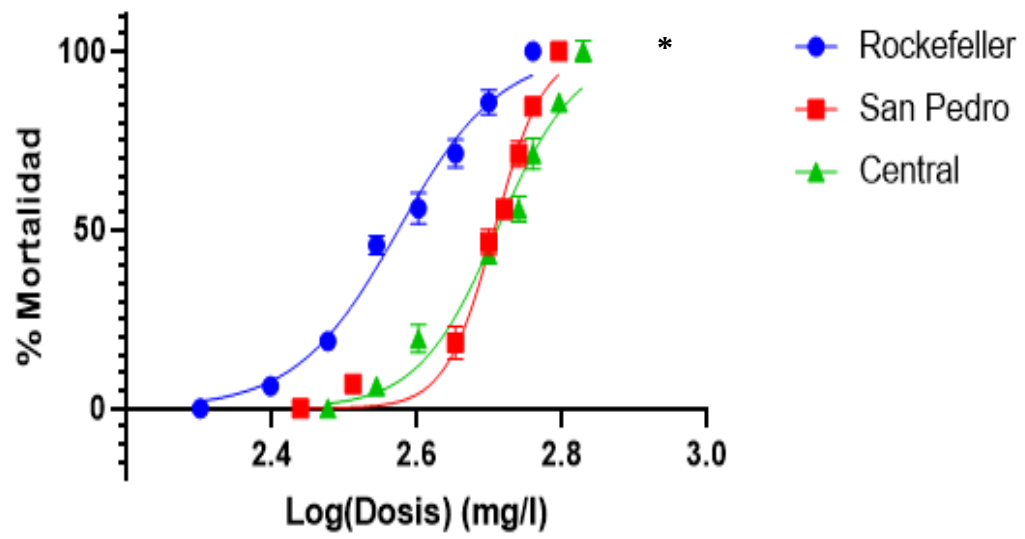


Figura 12. Curva dosis- respuesta de *Annona sp.* (chirimoya) en larvas L3-L4 de *Aedes aegypti* obtenida mediante análisis Probit. * Sig.: >0,05

4.2 Concentraciones letales de extractos

Para estimar la efectividad como larvicida de cada extracto utilizado en este estudio, se realizó el cálculo de las concentraciones letales, en este caso CL50 y CL90. Se pueden observar los valores de CL-50 y CL-90 obtenidos para *R. chalepensis* (Tabla 1), y se observa que el extracto es más activo en Rockefeller, esto es de esperarse porque esta cepa es utilizada como control en compuesto de insecticidas, los valores tanto en cepas de San Pedro y Central son bastante similares, demostrando que esta especie vegetal tiene la misma efectividad en poblaciones que se encuentran en dos zonas geográficas distintas.

Las concentraciones letales para *J. curcas* se pueden observar en la tabla 1, se obtuvieron valores similares para la cepa Rockefeller y las cepas salvajes evaluadas.

En el caso de *Annona sp*, es la especie que presentó menor actividad larvicida en nuestro estudio, como se pueden ver en sus valores de concentraciones letales (tabla 1), se observa una mayor actividad en Rockefeller en comparación a las cepas salvajes.

Tabla 1. Valores CL50 y CL90 en mg/L de extractos etanólicos utilizados para la cepa Rockefeller y las cepas naturales de *Aedes aegypti* estudiadas.

Extracto etanólico	Cepa	CL50(mg/L)	CL90 (mg/L)
<i>Ruta chalepensis</i>	Rockefeller	161,4	321,7
		(152,1-171,1) *	(295,3-356,6) *
	San Pedro	213,9	404,0
		(202,9-225,4) *	(372,6-445,9) *
	Central	215,0	401,5
		(203,9-226,4) *	(370,9-442,2) *
<i>Jatropha curcas</i>	Rockefeller	217,4	378,5
		(207,4-227,2) *	(352,9-411,9) *
	San Pedro	218,7	373,5
		(209,0-228,6) *	(349,2-405,1) *
	Central	229,6	388,8
		(219,8-239,7) *	(363,0-422,8) *
<i>Annona sp</i>	Rockefeller	371,9	526,8
		(361,0-383,0) *	(503,6-556,4) *
	San Pedro	490,5	678,9
		(477,5-503,2) *	(649,6-718,3) *
	Central	505,1	687,5
		(492,3-518,1) *	(660,8-721,6) *

* Intervalos de confianza (inferior-superior) del 95%

4.3 Factores de resistencia

Una vez obtenidos los valores de CL50 de todas las cepas estudiadas, se realizó el cálculo de FR50 (sección 3.16), estos resultados se muestran en la tabla 2, para todas las especies evaluadas en nuestro trabajo, se tuvieron FR50 menores a 1,5, estos valores nos indican el nivel de susceptibilidad que presenta el mosquito *Ae. aegypti*, en el ambiente natural con los extractos utilizados.

Las poblaciones de San Pedro y Central, presentaron alto grado de susceptibilidad para todos los extractos evaluados en el trabajo, es decir que todos los extractos presentaron actividad larvicida, sin embargo, el compuesto que tuvo el mayor grado de susceptibilidad fue el extracto de *J. curcas*, comparado con las especies de *R. chalepensis* y *Annona sp.*, que tuvieron valores similares.

Tabla 2. Valores de los Factores de Resistencia 50 de cada extracto vegetal, diferenciado por localidad.

Extracto etanólico	FR50	FR50
	San Pedro	Central
<i>Ruta chalepensis</i>	1,32	1,31
<i>Jatropha curcas</i>	1.01	1.04
<i>Annona sp.</i>	1.31	1.36

4.4 Análisis estadísticos

Para verificar la existencia de diferencias significativas entre la concentración de extracto necesaria para lograr una mortalidad de larvas de más del 90% de la población, se realizó un análisis ANOVA de dos vías, donde los factores fueron las cepas de *Ae. aegypti* y la especie vegetal utilizada. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 3, para el caso de cepas de mosquitos, no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre este grupo estudiado. Considerando las especies de plantas de las cuales se obtuvieron los extractos, se observó que si existen diferencias significativas ($p < 0,05$). Para el análisis de las diferencias intra grupos, se muestran los resultados de la prueba pos-hoc de Bonferroni (tabla 4), que ha demostrado que existe diferencia entre la especie *Annona sp* con *J. curcas* y *R. chalepensis*, en cambio cuando se consideraron estas dos últimas especies, no se observaron diferencias significativas.

Tabla 3. ANOVA de dos factores, tomando la concentración de extracto como variable dependiente. Nivel de significancia del 95%.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	900850,694	8	112606,337	8,215	0,000
Intersección	6495008,681	1	6495008,681	473,860	0,000
Cepa	47621,528	2	23810,764	1,737	0,184
Especie vegetal	825017,361	2	412508,681	30,096	0,000
Cepa*Especie vegetal	28211,806	4	7052,951	0,515	0,725
Error	863515,625	63	13706,597		
Total	8259375,000	72			
Total corregida	1764366,319	71			

Tabla 4. Prueba Pos Hoc de Bonferroni, para determinar diferencias intragrupos entre especie vegetal utilizada.

(I)Extracto (J)Extracto		Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Annona sp	<i>J. curcas</i>	213,542*	33,7967	0,000	130,416	296,667
	<i>R. chalepensis</i>	238,542*	33,7967	0,000	155,416	321,667
J. curcas	<i>Annona sp</i>	-213,542*	33,7967	0,000	-296,667	-130,416
	<i>R. chalepensis</i>	25,000	33,7967	1,000	-58,126	108,126
R. chalepensis	<i>Annona sp</i>	-238,542*	33,7967	0,000	-321,667	-155,416
	<i>J. curcas</i>	-25,000	33,7967	1,000	-108,126	58,126

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05

4.5 Metabolitos secundarios presentes en los extractos

Posterior a los ensayos de dosis-respuesta, se seleccionaron a las tres plantas que presentaron actividad larvicida. Se pudieron apreciar los compuestos identificados en el extracto de *Annona sp.* (Tabla 5) en el cual se identificaron tres compuestos, estos fueron; dihidrocherlimolina, bullatacinona y nornucifenina, los dos primeros compuestos pertenecen al grupo de las acetogeninas, el tercero corresponde a un alcaloide. Para el caso de la bullatacinona, no se pudo diferenciar por el peso si corresponde a este compuesto, o a un isómero (cromatogramas Anexo 10).

En el extracto de *J. curcas*, se identificaron compuestos como terpenos (estigmasterol - hexadeca-4, 6, 13-trieno-8,15-diona e isómero) y flavonoides (vitexin/isovitexin) (Tabla 6). Para esta especie se detectaron varios isómeros, pero no se pudieron identificar debido a la metodología planteada en este estudio (Anexo 10).

En el extracto de *R. chalepensis*, se detectaron alcaloides (graveolina y graveolinina), cumarinas (rutaretina y rutamarina) y flavonoides (apigenin 7,4-dimetil éter) (Tabla 7).

Los cromatogramas de todos los compuestos identificados están disponibles en Anexo 10.

Tabla 5. Compuestos identificados en el extracto etanólico de *Annona sp.* (Chirimoya).

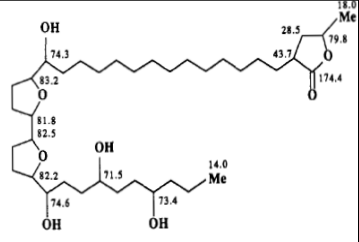
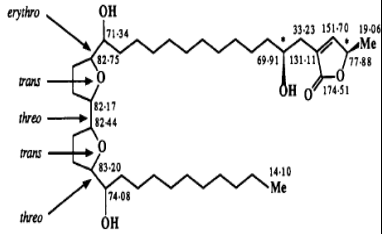
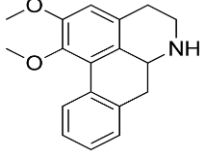
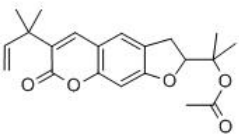
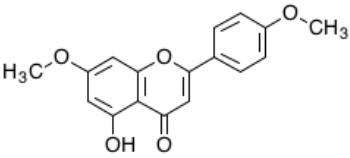
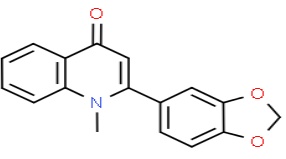
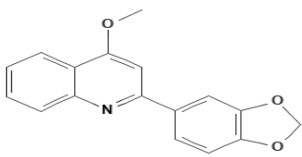
Extracto vegetal	Nombre el compuesto	Estructura
<i>Annona sp.</i>	Dihidrocherimolina	
	Bullatacinona	
	Nornucifenina	

Tabla 6. Compuestos identificados en el extracto etanólico de *Jatropha curcas* (Piñon manso).

