



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

CENTRO DE POSTGRADOS

**MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA. MENCIÓN SISTEMAS
AGROINDUSTRIALES**

Proyecto de Innovación previo a la obtención del título de:

MAGISTER EN AGROINDUSTRIA

TEMA

**EFEECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS DE HOJA Y
TALLO DE *Mansoa standleyi* (Steyerm) A.H. GENTRY EN EL CRECIMIENTO
LARVARIO DE *Culex* spp. (DÍPTERA: CULICIDAE)**

AUTORA

Dra. Q.F. Génova Marjorie Cabrera Murillo

DIRECTOR DEL PROYECTO

Ing. Pedro Damián Ríos Guayasamín Msc.

CO DIRECTOR DEL PROYECTO

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez PhD.

PUYO- ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Génova Marjorie Cabrera Murillo con cédula de identidad 091661221-1, declaro ante las autoridades educativas de la Universidad Estatal Amazónica que el contenido del Proyecto de Innovación titulado: “**EFFECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS DE HOJA Y TALLO DE *Mansoa standleyi* (Steyerm) A.H. GENTRY EN EL CRECIMIENTO LARVARIO DE *Culex* spp. (DÍPTERA: CULICIDAE)**” es absolutamente original, autentico y personal.

En tal virtud y según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente, certifico libremente que los criterios y opiniones que constan en el Proyecto de Investigación y Desarrollo son de exclusiva responsabilidad de la autora, y que los resultados expuestos pertenecen a la Universidad Estatal Amazónica.

Génova Marjorie Cabrera Murillo

091661221-1

AUTORA



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

Centro de Postgrados

AVAL

Quien suscribe Ing. Pedro Damián Ríos Guayasamín Msc., Director y Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez PhD, Co-director del Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Innovación titulado: Efecto inhibitor del aceite esencial y extractos de hoja y tallo de *Mansoa standleyi* (Steerm) A.H. Gentry en el crecimiento larvario de *Culex* spp. (Díptera: Culicidae)” a cargo de Génova Marjorie Cabrera Murillo egresado(a) de la primera cohorte de la Maestría en Agroindustria mención Sistemas Agroindustriales de la Universidad Estatal Amazónica.

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Innovación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución por lo que se encuentra listo para ser sustentado.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de innovación para que sea presentado ante la Dirección de Posgrado como forma de titulación como Magister en Agroindustria mención Sistemas Agroindustriales y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que a si conste, firmo la presente a los 12 días del mes de diciembre de 2018.

Atentamente,

Ing. Pedro Damián Ríos Guayasamín Msc.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez PhD.

CO DIRECTOR DE TESIS



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND



Oficio No. 085-IL-UEA-2018

Puyo, 10 de diciembre de 2018

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El trabajo de titulación, investigación y desarrollo correspondiente a la ING. **CABRERA MURILLO GÉNOVA MARJORIE**, con C.I. 0916612211 con el Tema: **"Efecto inhibitor del aceite esencial y extractos de hoja y tallos de *Mansoa standleyi* (Steerm.) A.H. Gentry en el crecimiento larvario de *Culex spp.* (díptera: culicidae)"**, de la Maestría en Agroindustria, Mención en Sistemas Agroindustriales, Director del proyecto DR. Bravo Sánchez Luis Ramón, PhD, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 0%, Informe generado con fecha 07 de diciembre de 2018 por parte del director, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,



Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.
ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El presente trabajo: “**EFEECTO INHIBIDOR DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS DE HOJA Y TALLO DE *Mansoa standleyi* (Steyerm) A.H. GENTRY EN EL CRECIMIENTO LARVARIO DE *Culex* spp. (DÍPTERA: CULICIDAE)**” bajo la responsabilidad de la egresada Génova Marjorie Cabrera Murillo, ha sido meticulosamente revisada, autorizando su presentación:

Para constancia firman:

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Estatal Amazónica, Centro de Postgrado ya que ha sido pilar fundamental del desarrollo y consecución de los objetivos trazados.

