

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUÍZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

“EFECTO BIOCIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Lantana camara* (Lantana) SOBRE EL ESTADÍO ADULTO DE *Aedes aegypti* Y TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina* (Camarón salino) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.”

Bach. Baldera Paico, Claudia Janeth.
Bach. Dejo Tovar, Ana María.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL EN
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

APROBADO POR:

Dra. SOCORRO VÁSQUEZ DEL CASTILLO

PRESIDENTE

MSc. CONSUELO ROJAS IDROGO

SECRETARIA

Lic. JULIO CÉSAR SILVA ESTELA

VOCAL

Dra. MARTHA ARMINDA VERGARA ESPINOZA

PATROCINADORA

Lambayeque, Octubre del 2018.

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUÍZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



“Efecto biocida del extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* (Lantana) sobre el estadio adulto de *Aedes aegypti* y toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón salino) en condiciones de laboratorio.”

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología – Microbiología
y Parasitología.

Autores:
Claudia Janeth Baldera Paico.
Ana María Dejo Tovar.

Lambayeque, Perú.

2018

DEDICATORIA

A Dios Padre Celestial, por haberme dado salud, fortaleza y por ser mi guía para lograr y alcanzar un peldaño más en mi vida y permitirme culminar con éxito el esfuerzo de todos estos años de estudio. Para Él nuestro agradecimiento infinito.

A mis padres, Segundo Baldera y Ana Paico; instrumentos de Dios para darnos la vida y a quienes les agradezco el cariño, comprensión, paciencia y apoyo incondicional que me brindaron para culminar satisfactoriamente mi carrera profesional. ¡Son mi vida!

A mi hermano, Marcos, porque siempre he contado con su apoyo, confianza y amistad, le agradezco por ser una de las personas que me inspira a ser mejor persona cada día y me enseña a que siempre debo perseverar para lograr mis metas trazadas en mi vida.

Claudia.

DEDICATORIA

A Dios, por cada paso necesario dado en mi vida personal y profesional, culminando cada etapa con un nuevo aprendizaje, y por permitirme empezar las siguientes con la misma fuerza y empeño.

A mis padres, Mary Tovar Vera y Carlos Dejo Lalopú, por continuar siendo en todo momento mi impulso, y no faltar en ellos palabras de aliento y razón para cada situación compleja en la que me haya encontrado.

A mis hermanos, Carla y Diego, por ser aquellas personas a quienes quiero inspirar a lograr más de lo que yo pueda.

A mi abue, Ana Antonia, por su apoyo y orgullo al inicio de esta etapa, y por el gusto que le habría dado verme culminarla.

A mi compañerito, Braulio, por convertirse en alguien que me incentiva a seguir cumpliendo las metas puestas, y por su gran apoyo incondicional.

Ana María.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por bendecirnos para llegar hasta donde hemos llegado, porque gracias a Él hicimos realidad este sueño anhelado.

A nuestra Asesora Dra. Martha Vergara Espinoza, de manera muy especial quien abrió las puertas para la realización de esta tesis brindándonos su apoyo, su preocupación e interés en nuestro desarrollo profesional y por brindarnos su valioso tiempo.

Al profesional Blgo. Wilmer Carpio Montenegro, por brindarnos las facilidades y colaboración a través del Laboratorio Referencial de Salud – Lambayeque; para realizar la parte experimental de nuestra anhelada tesis.

Al profesor Msc. Jorge Fupuy Chung, por su orientación y atención a nuestras consultas en la parte estadística, brindando todos sus conocimientos para esta tesis.

Nuestro agradecimiento infinito a todas las personas que han formado parte de nuestra vida profesional, a las que les agradecemos su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí con nosotras y otras en nuestros recuerdos y corazón, sin importar en donde estén queremos darles las gracias por formar parte, por todo lo que nos han brindado y por todas sus bendiciones.

Claudia y Ana María.

RESUMEN

OBJETIVOS: Determinar el efecto biocida del extracto etanólico de hojas de *L. camara* (Lantana) sobre el estadio adulto de *Aedes aegypti* y toxicidad sobre *A. salina* (Camarón salino) en condiciones de laboratorio. **MÉTODOS:** Se expuso el extracto etanólico de las hojas de *L. camara* por aspersión sobre el estadio adulto – hembra de una cepa de *A. aegypti* procedente del Distrito de Pucalá, departamento de Lambayeque y sobre la cepa control Rockefeller lo cual permitió determinar el efecto biocida mediante la dosis letal media (DL50). Para la prueba de toxicidad se determinó la dosis letal media (DL50), lo cual permitió asignar al extracto estudiado dentro de una de las categorías de extremadamente tóxico, muy tóxico, moderadamente tóxico y no tóxico de acuerdo al CYTED. **RESULTADOS:** Para el efecto biocida del estadio adulto de *A. aegypti*, tanto de la cepa salvaje Pucalá, como de la cepa control Rockefeller; se observó que a las 24 horas de exposición al extracto etanólico de *L. camara*, los valores de la DL50 fueron 1.7879 mg/mL y 1.2744 mg/mL, para las cepas Pucalá y Rockefeller respectivamente. Para la prueba de toxicidad el valor de la DL50 dio como resultado 1625 ug/mL, este valor es considerado según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) como relativamente inocuo. **CONCLUSIONES:** El extracto etanólico de hojas de *L. camara* presentó un efecto biocida sobre el estadio adulto de *A. aegypti*, siendo más elevado para la cepa patrón Rockefeller con respecto a la cepa salvaje Pucalá. De acuerdo al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), el extracto etanólico de hojas de *L. camara*, no muestra toxicidad frente a *A. salina*.

Palabras clave: Efecto biocida, *A. aegypti*, extracto etanólico, toxicidad, *Artemia salina*.

ABSTRACT

OBJECTIVES: To determine the biocidal effect of the ethanolic extract of leaves of *L. camara* (Lantana) on the adult stage of *Aedes aegypti* and toxicity on *A. salina* (Saline shrimp) under laboratory conditions. **METHODS:** The ethanolic extract of *L. camara* leaves was sprayed on the adult - female stage of an *A. aegypti* strain from the District of Pucalá, department of Lambayeque and on the Rockefeller control strain, which determined the effect biocide by the mean lethal dose (LD50). For the toxicity test, the mean lethal dose (LD50) was determined, which can be assigned to the extract studied within one of the categories of extremely toxic, very toxic, moderately toxic and non-toxic according to CYTED. **RESULTS:** For the biocidal effect of the adult stage of *A. aegypti*, both of the Pucalá wild strain and of the Rockefeller control strain; The LD50 doses were 1.7879 mg / ml and 1.2744 mg / ml, for the Pucalá and Rockefeller strains respectively. For the toxicity test the value of the LD50 resulted in 1625 µg / mL, this value is considered by the Ibero-American Program of Science and Technology for Development (CYTED) as relatively innocuous. **CONCLUSIONS:** The ethanolic leaf extract of *L. camara* presented a biocidal effect on the adult stage of *A. aegypti*, being higher for the Rockefeller stock strain with respect to the Pucalá wild strain. According to the Ibero-American Program of Science and Technology for Development (CYTED), the ethanolic extract of *L. camara* leaves does not show toxicity against *A. salina*.

Key words: Biocidal effect, *A. aegypti*, ethanolic extract, toxicity, *Artemia salina*.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	5
2.1.	Antecedentes epidemiológicos del Dengue	5
2.2.	Antecedentes susceptibilidad y resistencia de <i>Aedes aegypti</i>	7
2.3.	Antecedentes de la actividad de extractos de <i>Lantana camara</i>	8
2.4.	Antecedentes de bioensayos de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	11
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1.	Material Biológico	13
3.2.	Métodos	13
3.2.1.	Población y Muestra	13
3.2.2.	Diseño Experimental	13
3.2.3.	Procedimiento	15
A.	Determinación del efecto biocida del extracto etanólico de hojas de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre el estadio adulto de <i>Aedes aegypti</i>	15
1.	Acondicionamiento del material vegetal para la obtención de los extractos y obtención del extracto etanólico (Método de Maceración. Fernaroli's, 1975)	15
2.	Preparación de solución madre y tratamientos	16
3.	Obtención del estadio adulto de <i>Aedes aegypti</i> (Estrada y Craig, 1985; Nelson, 1986; Consoli y De Oliveira, 1998)	18
4.	Bioensayo (Método de ensayo susceptibilidad o resistencia de los mosquitos adultos a los extractos crudos por el método de aspersión) (Bazán – Calderon, <i>et al</i> , 2011)	20
B.	Determinación de la toxicidad del extracto etanólico de hojas de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre <i>Artemia salina</i> (Camarón salino) en condiciones de laboratorio. Prueba de toxicidad establecido por la CYTED (Fernández, <i>et al.</i>)	21
1.	Reproducción de los cistos de <i>Artemia salina</i> (Camarón salino)	21
2.	Selección e incubación y de los cistos de <i>Artemia salina</i> (Camarón salino)	21
3.	Bioensayo	23

C. Análisis estadístico de datos	24
IV. RESULTADOS	24
A. Efecto biocida del extracto etanólico de hojas de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre el estadio adulto de <i>Aedes aegypti</i>	24
1. Efecto del extracto de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre adultos de <i>Aedes aegypti</i>	24
2. Dosis Letal (DL50) del extracto de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre adultos de <i>Aedes aegypti</i>	26
B. Toxicidad del extracto etanólico de hojas de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre <i>Artemia salina</i> (Camarón salino) en condiciones de laboratorio.	27
1. Efecto del extracto de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre metanauplios de <i>Artemia salina</i> (Camarón salino)	27
2. Dosis letal (DL50) del extracto de <i>Lantana camara</i> (Lantana) sobre metanauplios de <i>Artemia salina</i> (Camarón salino)	28
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

INDICE DE TABLAS

Tabla 01. Dosis de Solución Madre y Agua Destilada correspondiente a los tratamientos según las diferentes concentraciones de extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* en mg/mL sobre adultos de *Aedes aegypti* de la cepa Pucalá y cepa Rockefeller.

Tabla 02. Dosis de Solución Madre y diluyente (Agua de Mar Artificial) correspondiente a los tratamientos según las diferentes concentraciones de extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* en mg/mL sobre metanauplios de *Artemia salina*.

Tabla 03. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de la Cepa Pucalá frente al extracto etanólico de *L. camara*.

Tabla 04. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de la Cepa Rockefeller frente al extracto etanólico de *L. camara*.

Tabla 05. Dosis Letal (DL50) del extracto etanólico de *L. camara* sobre adultos de *A. aegypti*.

Tabla 06. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de metanauplios de *A. salina* frente al extracto etanólico de *L. camara*.

Tabla 07. Dosis Letal (DL50) del extracto de *Lantana camara* sobre metanauplios de *Artemia salina*.

INDICE DE TABLAS - ANEXOS

Tabla 01 – A. Recuento de mortalidad para la Cepa Pucalá y Cepa Rockefeller frente al extracto etanólico de *L. camara*.

Tabla 02 – A. Valores de la prueba de toxicidad establecidos por la CYTED.

Tabla 03 – A. Efecto biocida (%) del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti* a las 24 horas.

Tabla 04 – A. Mortalidad (%) del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre metanauplios de *Artemia salina* a las 24 horas.

INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Diseño de la Investigación Experimental para el Efecto Biocida del extracto etanólico de *Lantana camara* L. sobre *Aedes aegypti*.

Figura 02: Acondicionamiento de material. A) Molienda, B) Obtención de masa seca pulverizada.

Figura 03: Obtención de extracto etanólico de hojas de *L. camara*. A) Filtración, B) Recuperación.

Figura 04: Preparación de solución madre y tratamientos. A) Preparación de los tratamientos, B) Dosis del extracto por tratamiento.

Figura 05: Obtención del estadio adulto de *Aedes aegypti*. A) Colección de Huevos, B) Jaula entomológica.

Figura 06: Bioensayo (Susceptibilidad o Resistencia de los mosquitos adultos a los extractos crudos por el método de Aspersión). A) Método de Aspersión, B) Adultos muertos.