Extracto vegetal	Nombre el compuesto	Estructura
<i>Jatropha curcas</i>	Vitexina	
	Isovitexina	
	Estigmasterol	

Tabla 7. Compuestos identificados en el extracto etanólico de *Ruta chalepensis* (Ruda).

Extracto vegetal	Nombre el compuesto	Estructura
<i>Ruta chalepensis</i>	Rutamarina	
	Apigenina 7,4'-dimetil éter	
	Graveolina	
	Graveolinina	

V. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demostraron la capacidad larvicida que poseen los extractos etanólicos de las plantas evaluadas, estos fueron efectivos contra una cepa control de *Ae. aegypti* denominada Rockefeller, y dos poblaciones salvajes procedentes de los Dptos. de San Pedro y Central. Según los valores de concentraciones letales obtenidos, CL50 y CL90, las especies que mejor actividad presentaron fueron *R. chalepensis* y *J. curcas*, seguida por *Annona sp.* El extracto de la especie *C. citratus*, no presentó actividad larvicida, tanto en cepa Rockefeller, como en las poblaciones salvajes.

Los valores de CL50 y CL90, obtenidos del extracto de *R. chalepensis*, en nuestro trabajo fueron 161,4 y 321,7 mg/L, respectivamente. Previamente se ha reportado, que plantas de la familia Rutaceae, poseen actividad larvicida, lo cual fue reportado en un estudio donde evaluaron este efecto en *Ae. aegypti*, con extractos acuosos de *Citrus paradisi*, los cuales presentaron valores de CL50: 47,3 mg/L y CL90: 98,7 (72). Similarmente otras plantas del género *Ruta*, como la *R. graveolens* presentan buena actividad larvicida, como lo habían demostrado Rosado et al 2018, donde la CL50 fue de 7,20mg/L, para larvas de mosquitos del género *Culex* (73) Comparado con estos trabajos, nuestros valores reflejan una menor actividad, situación que podría esperarse debido a la utilización de metodologías de extracción diferentes a las reportadas por estos autores. Rosado et al 2018 también evaluaron actividad de extractos etanólicos, en el cual *Dieffenbachia seguine* fue la especie con mejor actividad, con CL50: 693,5 mg/L (73). En este sentido se puede deducir que, en nuestro trabajo, fue mucho más eficiente el extracto etanólico de *R. chalepensis*.

Se han evaluado extractos etanólicos, de diversas especies de plantas, como en cáscaras de *Citrus sinensis* (Rutaceae), donde se reportaron valores de CL50 entre 342,45 y 436,93 mg/L, contra larvas L3 y L4 de *Ae. aegypti* (74); otro estudio, donde evaluaron extractos etanólicos sobre *Ae. aegypti*, reportaron valores de CL50: 860 mg/L, para *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) (75). Comparando estos resultados con los encontrados en nuestro trabajo, se puede estimar la buena actividad de nuestros extractos, en el caso de *J. curcas* (Euphorbiaceae), los valores de CL50 para todas las cepas fue entre 217,4 a 229,6 mg/L, siendo esto superior a los valores obtenidos con los extractos de las especies nombradas anteriormente, teniendo en cuenta que la metodología utilizada y los organismos expuestos fueron los mismos que se utilizaron en nuestro trabajo.

En lo que respecta al género *Annona*, se han reportado que extractos alcohólicos de las semillas de *A. muricata* presenta CL50: 41,8mg/L, con el uso de etanol como solvente de extracción, con larvas de *Ae. aegypti* (76); otro estudio donde evaluaron extractos acuosos, semillas de *A. muricata* presenta CL50: 60 mg/L (77). En nuestro trabajo los valores de CL50 de *Annona sp*, fueron de 371,9 a 505,1 mg/L para todas las cepas expuestas. Estos valores indican menor actividad larvicida, teniendo en cuenta que en nuestro estudio se hizo una extracción de hojas y tallos. En el reporte de Bobadilla et al. 2005, realizaron extracción de hojas de *A. muricata*, obteniéndose CL50: 15790 mg/L (77). Este tipo de resultados nos permite afirmar que las semillas de este género de plantas (*Annona*), son las que poseen mayor cantidad de compuestos con actividad larvicida. Por otra parte, se ha observado que con el agregado de tallos a la extracción de hojas se puede incrementar la actividad larvicida, como lo reflejan nuestros resultados.

Las concentraciones letales determinadas en diferentes especies de plantas, presentan valores distintos, lo que puede ser debido a la presencia de diversos compuestos, el tipo de extracción seleccionado, presiones climáticas donde se cultiva, entre muchas otras características. *Sathiyamoorthy et al 1997* definieron como extractos activos, aquellos que presentaban $CL_{50} < 500 \text{ mg/L}$ (78), otros autores como *Oliveira et al 2010* (79), definen alta actividad cuando a concentraciones de 250 mg/L , se producen más del 75% de mortalidad, y actividad baja cuando a mencionada concentración la mortalidad es menor a 70%. Mediante estos antecedentes, la mayoría de los trabajos con plantas, definen una buena actividad con $CL_{50} < 500 \text{ mg/L}$, actividad moderada con valores entre $500\text{-}1000 \text{ mg/L}$, e inactivos cuando $CL_{50} > 1000 \text{ mg/L}$ (80).

Como se había mencionado en la metodología, se contó con datos de un control positivo realizado con el larvicida Temefos. Estos datos generados previamente, nos indicaron que la CL_{50} de este larvicida es de $0,01172 \text{ mg/L}$, este valor es considerablemente menor a los encontrados experimentalmente en nuestra investigación, sin embargo, los valores obtenidos de FR_{50} para este compuesto larvicida, testada en poblaciones naturales de mosquitos de Asunción, fue de 2,88. Este valor es superior a lo observado con nuestros extractos, lo cual nos indicaría que el grado de susceptibilidad es superior en los compuestos obtenidos a partir de las plantas estudiadas en esta tesis.

Con lo mencionado anteriormente, se deduce que los extractos evaluados en nuestro trabajo poseen buena actividad larvicida, ya que tanto *R. chalepensis*, *J. curcas* y *Annona sp*, presentaron valores de $CL_{50} < 500 \text{ mg/L}$, para todas las cepas estudiadas, a excepción del efecto del extracto de *Annona sp* con la cepa de Central, donde presentó un valor $505,1 \text{ mg/L}$, pudiéndose considerar, en este caso una actividad más bien moderada. Además, todos los extractos tuvieron el mismo efecto, tanto en la cepa control, como en las cepas de San Pedro y Central, esto es muy importante, ya que se confirma su efecto no sólo en cepas de referencia, sino también en poblaciones naturales, incrementando la posibilidad de su aplicación como producto insecticida.

Los compuestos encontrados en el extracto de *Annona sp*, dihidrocherimolina y bullatacinona, son acetogeninas, que ya se habían descubierto en plantas de la familia *Annonaceae*, poseen propiedades biológicas, como actividad antitumoral, antibacterial y pesticida (81). El otro compuesto encontrado, nornucifenina, es perteneciente al grupo de los alcaloides, estos se caracterizan por tener efectos antidepresivos, y citotóxicos en algunos organismo (82)

Se ha demostrado el efecto antimicrobial de los compuestos alcaloides (83), sin embargo, la capacidad insecticida no ha sido estudiada en profundidad, en cambio, las acetogeninas sí poseen reconocida actividad larvicida, en ensayos in vitro sobre *Ae. aegypti*, el mecanismo de acción de estos compuestos podría implicar la inhibición de un complejo mitocondrial de artrópodos (82). Es de suponer, que la actividad larvicida exhibida por *Annona sp*, se debe a la presencia de los compuestos dihidrocherimolina y bullatacinona, por otra parte, no se puede confirmar el tipo de efecto que puede tener en mosquitos el compuesto nornucifenina.

El género *Jatropha*, corresponde a plantas que presentan gran variedad de compuestos, que poseen diferentes actividades biológicas, el compuesto estigmasterol identificado en nuestro estudio, ya se había detectado en *Jatropha isabellei*, donde se comprobó que poseía efectos antioxidantes y antimicrobial (84). Con este mismo extracto se reportó que presentaba acción insecticida contra *Spodoptera frugiperda*(85). En este sentido se puede inferir que el extracto presenta efecto larvicida en *Ae. aegypti*, aunque no se registren antecedentes con esta especie.

Los compuestos identificados en nuestro estudio: vitexin e isovitexin, ya se habían detectado en plantas del género *Jatropha* (84), sin embargo, no se han evaluado los efectos biológicos que poseen estos compuestos flavonoides, por ello es difícil afirmar que actúan en mecanismos asociados a la actividad larvicida, sin embargo no se descarta esa posibilidad. Para verificar esta afirmación se requieren de más estudios complementarios.

En cuanto a la especie *R. chalepensis*, los compuestos identificados en nuestro trabajo, graveolina y graveolinina (alcaloides), rutaretina y rutamarina (cumarinas), y Apigenin 7-4'-dimetil éter (flavonoide), son grupos de compuestos que se encuentran normalmente en la familia Rutaceae (86). Se han reportado que compuestos alcaloides tienen efectos larvicida sobre *Ae. aegypti*, aislados mediante extractos etanólicos de hojas de plantas medicinales (87), así también, se reportaron efectos similares contra esta especie de mosquitos, evaluando compuestos como las cumarinas y fenoles, provenientes de plantas (88).

Teniendo en cuenta, los antecedentes consultados, los grupos de compuestos identificados en nuestro trabajo, conducen a la idea de la existencia de capacidad larvicida de los extractos etanólicos evaluados. En este caso, cada extracto presenta grupos de compuestos con características químicas distintas, pero no se puede afirmar que estos actúan de forma sinérgica en cuanto al efecto estudiado, ya que, para algunas familias de metabolitos, no se tienen antecedentes sobre efectos en insectos semejantes a la especie *Ae. aegypti*.