De manera muy especial agradezco a mis tutores de tesis al Ing. Pedro Ríos y al Dr. Luis Bravo quienes, con su esfuerzo, dedicación, y su motivación han sido fundamentales para la culminación del proyecto.

Mi agradecimiento también va dirigido al Dr. Yaziel Arteaga, Dr. Matteo Radice y Dr. Amaury Pérez, quienes me asesoraron de la mejor manera brindándome sus conocimientos y experiencias que contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

Agradezco también a Q.F. Andrea Tapuy, Dr. Yudel García y al Ing. Jorge Reyes por todo el apoyo que me han brindado para el avance de este trabajo investigativo.

A mi padre, mi esposo e hijos demás personas que de una u otra manera brindaron su apoyo para la finalización los estudios y el proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Claudio Cabrera y Genoveva Murillo (+), por sus enseñanzas y apoyo incondicional, quienes siempre me enseñaron que sin esfuerzo no hay recompensa.

A mi amado esposo Ricardo y a mis tres motores de lucha mis hijos Doménica, Ricardo y Miguel quienes son el regalo que Dios me ha dado, por brindarme día a día su apoyo, compañía y ánimo y sobre todo por ser el pilar fundamental de mi vida.

Genova Cabrera Murillo

RESUMEN

Los productos naturales de origen vegetal con actividad biocida, se han convertido en una de las alternativas más viables para el control de insectos como reemplazo de los plaguicidas sintéticos convencionales. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto inhibitor del aceite esencial y extractos acuoso, etanólico y etéreo del tallo y hoja de *Mansoa standleyi* sobre larvas de III y IV instar del mosquito *Culex* spp. La metodología consistió en realizar una destilación por arrastre de vapor del material vegetal fresco para obtener el aceite esencial y su hidrolato, a partir del cual se realizaron las diluciones en ppm para el aceite y en porcentaje para el hidrolato con las cuales se evaluó la mortalidad larvaria, adicionalmente se determinó presencia de aliina por cromatografía de capa fina en el hidrolato a fin de determinar su influencia en la mortalidad larvaria. Para los extractos se utilizó las hojas y tallo secos y molidos de *Mansoa standleyi* y se aplicó la extracción por baño de ultrasonido obteniendo los extractos acuosos, etanólico y etéreos a partir del cual se realizaron las diluciones en ppm y se determinó la inhibición del crecimiento de pupa, adicionalmente se realizó una determinación de polifenoles en los extractos. La fase experimental consistió en colocar 10 larvas de *Culex* spp. en tubos de ensayo que contenían 20 mL de agua y se aplicó 1 mL del preparado vegetal. Para el aceite e hidrolato las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo luego de 24, 48 y 72 horas y se calculó la dosis letal DL50 y la DL90 mediante el método de análisis Probit. El aceite esencial de la hoja a 649 ppm mostro actividad larvicida a las 24 horas mientras que el tallo a 478 y 400 ppm. El hidrolato al 50 y 30% de concentración de hoja y tallo mostraron 100% de efectividad después de las 36 horas. El extracto acuoso mostro una reducción de desarrollo de pupa de 7 días, mientras que el etanólico y etéreo provocaron un alargamiento del tiempo de vida de la larva en más de 20 días. Los diez tratamientos evaluados muestran control sobre las larvas en el tercer y cuarto estadio de *Culex* spp. En condiciones de laboratorio el aceite esencial de tallo muestra mayores niveles de control con una mortalidad del 100% en el 86% de las disoluciones, el aceite esencial de hoja mostro un 100% de efectividad solo en el 40% de las disoluciones; el hidrolato de tallo muestra mayores niveles de control con una mortalidad del 100% en el 80% de las disoluciones, el aceite esencial de hoja mostro un 100% de efectividad solo en el 60% de las disoluciones. Se observó inhibición de la larva tanto para el aceite esencial como para el hidrolato; los extractos etanolicos y etéreos inhiben el crecimiento normal de las larvas de mosquito, prolongando su ciclo de vida.