Figura 07: Reproducción de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino). A) Acondicionamiento del ambiente

Figura 08: Incubación y Selección de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino). A) Nauplius Instar II (metanauplios).

Figura 09: Bioensayo de Toxicidad en *Artemia*.

Figura 10: Mortalidad de adultos de *A. aegypti* en las jaulas entomológicas.

INDICE DE FIGURAS - ANEXOS

Figura 01 – A. Planta de *Lantana camara*.

Figura 02 – A. Procedimiento para la obtención del material vegetal.

Figura 03 – A. Procedimiento para la obtención del extracto etanólico por el Método de Maceración Fernaroli's, 1975.

Figura 04 – A. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

Figura 05 – A. Recolección de huevos de *Aedes aegypti*.

Figura 06 – A. Eclosión de *A. aegypti*. Estadíos larvales y posteriores pupas.

Figura 07 – A. Diferenciación de estadíos larvales de zancudos.

Figura 08 – A. Estadíos adultos de *A. aegypti*.

Figura 09 – A. Oviposición de *A. aegypti*,

Figura 10 – A. Jaulas entomológicas.

Figura 11 – A. Jaulas para cada tratamiento del enfrentamiento de *A. aegypti* contra el extracto.

Figura 12 – A. Reproducción de los cistos de *Artemia salina*.

Figura 13 – A. Ciclo biológico de *Artemia salina*.

I. INTRODUCCIÓN

Los problemas que se originan con la utilización de insecticidas químicos, están relacionados con la creciente resistencia de los mosquitos y la contaminación ambiental que generan (MINSA, 2000). En el Perú, una de las principales dificultades en la aplicación de las medidas de control vectorial y de brotes en forma oportuna y eficaz, es la limitación de recursos económicos (EsSalud, 2011). Haciéndose necesario el uso de insecticidas piretroides e insecticidas organofosforados, de acción residual en paredes y sitios de reposo de estos mosquitos. Mostrando así, *Aedes aegypti*, en el norte del Perú, un mecanismo de resistencia a Temephos y Deltametrina (Vargas *et al.*, 2006).

Como una alternativa de control, se da el uso de insecticidas de origen vegetal, por ser accesible y de bajo costo para los campesinos y comunidades, debido a que varias especies vegetales que poseen actividad insecticida reconocida, crecen con facilidad o son endémicas de estas áreas geográficas; y además la obtención de los extractos activos no requiere de metodologías complejas, se pueden preparar mediante tratamientos caseros y ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos costosos; teniendo la ventaja de ser más biodegradables que sus contrapartes sintéticas. Los resultados de investigaciones recientes han mostrado que los insecticidas botánicos son blanco específico, no afectando por lo tanto la fauna benéfica, ya que la resistencia por parte de los insectos tarda más tiempo en desarrollarse cuando se usa una mezcla de ingredientes activos naturales, siendo un factor positivo para su utilización (Arnazon *et al.*, 1997; Parra, 2005; Nathan *et al.*, 2006; Bowers *et al.*, 1976).

El Dengue es una enfermedad viral, transmitida por la picadura de *A. aegypti*, dicha enfermedad ha incrementado su incidencia hasta en 30 veces en los últimos 50 años (OPS/OMS 2009). Este vector comprende diferentes estadios de desarrollo; huevo, larva y pupa (acuáticos) y adulto (aéreo), en las condiciones adecuadas el ciclo se completa de 7 a 13 días, los adultos hembras se alimentan de sangre del huésped, y los adultos machos de agua azucarada o frutas frescas.

En el Perú, se identificaron los cuatro serotipos del virus: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (OPS/OMS 2009). En la Región Lambayeque, la Gerencia Regional de Salud, a través de la Oficina de Epidemiología detalla que actualmente el Dengue es una enfermedad endémica y sigue afectando más distritos.

Debido a la incidencia y tasa de letalidad, la enfermedad del Dengue se ha convertido en un problema de salud pública; existiendo numerosos factores que contribuyen con la circulación del virus y la diseminación del mosquito *A. aegypti*, como son: el aumento de las migraciones, el cambio en las condiciones climáticas, las construcciones no planificadas, las dificultades en el abastecimiento de agua, escasos programas de control del vector, escasez de insecticidas con buena relación costo/efectividad y falta de programas educativos de sanidad (Guía para Manejo Clínico de Dengue - Ministerio Salud Pública de República Dominicana; Organización Panamericana de la Salud, 2002). Para la prevención y control del Dengue, la estrategia global requiere un control vectorial selectivo con la participación intersectorial y comunitaria, que durante epidemias y períodos con un alto riesgo de transmisión, usan insecticidas en el esfuerzo de controlar el mosquito adulto (OMS, Reiter y Nathan, 2001).

Lantana camara L. (Lantana) ocupa vastas extensiones de tierra en el planeta, es de fácil acceso, y presenta propiedades medicinales, así como plaguicidas (Alfonso, 1988; Sharma y Dawra, 1987). En las hojas de *L. camara*., se localiza la mayor cantidad de sustancias activas presentes en la planta, teniendo efectos tóxicos, así como propiedades insecticidas, motivos por los que son utilizadas para la preparación de los extractos crudos (Gundidza 1993; Sharma *et al.*, 2000). La composición química de los extractos de *L. camara* incluye mezclas policomponentes de metabolitos secundarios de tipo monoterpenos y sesquiterpenos, atribuyéndose a ellos la acción insecticida (Barre y Bruce, 1997).

Diferentes investigadores evaluaron el efecto larvicida de *L. camara* en *A. aegypti*, Pérez, A. (2016), demostró el efecto en larvas instar III usando

extracto etanólico de hojas de *L. camara*; Sathisk y Maneemegalai. (2008), trabajaron en larvas instar III y IV con extractos metanólico y etanólico de flores y hojas de *L. camara*. Dua *et al.* (2010), realizaron estudios donde obtuvieron que el aceite esencial de las hojas de *L. camara* posee una actividad adulticida contra *A. aegypti*. Otras investigaciones han demostrado que las hojas de *L. camara* tienen una elevada actividad repelente como extracto etanol, éter, acetona y acetona-éter contra los huevos, ninfas y adultos de *Trialeurodes vaporariorum* (Vinasco *et al.*, 2015); como extracto crudo contra los huevos, larvas, pupas y adultos de *Phthorimaea operculella* (Lannacone y Lamas, 2003); o como aceite esencial contra los adultos de *Callosobruchus maculatus* (Zandy - Sohani *et al.*, 2013). A pesar de estos bioensayos no se ha evaluado el efecto biocida del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti*.

Artemia salina (Camarón salino) es un crustáceo pequeño de aguas salobres presenta dos tipos de reproducción: sexual y partenogenética; es un organismo de prueba en bioensayos generales para evaluar la actividad biológica de sustancias vegetales (Meyer *et al.*, 1982); basándose en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (Kanegusuku *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2001). Se consideró que si una determinada sustancia en una cierta concentración produce efectos farmacológicos y que esa misma sustancia en concentraciones más elevadas produce efectos tóxicos, entonces la toxicidad, medida como la mortalidad producida a un organismo simple, como *A. salina*, puede ser utilizada como criterio para la detección y evaluación de actividad biológica en extractos vegetales y su separación o fraccionamiento y purificación (McLaughlin *et al.*, 1998).

A. salina es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimento para peces y crustáceos en acuicultura (Artoxkit en Mayorga, 2001). Sobresaliendo la viabilidad de los quistes por varios años y la sensibilidad de los nauplios a distintas sustancias tóxicas.

Es útil en ensayos biológicos para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, por responder a un amplio rango de compuestos química y farmacológicamente diversos; con las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo, por no requerirse técnicas asépticas; y empleándose pequeñas cantidades de muestra (2-20mg o menos) (Artoxkit en Mayorga, 2001).

Ensayos han demostrado que *A. salina* es útil para evaluar la toxicidad aguda de compuestos bioactivos de extractos de plantas como nuevos productos naturales, clasificando las sustancias de acuerdo con su peligrosidad siguiendo los estándares proporcionados por la CYTED (Pacheco, 2011), los mismos que se basan en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (Kanegusuku *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2001).

En un estudio realizado con *A. salina* se evaluó la actividad tóxica *in vitro* de los extractos etanólicos de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw, encontrándose valores de CL50 de 181.4 ug/ml y 221.30 ug/ml, respectivamente, clasificándose como Moderadamente tóxico (100 – 500 ug/ml) según el CYTED (Sánchez y Neira, 2005). En otros estudios, Ponce *et al.*(2007), determinaron que el extracto de alcaloides de *Coronopus dydimus* presenta una CE50 igual a 733.69 ppm, clasificándolo como Moderadamente tóxico; Fernández-Calienes *et al.* (2009), evaluaron la toxicidad de extractos de 34 plantas cubanas en *A. salina*, expuestas a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 ug/ml por 24 horas, de los cuales sólo 5 extractos (*Artemisia absinthium*, *Luffa cylindrica*, *Melia azedarach*, *Melaleuca leucadendron* y *Simarouba glauca*) resultaron extremadamente tóxicos, 13 moderadamente tóxicos, mientras que 17 extractos (48,5 %) se clasificaron como no tóxicos al exhibir valores de CL50 superiores a 1 000 µg/mL.

Frente a esta situación se planteó si el extracto etanólico de hojas de *L. camara* tiene efecto biocida sobre el estadio adulto de *A. aegypti* y si posee

toxicidad sobre *A. salina* en condiciones de laboratorio; considerando que dicho extracto posee efecto biocida y es de baja toxicidad, se ejecutó el presente estudio cuyo objetivo es determinar el efecto biocida del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti* y toxicidad sobre *A. salina* en condiciones de laboratorio

II. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes epidemiológicos del Dengue.

El Dengue es transmitido por la picadura de *A. aegypti* que es el mosquito de más rápida propagación en el mundo. En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas rurales a urbanas. Anualmente ocurre un estimado de 50 millones de infecciones por Dengue y aproximadamente 2,5 mil millones de personas viven en países con Dengue endémico. De 2001 a 2007, más de 30 países de las Américas notificaron un total de 4' 332.731 casos de Dengue. El número de casos de fiebre hemorrágica por Dengue (FHD) en el mismo período fue de 106.037. El número total de muertes por Dengue de 2001 a 2007 fue de 1.299, con una tasa de letalidad por la forma hemorrágica de 1,2%. En Perú, se identificaron simultáneamente los cuatro serotipos del virus del Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) en un año durante este período (OMS y TDR, 2009).

La Gerencia Regional de Salud Lambayeque a través de la Oficina de Epidemiología detalla que en la Región actualmente el Dengue es una enfermedad endémica y sigue afectando más distritos. En el año 2011, 18 distritos reportaron la presencia del vector con índices aédicos que oscilaron entre 1.0 y 12.50%. Del año 2001 al 2011 han circulado los serotipos del virus Dengue: D1, D2, D3 y D4. El Año 2011 la GERESA Lambayeque, recibió la notificación de un total de 315 casos probables (314 sin señales de Alarma y 01 con señales de Alarma), de ellos 176 fueron autóctonos de la Región (10 casos confirmados y 166 casos

descartados). Los casos confirmados procedieron de los distritos de Motupe: 01, Pomalca: 01 y Pacora: 08 (Chávez y Dávila, 2013).

Los casos presentados en el año 2011 han sido considerablemente menores a los años anteriores, siendo 28.6 veces menor al año 2010. En el año 2012, se recibió la notificación de 04 casos probables de Dengue sin señales de Alarma de la Región Lambayeque. El acumulado a la fecha es de 1 621 casos notificados, de los cuales 1460 son de la Región Lambayeque (594 confirmados por nexo epidemiológico). De los 1460 casos autóctonos, se tiene 831 casos confirmados (237 confirmados por LARESA y 594 por nexo Epidemiológico), 369 descartados y 259 quedan aún como probables (Chávez y Dávila, 2013).