Se han realizado estudios con *C. citratus*, y se reportaron efectos insecticidas contra *Ae. aegypti*, tanto para mosquitos adultos y larvas(61)(89), sin embargo esto no fue reproducido en nuestro trabajo, ya que no se pudo generar mortalidad en larvas de mosquito tanto en la cepa control como las salvajes. En este sentido podemos pensar que uno de los factores que pudo contribuir a este fenómeno, es el solvente utilizado para la extracción, en este caso etanol, donde no se logró aislar una cantidad de compuestos necesarios para lograr efecto larvicida. Por otra parte, otro factor influyente podría ser la época de la colecta del material vegetal, ya que este es un factor importante y dependiendo de la época de crecimiento de la planta, se van generando innumerable cantidad de compuestos diferentes.

El factor de resistencia FR50, se utiliza normalmente para medir el grado de resistencia que presenta una población salvaje de *Ae. aegypti* con un compuesto específico, comparada con una cepa de control susceptible (Rockefeller) (90,91), siendo el compuesto normalmente, un insecticida que se utiliza normalmente en fumigaciones para el control vectorial, pero también nos indica el grado de susceptibilidad que presentan las cepas salvajes con compuestos nuevos, en nuestro caso, extractos vegetales.

Por otra parte, los resultados de este estudio reflejan que existe alto grado de susceptibilidad, para todos los extractos de *R. chalepensis*, *J. curcas* y *Annona sp*, en las cepas de San Pedro y Central, considerando que todos los valores obtenidos fueron cercanos a 1, lo que nos hace pensar que las poblaciones salvajes (naturales) de estos Departamentos, nunca fueron expuestas anteriormente a compuestos similares a los extractos evaluados, y por tanto, no presentan ningún tipo de mecanismo efectivo para suprimir los efectos nocivos que estos productos generan a las larvas.

VI. CONCLUSIÓN

Con la investigación realizada, se pudo determinar el efecto que poseen las especies de *R. chalepensis*, *J. curcas* y *Annona sp* sobre larvas L3 y L4 de *Ae. aegypt*, mediante la determinación de concentraciones letales de sus extractos etanólicos. Los resultados nos indican que las plantas mencionadas poseen buena actividad larvicida, siendo *R. chalepensis* y *J. curcas* las especies que generaron mortalidad de larvas a menor concentración de extracto.

Los extractos etanólicos de estas tres especies vegetales, presentaron un efecto similar en cepa Rockefeller, una cepa de laboratorio utilizada como control en pruebas de susceptibilidad, y en las cepas salvajes de San Pedro y Central, demostrando ser igualmente efectiva en poblaciones que poseen mayor resistencia a presiones ambientales y compuestos naturales, siendo bastante prometedor sus posibles usos como alternativas de control vectorial.

Con la identificación de compuestos presentes en los extractos etanólicos, se puede concluir que las especies de *R. chalepensis*, *J. curcas* y *Annona sp.*, poseen metabolitos secundarios que tienen efecto larvicida sobre *Ae. aegypti*. Dejando antecedentes para posteriores investigaciones, en donde uno de los objetivos podría ser cuantificar los mismos, y potenciar su acción mediante la colecta de material vegetal en épocas específicas.

Finalmente, los resultados de este trabajo, representan uno de los primeros datos generados en nuestro país, sobre el efecto de productos obtenidos de plantas cultivadas, en poblaciones salvajes y cepas control de *Ae. aegypti*, atendiendo la importancia en la búsqueda de alternativas para el control vectorial, ya que las estrategias usadas actualmente no ofrecen soluciones efectivas, por el gran número de afectados por arbovirosis, que representa una problemática constante.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Slosek J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: A review of their interactions with the human population. Soc Sci Med. 1986;23(3):249–57.
2. Devine GJ, Eza D, Oigusuku E, Furlong MJ. Insecticide use: context and ecological consequences. Vol. 25, Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2008.
3. Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Wink M, editor. Vol. 40, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010. 1–445 p.
4. Macdonald WW. *Aedes aegypti* in malaya. Ann Trop Med Parasitol. 1956;50(4):399–414.
5. Nelson M. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Pan American Health Organization. 1986. p. 1–16.
6. Montero G. Biología de *Aedes aegypti*. FCA, UNR. 2009.
7. Mohammed A, Chadee DD. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 2011 Jul 1;119(1):38–43.
8. Anoopkumar AN, Puthur S, Varghese P, Rebello S, Aneesh EM. Life cycle, bio-ecology and DNA barcoding of mosquitoes *aedes aegypti* (Linnaeus) and *aedes albopictus* (Skuse). J Commun Dis. 2017;49(3):32–41.
9. Oliva CF, Damiens D, Benedict MQ. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. Acta Trop. 2014 Apr 1;132(1):S12–9.
10. Patricia D, Aldama C, De Jesús Hidalgo García DF, En L, Rosa G, Carmen D, et al. Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. Vol. 22. 2001.
11. Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. Vol. 47, Journal of Medical Entomology. Oxford Academic; 2010. p. 957–71.
12. Service MW. Mosquito (Diptera: Culicidae) Dispersal—The Long and Short of it. J Med Entomol. 1997 Nov 1;34(6):579–88.
13. Suleman M, Arshad M, Khan K. Yellowfever Mosquito (Diptera: Culicidae) Introduced into Landi Kotal, Pakistan, by Tire Importation. J Med Entomol. 1996 Jul 1;33(4):689–93.

14. Mattingly PF. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. *Ann Trop Med Parasitol.* 1957 Dec 17;51(4):392–408.
15. Smith KG V. Insects of minor medical importance. In: *Medical Insects and Arachnids.* Springer Netherlands; 1993. p. 576–93.
16. Crawford JE, Alves JM, Palmer WJ, Day JP, Sylla M, Ramasamy R, et al. Population genomics reveals that an anthropophilic population of *Aedes aegypti* mosquitoes in West Africa recently gave rise to American and Asian populations of this major disease vector. *BMC Biol.* 2017 Dec 28;15(1):16.
17. Gubler DJ. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International Press; 1997. p. 1–22.
18. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MUG, Messina JP, Reiner RC, et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasites and Vectors.* 2014 Jul 22;7(1):338.
19. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife.* 2015 Jun 30;4.
20. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):504–7.
21. Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: Literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(5):489–506.
22. Putnam JL, Scott TW. Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(3):225–7.
23. Carbajo A. Distribución espacio-temporal de *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae): su relación con el ambiente urbano y el riesgo de transmisión del virus dengue en la Ciudad de Buenos Aires. 2003;172.
24. Espinoza MM. Aspectos clínicos de la infección por el virusa zika. *An la Fac Med.* 2017 May 16;78(1):79.

25. Dick GWA. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952 Sep;46(5):509–20.
26. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. Vol. 21, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2015. p. 1885–6.
27. Ross RW. The newala epidemic: III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond).* 1956;54(2):177–91.
28. | Hoja informativa Chikungunya [Internet]. [citado 2021 Junio 24]. Available from:
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303:2013-hoja-informativa-chikungunya&Itemid=40023&lang=fr
29. Vasconcelos PFC, Monath TP. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2016 Aug 1;16(8):566–7.
30. Barrios C., Fernández A, María Teresa Barán Wasilchuk D, Patricia Giménez Q, María Elena Ramírez de Rojas Edición D, Manuel Vargas L, Pistilli M, et al. *Ministro de Salud Pública y Bienestar Social Vice Ministra de Salud Dirección de Documentación Histórica.* 2016.
31. Gould E, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. Vol. 371, *The Lancet*. Lancet; 2008. p. 500–9.
32. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2006;20(6):407–15.
33. Schneider J, Droll D. A timeline for dengue in the americas to december 31, 2000 and noted first occurences. 2001.
34. Severo OP. Eradication of the *Aedes Aegypti* Mosquito from the Americas. 1955.
35. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jan;82(1):128–35.

36. Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. Vol. 87, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2012. p. 584–93.
37. Martínez De Cuellar C, Lovera D, Arbo A. ARTÍCULO ORIGINAL 136 *Pediatr (Asunción)*. 2017;44(2):136–42.
38. Juan L, Bisset A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Vol. 54, *REV CUBANA MED TROP*. 2002.
39. WHO | WHO Ad-hoc Advisory Group on aircraft disinsection for controlling the international spread of vector-borne diseases. WHO. 2017;
40. Lic Alba María Gaona Fernández S. Ficha Técnica.
41. Programa nacional de control vectorial del dengue - Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. SENEPA. 2018
42. Andrés J, Lazcano B, Magdalena M, Coto R, Hurtado Nuñez D, Hernández Alvarez H, et al. Insecticide resistance and its biochemical mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the municipality of Boyeros in the years 2010 and 2012. Vol. 68, *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2016.
43. Georgiou GP, Mellon RB. Pesticide Resistance in Time and Space. In: *Pest Resistance to Pesticides*. Springer US; 1983. p. 1–46.
44. Lagunes-Tejeda Á, Concepción Rodríguez-Maciel J, De Loera-Barocio JC. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de artrópodos de México susceptibility to insecticides in populations of mexican arthropods. *Agrociencia*. 2009;43:173–96.
45. Lopes RP, Lima JBP, Martins AJ. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: A review. Vol. 12, *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd.; 2019. p. 591.
46. Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, Raymond M. Determination of Ace.1 genotypes in single mosquitoes: Toward an ecumenical biochemical test. *Pestic Biochem Physiol*. 1996;55(2):122–8.