PALABRAS CLAVES: *Mansoa standleyi*, *Culex* spp., aceite esencial, baño de ultrasonido, dosis letal, hidrolato, extractos polifenoles, aliina.

ABSTRACT

Natural products of vegetable origin with biocidal activity have become one of the most viable alternatives for the control of insects as a replacement for conventional synthetic pesticides. The objective of the present investigation was to evaluate the inhibitory effect of the essential oil and aqueous, ethanolic and ethereal extracts of the stem and leaf of *Mansoa standleyi* on larvae of III and IV instar of the *Culex* spp mosquito. The methodology consisted of conducting steam distillation of the fresh plant material to obtain the essential oil and its hydrolate, from which dilutions were made in ppm for the oil and in percentage for the hydrolate with which the mortality was evaluated. Larvae, additionally presence of alliin was determined by thin layer chromatography in the hydrolate to determine its influence on larval mortality. For the extracts, the dry and ground leaves and stems of *Mansoa standleyi* were used and the ultrasound bath extraction was applied, obtaining the aqueous, ethanolic and ethereal extracts from which the dilutions were made in ppm and the growth inhibition was determined. Pupa, additionally a determination of polyphenols was made in the extracts. The experimental phase consisted of placing 10 larvae of *Culex* spp. in test tubes containing 20 mL of water and 1 mL of the vegetable preparation was applied. For the oil and hydrolate the mortality readings were carried out after 24, 48 and 72 hours and the lethal dose DL50 and DL90 were calculated by means of the Probit analysis method. The essential oil of the leaf at 649 ppm showed larvicidal activity at 24 hours while the stem at 478 and 400 ppm. Hydrolate at 50 and 30% concentration of leaf and stem showed 100% effectiveness after 36 hours. The aqueous extract showed a pupal development reduction of 7 days, while ethanolic and ethereal caused a lengthening of the larval life time in more than 20 days. The ten treatments evaluated show control over the larvae in the third and fourth stages of *Culex* spp. In laboratory conditions the stem essential oil shows higher levels of control with 100% mortality in 86% of the solutions, the leaf essential oil showed a 100% effectiveness only in 40% of the solutions; the stem hydrolate shows higher levels of control with a 100% mortality in 80% of the solutions, the essential leaf oil showed a 100% effectiveness only in 60% of the solutions. Larval inhibition was observed for both essential oil and the hydrolate; the ethanol and ethereal extracts inhibit the normal growth of the mosquito larvae, prolonging its life cycle.

KEY WORDS: *Mansoa standleyi*, *Culex* spp., essential oil, ultrasound bath, lethal dose, hydrolate, polyphenol extracts, alliin.

Tabla de contenido

| | |
|---|----------|
| CAPÍTULO I | 1 |
| 1.2. Problema científico | 2 |
| 1.3. Hipótesis de la investigación | 2 |
| 1.4. Objetivo general..... | 2 |
| 1.5. Objetivos específicos..... | 2 |
| CAPÍTULO II..... | 3 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Plantas medicinales..... | 3 |
| 2.2. Familia bignoniácea..... | 4 |
| 2.2.1. Taxonomía y hábitat..... | 4 |
| 2.2.2. Usos tradicionales | 5 |
| 2.2.3. Descripción botánica | 6 |
| 2.2.4. Composición química del aceite de <i>Mansoa standleyi</i> | 8 |
| 2.2.5. Aliina o sulfóxido de s-alil-cisteína (aminoácido azufrado)..... | 8 |
| 2.2.6. Alicina | 9 |
| 2.2.7. Actividad biológica de los compuestos azufrados | 9 |
| 2.3. Extracción de componentes bioactivos..... | 10 |
| 2.3.1. Maceración..... | 10 |
| 2.3.2. Destilación por arrastre de vapor | 10 |
| 2.3.3. Cromatografía de capa fina | 11 |
| 2.3.4. Extracción asistida por ultrasonido | 11 |
| 2.4. Aceites esenciales | 12 |
| 2.4.1. Principales usos de los aceites esenciales..... | 13 |
| 2.4.2. Forma de acción de los aceites esenciales..... | 13 |
| 2.5. Radicales libres y estrés oxidativo | 14 |
| 2.6. Polifenoles | 14 |
| 2.6.1. Propiedades de los polifenoles | 15 |
| 2.6.2. Métodos para determinar polifenoles | 16 |
| 2.7. Enfermedades transmitidas por vectores..... | 17 |