En el año 2015, la Dirección General de Epidemiología, reportó 10 129 casos de Dengue, con una incidencia nacional de 0,33 por 1 000 habitantes. Siendo 17 regiones con casos confirmados de Dengue. Lambayeque es la tercera región de la costa norte del país con mayor cantidad de casos, después de Piura y Tumbes. Según la Dirección General de Epidemiología – Lima (2015), en Lambayeque se reportaron 303 casos, de los cuales 232 fueron casos confirmados de Dengue. Son 20/38 los distritos infestados por *A. aegypti*, el distrito con mayor índice aédico fue Pátapo (4.7 %); seguido de Jayanca (4.5 %), Motupe (2.7%) y Pucallá (1.3%).

Algunos de los factores relacionados con la diseminación del mosquito *A. aegypti*, que contribuyen con la circulación del virus son: el aumento de las migraciones, el cambio en las condiciones climáticas, las construcciones no planificadas, las dificultades en el abastecimiento de agua, escasos programas de control del vector, escasez de insecticidas con buena relación costo/efectividad y falta de programas educativos de sanidad (Organización Panamericana de la Salud, 2002). Dada la tasa de letalidad y la incidencia acumulada o número de casos que se reportan cada año, el Dengue se ha convertido en un problema de salud pública

(Guía para Manejo Clínico de Dengue - Ministerio Salud Pública de República Dominicana).

2.2. Antecedentes susceptibilidad y resistencia de *Aedes aegypti*.

La estrategia global para la prevención y control del Dengue requiere un control vectorial selectivo, integrado a la participación intersectorial y comunitaria. Durante las epidemias y períodos con un alto riesgo de transmisión, las autoridades locales usan frecuentemente el rociado espacial de insecticidas en el esfuerzo de controlar el mosquito adulto (OMS, Reiter y Nathan, 2001). En el Perú, una de las principales dificultades en la aplicación de las medidas de control vectorial y de brotes en forma oportuna y eficaz, es la limitación de recursos económicos (EsSalud, 2011). Corrientemente se utilizan insecticidas piretroides e insecticidas organofosforados de acción residual en paredes y sitios de reposo de estos mosquitos (principalmente Temefos). Los problemas de la aplicación de estos insecticidas químicos de carácter comercial están relacionados con la creciente resistencia que ocasionan en los mosquitos y también por la contaminación ambiental que generan (MINSA, 2000).

Mediante bioensayos con una cepa de *A. aegypti* procedente del municipio de Soyapango, departamento de San Salvador, (El Salvador), se determinó que las larvas de *A. aegypti* mostraron una alta resistencia al Temefos ($FR_{50} = 24,16$), y que la enzima esterasa A4 estaba vinculada al mecanismo de resistencia al Temefos. Los mosquitos adultos de *A. aegypti* resultaron susceptibles a la Lambdacialotrina y al Clorpirifós y su resistencia a la Deltametrina y la Cipermetrina quedó en la categoría de verificación. Se estableció el mecanismo de resistencia al Temefos mediante el empleo de sustancias sinergistas, ensayos bioquímicos de actividad enzimática y zimogramas en gel de poliacrilamida (Bisset – Lazcano *et al.*, 2009).

Se determinaron los niveles de resistencia a Temephos y Deltametrina en cinco poblaciones naturales de *A. aegypti* del norte del Perú: La Esperanza, El Porvenir y Florencia de Mora en Trujillo, Sullana y

Tambogrande en Piura. Se reportó que las poblaciones de *A. aegypti* de Sullana y Tambogrande presentaron factores de resistencia (FR) a Temephos de 6,84 con un KDT50 = 160,42 minutos y 70% de mortalidad a las 24 horas, en tanto en la población de Tambogrande se observó un FR de 5.60; kdt 50 = 107,20 y un 80% de mortalidad, a diferencia de las cepas de La Esperanza, El Provenir y Florencia de Mora (Trujillo) que fueron susceptibles (Vargas *et al.*, 2006).

2.3. Antecedentes de la actividad de extractos de *Lantana camara*.

El concepto de manejo integrado de plagas, incluyendo controladores biológicos, manejo ambiental y utilización de insecticidas de origen vegetal, proporcionan modos de acción novedosos y reducen el riesgo de resistencia cruzada. Se hace necesario evaluar insecticidas vegetales que presenten la ventaja de ser opciones de bajo riesgo para el ser humano, efectivos en el control de mosquitos e inocuos para el ambiente. Las propiedades antes señaladas que se logran con los insecticidas de productos naturales, además de su bajo costo, posibilitarían un amplio uso en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (OMS, 1988; Gomero, 2002).

El uso de insecticidas de origen vegetal es una alternativa de control accesible y de bajo costo para los campesinos y comunidades, ya que los extractos se pueden preparar mediante tratamientos caseros y ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos costosos, debido a que varias especies vegetales que poseen actividad insecticida reconocida, crecen con facilidad o son endémicas de estas áreas geográficas, además la obtención de los extractos activos no requiere de metodologías complejas y tienen la ventaja de ser más biodegradables que sus contrapartes sintéticas. Investigaciones han demostrado que la resistencia por parte de los insectos tarda más tiempo en desarrollarse cuando se usa una mezcla de ingredientes activos naturales por presentar blancos específicos y no afectar la fauna benéfica (Arnazon *et al.*, 1997; Parra, 2005; Nathan *et al.*, 2006; Bowers *et al.*, 1976).

L. camara perteneciente a la familia de las Verbenáceas, es un arbusto considerado como maleza y también ha sido utilizada como planta ornamental en diferentes países (Alfonso, 1988; Sharma y Dawra, 1987). Se estudió el efecto insecticida de *L. camara*, reportando actividades repelentes de extractos de sus flores contra mosquitos del género *Aedes* (Diptera: Culicidae). Además, se han detectado propiedades antimaláricas en extractos de sus raíces. Varios autores han revisado los efectos foliares tóxicos de *L. camara*, entre ellos sus propiedades insecticidas (Sharma *et al.*, 2000). Las hojas de “Lantana” son utilizadas para la preparación de los extractos crudos, ya que sus sustancias activas se encuentran mayormente a nivel foliar (Gundidza 1993; Sharma *et al.*, 2000).

Investigaciones de las especies del género *Lantana* han establecido la presencia de terpenoides, fenilpropanoides y flavonoides, como los principales componentes con actividades biológicas relevantes. *L. camara* presenta mezclas policomponentes de metabolitos secundarios de tipo monoterpenos y sesquiterpenos, a los cuales se les atribuye la acción insecticida; entre los componentes biológicamente activos destacan δ -limoneno, α -terpinol, α -mirceno y linalool, un análisis ha demostrado que los componentes mayoritarios detectados son β -cariofileno y acetato de geraniol, otros componentes que se identificaron fueron el acetato de terpeniol, acetato de bornilo, limoneno, citral, α -felandreno, linaton, lineol, eugenol y felandronafurfural y *p*-cimeno; en sus hojas y partes aéreas están presentes triterpenoides y terpenoides (Pérez, 2016). Siendo las concentraciones de estas, diferentes entre países e incluso zona de recolección de un mismo país, así como en las variedades de ciertas regiones (Inga, 2016).

De los compuestos encontrados, estudios demuestran que el β -cariofileno mostró su potencial para interrumpir el funcionamiento nervioso y por lo tanto puede ser el compuesto bioactivo en el extracto (Unnithan, 2015). Así mismo el β -cariofileno y el linalool son inhibidores de la acetilcolina,

quedando la enzima bloqueada e inactiva, de esta manera las concentraciones sinápticas de la acetilcolina aumentan y ocurre una hiperexcitación del sistema nervioso central paralizando la transmisión nerviosa reportándose hiperactividad, convulsiones, temblores, seguido por parálisis, pérdida de la locomoción e incluso la muerte (Pérez, 2016).

Se realizaron estudios donde obtuvieron que el aceite esencial de las hojas de *L. camara* presentó una actividad adulticida contra los mosquitos vectores *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *A. culicifacies*, *A. fluvialitis* y *A. stephensi*; demostrando que DL50 del aceite fueron 0.06, 0.05, 0.05, 0.05 y 0.06 mg/cm², mientras que los valores LD90 fueron 0.10, 0.10, 0.09, 0.09 y 0.10 mg/cm² contra el *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *A. culicifacies*, *A. fluvialitis* y *A. stephensi*, respectivamente; la persistencia de la actividad adulticida del aceite esencial de *L. camara* contra *A. aegypti* en papeles almacenados a 4° C y a 26 ± 2°C, la mortalidad fue del 84.4 % y 46.4 % en la semana tres respectivamente; mostrando más actividad adulticida los papeles almacenados a 4° C (Duat *et al*, 2010).

El efecto larvicida que presenta el extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre larvas instar III de *A. aegypti* a partir de las concentraciones de 1.5 mg/ml y 2.0 mg/ml, causó la mortalidad del 100% de la población estudiada, la primera concentración a las 54 horas y la segunda a las 42 horas. El resultado Probit permitió determinar las concentraciones letales, la concentración letal media (CL50) y concentración letal (CL90) fue de 0.52 mg/ml y 1.00 mg/ml respectivamente. (Pérez, 2016). La actividad larvicida del extracto metanólico y etanólico de flores y hojas de *L. camara* sobre larvas instar III y IV de *A. aegypti*, a partir de las concentraciones 0.75 y 1.00 mg/ml del extracto etanólico de flores, causó la mortalidad del 100% de la población estudiada; mientras que el extracto etanólico de hojas en la concentración 1.00 mg/ml mostró un porcentaje de mortalidad de 85% y 84% en larvas instar III y IV respectivamente; el extracto metanólico de hojas y flores mostro un porcentaje inferior del 50% de mortalidad para ambas larvas Instar III y IV (Sathisk M & Maneemegalai S, 2008).

En la determinación de la actividad insecticida de los seis extractos etanólicos sobre los adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en condiciones de laboratorio, a concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 ppm para cada extracto. El extracto de lantana ocasionó una mortalidad de 50,3 % a las 24 horas (Romero, 2015). El efecto insecticida que presenta *L. camara* sobre huevos, ninfas y adultos de *Trialeurodes vaporariorum* a partir de la extracción con los disolventes etanol, éter, acetona y acetona-éter en concentraciones del 100, 75, 50 y 25%, el extracto etanólico ocasionó una mortalidad superior al 94% en ninfas mientras que en el extracto acetónico produjo una mortalidad de 33%, mientras que en adultos, los extractos acetónicos-etéricos de *L. camara* ocasionaron mortalidad superior al 80% (Vinasco *et al.*, 2015). La actividad insecticida del extracto botánico de *L. camara* sobre huevos, larvas, pupas y adultos de *Phthorimaea operculella*, mostró que los extractos acuosos tienen efectividad en el control larvario de 80% y una emergencia de pupas de 85% de F₁ (Iannacone y Lamas, 2003).

2.4. Antecedentes de bioensayos de toxicidad en *Artemia salina*.

Artemia salina es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimento para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos, es también útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, responde a un amplio rango de compuestos químicos y farmacológicamente diversos. El ensayo con *Artemia spp.* tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se puede utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos) (Artoxkit en Mayorga, 2001).

Se propuso el uso de larvas de *Artemia salina* como organismo de prueba en un bioensayo general para evaluar la actividad biológica de sustancias

vegetales (Meyer *et al.*, 1982); basándose en la premisa de que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad en un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (Kanegusuku *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2001). Se consideró que, si una determinada sustancia en cierta concentración produce efectos farmacológicos y que esa misma sustancia en concentraciones más elevadas produce efectos tóxicos, entonces la toxicidad, medida como la mortalidad producida a un organismo simple, como *A. salina*, puede ser utilizada como criterio para la detección y evaluación de actividad biológica en extractos vegetales y su separación o fraccionamiento y purificación (McLaughlin *et al.*, 1998).

Se evaluó la letalidad a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw, mediante el bioensayo en *Artemia salina*; donde la CL50, concentración que inhibe el 50% de la población, mostró valores de 181. 4 y 221.30 ug/ml respectivamente, considerándose como moderadamente tóxico (Sánchez y Neira, 2005). En otro estudio para determinar la toxicidad y la bioactividad de alcaloides totales extraídos de *Coronopus dydimus* (L.), la bioactividad se realizó con *Artemia salina* consiguiendo una DL50 de 773,69 ppm (Ponce *et al.* 2007).