47. Villani F, White GB, Curtis CF, Miles SJ. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res. 1983;73(1):153–70.
48. Ochipinti GM, Berti J, Guerra LA, Salazar M, Zuleima Escobar C, Ángel Gómez J. Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela Effect of the growth regulator pyriproxyfen on *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) . Vol. LIV. 2014.
49. Yunta C, Grisales N, Nász S, Hemmings K, Pignatelli P, Voice M, et al. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. Insect Biochem Mol Biol. 2016 Nov 1;78:50–7.
50. Ma W, Li X, Dennehy TJ, Lei C, Wang M, Degain BA, et al. Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype b: Metabolic mechanism. J Econ Entomol. 2010 Feb;103(1):158–65.
51. Carvalho BL, Germano RNL, Braga KML, de Araújo ERF, Rocha D de A, Obara MT. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the federal district of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53.
52. Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior ADJ. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019 Mar 1;114(3).
53. Ferreira Coronel M, Dos Santos Dias L, Rodovalho C de M, Pereira Lima JB, Gonzalez Britez N. *Aedes aegypti* (Díptera-Culicidae) Susceptibility to Temephos in Ciudad del Este, Alto Paraná, Paraguay. Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud. 2016 Sep 15;14(2):98–105.
54. Ghosh, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. Indian J Med Res. 2012;135(5):581.
55. Dias CN, Moraes DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. Vol. 113, Parasitology Research. Springer; 2014. p. 565–92.
56. Sepúlveda-jiménez G. Sepúlveda Jiménez , Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. Rev Mex Fitopatol. 2003;21(3):355–63.

57. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. Terpenoids. In: Pharmacognosy. Elsevier; 2017. p. 233–66.
58. Vartak PH SRV toxicity & repellence of some essential oils & terpenoids to adults of *A. aegypti* (L) (Diptera: CIJMR 1993 M-7. P 8406635. Toxicidad de vapor y repelencia de algunos aceites esenciales y terpenoides para adultos de *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) - PubMed. Indian J Med Res. 1993;7:97:122.
59. Dhinakaran SR, Mathew N, Munusamy S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. Drug Dev Res. 2019 Sep 26;80(6):791–9.
60. Rosado-Solano DN, Jaramillo-Pérez VM, Kouznetsov VV, Restrepo-Manrique R, Puerto-Galvis CE, Vargas-Méndez LY. Actividad larvica de aceites esenciales y extractos de plantas colombianas frente a *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae). ITECKNE. 2018 Dec 7;15(2):79–87.
61. Muñoz JA, Staschenko E, Ocampo CB. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Colomb Entomol. 2014;40(2):198–202.
62. Aldred E. Phenols. In: Pharmacology. Elsevier; 2009. p. 149–66.
63. Leoncio M, Castillo S, Bertha B, Moreno Rodríguez B. Efecto de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens* en la mortalidad de larvas III de *Aedes aegypti*. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas; 2018.
64. Devi U, Bora D. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. Asian Pac J Trop Med. 2017 Aug 1;10(8):787–91.
65. O'Connor SE. Alkaloids. In: Comprehensive Natural Products II. Elsevier; 2010. p. 977–1007.
66. Touré S, Nirma C, Falkowski M, Dusfour I, Boulogne I, Jahn-Oyac A, et al. *Aedes aegypti* Larvicidal Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus oblongata*. J Nat Prod. 2017 Feb 24;80(2):384–90.

67. Liu ZL, Liu QZ, Du SS, Deng ZW. Mosquito larvicidal activity of alkaloids and limonoids derived from *Evodia rutaecarpa* unripe fruits against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012 Sep 25;111(3):991–6.
68. Sanabria L, Segovia E, González N, Alcaraz P, Bilbao VN de. Actividad larvica de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti*: primeros ensayos. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud.* 2007;7(2):26–31.
69. SENEPA. Plan de manejo integrado de vectores. 2017.
70. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Sep 1;77(3):467–77.
71. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvices. *World Heal Organ.* 2005;1–41.
72. Morales-Saldaña J, Gómez N, Rovira J, Abrahams M. Actividad larvica de la toronja, *Citrus paradisi* (Rutaceae) sobre dos vectores del dengue Larvicidal activity of the grapefruit *Citrus paradise* (Rutaceae) on two vectors of dengue 1 Instituto Smithsonian de investigaciones Tropicales, Republica de Pan-. Vol. 14, Rev. peru. biol. 2007.
73. Rosado-Solano DN, Jaramillo-Pérez VM, Kouznetsov VV, Restrepo-Manrique R, Puerto-Galvis CE, Vargas-Méndez LY. Actividad larvica de aceites esenciales y extractos de plantas colombianas frente a *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Iteckne.* 2018;15(2):79–87.
74. Murugan K, Kumar PM, Kovendan K, Amerasan D, Subrmaniam J, Hwang JS. Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012 Oct 15;111(4):1757–69.
75. Parra Henao JG, García Pajón CM, Cotes Torres MJ. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Med.* 2007;21(1):47–54.
76. Agrela Irma F HF. Acción larvica de extractos alcohólicos de semilla de *Annona Muricata* (guanábana) sobre *Aedes Aegypti* y *Aedes Albopictus*. *Bol Mal Salud Amb.* 2016;56(2):235–8.

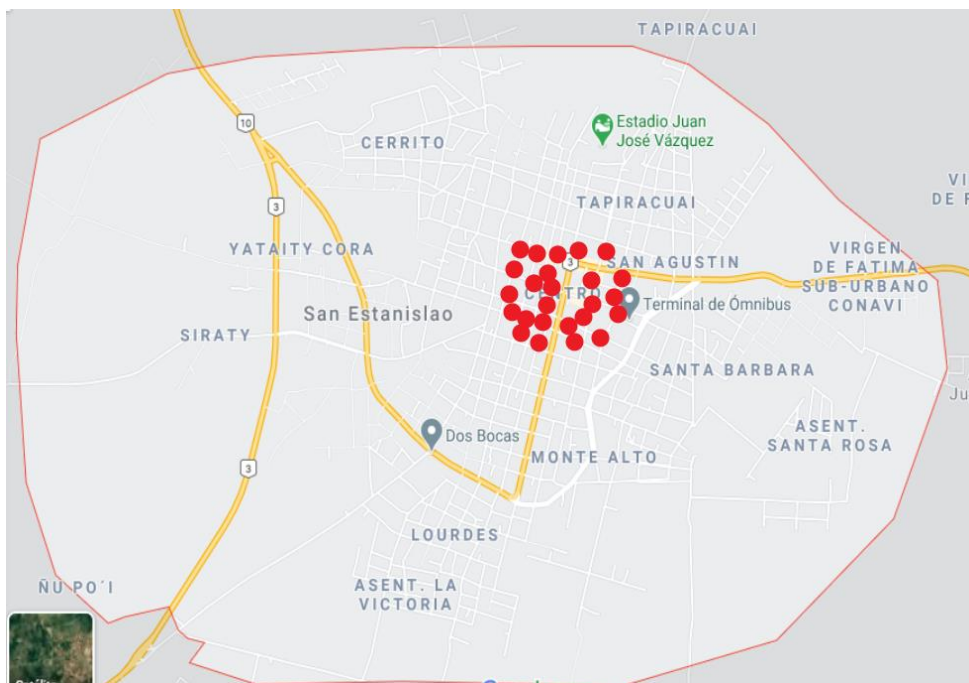
77. Bobadilla M, Zavala F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J, Taramona L. Evaluación larvica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). Rev Peru Biol. 2005;12(1):145–52.
78. Sathiyamoorthy P, Lugasi-Evgi H, Van-Damme P, Abu-Rabia A, Gopas J, Golan-Goldhirsh A. Larvicidal activity in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products. Pharm Biol. 1997;35(4):265–73.
79. Oliveira P V., Ferreira JC, Moura FS, Lima GS, De Oliveira FM, Oliveira PES, et al. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2010 Jul;107(2):403–7.
80. Huenten JD. Evaluación del efecto larvica de extractos de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) sobre *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.; 2017.
81. Hui Y, Lilly E. Annonaceous Acetogenins : A Review. J N. 1990;53(2):237–78.
82. Coria-téllez A V, Montalvo-gonzález E, Yahia EM, Obledo-vázquez EN. *Annona muricata* : A comprehensive review on its traditional medicinal uses , phytochemicals , pharmacological activities , mechanisms of action and toxicity. Arab J Chem. 2016;(January):83.
83. Rinaldi M, Diaz I, Suffredini I, Moreno P. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). Brazilian J Pharmacogn. 2017;27:77–83.
84. Cavalcante NB, Diego da Conceição Santos A, Guedes da Silva Almeida JR. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. Vol. 318, Chemico-Biological Interactions. 2020.
85. Ribeiro SS, Brasil T, Regina V, Moraes DS, Cesar P, Nogueira DL, et al. Chemical Constituent Of Methanolic Extracs Of *Jatropha curcas* L And Efects On *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Quim Nov. 2012;35(11):2218–21.

86. Ahmad Parray S, udin Bhat J, Ahmad G, Jahan N, Sofi G, Faisal Iqbal SM. *Ruta graveolens*: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview. Am J PharmTech Res. 2012;2(2).
87. Carpio CM, David Z, Estrada J, Universidad R, Sucre DE, De Educacion F, et al. química, actividad larvica sobre *Aedes aegypti* y evaluación antioxidante del extracto total en etanol de las hojas secas de croton conduplicatus Kunth. 2016.
88. Aguirre-Obando OA, Duarte-Gandica I, Álvarez-Londoño JC, Jiménez-Montoya JA. Actividad larvica de extractos vegetales de la familia Asteraceae y modelación matemática para su uso en el control de poblaciones de *Aedes aegypti*. Actual Biológicas. 2018 Jan 1;40(108).
89. Soonwera M, Phasomkusolsil S. Effect of Cymbopogon citratus (lemongrass) and Syzygium aromaticum (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and Anopheles dirus larvae. Parasitol Res. 2016 Apr 1;115(4):1691–703.
90. Lazcano JAB, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R, Lazcano B, et al. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador Investigación original / Original research. Vol. 26, Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 2009.
91. Frías Carrillo PA, Milián Pérez RJ. Susceptibilidad y factor de resistencia (FR50) de larvas (estadio III) de *Aedes aegypti* procedente de los distritos de Olmos y Motupe - Región de Lambayeque a Temephos (Abate) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Univ Nac Pedro Ruiz Gall. 2013;