| | | |
|-----------------------------------|--|-----------|
| 2.7.1. | Ubicación taxonómica | 19 |
| 2.7.2. | Distribución geográfica del mosquito | 19 |
| 2.7.3. | Ciclo biológico del mosquito | 20 |
| 2.7.4. | Control de vectores | 23 |
| 2.8. | Mecanismo de acción de los organofosforados..... | 24 |
| 2.8.1. | Manifestaciones clínicas por intoxicación..... | 24 |
| 2.9. | Tratamientos botánicos | 25 |
| CAPÍTULO III | | 28 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | | 28 |
| 3.2. | Tipo de investigación..... | 28 |
| 3.3. | Métodos de investigación | 29 |
| 3.4. | Material vegetal | 29 |
| 3.4.1. | Localización y muestreo | 29 |
| 3.4.2. | Clasificación taxonómica | 30 |
| 3.4.3. | Obtención del aceite esencial de <i>Mansoa standleyi</i> | 30 |
| 3.4.4. | Determinación del rendimiento del aceite de <i>Mansoa standleyi</i> | 30 |
| 3.4.5. | Preparación de las concentraciones del aceite esencial y del hidrolato de <i>Mansoa standleyi</i> 31 | |
| 3.4.6. | Preparación de extractos crudos de <i>Mansoa standleyi</i> | 31 |
| 3.4.7. | Identificación aliina: Cromatografía de capa fina | 32 |
| 3.4.8. | Determinación de Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu | 32 |
| 3.5. | Actividad larvicida | 33 |
| 3.5.1. | Colección y mantenimiento de larvas | 33 |
| 3.5.2. | Identificación de las larvas | 33 |
| 3.5.3. | Actividad larvicida | 34 |
| 3.5.4. | Inhibición del desarrollo de Pupa..... | 35 |
| 3.6. | Tratamientos de datos | 36 |
| 3.6.1. | Diseño experimental | 36 |
| 3.6.2. | Tratamiento aplicado | 37 |
| 3.6.3. | Unidades experimentales..... | 37 |
| 3.6.4. | Análisis estadístico | 37 |
| 3.6.5. | Variables..... | 37 |
| 3.7. | Recursos humanos y materiales..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO IV | 41 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |
| 4.2. Identificación aliina: Cromatografía de capa fina | 41 |
| 4.3. Identificación polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu | 42 |
| 4.4. Actividad larvicida | 44 |
| 4.5. Inhibición del desarrollo de Pupa..... | 48 |
| 4.6. Conclusiones..... | 52 |
| 4.7. Recomendaciones | 54 |
| 4.8. Bibliografía | 55 |
| 4.9. Anexos | 70 |