En el ensayo para la evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria, las larvas de *Artemia salina* L. fueron expuestas a 4 concentraciones de los 35 extractos etanólicos, determinándose la concentración letal media (CL50), asignándose del total de extractos evaluados solo a 5 (*Artemisia absinthium*, *Luffa cylindrica*, *Melia azedarach*, *Melaleuca leucadendron* y *Simarouba glauca*) como extremadamente tóxicos o muy tóxicos, 13 moderadamente tóxicos, y 17 extractos (48,5 %) se clasificaron como no tóxicos por exhibir valores de CL50 superiores a 1 000 µg/mL (Fernández-Calienes *et al.*, 2009).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material Biológico

- Hojas de *Lantana camara* (lantana) colectadas de plantas de los jardines de la UNPRG.
- *Aedes aegypti*, en estadio adulto colectado del Distrito de Pucalá.
- *Aedes aegypti* en estadio adulto, grupo patrón “Rockefeller”.
- Cistos de *Artemia salina* “Camarón salino” certificados obtenidos comercialmente.

3.2. Métodos

3.2.1. Población y Muestra

La población en estudio para determinar el efecto biocida estuvo constituida por el estadio adulto de *Aedes aegypti* procedentes del Distrito de Pucalá.

La muestra fue 100, resultado de la interacción de los factores: concentraciones del extracto etanólico (5), y estadio adulto de *Aedes aegypti* (20). Incluyendo las repeticiones (3) se obtuvieron 300 unidades experimentales. El experimento contó con la cepa patrón Rockefeller, control, siguiendo el mismo procedimiento anterior con 300 unidades experimentales.

La población para evaluar la toxicidad de *Lantana camara*, fue *Artemia salina* (camarón salino).

La muestra fue 50, resultado de la interacción de los factores: concentraciones del extracto etanólico (5), cistos de *Artemia salina* (10). Incluyendo las repeticiones (3) se obtuvieron 150 unidades experimentales.

3.2.2. Diseño Experimental

El presente estudio es de tipo experimental y se utilizò el diseño de estímulo creciente (Goode y Hatt, 1986 en Alvitres, 2000). Para la determinación del efecto biocida, la Variable Independiente estuvo constituida por la dosis del extracto etanólico de hojas de *L. camara*, y la Variable Dependiente fue la respuesta motora de adultos de *A. aegypti*. Para la prueba de toxicidad la Variable Independiente estuvo constituida

por la dosis del extracto etanólico de hojas de *L. camara*, y la variable Dependiente fue la mortalidad de los nauplios de *Artemia salina* (Figura 01).

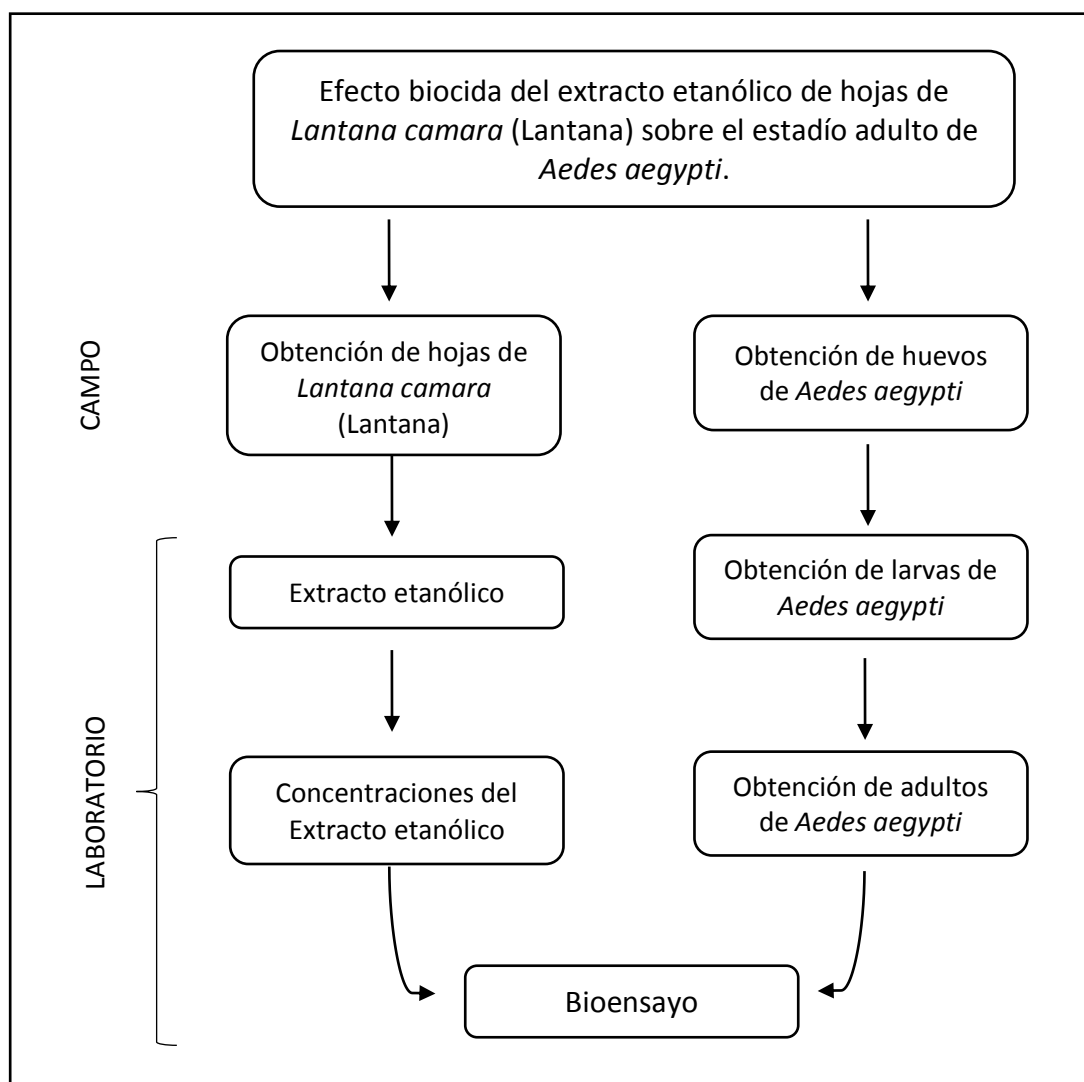


Figura 01: Diseño de la Investigación Experimental para el Efecto Biocida del extracto etanólico de *Lantana camara* L. sobre *Aedes aegypti*.

3.2.3. Procedimiento

A. DETERMINACIÓN DEL EFECTO BIOCIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Lantana camara* (LANTANA) SOBRE EL ESTADÍO ADULTO DE *Aedes aegypti*.

1. Acondicionamiento del material vegetal para la obtención del extracto y obtención del extracto etanólico (Método de Maceración. Fernarolí's, 1975)

- El material vegetal constituido por hojas de *L. camara* (Lantana) (Ver Anexo 01), fue sometido a desecado con temperatura ambiente bajo sombra y posteriormente llevado a molienda, triturándolo en un mortero estéril hasta obtener la masa seca pulverizada (Fig. 02 A y B).



Figura 02: Acondicionamiento de material. A) Molienda, B) Obtención de masa seca pulverizada.

- Se pesó 50 gr. de masa seca pulverizada, se procedió a la maceración utilizando el triple de volumen del solvente extracto etanol 96%, por tres veces consecutivas durante 72 horas. (Ver Anexo 03)

- Se reunieron las fracciones de extracción, se filtraron y colocaron en placas de Petri a temperatura ambiente para su evaporación. El extracto concentrado fue recuperado con una espátula pequeña y etanol. Posteriormente, se colocó en viales de peso conocido y previamente rotulados (Fig. 03 A y B).

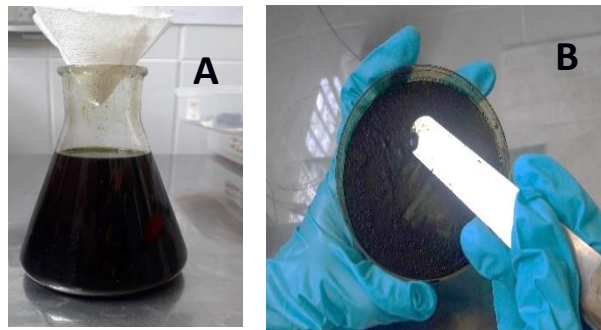


Figura 03: Obtención de extracto etanólico de hojas de *L. camara*. A) Filtración, B) Recuperación.

2. Preparación de solución madre y tratamientos

- Se preparó una solución madre utilizando como solvente etanol.
- Se determinó con cálculos previos, que 1000 mg. de extracto disuelto en 100 mL de etanol que constituye un volumen suficiente para atender el total de aplicaciones para adultos y tratamientos.

$$\begin{array}{lcl} 1 \text{ mg} & \rightarrow & 1000 \text{ mL} \rightarrow 1 \text{ ppm} \\ 1000 \text{ mg} & \rightarrow & 100 \text{ mL} \rightarrow X \end{array}$$

$$\text{Dónde: } x = 10\,000 \text{ ppm}$$

- Para el cálculo de la cantidad de volumen de solución madre en cada concentración se aplicó la fórmula.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde, para el caso del tratamiento T1 se tuvo:

$$10\,000 \text{ ppm} \times V1 = 50.81 \text{ ppm} \times 40 \text{ mL}$$

$$V1 = 0.203 \text{ mL}$$

Para obtener el T1 (0, 05081 mg/mL) se mezcló 0.203 ml de solución madre más 39.797 mL de Agua Destilada. De igual forma se procedió en los siguientes tratamientos. (Tabla N° 01).

Tabla 01. Dosis de Solución Madre y Agua Destilada correspondiente a los tratamientos según las diferentes concentraciones de extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* en mg/mL sobre adultos de *Aedes aegypti* de la cepa Pucalá y cepa Rockefeller.

Tratamiento	Sol. Madre (mL) (Extracto/ Etanol)	Agua Destilada (mL)	Total (mL)	Concentración del extracto (mg/ mL)
T ₁	0.203	39.797	40	0.05081
T ₂	8.203	31.797	40	2.05081
T ₃	16.203	23.797	40	4.05081
T ₄	24.203	15.797	40	6.05081
T ₅	32.203	7.797	40	8.05081

- Cabe destacar que se preparó un volumen total de 40 mL para cada concentración la cual se repitió a razón de 6 mL por jaula con sus respectivas repeticiones, así como para cada tipo de *A. aegypti* cepa Pucalá y Rockefeller. (Fig, 04 A y B)

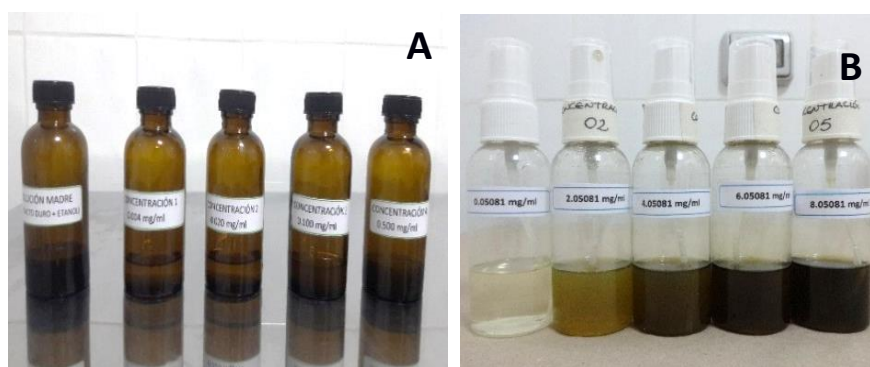


Figura 04: Preparación de solución madre y tratamientos. A) Preparación de los tratamientos, B) Dosis del extracto por tratamiento.