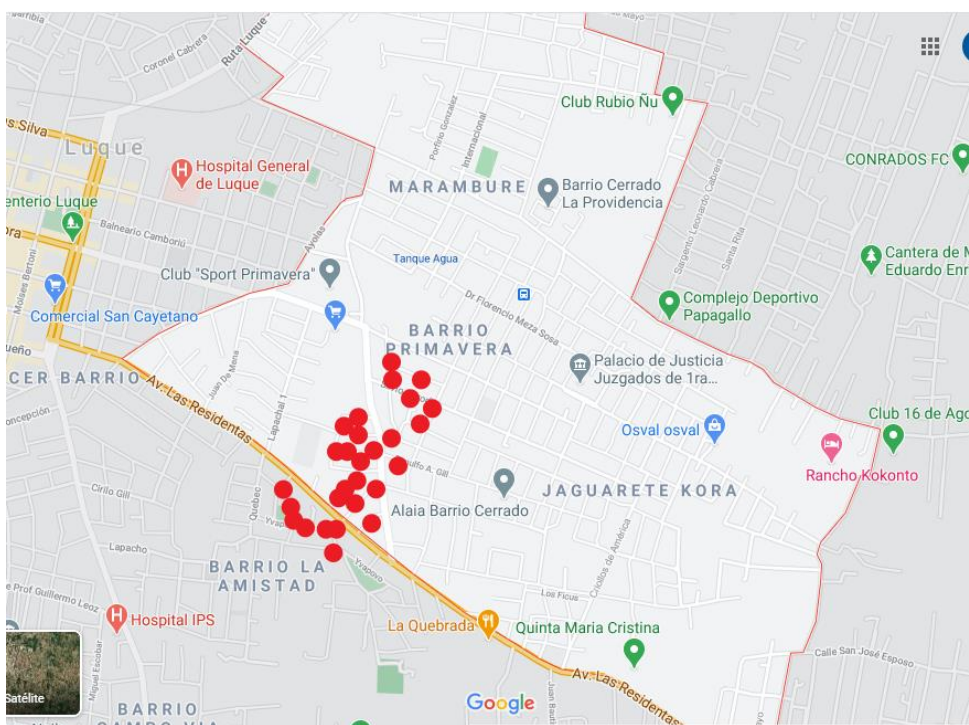
VIII. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Mapa de zonas de muestreo, ciudad de Santaní- Departamento de San Pedro



Mapa de zonas de muestreo, ciudad de Luque- Departamento Central



8.2 Anexo 2

Ovitrampa utilizada para trabajos de campo, diseño casero



8.3 Anexo 3

Modelo del Permiso de colocación de trampas por los propietarios de las viviendas visitadas.

Proyecto: Extractos etanólicos de diferentes especies vegetales con actividad larvicida en *Aedes aegypti*

Objetivos: Evaluar la actividad insecticida de extractos etanólicos de diversas especies vegetales en larvas de *Aedes aegypti*

En caso de participar en el trabajo

Yo,.....

Cel.Nº

Permito el acceso al personal investigador del proyecto, dentro de mi vivienda y sus alrededores, bajo mi responsabilidad, quienes entrarán para colocar trampas en busca de mosquitos. Permito la colección y transporte adecuado de los insectos para realizar la debida identificación y el diagnóstico de estos.

Beneficios

Se busca un nuevo método de eliminación de larvas de vectores transmisores, se espera encontrar buen rendimiento de los extractos vegetales para evitar el uso de insecticidas sintéticos.

Riesgo

No representa ningún riesgo las actividades realizadas en este proyecto.

..... Firma del propietario.

8.4 Anexo 4

Descripción botánica de las plantas escogidas:

Jatropha curcas (piñón blanco)

Especie identificada	<i>Jatropha curcas</i> (Bisse 1988, Heller 1996 y Joker, Jepsen 2003)
Porte de la planta	Árbol pequeño, caducifolio, con diámetro de altura de pecho (DAP) aproximadamente 20 cm, y fuste de ramificaciones a baja altura.
Copa	Irregular
Tallo	Forma cilíndrica, de coloración verdosa, de contextura sólida, que contienen savia lactosa.
Hojas	Presentan pelos finos, tienen una longitud de 10 a 15 cm, ancho de 9 a 12 cm, de estructura oval ancha, simples, con filotaxis alterna espiral. Posee cinco nervaduras, láminas acorazadas con aproximadamente 10 cm, con tres a cinco lóbulos de borde liso. Coloración del haz verde y envés verde claro.
Frutas	Presentan forma ovoide, de contextura carnosa, con bordes redondeados, conteniendo en su interior dos a tres semillas, inicialmente de color verde, para pasar posteriormente a una coloración mate oscura. Son de aproximadamente 2 cm de ancho,
Semillas	Por fruta se presentan en cantidad de dos a tres, aproximadamente de 2 cm de largo con 1 cm de ancho, pálidas con líneas negras bastante notables.

Imágenes de la planta seleccionada:



Partes de la planta (Toral et al., 2008):

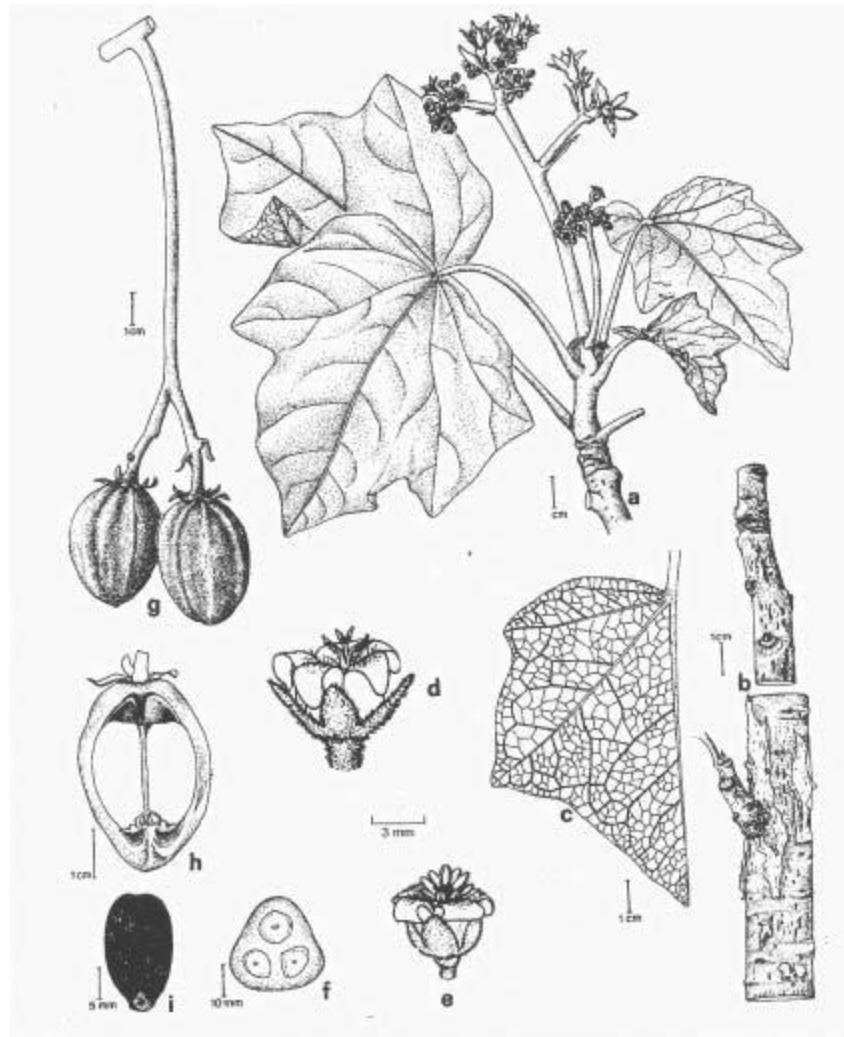


Figura de anexo. a) ramas florecidas; b) corteza; c) venas de la hoja; d) flores con pistilos; e) flor con estambres; f) corte transversal de un fruto inmaduro; g) frutos; h) corte longitudinal de un fruto; i) semilla.

Annona sp. (chirimoya)

Especie identificada	<i>Annona sp.</i> (Linnaeus, 1753)
Porte de la planta	Árbol caducifolio, de aproximadamente 3 a 5 metros de altura, muy ramificado con hojas caídas y delgadas.
Copa	Pendular.
Tallos	Forma cilíndrica, de coloración marrón clara, compactos, ásperos de consistencia rugosa, presentan numerosas lenticelas.
Hojas	Son de tipo alternas, lisas y presentan pelos simples eglandulares transparentes, con la coloración del haz en verde oscuro, y de tonalidad del envés más claras, de estructuras ovadas elípticas, aproximadamente 3 cm de ancho y 6 cm de largo.
Frutas	El fruto presenta numerosos carpelos, formando un sincarpio, presenta forma ovoide, la textura es carnososa y rugosa, con prominentes protuberancias superficiales.
Semillas	Numerosas por frutos, compactas, negras y brillantes, con forma semejante a los frijoles. Aproximadamente presentan un largo de 2cm y un ancho de 1cm.



Partes de la planta:

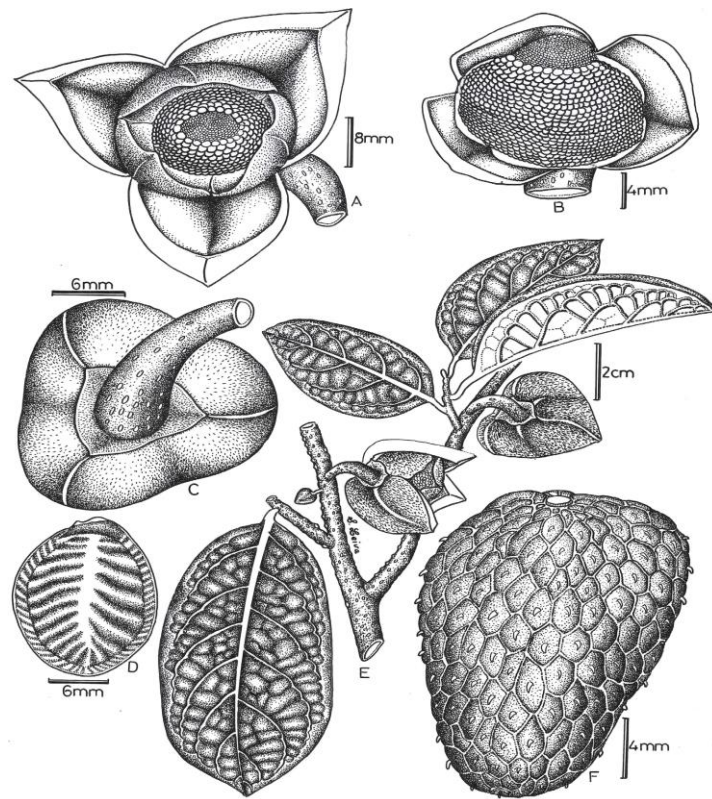


Figura de anexo: A. Flor en antesis; B. Estambres y gineceo con restos de cáliz y corola; C. Inserción de la flora al pedúnculo; D. Semilla; E. Rama florífera; F. Baya.