TABLA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Distribución de las Bignoniáceas..... | 5 |
| Figura 2 Aspecto morfológico de las flores de <i>Mansoa standleyi</i> (Steerm.) A. H. Gentry | 7 |
| Figura 3 Descomposición de la alicina en ajoenos..... | 9 |
| Figura 4 Ruta biosintética de los polifenoles en plantas..... | 17 |
| Figura 5 Esquema del mosquito con sus principales apéndices | 18 |
| Figura 6 Huevos de mosquito..... | 20 |
| Figura 7 Larva de mosquito..... | 21 |
| Figura 8 Pupa de mosquito..... | 22 |
| Figura 9 Emergencia del mosquito adulto | 22 |
| Figura 10 Georreferenciación de Universidad Estatal Amazónica..... | 28 |
| Figura 11 Georreferenciación de sitio de muestreo de planta | 29 |
| Figura 12 TLC de hidrolato de hoja y tallo de <i>M. standleyi</i> para evidenciar presencia de aliina | 42 |
| Figura 13 Contenido de Polifenoles totales en extractos de <i>Mansoa standleyi</i> | 43 |
| Figura 14 Comportamiento de la Dosis Letal 50 del Aceite esencial de Hoja y Tallo de <i>Mansoa standleyi</i> | 46 |
| Figura 15 Comportamiento de la Dosis Letal 50 del Hidrolato de Hoja y Tallo de <i>Mansoa standleyi</i> ... | 48 |
| Figura 16 Viabilidad del tiempo de vida larvaria el porcentaje de desarrollo de pupa | 50 |

TABLA DE FOTOGRAFÍAS

| | | |
|--|---|----|
| Fotografía 1 Trampas para colección de larvas | Fotografía 2 Contenedor de larvas..... | 70 |
| Fotografía 3 Especie identificada como <i>Mansoa standleyi</i> | Fotografía 4 Identificación de Larva en Estereomicroscopio..... | 70 |
| Fotografía 5 Destilación del material vegetal | Fotografía 6 Aceite obtenido de hoja | 71 |
| Fotografía 7 Aceite obtenido del tallo | Fotografía 8 Secado del material en estufa | 71 |
| Fotografía 9 Molienda del material vegetal | Fotografía 10 Baño ultrasónico .. | 72 |
| Fotografía 11 Extractos obtenidos | Fotografía 12 Determinación de polifenoles..... | 72 |
| Fotografía 13 Concentrado en Rotavapor | Fotografía 14 Extracto resultante | 73 |
| Fotografía 15 Extractos foliares | Fotografía 16 Pruebas de inhibición | 73 |
| Fotografía 17 Pruebas de inhibición | Fotografía 18 Pruebas de inhibición | 74 |

TABLA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Descripción botánica de <i>Mansoa standleyi</i> | 6 |
| Tabla 2 Componentes identificados en aceites de varias partes de <i>M. standleyi</i> | 8 |
| Tabla 3 Jerarquía taxonómica del <i>Culex</i> | 19 |
| Tabla 4 Diseño experimental para determinar de la Actividad Larvícida del Aceite esencial e Hidrolato | 35 |
| Tabla 5 Diseño experimental para determinar de la inhibición del desarrollo de Pupa en los extractos | 36 |
| Tabla 6 Tratamientos | 37 |
| Tabla 7 Diseño experimental de aceite y extractos | 37 |
| Tabla 8 Cálculo del contenido de polifenoles | 43 |
| Tabla 9 Actividad Larvícida por 72 horas consecutivas del aceite esencial de hojas de <i>M. standleyi</i> en larvas del 3er y 4to instar de <i>Culex</i> spp. | 44 |
| Tabla 10 Actividad Larvícida por 72 horas consecutivas del aceite esencial del tallo de <i>M. standleyi</i> en larvas del 3er y 4to instar de <i>Culex</i> spp. | 45 |
| Tabla 11 Actividad Larvícida del hidrolato de hojas de <i>M. standleyi</i> en larvas del 3er y 4to instar de <i>Culex</i> spp. | 46 |
| Tabla 12 Actividad Larvícida del hidrolato del tallo de <i>M. standleyi</i> en larvas del 3er y 4to instar de <i>Culex</i> spp. | 47 |
| Tabla 13 Extractos acuosos, etanólico y etéreo y su efecto en el desarrollo de pupa | 49 |