3. Obtención del estadio adulto de *Aedes aegypti* (Estrada y Craig, 1985; Nelson, 1986; Consoli y De Oliveira, 1998)

- Se colectaron huevos de *Aedes aegypti* del distrito de Pucalá. (Lambayeque), en criaderos domiciliarios y peridomiciliarios, considerando diversos depósitos como tanques, cántaros, llantas, floreros, entre otros, conteniendo agua retenida.
- En el laboratorio, después de su identificación, se colocaron los huevos bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (75 y 80% HR y 23 y 26 °C) en bandejas de plástico y se alimentaron cada 24 horas con 1.5 g de purina pulverizada (Ver Anexo 05).
- Se dejaron eclosionar (Ver Anexo 06) para después confirmar la identificación de las larvas en el laboratorio con ayuda del estereoscopio, buscando las estructuras que permitan asegurar el género como la forma del sifón y la disposición de las escamas del peine, de esta forma se diferenció a *A. aegypti* de géneros como *Culex* o *Anopheles*. (Ver Anexo 07)
- Los estadios de pupa obtenidos después de larva, presentaron un aspecto de coma (Ver Anexo 06). Se llevaron a recipientes plásticos los que se colocaron dentro de una jaula entomológica de material metálico de 50 x 40 x 80 cm, de largo, ancho y altura, respectivamente (Ver Anexo 10), proporcionadas por el Área de Zoonosis del Laboratorio Referencial de Salud de Lambayeque, donde la emergencia a la fase adulta se dio entre las 24 – 72 horas.
- La fase adulta, se caracterizó por el color con aspecto mosaico en las patas, además de poseer cabeza, tórax y abdomen; en la parte dorsal del tórax presentó la “lira” y en la parte lateral del abdomen las manchas plateadas (Ver Anexo 08). Una vez obtenidos los adultos hembra, por ser hematófago, fue alimentada con sangre de animal, obtenida de *Cavia porcellus* al colocarlo por encima de la jaula por un tiempo considerable, mientras que el macho fue alimentado con una solución sobresaturada de azúcar

en agua destilada embebida en algodón y renovada interdiariamente, el macho se diferenci6 de la hembra por poseer antenas plumosas m6s notorias y visible (Ver Anexo 08).

- Para la oviposici6n, se coloc6 dentro de la jaula tres ovitrampas de material pl6stico descartable con papel kraft en su interior, llenos con agua hasta aproximadamente un tercio de su capacidad. Cuando se observ6 una cantidad considerable de huevos impregnados en el papel, fue reemplazado para la siguiente ovipostura (Ver Anexo 09).
- Se recolectaron los huevos y fueron mantenidos a temperatura ambiente en cajas de tecnopor selladas y rotuladas correctamente. Luego fueron expuestos en una bandeja con agua para su eclosi6n, y se repiti6 el proceso hasta obtener el n6mero de muestra de adultos necesario para el bioensayo (Fig. 05 A y B)
- El grupo patr6n de adultos de *A. aegypti*, denominadas con el nombre de Rockefeller, fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS) a trav6s del Laboratorio Referencial de Salud de Lambayeque (LARESA), las mismas que presentan una sensibilidad confirmada a determinadas concentraciones del producto qu6mico denominado Malation (Organofosforados).

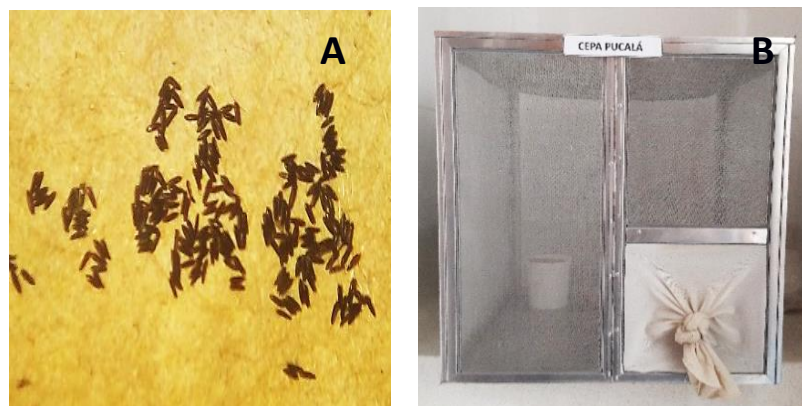


Figura 05: Obtenci6n del estadio adulto de *Aedes aegypti*. A) Colecci6n de Huevos, B) Jaula entomol6gica.

4. Bioensayo para determinar la Susceptibilidad o Resistencia de los mosquitos adultos a los extractos crudos por el método de Aspersión. (Bazán – Calderon, *et al*, 2011)

- Se seleccionó los adultos hembra de *Aedes aegypti* de la cepa salvaje (Cepa Pucalá) obtenida en el laboratorio, luego fueron pasados a una jaula entomológica de 20 cm x 20 cm, con un pasador de 10 cm de diámetro para adultos hembra de *Aedes aegypti*, alimentadas con una hora de anterioridad para evitar la mortalidad antes del enfrentamiento (Ver Anexo 10).
- Se utilizaron 20 individuos por jaula, la que se instaló en el laboratorio a un metro de altura del suelo, aplicándose la aspersión en horas de la mañana. Cada tratamiento se repitió tres veces, contando con un control cada repetición (Fig. 06 A) (Ver Anexo 11).
- La duración de las aspersiones fue de 30 segundos y los recuentos de mortalidad se realizaron a las 1, 3, 6, 9 y 24 horas, después de aplicado el tratamiento. (Ver Anexo 14)
- Se consideraron adultos muertos aquellos que no reaccionaron al ser tocados en la región cefálica con un puntero de punta roma o estaban muribundos (Fig. 06 B).
- El mismo procedimiento se siguió para la cepa patrón Rockefeller.



Figura 06: Bioensayo (Susceptibilidad o Resistencia de los mosquitos adultos a los extractos crudos por el método de Aspersión). A) Método de Aspersión, B) Adultos muertos.

B. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Lantana camara* (LANTANA) SOBRE *Artemia salina* (CAMARÓN SALINO) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

1. Reproducción de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino).

- Se incubaron aproximadamente 500 mg de cistos de *Artemia salina* (Ver Anexo 12) MACKAY MARINE certificados, en 1 L de agua de mar artificial, en un recipiente plástico con capacidad de 1L, con oxigenación. Se expuso los cistos por 24 horas a una fuente luminosa de 1000 - 4000 lux, para su reproducción (25°C) y posterior eclosión (Fig 07 A).



Figura 07: Reproducción de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino).

A) Acondicionamiento del ambiente.

2. Selección e incubación de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino).

- Se transfirieron los nauplios (organismos recién nacidos) individualmente, con una pipeta Pasteur, a otra placa Petri con medio fresco (Ver Anexo 13). Para facilitar la transferencia de los nauplios, se colocó una fuente luminosa al extremo de la placa Petri para atraerlas, ya que éstas son fototácticas. Se observó el estado de las larvas, que estén móviles y nadando. Se eliminaron las muertas o defectuosas.

- Se incubaron por 24 – 48 horas más en oscuridad y a 25 °C, hasta que los nauplios alcancen el estado de metanauplios (instar II). Al cabo de las 48 horas estuvieron listas para ser utilizadas como organismos de ensayo. De los cuales se seleccionaron 240 metanauplios. (Fig. 08 A)
- Las placas, réplicas y los controles estuvieron debidamente rotulados.

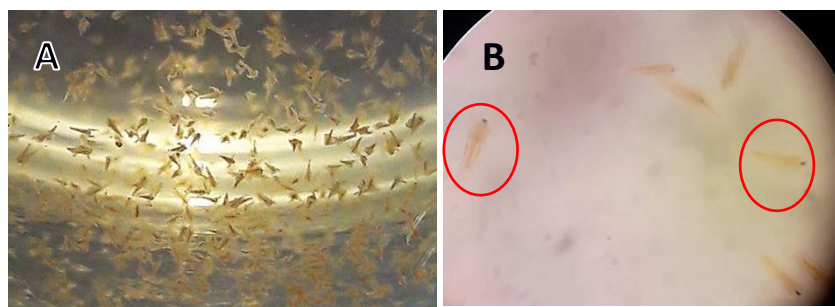


Figura 08: Selección e incubación de los cistos de *Artemia salina* (camarón salino). A) Nauplius Instar II (metanauplios) recién eclosionados. B) Nauplius Instar II (metanauplios) vistos al estereoscopio.

3. Bioensayo para la determinación de toxicidad, establecido por la CYTED (Fernandez *et al.*)

- Para la realización del bioensayo se expusieron metanauplius de *Artemia salina* a las concentraciones 0.05081; 0.45081; 0.85081; 1.25081 y 1.65081 mg/mL del extracto de hojas de *L. camara* alcanzando su equivalencia con los valores de la prueba de toxicidad establecidos por la CYTED. (Ver Anexo 15)
- A partir de la solución madre se realizaron las diluciones con Agua de Mar Artificial obteniéndose las diferentes concentraciones. (Tabla 02)
- Se realizarán tres tipos de controles, dos blancos, uno con agua de mar artificial y otro con agua destilada, y un control positivo con Etanol. (Fig. 09)

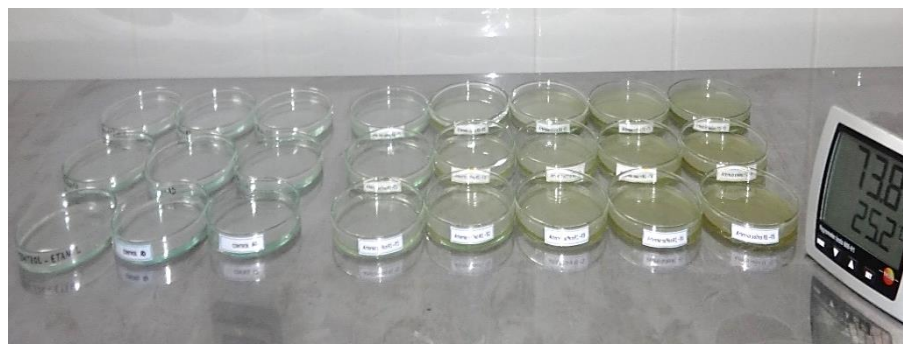


Figura 09: Bioensayo de Toxicidad en *Artemia*.

Tabla 02. Dosis de Solución Madre y diluyente (Agua de Mar Artificial) correspondiente a los tratamientos según las diferentes concentraciones de extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* en mg/mL sobre metanauplios de *Artemia salina*.

Tratamiento	Sol. Madre (mL) (Extracto/ Etanol)	Agua De Mar Artificial (mL)	Total (mL)	Concentración del extracto (mg/ mL)	Equivalencias (ug/mL)
T ₁	0.152	29.848	30	0.05081	50.81
T ₂	1.352	28.648	30	0.45081	450.81
T ₃	2.552	27.448	30	0.85081	850.81
T ₄	3.725	26.275	30	1.25081	1250.81
T ₅	4.952	25.048	30	1.65081	1650.81

- Las placas estuvieron marcadas del 1 al 5 y las réplicas como R1T1, R1T2 y R1T3, R2T1, R2T2...etc. Los controles estuvieron rotulados por las iniciales de lo que contenían.
- Con una pipeta Pasteur se colocaron 10 metanauplios sobre cada 10ml de concentración. Se incubaron por 24 horas a 25°C, en oscuridad. Este ensayo se hizo por triplicado para un mejor análisis de los resultados.

- Al cabo de 24 horas de contacto con las sustancias se evaluó el nivel de mortalidad. Se realizó una observación frente a una luz para evaluar la movilidad de las larvas. Se contarán las larvas vivas y muertas.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados del efecto biocida, en ambas cepas y los resultados de toxicidad con *Artemia salina*, se calcularon de acuerdo al método de “Probit” mediante el software EPA Probit Analisis Program 1.5., obteniéndose los parámetros estadísticos para determinar la Dosis Letal Media (DL50).

IV. RESULTADOS

A. EFECTO BIOCIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Lantana camara* (LANTANA) SOBRE EL ESTADÍO ADULTO DE *Aedes aegypti*.

1. Efecto del extracto etanólico de *Lantana camara* sobre adultos de *Aedes aegypti*.

La mortalidad en los adultos de *A. aegypti* alcanzada hasta las 24 horas de evaluación fue directamente proporcional a la concentración y al tiempo de exposición del extracto etanólico (mg/ml) de las hojas. El efecto del extracto a la mayor concentración de 8.05081 mg/ml fue de 96.67% para la cepa Pucalá, mientras que para la cepa Rockefeller fue de 98.33%. (Fig. 10 y Tabla 03)



Figura 10: Mortalidad de adultos de *A. aegypti* en las jaulas entomológicas.