Ruta chalepensis (ruda)

Especie identificada	Ruta chalepensis (Linnaeus, 1767)
Porte de la planta	Arbusto perenne, de aproximadamente 100 a 150 cm de altura, presenta una base leñosa, desnuda y despide un olor característico.
Tallos	De estructura leñosa, presenta numerosas ramificaciones.
Hojas	De estructura alternas, las hojas presentan una coloración verdosa azulada, constan de segmentos ovales, espatuladas y glaucas.



Ilustración de la planta:



Imagen obtenida de: <http://herbarivirtual.uib.es/es/general/1138/especie/ruta-chalepensis-l-subsp-chalepensis>.

Cymbopogon citratus (cedrón kapi'i)

Especie identificada	<i>Cymbopogon citratus</i> (Roig, 1974)
Porte de la planta	Arbusto perenne, se propaga por esquejes, una característica es que posee bastante aromaticidad, con ojos en forma de espigas de aproximadamente 60 cm.
Hojas	De estructura alargada, semejante a listones, ásperas, tienen una base de matas densas que surgen desde el suelo, poseen coloración verde claro.

Imágenes de la planta:



8.5 Anexo 5

Técnica para obtención de extractos alcohólicos. (Lock, O. 2013)

Secado de hojas y tallos: una vez colectadas las plantas, se colocan las partes a utilizar sobre papel periódico a la sombra, a temperatura ambiente y sin mucho aire para su secado. Una vez que produzca un buen secado las mismas, se procede a la pulverización de la parte vegetal con un molino manual, hasta obtener un residuo semejante a un polvo.

Agregado de reactivo de extracción: El polvo obtenido en el paso anterior, será introducido en vasos de precipitados de 1000 mL, se mezcla con etanol a 98 % en una proporción de un litro por cada 200 gramos de planta; esta mezcla se deja por 24 horas, posteriormente se realizan ciclos de sonicación de 30 minutos, dejando en reposo luego por 15 minutos, este proceso se realiza por triplicado; el paso siguiente es la filtración, se realiza con un equipo de filtración al vacío. Una vez filtrado todo el líquido del vaso de precipitado, se le vuelve agregar etanol a 98% al polvo residual(24hs), repitiendo tres veces el procedimiento de sonicación y filtración; el líquido filtrado se deja reposar por 24 horas.

Concentración por Rotavapor: El concentrado del filtrado se pasa a un balón de destilación al vacío, este procedimiento elimina el solvente orgánico necesario para la extracción, en este caso el etanol. El balón de destilación se conecta al tubo evaporador que dirige los vapores de los disolventes hacia el interior de un refrigerante. Una vez que los vapores condensan, el disolvente se recoge en un balón colector; el rotavapor lleva incorporado un motor rotatorio que hace girar el balón y evita que el disolvente salte violentamente mientras se aplica vacío, este mecanismo, permite que el líquido interior humedezca una mayor superficie del balón y contribuye a que la evaporación se realice de manera controlada, el balón de destilación puede calentarse externamente mediante baño maría.

Cálculo de rendimiento del extracto obtenido: $\frac{\text{Peso de extracto}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$

Equipo de rotavapor utilizado:



Filtrado de extracto etanólico:



8.6 Anexo 6

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACUERDO DE COLABORACIÓN CIENTÍFICA ENTRE EL DEPARTAMENTO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNA, Y EL LABORATORIO DEL INSECTARIO, DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD

El presente acuerdo se suscribe a los 11 días del mes de Julio del 2019, en el marco del proyecto “**Actividad larvicide de extractos etanólicos de cuatro especies vegetales sobre *Aedes aegypti***” elaborado por el alumno de maestría en Ciencias Biomédicas: Cristhian Ojeda, bajo la tutoría de: PhD. Nilsa González, y cotutoría de: PhD. Nelson Alvarenga, FCQ; y PhD. Silvia Caballero

Se acuerda que:

- El presente acuerdo tendrá una duración de 18 meses, a partir de la fecha de firma del acuerdo, el cual podrá ser prorrogado según acuerdo mutuo de las partes.
- Por parte del Departamento de Fitoquímica, el Dr. Nelson Alvarenga se compromete a la disposición de equipos, materiales y espacio físico necesarios para la elaboración de extractos vegetales a realizarse en su Departamento en el tiempo acordado.
- Por parte del Departamento de Medicina Tropical, la Dra. Nilsa González se compromete a la disposición de materiales, equipos y espacio físico necesarios para la realización de bioensayos con larvas de mosquitos.
- La publicación de los resultados de este proyecto será de común acuerdo entre el investigador Cristhian Ojeda, la Dra. Nilsa González (tutor), el Dr. Nelson Alvarenga y la Dra. Silvia Caballero (cotutores).

8.7 Anexo 7

Protocolo de obtención de larvas F1 de *Ae. aegypti*:

a) Hidratación de huevos recolectados de campo:

Los huevos obtenidos de las salidas de campo se hidratan con agua desoxigenada, aproximadamente 1 litro por cada 500 huevos, las larvas emergentes son repartidas en bandejas con capacidad de 300 a 400 larvas para evitar hacinamiento, las cuales son limpiadas diariamente de desechos. En ellas se agregan alimento para gatos finamente molido. En caso de que las bandejas requieran cambio de agua, se utiliza agua sin cloro.

b) Cría de adultos:

Pupas: son separadas de las larvas en recipientes llenos hasta 1/3 de su capacidad.

Adultos: son mantenidos en jaulas de cría (imagen más adelante), con la utilización de motas de algodón azucaradas al 10%, para fuente de alimentación de adultos. Las hembras son alimentadas con sangre de origen animal, una vez por semana, empleando ratos albinos vivos, con una duración de 20 minutos, estos son anestesiados con Ketagal + Xilagal (40-90mg/kg ket. IM + 5- 15mg/kg xil. IM).

Posteriormente se realiza la limpieza de la base de la jaula con gasa para evitar la proliferación de hongos.



c) Obtención de huevos F1: Los huevos obtenidos luego de la alimentación sanguínea, corresponden a la filial 1, estos son recolectados y almacenados para su uso posterior en ensayos biológicos

8.8 Anexo 8

Resultados de pre ensayos

Rango de concentraciones de extracto vegetal que causa mort. Del 1 al 99% en Larvas de *Aedes aegypti*. Cepa Rockefeller.

Especie vegetal	Rango de concentración (mg/L)- Mort. 1-99 %
<i>Ruta chalepensis</i>	50-350
<i>Jatropha curcas</i>	100-375
<i>Annona sp.</i>	200-575

Rango de concentraciones de extracto vegetal que causa mort. Del 1 al 99% en Larvas de *Aedes aegypti*. Cepa salvaje- San Pedro

Especie vegetal	Rango de concentración (mg/L)- Mort. 1-99 %
<i>Ruta chalepensis</i>	75-375
<i>Jatropha curcas</i>	100-400
<i>Annona sp.</i>	275-625

Rango de concentraciones de extracto vegetal que causa mort. Del 1 al 99%
en Larvas de *Aedes aegypti*. Cepa salvaje- Central

Especie vegetal	Rango de concentración (mg/L)- Mort. 1-99 %
<i>Ruta chalepensis</i>	75-400
<i>Jatropha curcas</i>	100-425
<i>Annona sp.</i>	300-675

8.9 Anexo 9

Análisis Póbit para extractos vegetales

Análisis de extractos de *R. chalepensis* con cepa Rockefeller

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico		Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	4,724	,289	6,372	0,000	4,159	5,290
	Intersección	-11,020	,680	16,198	0,000	-11,700	-10,339

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

	Chi-cuadrado	gl ^b	ig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	3,999	6	677 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		,699	100	1	1,472	-,361	,015
		,875	100	8	7,719	,614	,077
		,000	100	23	18,682	4,096	,187
		,176	100	41	44,580	-3,350	,446
		,301	100	61	65,478	-4,268	,655
		,398	100	77	79,186	-1,964	,792
		,477	100	89	87,527	1,362	,875
		,544	100	95	92,480	2,750	,925

Análisis de extractos de *R. chalepensis* con cepa San Pedro

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	4,643	,287	6,151	,000	4,079	5,206
	Intersección	-10,819	,677	15,972	,000	-11,497	-10,142

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	5,263	6	,511 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		,875	100	2	1,727	,496	,017
		,000	100	8	6,254	2,079	,063
		,176	100	23	23,693	-,915	,237
		,301	100	41	44,585	-4,045	,446
		,398	100	61	62,316	-,996	,623
		,477	100	70	75,219	-4,769	,752
		,544	100	85	83,945	1,515	,839
		,574	100	92	87,104	5,016	,871

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *R. chalepensis* con cepa Central

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	4,724	,289	6,372	,000	4,159	5,290
	Intersección	-11,020	,680	16,198	,000	-11,700	-10,339

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	9,187	6	,163 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		,875	100	2	1,534	,132	,015
		,000	100	9	5,811	3,634	,058
		,176	100	24	22,997	,892	,230
		,301	100	33	44,090	-10,757	,441
		,398	100	60	62,140	-2,600	,621
		,477	100	76	75,277	,278	,753
		,544	100	88	84,123	4,211	,841
		,602	100	92	89,858	1,922	,899

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *J.curcas* con cepa Rockefeller

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	5,310	,313	6,970	,000	4,696	5,923
	Intersección	-12,408	,736	16,856	,000	-13,144	-11,671

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

b.