CAPÍTULO I

1.1. Introducción

Los aceites esenciales, poseen un gran valor y son utilizados como materia prima, en industrias como la cosmética para elaborar perfumes, en fitoterapia para los aromas y en la industria culinaria para la elaboración de especias. Todo esto ha despertado interés en las diferentes áreas científicas, llegando a centrar el estudio en las propiedades de las plantas, así como los efectos producidos por sus metabolitos secundarios (Condori *et al.*, 2013). Diversos estudios han logrado analizar la efectividad de aceites esenciales obtenidos de especies aromáticas tales como *Piper auritum*, *Piper aduncum*, *Pimenta racemosa* y *Dysphania ambrosioides* han demostrado efecto larvicida contra *Aedes aegypti* (Leyva *et al.*, 2009). Estudios realizados sobre géneros de Bignoneaceas como *Adenocalymma alliicum*, *Petiveria alliacea* (Zoghbi *et al.*, 2002); *Pseudocalymma alliaceum* (Tomás *et al.*, 2014) y en la *Mansoa alliacea* (Ruiz *et al.*, 2011), demostraron efecto larvicida en géneros de la familia de las Dípteras. La familia Culicidae ha ganado gran importancia en virtud de que las hembras son vectores de las enfermedades metaxénicas, las que son prevalentes en zonas tropicales y subtropicales, así como también en lugares con problemas de acceso al agua potable y al saneamiento (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2017). Entre las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial encontramos: Fiebre amarilla, dengue, virus del Nilo, virus de San Luis, chikungunya, zika y paludismo. (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2017); la presencia de enfermedades metaxénicas representan una regresión en el desarrollo de un país, por lo que es necesario desarrollar nuevas técnicas efectivas para el control de vectores.

Hasta el momento el control de vectores se realiza con el uso de plaguicidas químicos, su uso indiscriminado genera diferentes impactos como los altos costos de producción, la resistencia que presentan los vectores y principalmente el alargamiento del efecto residual en el ambiente, así como la afectación a la salud humana. En la Gaceta Epidemiológica 20 del Ministerio de Salud del Ecuador se reportan 146 casos de intoxicación por plaguicidas. (Gaceta Epidemiológica, SIVE Alerta, 2018). Una alternativa adelantadora para el control de vectores se basa en el uso de insecticidas de origen botánicos debido a su efectividad, su bajo efecto residual en el ambiente y fácil degradación; la mayoría de estos insecticidas basan

su efecto en las propiedades de los aceites esenciales obtenidos de plantas, (Conti *et al.*, 2010). La potencialidad de los aceites esenciales utilizados como larvicidas varía según la especie vegetal, entre los componentes más relevantes de *Mansoa standleyi* tenemos: ligninas, terpenos, alcoholes, aldehídos, polifenoles, disulfuro de alilo, aliina, alicina o sulfuro de dialilo los que son considerados como responsables de su actividad insecticida (Leyva *et al.*, 2009; Karr & Cotas 1998; Araujo *et al.*, 2003).

En base a lo expuesto, el presente estudio pretende dar una respuesta amigable a una problemática local al analizar su capacidad de inhibición larvaria en individuos de la Familia Culicidae que se conoce son vectores de enfermedades de importancia humana como es el *Culex* spp.

1.2. Problema científico

En la provincia de Pastaza, ciudad de Puyo, no se han realizado estudios que demuestren cómo inciden los derivados de *Mansoa standleyi* en la inhibición de larvas de *Culex* spp. y que sirvan como alternativa natural para su control

1.3. Hipótesis de la investigación

Es posible lograr un nivel de inhibición de larvas de *Culex* spp. si se logra caracterizar el efecto larvicida de los derivados de *Mansoa standleyi* en dosificaciones que no sobrepasen las 600 ppm frente a tiempos de exposición inferiores a las 72 horas.

1.4. Objetivo general

Determinar el efecto larvicida de los derivados de *Mansoa standleyi* sobre las larvas de mosquito del género *Culex* spp.