Tabla 03. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de la Cepa Pucalá frente al extracto etanólico de *L. camara*.

CEPA PUCALÁ	TOTAL DE INDIV.	REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
		24 HORAS		24 HORAS		24 HORAS	
		MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.
0.05081 mg/ml	20	3	15%	1	5%	2	10%
2.05081 mg/ml	20	7	35%	6	30%	5	25%
4.05081 mg/ml	20	12	60%	11	55%	10	50%
6.05081 mg/ml	20	14	70%	15	75%	16	80%
8.05081 mg/ml	20	19	95%	19	95%	20	100%
CONTROL	20	1	5%	0	0%	0	0%

Tabla 04. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de la Cepa Rockefeller frente al extracto etanólico de *L. camara*.

CEPA PUCALÁ	TOTAL DE INDIV.	REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
		24 HORAS		24 HORAS		24 HORAS	
		MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.
0.05081 mg/ml	20	1	5%	2	10%	3	15%
2.05081 mg/ml	20	6	30%	5	25%	8	40%
4.05081 mg/ml	20	15	75%	16	80%	15	75%
6.05081 mg/ml	20	19	95%	18	90%	18	90%
8.05081 mg/ml	20	20	100%	20	100%	19	95%
CONTROL	20	0	0%	0	0%	0	0%

2. Dosis Letal (DL50) del extracto etanólico de *Lantana camara* sobre adultos de *Aedes aegypti*.

La Tabla 4 muestra los valores de la DL50 (mg/mL) calculado a las 24 horas de exposición del *Aedes aegypti* al extracto etanólico de *Lantana camara*.

Al realizar una comparación a nivel de Dosis Letal Media, del estadio adulto tanto de la cepa salvaje Pucalá, como de la cepa control Rockefeller; se observó una mayor susceptibilidad para el grupo Rockefeller en cada una de las evaluaciones de tiempo en que fueron realizados los ensayos. Siendo, a las 24 horas de exposición del *Aedes aegypti* al extracto etanólico de *Lantana camara*, los valores de la DL50= 1.7879 mg/mL y DL50=1.2744 mg/mL, para las cepas Pucalá y Rockefeller respectivamente. (Ver Tabla 04).

Tabla 05. Dosis Letal (DL50) del extracto etanólico de *L. camara* sobre adultos de *A. aegypti*

EXTRACTO	CEPA	PENDIENTE (\pm SE)	DOSIS LETAL (%) mg/ml	
			DL ₅₀	Límites 95%
<i>Lantana camara</i>	Pucalá	1.1598	1.7879	0.2566 12.4594
	Rockefeller	0.9295	1.2744	0.1480 10.9712

B. TOXICIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Lantana camara* (LANTANA) SOBRE *Artemia salina* (CAMARÓN SALINO) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

1. Efecto del extracto etanólico de *Lantana camara* sobre metanauplios de *Artemia salina*.

La tabla 5 muestra el porcentaje del promedio de las tres repeticiones de metanauplios muertos por efecto del tratamiento con hojas a diferentes concentraciones, la primera concentración de 50.81 ug/ml, de los 30 nauplios expuestos murieron sólo el 3%; mientras que en la última y mayor concentración de 1650.81 ug/ml murieron el 60% de los nauplios. De igual manera la misma tabla 5 muestra que tanto en los controles con Agua de mar artificial, Agua Destilada y Etanol al 96°, no murieron ninguno de los metanauplios expuestos.

Tabla 06. Recuento de mortalidad a las 24 horas, de metanauplios de *A. salina* frente al extracto etanólico de *L. camara*.

<i>Artemia salina</i>	TOTAL DE INDIV.	REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
		24 HORAS		24 HORAS		24 HORAS	
		MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.	MUERTOS	% MORT.
C. AG. DEST.	10	0	0%	0	0%	0	0%
C. AG. MAR.	10	0	0%	0	0%	0	0%
C. ETANOL.	10	0	0%	0	0%	0	0%
0.05081 mg/ml	10	0	0%	1	10%	0	0%
2.05081 mg/ml	10	2	20%	1	10%	1	10%
4.05081 mg/ml	10	3	30%	2	20%	3	30%
6.05081 mg/ml	10	4	40%	6	60%	3	30%
8.05081 mg/ml	10	5	50%	7	70%	6	60%

2. Dosis Letal (DL50) del extracto de *Lantana camara* sobre metanauplios de *Artemia salina*.

La Tabla 06 muestra los valores de la DL50 (1625 ug/mL) considerado según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) como relativamente inocuos.

Tabla 07. Dosis Letal (DL50) del extracto de *Lantana camara* sobre metanauplios de *Artemia salina*.

EXTRACTO	ESPECIE	PENDIENTE (\pm SE)	DOSIS LETAL (%) ug/ml	
			DL_{50}	Límites 95%
<i>Lantana camara</i>	<i>Artemia salina</i>	469.7584	1 625.4280	1 131.0820

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación, el extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti* presentó un efecto biocida, tanto para la cepa salvaje como para la cepa patrón. Asumiendo su actividad biológica a terpenoides, fenil-propanoides y flavonoides, encontrados en el género *Lantana*; presentando en la especie estudiada metabolitos secundarios como δ -limoneno, α -terpineol, α -mirceno, linalool, y acetato de geraniol, (Perez, 2016); β -cariofileno, óxido de cariofileno, , α -humuleno y β -curcumeno (Inga, 2016), los cuales demostraron una acción neurotóxica por interferir con el neuromodulador octopamina del sistema olfativo de los insectos (Kostyukovsky *et al.* 2002, Bischof y Enan 2004). Se demostró que el β -cariofileno tiene potencial para interrumpir el funcionamiento nervioso (Unnithan, 2015). El β -cariofileno y el linalool, son inhibidores de la acetilcolina, de esta manera las concentraciones sinápticas de acetilcolina

aumentan y ocurre una hiperexcitación del sistema nervioso central paralizando la transmisión nerviosa produciendo incluso la muerte (Perez, 2016).

Se demostró también que la cepa salvaje tiene una mayor resistencia en comparación a la cepa patrón, coincidiendo con otro ensayo donde se puede evidenciar que la cepa Rockefeller tuvo una mayor sensibilidad a los metabolitos presentes en los extractos vegetales con concentraciones letales inferiores a las observadas en la cepa silvestre; de forma contraria la cepa silvestre presentó una menor sensibilidad a los metabolitos en los extractos vegetales (Amariles – Barrera, *et al*, 2013). Asumiendo que la primera cepa en mención está en constante exposición al ambiente y a productos químicos, mientras que la segunda se estudia bajo condiciones de laboratorio, volviéndola más susceptible al contacto de distintos metabolitos. Esta idea nos hace considerar que es un punto que no se debe dejar de tomar en cuenta en investigaciones posteriores, puesto que ayudaría a esclarecer la interpretación de resultados.

En el presente trabajo la DL50 calculado a las 24 horas de exposición del *A. aegypti* al extracto etanólico de hojas de *L. camara*, fue de 1.7879 mg/mL para la cepa salvaje Pucalá y de 1.2744 mg/mL para la cepa control Rockefeller; estos resultados difieren de un estudio en el que el aceite esencial de hojas de *L. camara* presenta una actividad adulticida contra diferentes especies de mosquitos (Dua *et al.*, 2010), donde la DL50 resultó ser 0.06 mg/cm² para *A. aegypti*. Esto puede deberse a que al utilizarse un aceite esencial sus compuestos activos pueden encontrarse en mayor proporción en comparación a los mismos que se hallan en el extracto estudiado.

Otros reportes mencionan que la DL50 incrementa con la concentración y disminuye con el tiempo de exposición del extracto etanólico de hojas de *L. camara* en larvas instar III de *A. aegypti* (Pérez, 2016), coincidiendo con los resultados de esta investigación del extracto etanólico de hojas de *L. camara* en adultos de *A. aegypti*, al comparar los porcentajes de mortalidad; donde

la concentración para el primer ensayo es de 2.00 mg/ml, presentando un 75% de muerte, mientras que en esta investigación presenta una concentración de 2.05081 mg/ml, una cantidad muy parecida, que representa un 30% de muerte para cepa salvaje Pucalá. Estos datos, en conjunto con la evaluación del extracto etanólico de hojas de *L. camara* en larvas instar III y IV de *A. aegypti* (Sathish, 2008) nos muestra que para la concentración 1.00 mg/ml se obtiene un porcentaje de mortalidad de 88% y 84% para las larvas instar III y IV, respectivamente; lo que nos hace suponer que al realizarse el enfrentamiento en diferentes estadios de desarrollo del insecto, se recurrirá a utilizar una concentración mayor para un menor estadio, y en sentido contrario.

En el estudio de extractos etanólicos de plantas sobre los adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.), *R. graveolens* y *A. indica* produjeron mayores porcentajes de mortalidad, siguiendo *L. camara*, que causó la muerte del mayor número de los insectos evaluados a concentraciones de 0.5, 0.75 y 1,0 mg/ml. Mostrando una tendencia al aumento de la mortalidad en correspondencia con el incremento de la concentración de las soluciones (Romero, 2015). La aplicación de diferentes extractos de *L. camara* sobre huevos, ninfas y adultos de *Trialeurodes vaporariorum*, demostraron efectos insecticidas, destacando los siguientes resultados: que a partir de la extracción con etanol, presentó una mortalidad superior al 94%, y en cuanto al extracto acetónico presentó una mortalidad de 33%, ambos en ninfas; mientras que en adultos, los extractos acetónicos-etéricos de *L. camara* ocasionaron una mortalidad superior al 80% (Vinasco *et al.*, 2015).

Evaluando los diversos extractos de lantana sobre huevos, larvas, pupas y adultos de *Phthorimaea operculella* (Iannacone y Lamas, 2003), el extracto acuoso no mostró efectos ovicidas significativos en comparación con el control (agua destilada); sin embargo sí mostró efectividad larvaria sobre el 70 %, siendo altamente significativos. Demostrándose su letalidad y motivando su posible efecto biocida en *A. aegypti* adulto. Maguiña & Iannacone (2000) señalan que los extractos orgánicos botánicos presentan mayor actividad que los acuosos, mientras que Roel (1998) ha señalado que

la efectividad de un extracto botánico depende de la sustancia orgánica empleada para su extracción (acetona, metanol, hexano o acetato de etilo), fomentando obtener por un extracto de lantana diferente al acuoso para comprobar un efecto biocida en *A. aegypti* adulto.

Al no existir hasta la fecha registros relacionados al efecto biocida del extracto etanólico de hojas de *L. camara* contra el estadio adulto de *A. aegypti*, y teniendo en cuenta los principios activos que presenta *L. camara* que hacen de ella una importante materia prima; se planteó la presente investigación que tuvo como finalidad evaluar la actividad adulticida de las concentraciones 0.05081, 2.05081, 4.05081, 6.05081 y 8.05081 mg/ml del extracto etanólico de las hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti*, procedentes del distrito de Pucallá, en condiciones experimentales.

Estudios previos han recurrido a *A. salina* para determinar la toxicidad aguda de compuestos bioactivos de extractos de plantas como nuevos productos naturales, clasificando las sustancias de acuerdo con su peligrosidad siguiendo los estándares proporcionados por la CYTED (Pacheco, 2011). El valor de DL50, producto del bioensayo es indicador de toxicidad a nivel celular, lo que puede orientar investigaciones específicas futuras, en busca de nuevos productos naturales bioactivos en las plantas empleadas; sin embargo este valor no muestra una actividad fisiológica o biológica en particular. El ensayo de letalidad de *Artemia salina* es considerado una herramienta útil para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas (Sánchez y Neira, 2005).

El extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw, mostró una CL50 de 181. 4 y 221.30 ug/ml respectivamente, clasificándolos como “Moderadamente tóxico”, según la CYTED. (Sánchez y Neira, 2005) En la determinación de la bioactividad de alcaloides totales extraídos de *Coronopus dydimus* (L.), se consiguió una DL50 de 773,69 ppm. Ponce *et al.* (2007) En la evaluación de la toxicidad de 35 extractos etanólicos con posible acción antiparasitaria, su clasificación es de solo 5 como

“Extremadamente tóxicos” o “Muy tóxicos”, 13 como “Moderadamente tóxicos”, y 17 extractos como “No tóxicos” por exhibir valores de CL50 superiores a 1 000 µg/mL. Fernández-Calienes *et al.* (2009). Estos estudios en común dejan ver su baja efectividad, ya que cada uno resulta ser tóxico para el individuo en estudio *A. salina*; punto clave en el que claramente difiere el presente bioensayo, pues muestra una efectividad por encima de los estudios mencionados por presentar una baja toxicidad con un valor de DL50 de 1625 ug/ml, y considerarse como “Relativamente inocuo”.

Finalmente, el alto efecto biocida y la baja toxicidad del extracto de la presente investigación resultan ser muy favorables y permiten proponer una alternativa natural para la erradicación del vector de Dengue, con importantes ventajas tales como: una mayor accesibilidad a la planta; una fácil elaboración de la solución madre por tener como disolvente al etanol; un bajo costo para la producción del extracto etanólico, y una práctica aplicación del mismo sobre el vector estudiado; sin embargo, aún se considera necesario continuar ensayos en campo para la obtención de información.

VI. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de hojas de *Lantana camara* presenta efecto biocida sobre el estadio adulto de *A. aegypti*, siendo más elevado para la cepa patrón Rockefeller con respecto a la cepa salvaje Pucalá.

Lantana camara “Lantana”, no demuestra toxicidad frente a *A. salina* de acuerdo al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

VII. RECOMENDACIONES

Revalidar con pruebas de campo la dosis letal del extracto empleado en el presente estudio para el uso práctico, que pueda ayudar a controlar y erradicar vectores causantes de enfermedades metaxénicas zoonóticas.

Realizar estudios de efecto biocida del extracto etanólico utilizado, enfrentándolo en los diferentes estadios del *A. aegypti*.

Realizar estudios de efecto biocida de distintos extractos (acuosos, metanólico, hexánico, etc) de *Lantana camara* “Lantana” sobre el estadio adulto de *A. aegypti*, así como en parte de la fauna entomológica y cada uno de sus estadios.

Continuar estudiando la gran cantidad de plantas medicinales existentes, tanto de la región como del país, con propiedades biocidas, evaluando a la vez su toxicidad.

Concientizar y promover el uso práctico de aquellos extractos para el control de vectores, reduciendo el uso de insecticidas químicos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu - Payrol, J., M. Miranda - Martinez, G. Toledo - Carrabeo y O. Castillo - García. (2001). Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (Piña de ratón). *Revista cubana de Farmacología*, 35(1), 56-60.
- Alfonso, H. (1988). Algunas consideraciones sobre las plantas tóxicas para los animales domésticos, *Ed. CENSA. La Habana*.
- Amariles- Barrera, S., García – Pajón, CM., Parra – Henao, G. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *CES Medicina*, 27 (2), 193-203.

- Barre, JT., Bruce, FB. (1997). A Bioactive Interpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry*, 45 (2), 321 -324.
- Bazan – Calderón, J., Venturomerora – Flores, R., Kato, M., Rojas – Idrogo, C & Delgado – Paredez, G. (2011). Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. amariles Sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). *Anales de Biología*, 33, 135 – 147.
- Bisset – Lazcano, J., Rodríguez, M., San Martín, J., Romero, J. & Montoya, R. (2009). Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26(3), 229 - 234
- Bowers, WS., Ohta, T., Cleere, JS. & Marcella, PA. (1976). Discovery of insects anti-juvenile hormones in plants. *Sci.*, 193, 542-547.
- Chávez, AF. & Dávila, CO. (2013). *Efecto biocida del extracto etanólico de inflorescencias y plantas in vitro de Piper tuberculatum Jacq. (Matico) sobre larvas del III estadio de Aedes aegypti y toxicidad in vitro en Artemia salina. Tesis.* UNPRG, Lambayeque - Perú
- Consoli, R. & Lourenco, R. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Fiocruz*. 155-190.
- Dua, DK., Pandey AC, Dash AP. (2010). Asulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against Mosquitoes, *Indian Journal of Medical Research*. 127. 509 – 511.
- Estrada, G. & Craig, B. (1995). Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus* *Cuaderno Técnico*, 42.12.
- Fernández - Calienes A., Mendiola J., Monzote I., García M., Sariego I., Acuña D., Scull R. & Gutiérrez Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*. 61(3), 254-258.
- Gomero - Osorio, L. (2002). Plantas que protegen a otras plantas. Coordinador Regional de la Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAPAL), Coordinador Nacional de Desarrollo Institucional de la RAAA . *Revista LEISA. Apartado Postal*, 11-0581.

- Goode, W. & Hatt, P. (1986). Métodos de Investigación Social. 14ava reimpresión. Trillas S.A. México. 235 pp.
- Gundidza, M. (1993). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Shinus molle* Linn. *Cent Afr J Med*. 39 (11). 231-243.
- Inga, L. (2016) Identificación de los componentes del aceite esencial de *Lantana camara* L. Formulación y elaboración de una forma farmacéutica repelente de insectos. Universidad Nacional Mayor De San Marcos – Lima.
- Kanegusuku, M., Benassi, J.C., Pedrosa, R.C., Yunes, R.A. , Cechinel-Filho, V. , Azevedo-Maia, A., De Souza, M.M., Delle-Monache, F. & Niero, R. (2002). Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift fur Naturforschung*, 57(C), 272-276.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demohenko, N., & Shoay, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible much of action against insect pests. *Past Manag, Sci* (58), 1101 -1106.
- Iannacone, J. & Lamas, G. (2003). Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica. (Venezuela)*, 18(2), 95-105.
- Maguiña, AA & Iannacone, JA. (2000). *Artemia franciscana* Kellog 1906 (camaron salino) como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas con propiedades antiparasitarias. *Boletín de la Sociedad Quimica del Peru*. 66, 154-169.
- Mayorga, P. (2001). Microbioensayos ecotoxicológicos para monitoreo ambiental y otras aplicaciones.
- McLaughlin, J.L., Rogers, L.L. & Anderson, J.E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32, 513-524.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.

- Ministerio de Salud, Dirección General de Epidemiología – Lima. (2015). Sala situacional para el análisis de situación de salud semana epidemiológica N° 15 – 2015. Recuperado 31 de mayo 2016, de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2015/SE15/dengue.pdf>
- MINSA. (2000). *Dengue Clásico y Dengue Hemorrágico. Documentos Técnicos OGE – INS*. Recuperado 30 de mayo 2016, de http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/mod_tec/7.pdf
- Nathan, SS., Savitha, G., George, DK., Narmodha, A., Suganya, L. & Cheng, PG. (2006). Efficacy of Meliaazedarach L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, 97(11), 1316-1323.
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti. Biología y Ecología. OPS/ OMS. Washington – USA*. 49.
- OMS. (1988). Clasificación de pesticidas según su grado de peligro recomendada por la OMS. y guía para su clasificación. 1988-1989. Pesticide Development and Safe Use Unit Division of Vector, *Biology and control (VBC), Ginebra. WHO/VBC, 88, 953*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). (2009) Dengue: Guías para el diagnóstico, Tratamiento, prevención y Control. *OPS/ OMS*, 170.
- Organización Mundial de la Salud., Reiter, P. & Nathan, MB. (2001). Guías para la evaluación de la eficacia del rociado espacial de insecticidas para el control del vector del Dengue *Aedes aegypti. WHO/CDS/CPE/PVC, 1*.
- Organización Panamericana de la Salud y Balmaseda – Echevarría. A. (2002) *Manual de Procedimientos de Técnicas para el Diagnostico del Dengue*. Recuperado 31 de mayo 2016, de [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/desastres/manual-procedimientos-tecnicos\[1\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/desastres/manual-procedimientos-tecnicos[1].pdf)
- Organización Panamericana de la Salud. (1997). Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guía para su prevención y control. *Publicación Científica; Washington D.C, 548, 109*.

- Pacheco – Gómez, J. (2011). Determinación de la toxicidad aguda (cl50) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana*. Universidad Nacional de Colombia. Cartagena.
- Parra, GJ. (2005) Evaluación de la actividad insectici-da de algunos extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens*. *Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES*, 102-107.
- Perez, A. (2016) Efecto larvicida de diferentes concentraciones del extracto etanolico de *Lantana camara* (Verbenaceae) en una población natural de *Aedes aegypti*, bajo condiciones experimentales. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.
- Roel A R. (1998) Efeito de extractos orgánicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). [Tese Doutorado]. Piracicaba: Universidade de Sao Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 115 p.
- Romero, R., Morales, P., Pino, O., Corneli, M. & Gonzalez, E. (2015). Actividad insecticida de seis extractos etanolicos de plantas sobre mosca blanca. *Revista Proteccion Vegetal*. 30 (1), 11-16.
- Sánchez, L. & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura Científica*. 3. 40 – 45.
- Ponce, R., Cabana, M., Vaira, M. & Giunta, S. (2007). Bioensayos para determinar la toxicidad y la bioactividad de alcaloides de *Coronopus dydimus*. *Boletín Latinoamericana y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6 (5). 268 -269.
- Sathish, M. & Maneemegalai, S. (2008). Evaluation of Larvicidal Effect of *Lantana camara* Linn against mosquito species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Advances in Biological Research*. 2 (3-4), 39-43.
- Sharma, O. P. & Dawra R. K. (1987) «Isolation and Partial Purification of *Lantana camara* Toxins», *Toxicol. Lett.* 37 (2), 165-72.

- Sharma, S., Sharma, O., Singh, B. & Bhat, T. (2000). Biotransformation of landadenes, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxins of *Lantana* plant. *In guinea pig. Toxicon*, 38, 1191-1202.
- Unnithan, A., Patil, S. & Unnikrishnan, G. (2015). In vitro sensitivity assay of *Lantana camara* against *Aedes aegypti* with supplementary fact from GC MS and in silico analysis. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*. 4 (1), 05-09.
- Vargas, F., Córdova, O. & Alvarado, A. (2006). Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev. Perú Med. Exp Salud Pública*, 23(4), 259-264.
- Vinasco, A. N., Salazar P. E., Soto G. A., Mejía G. L. & Dussan L, C. (2015). Efecto de *Jatropha urens* (Euphorbiaceae) y *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista De Ciencias Agrícolas Artículo De Investigación*, 32 (1), 55-64.
- Zandi-Sohani. N., Hojjati. M., & Carbonell-Barrachina. A. (2012). Bioactivity Of *Lantana camara* L. Essential Oil Against *Callosobruchus*. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, 72 (4), 502-506.

ANEXOS

ANEXO 01.



Figura 01 – A. Planta de *Lantana camara*.

ANEXO 02.



Figura 02 – A. Procedimiento para la obtención del material vegetal.
A) Desechado. **B)** Molienda. **C)** Obtención de masa pulverizada. **D)** Pesado.

ANEXO 03.