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	4,366	6	,627 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,000	100	3	3,689	-,355	,037
		2,097	100	7	10,143	-3,476	,101
		2,176	100	25	19,682	5,318	,197
		,301	100	45	42,480	2,170	,425
		2,398	100	61	62,738	-1,627	,627
		2,477	100	74	77,197	-2,753	,772
		2,544	100	86	86,452	-,896	,865
		2,574	100	92	89,615	1,955	,896

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *J.curcas* con cepa San Pedro

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$$\alpha = 0,05$$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	5,512	,321	17,176	,000	4,883	6,141
	Intersección	-12,897	,756	-17,059	,000	-13,653	-12,141

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	11,874	6	,065 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,000	100	1	3,052	-1,941	,031
		2,097	100	7	9,027	-2,361	,090
		2,176	100	24	18,336	6,108	,183
		2,301	100	43	41,528	1,012	,415
		2,398	100	66	62,558	2,998	,626
		2,477	100	77	77,535	-,869	,775
		2,544	100	79	86,983	-7,533	,870
		2,602	100	96	92,580	3,660	,926

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *J.curcas* con cepa Central

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	5,600	,343	16,323	,000	4,928	6,273
	Intersección	-13,222	,813	16,255	,000	-14,035	-12,408

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	8,314	6	,216 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas							
	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,000	100	3	2,162	,616	,022
		2,166	100	8	15,029	-6,696	,150
		2,243	100	26	25,454	,657	,255
		2,301	100	46	36,862	9,008	,369
		2,398	100	58	58,208	,125	,582
		2,477	100	73	74,236	-1,459	,742
		2,574	100	86	88,364	-2,784	,884
		2,628	100	95	93,290	1,250	,933

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$$\alpha = 0,05$$

Análisis de extractos de *Anona sp* con cepa Rockefeller

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$$\alpha = 0,05$$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	8,475	,515	16,471	,000	7,467	9,484
	Intersección	-21,785	1,327	-16,413	,000	-23,113	-20,458

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	7,277	6	,296 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,301	100	2	1,120	,547	,011
		2,398	100	8	7,184	,594	,072
		2,477	100	20	21,443	-1,443	,214
		2,544	100	46	41,147	4,964	,411
		2,602	100	56	60,555	-4,444	,606
		2,653	100	71	75,843	-4,732	,758
		2,699	100	85	86,194	-1,194	,862
		2,760	100	99	94,559	4,330	,946

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *Anona sp* con cepa San Pedro

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	9,077	,660	3,744	,000	7,782	10,371
	Intersección	-24,422	1,786	-13,674	,000	-26,208	-22,636

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	8,761	6	,187 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,439	100	2	1,128	1,094	,011
		2,512	100	7	5,237	2,013	,052
		2,653	100	31	36,711	-5,761	,367
		2,699	100	51	53,021	-1,571	,530
		2,720	100	56	60,570	-4,459	,606
		2,740	100	64	67,419	-2,969	,674
		2,760	100	75	73,459	1,991	,735
		2,796	100	90	83,032	7,418	,830

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.

$\alpha = 0,05$

Análisis de extractos de *Anona sp* con cepa Central

Ho: el aumento de la mortalidad de larvas no se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

H1: el aumento de la mortalidad de larvas se correlaciona al aumento de la concentración de extracto.

$\alpha = 0,05$

Estimaciones de los parámetros

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	PPM	9,572	,593	16,150	,000	8,410	10,734
	Intersección	-25,877	1,607	-16,098	,000	-27,484	-24,269

a. Modelo PROBIT: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10,000.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	12,064	6	,061 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que ,050, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	PPM	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT		2,477	100	2	1,515	,151	,015
		2,544	100	8	6,359	1,418	,064
		2,602	100	21	16,598	3,958	,166
		2,699	100	43	48,302	-4,968	,483
		2,740	100	56	63,819	-8,263	,638
		2,760	100	66	70,485	-4,915	,705
		2,796	100	84	81,193	3,251	,812
		2,829	100	96	88,589	6,951	,886

Ho: Los valores esperados no difieren significativamente de los valores observados.

H1: Los valores esperados difieren significativamente de los valores observados.
 $\alpha = 0,05$

Análisis ANOVA de dos factores

Ho: No existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre cepas y especies vegetales

H1: Existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre cepas y especies vegetales

$\alpha = 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: concentracion

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	900850,694 ^a		112606,337	8,215	,000
Intersección	6495008,681		6495008,681	473,860	,000
Cepa	47621,528		23810,764	1,737	,184
Especie	825017,361		412508,681	30,096	,000
Cepa * Especie	28211,806		7052,951	,515	,725
Error	863515,625	3	13706,597		
Total	8259375,000	72			
Total corregida	1764366,319	71			

a. R cuadrado = ,511 (R cuadrado corregida = ,448)

Pruebas post hoc

Ho: No existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre cepas de mosquitos

H1: Existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre cepas de mosquitos

$\alpha = 0,05$

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: concentracion

Bonferroni

(I)Cepa	(J)Cepa	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Luque	Rockefeller	59,375	33,7967	,251	-23,751	142,501
	San pedro	11,458	33,7967	1,000	-71,667	94,584
Rockefeller	Luque	-59,375	33,7967	,251	-142,501	23,751
	San pedro	-47,917	33,7967	,484	-131,042	35,209
San pedro	Luque	-11,458	33,7967	1,000	-94,584	71,667
	Rockefeller	47,917	33,7967	,484	-35,209	131,042

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 13706,597.

Ho: No existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre especies vegetales

H1: Existen diferencias en la concentración de extracto necesario para generar mortalidad en larvas entre especies vegetales

$\alpha = 0,05$

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: concentracion

Bonferroni

(I)Extracto	(J)Extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Anonna	Jatropha	213,542*	33,7967	,000	130,416	296,667
	Ruda	238,542*	33,7967	,000	155,416	321,667
Jatropha	Anonna	-213,542*	33,7967	,000	-296,667	-130,416
	Ruda	25,000	33,7967	1,000	-58,126	108,126
Ruda	Anonna	-238,542*	33,7967	,000	-321,667	-155,416
	Jatropha	-25,000	33,7967	1,000	-108,126	58,126

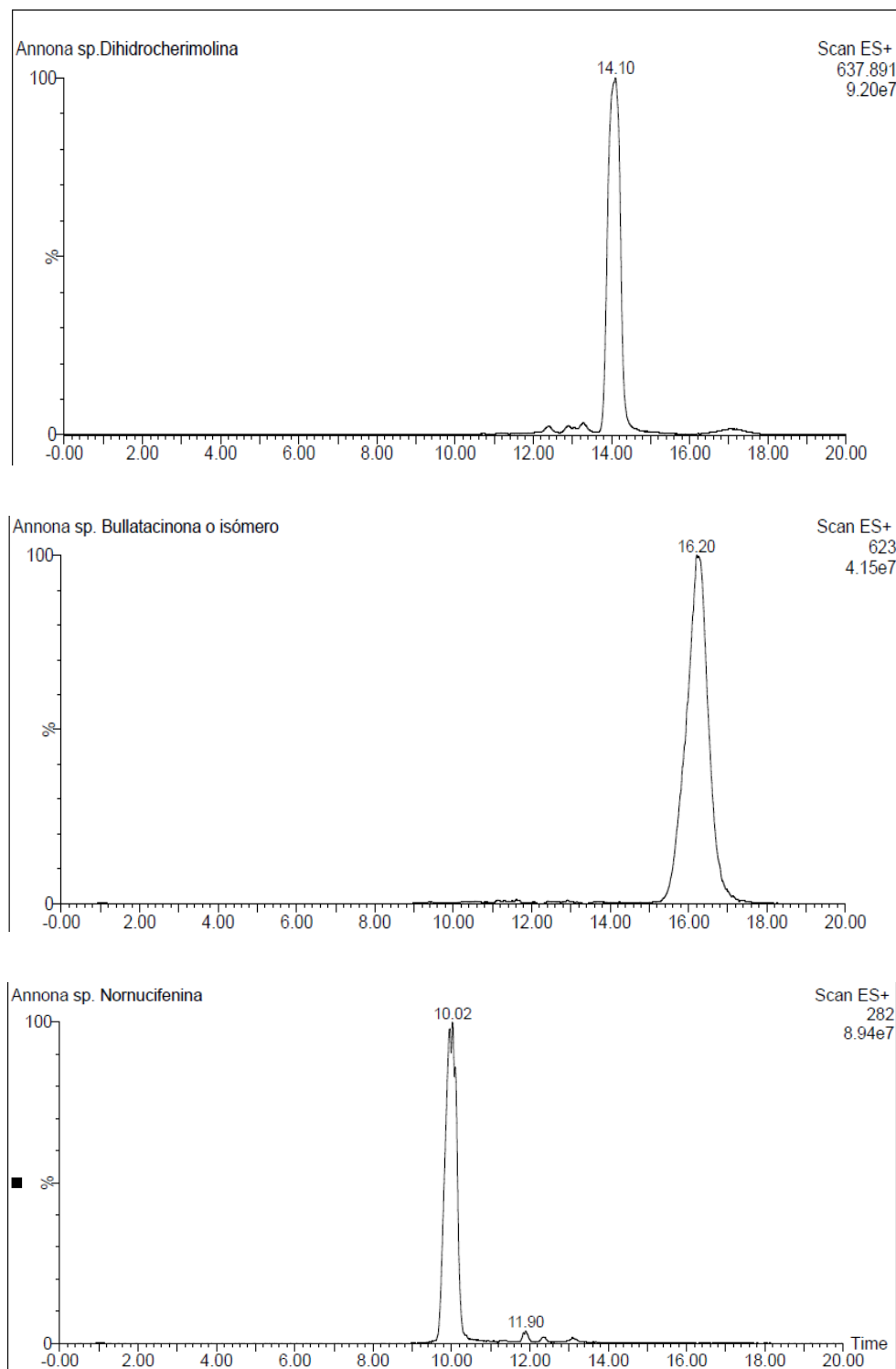
Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 13706,597.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