1.5. Objetivos específicos

- Determinar el efecto larvicida del aceite esencial e hidrolato de *Mansoa standleyi* frente a larvas de *Culex* spp.
- Determinar la inhibición del desarrollo de pupas de *Culex* spp. por parte de extractos acuosos, etanolicos y etéreos de *Mansoa standleyi*.
- Determinar en la fase del destilado la presencia del metabolito aliina.
- Determinar en los extractos evaluados el contenido de polifenoles totales.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas medicinales

Las plantas medicinales contienen principios activos que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre el organismo del hombre, es básicamente utilizada como principio activo en medicamentos para paliar la enfermedad o los síntomas de la misma. (Castro *et al.*, 2013) Las plantas aromáticas son aquellas de donde se extraen los aceites esenciales y aromas de sus partes constituyentes los mismos que son utilizados por la industria farmacéutica, cosmética y culinaria (MIA *et al.*, 2001). Duke (1989) compiló una lista de las 250 especies de plantas medicinales más importantes del mundo, de las cuales la mitad corresponde a plantas tropicales, esta lista incluye a plantas silvestres o cultivadas de la región, las que se mencionan a continuación: *Ananas comosus*, *Banisteriopsis capi*, *Brunfelsia* sp. *Camelia sinensis*, *Cannabis sativa*, *Carica papaya*, *Catharanthus roseus*, *Cephaelis ipecahuana*, *Chenopodium ambrosoides*, *Chondodendron tomentosum*, *Cinchona* *Cissampelus pareira*, *Citrus* spp., *Copaifera* sp., *Cotalaria sessiliflora*, *Curcuma longa*, *Datura stramonium*, *Digitalis* spp., *Erythroxylum coca*, *Jatropha curcas*, *Melissa officinalis*, *Momordica charantea*, *Mucuna pruriens*, *Musa* sp., *Myroxylon balsamum*, *Nicotiana tabacum*, *Papaver somniferum*, *Passiflora* spp., *Paullinia cupana*, *Physalis* spp., *Pilocarpus* spp., *Plantago* spp., *Quassia amara*, *Rauwolfia* spp., *Ricinus communis*, *Ruta graveolens*, *Smilax* spp., *Strychnos* spp., *Tabebuia* spp., *Tecoma stands*, *Theobroma cacao*, *Zea mays* y *Zingiber officinales*. En Ecuador, Ríos *et al.*, (2007) registra especies utilizadas como medicinales que incluyen *Artocarpus altilis*, *Brosimum utile*, *Brunfelsia chiricaspi*, *Carica papaya*, *Citrus lemon*, *Columnea nariniana*, *Cordia nodosa*, *Costus* sp., *Croton lechleri*. *Cymbopogon citratus*, *Cyperus luzulae*, *Erythroxylum* sp., *Fimbristylis littoralis*, *Grias neuberthii*, *Guadua angustifolia*, *Heisteria acuminata*, *Ilex guayusa*, *Inga edulis* var. *edulis*, *Jacaranda glabra*, *Mansoa alliacea*, *Maranta amazonica*, *Maytenus krukovii*, *Melissa officinalis*, *Mentha* sp., *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Plantago major*, *Potalia amara*, *Psidium guajava*, *Sambucus nigra*, *Scoparia dulcis*, *Smilax* sp., *Stachytarpheta cayennensis*, *Tabernaemontana sanano*, *Verbena officinalis*, y *Witheringia*

solanacea. Abril R. *et al.*, (2016) pudo determinar en su estudio que un total de 34 familia y 52 especies de plantas medicinales que son utilizadas por las familias encuestada en Pastaza, Mera Santa Clara y el uso de las mismas variaba dependiendo del lugar en que se realizó la encuesta.