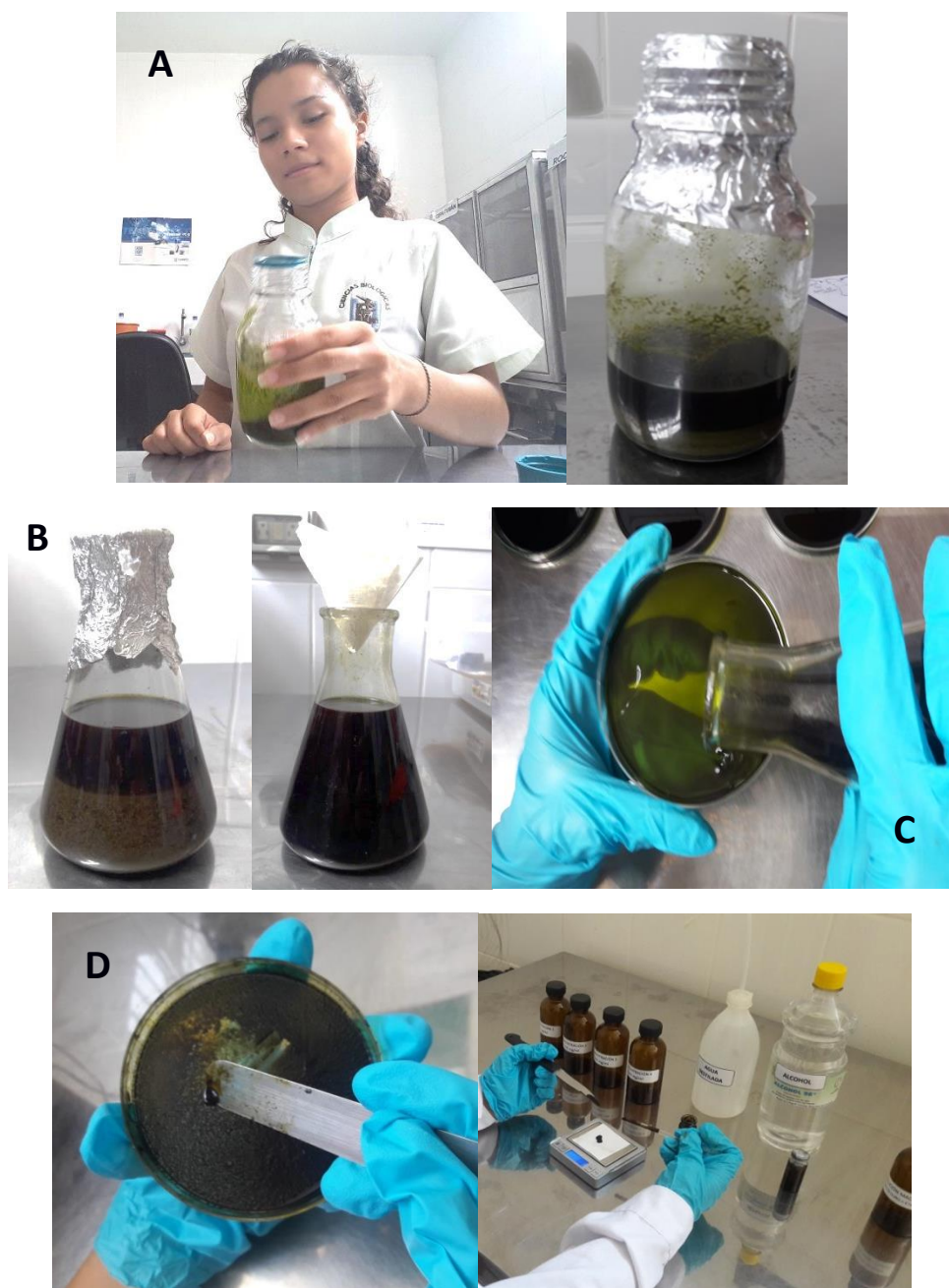




Figura 03 – A. Procedimiento para la obtención del extracto etanólico por el Método de Maceración Fernaroli's, 1975. **A)** Masa seca pulverizada con solvente extracto etanol 96%. **B)** Maceración, reunión y filtración. **C)** Evaporación. **D)** Recuperación del extracto, y pesado. **E)** Preparación de Solución Madre y sus tratamientos.

ANEXO 04.

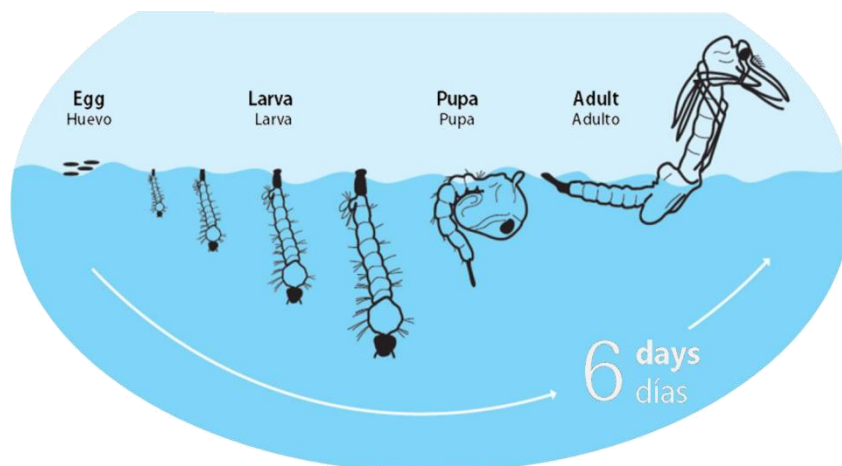


Figura 04 – A. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

ANEXO 05.



Figura 05 – A. Recolección de huevos de *Aedes aegypti*.

ANEXO 06.



Figura 06 – A. Eclosión de *A. aegypti*. Estadíos larvales y posteriores pupas.

ANEXO 07.

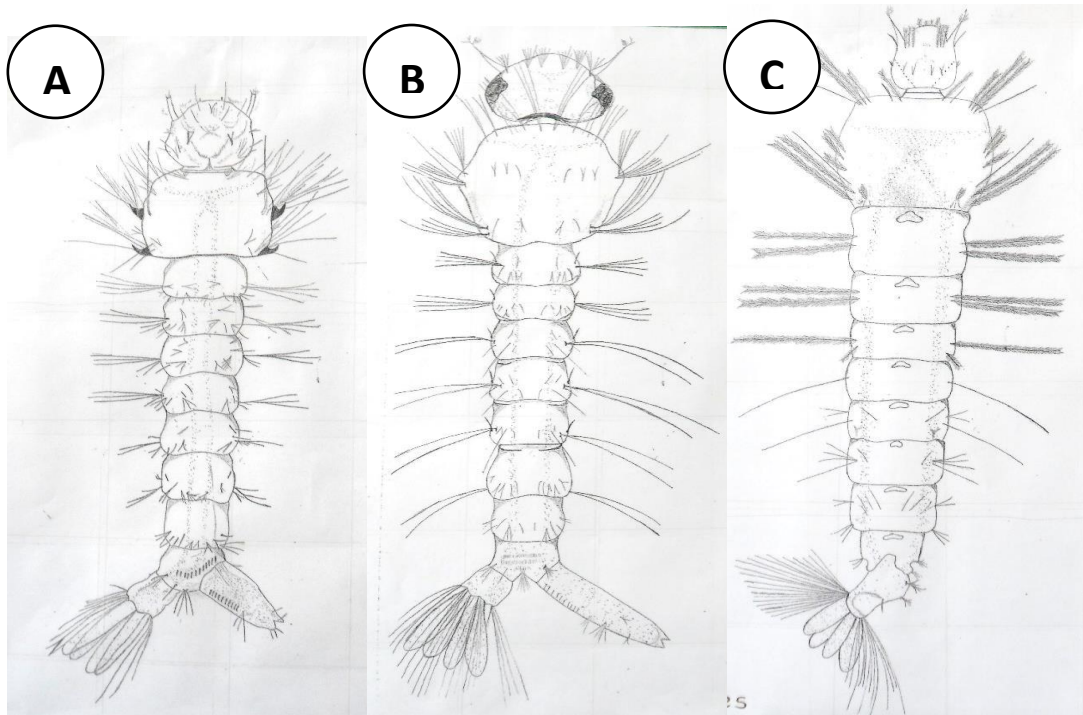


Figura 07 – A. Diferenciación de estadíos larvales de zancudos. *A) Aedes aegypti. B) Culex sp. C) Anopheles sp.*

ANEXO 08.



Figura 08 – A. Estadíos adultos de *A. aegypti*. Macho (Izquierda) y Hembra (Derecha).

ANEXO 09.



Figura 09 – A. Oviposición de *A. aegypti*. Ovitrapas de material plástico descartable y papel kraft en su interior.

ANEXO 10.



Figura 10 – A. Jaulas entomológicas. **A)** Jaulas metálicas para el mantenimiento de *A. aegypti*. **B)** Jaula empleada para el enfrentamiento de *A. aegypti* contra el extracto.

ANEXO 11.



Figura 11 – A. Jaulas para cada tratamiento del enfrentamiento de *A. aegypti* contra el extracto.

ANEXO 12.



Figura 12 – A. Reproducción de los cistos de *Artemia salina*.

ANEXO 13.

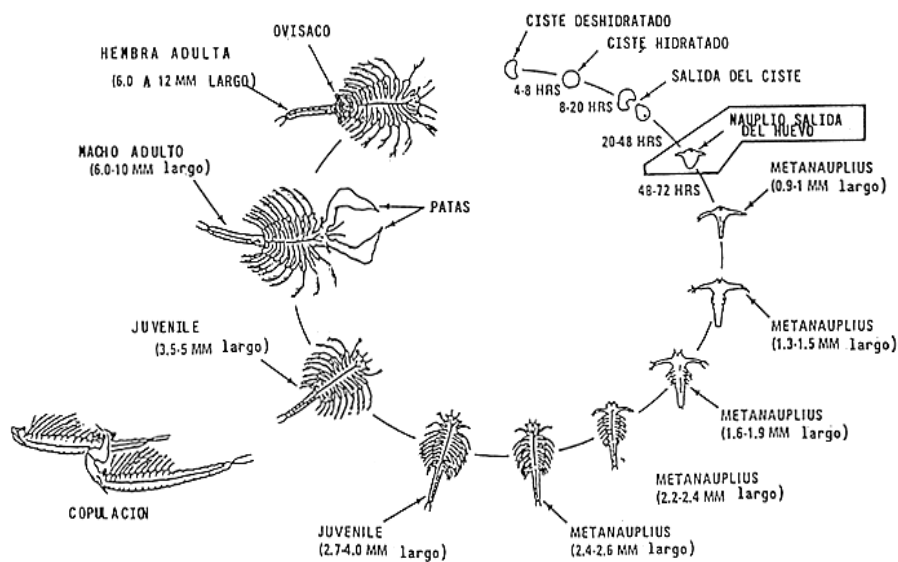


Figura 13 – A. Ciclo biológico de *Artemia salina*.

ANEXO 14.

Tabla 01 – A. Recuento de mortalidad para la Ceba Pucalá y Ceba Rockefeller frente al extracto etanólico de *L. camara*.

[illegible][illegible]

ANEXO 15.

CLASIFICACIÓN	VALORES
<i>Extremadamente toxico</i>	1-10 ug/mL
<i>Altamente tóxico</i>	10-100ug/mL
<i>Moderadamente tóxico</i>	100-500 ug/mL
<i>Ligeramente toxico</i>	500-1000ug/mL
<i>Prácticamente no tóxico</i>	1000 -1500 ug/mL
<i>Relativamente inocuo</i>	>1500 ug/mL (>1mg/mL)

Tabla 02 – A. Ciclo Valores de la prueba de toxicidad establecidos por la CYTED.

ANEXO 16.

CC (mg/ml)	ADULTOS		24 HORAS (%)	
	JAULA	TOTAL	PUC	ROC
CONTROL	20	60	0.00	1.67
0.05081	20	60	10.00	10.00
2.05081	20	60	30.00	31.67
4.05081	20	60	55.00	76.67
6.05081	20	60	75.00	91.67
8.05081	20	60	96.67	98.33

Leyenda: CC: Concentraciones PUC: Pucalá ROC: Rockefeller

Tabla 03 - A. Efecto biocida (%) del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre el estadio adulto de *A. aegypti* a las 24 horas.

ANEXO 17.

CONCENTRACIONES (ug/ml)	METANAUPLIOS			24 HORAS %
	POR ENSAYO	TOTAL USADOS	TOTAL MUERTOS	
AGUA DE MAR ARTIFICIAL	10	30	00	00
AGUA DESTILADA	10	30	00	00
ETANOL	10	30	00	00
50.81	10	30	01	03
450.81	10	30	04	13
850.81	10	30	08	27
1250.81	10	30	13	43
1650.81	10	30	18	60

Tabla 04 - A. Mortalidad (%) del extracto etanólico de hojas de *L. camara* sobre metanauplios de *Artemia salina* a las 24 horas.