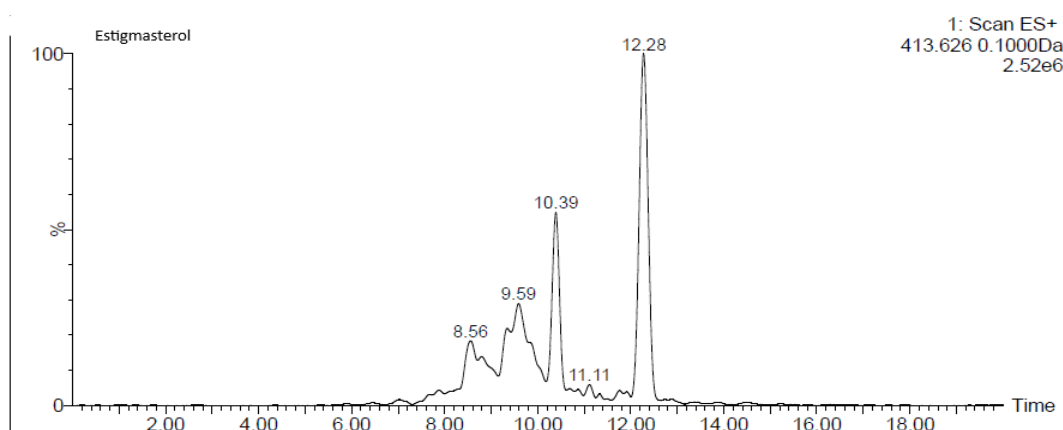
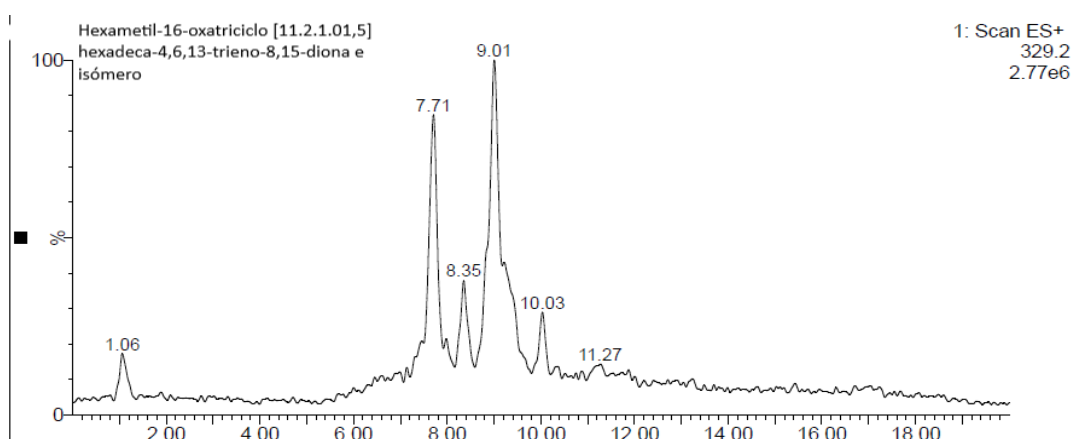
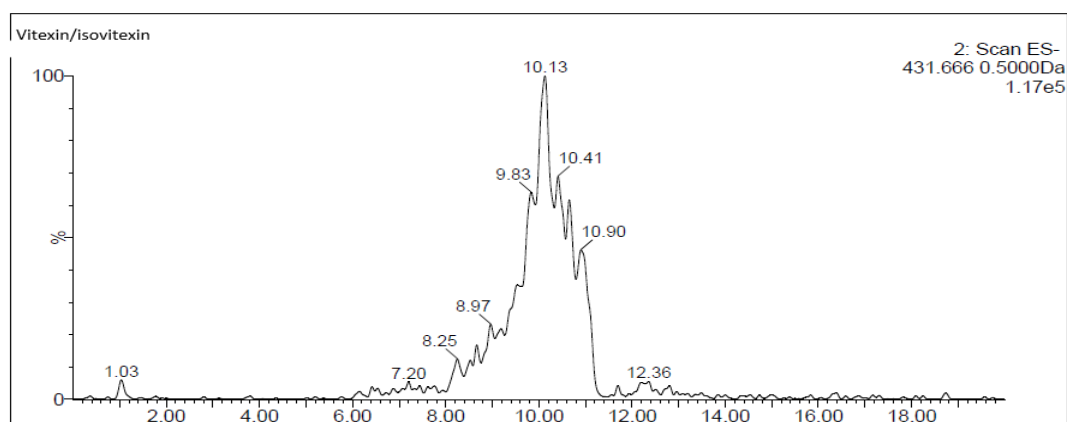
8.10 Anexo 10

Cromatogramas de compuestos identificados de extractos etanólicos.

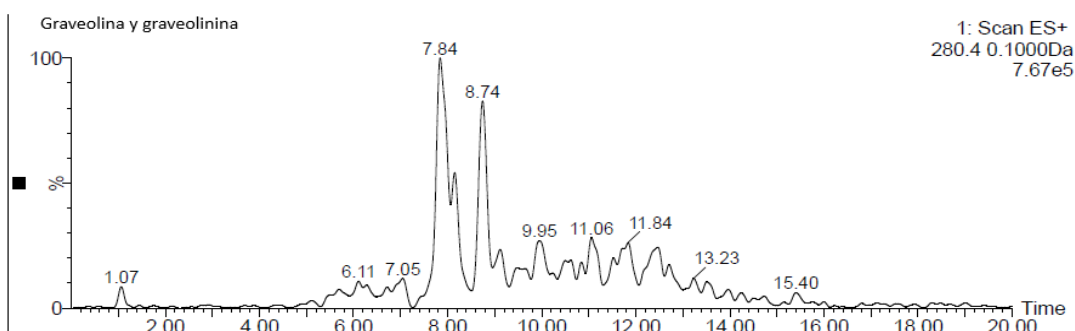
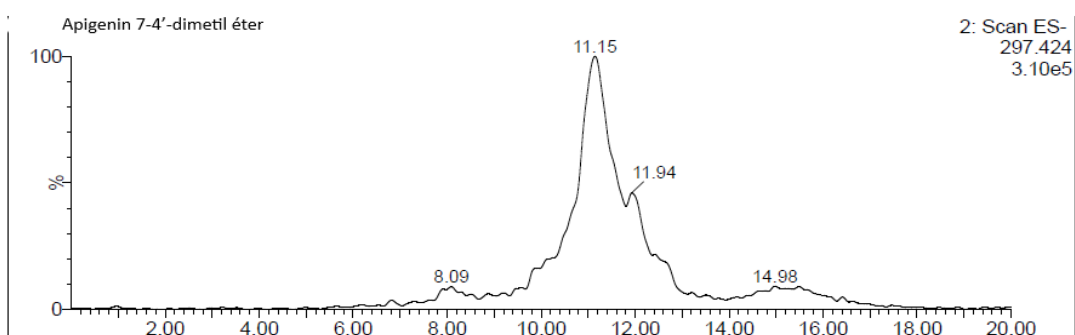
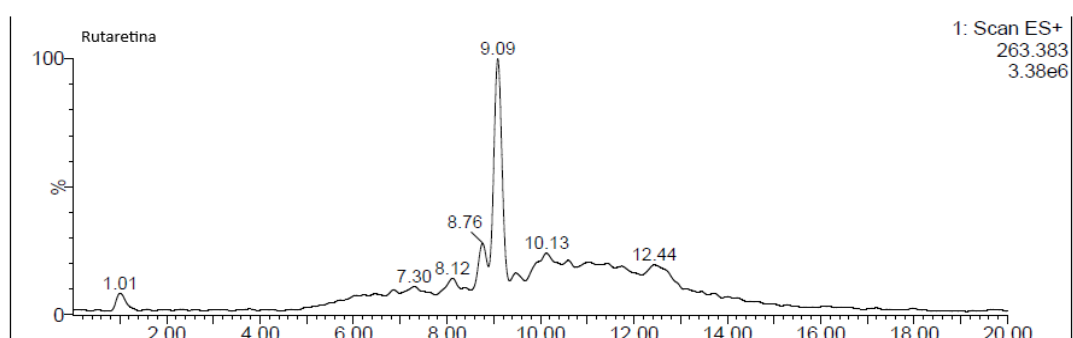
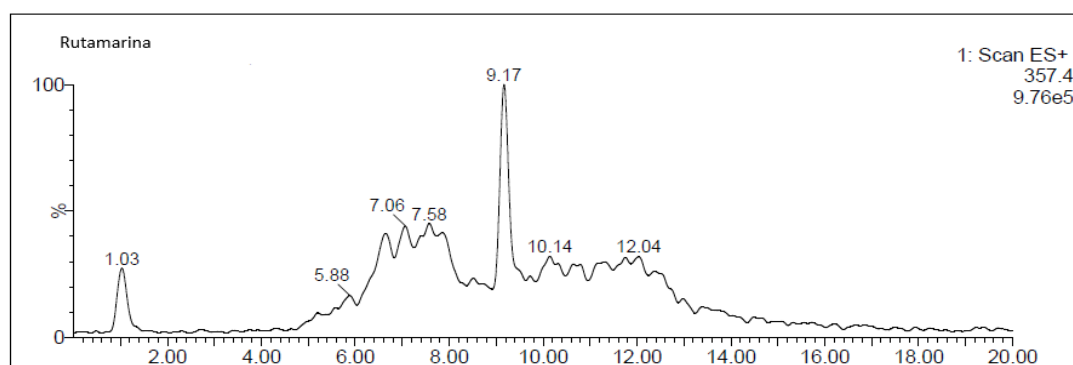


Figura

Cromatogramas obtenido de *Annona* sp. Dihydrocherimolina (14.1 min), bullatacinona (16.2 min), nornucifenina (10.02 min).



Cromatogramas obtenido de *J. curcas*. Vitexin/isovitexin (10.13 min), Hexametil-16-oxatriciclo [11.2.1.01,5] hexadeca-4,6,13-trieno-8,15-diona e isómero (7.71 y 9.01 min), estigmasterol (12.28 min)



Cromatogramas obtenido de *R. chalepensis*. Rutamarina (9.17 min), rutaterina (9.09 min), apigenina 7,4-dimetil éter (11.15 min), graveolina y graveolinina (7.84 y 8.74 min)