2.2. Familia bignoniácea

Esta familia se caracteriza por ser maderera principalmente, aunque también es utilizada como ornamental, por estudios realizados se conoce que existe 100 géneros y unas 800 especies, las mismas que son de distribución tropical y subtropical (Rzedowski, 1993) Este género se caracteriza por ser muy aromáticas con un sabor a ajo característico el mismo que le sirve para defenderse de los depredadores; este olor es debido a la presencia de compuestos como alilidisulfóxido, aliina, alicina y sulfuro de dialilo ente los más característicos. (Zoghbi *et al.*, 1984; López, 2010) Entre las 11 especies más estudiadas se encuentra *M. alliacea* (Lam)A.H. Gentry, *M. angustidens* (DC) Bureau & K. Schum., *M. difficilis* (Cham) Bureau & K. Schum., *M. glazovii* Bureau & K Schum., *M. hirsuta* DC., *M. hymenacea* (DC) A.H. Gentry, *M. lanceolata* (DC.) A.H. Gentry, *M. onohualcoides* A. H. Gentry, *M. parviflora* (A. H. Gentry) A.H.Gentry, *M. sandleyi* (Steayerm) A.H. Gentry y *M.vurrucifera* (Schltdl) A.H. Gentry. (Lohmann, 2007).

2.2.1. Taxonomía y hábitat

El género *Mansoa* abunda en clima seco y húmedo de Brasil y desde Argentina hasta el sur de México (Lohmann, 2007). En la Figura 1 podemos observar la distribución a nivel mundial de la Familia Bignoniácea.

De acuerdo a Revilla (2001) la *Mansoa alliacea* crece en suelo sólido, que no esté cerca de cuerpos de agua, en áreas ocultas de poca vegetación y en bosques primarios. No es común que crezcan en áreas inundadas o en áreas abiertas. Generalmente crecen en áreas tropicales con lluvia de 1800 – 3500 mm/por año a temperaturas que se encuentran entre los 20 a 30°C. La *Mansoa hymenaea* es una planta nativa del Brasil y del Perú (Thetburanatham, 1987) de acuerdo a Chirunthorn *et al.*, (2005) también crece en algunas partes de Tailandia.

Mansoa standleyi (sinónimo *Pseudocalymma standleyi* Steyerm, *Pachyptera standleyi* (Steyerm) A.H. Gentry) se encuentra presente en las municipalidades de Pará, y es conocida por su nombre común de ajo de monte. La *Mansoa standleyi* es cultivada en los jardines y en lugares donde abundan el bosque secundario. (Zoghbi *et al.*, 2009)

Es un bejuco con un fuerte olor a ajo, de un gran valor etnomedicinal, cuyos nombres más comunes son hosmecha, hierba ajo, ajo sacha, ajo de monte, bejuco de ajo y boens (Tang, 2007; Gentry A.H. 1992). Es una especie que se distribuye en América Tropical, en zonas con un rango de precipitación de 1800 a 3500 mm/año y temperaturas entre los 20 a 26°C, en suelos de tipo arcillosos con abundante materia orgánica. (Stevens, 2001)

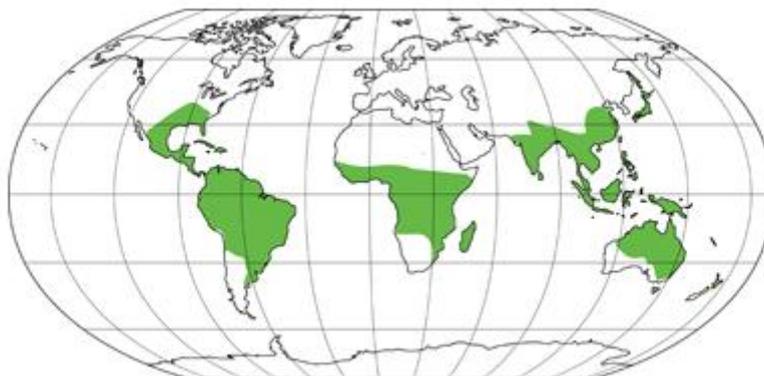


Figura 1 Distribución de las Bignoniáceas

Fuente: Plantas Vasculares, S. (2013).

2.2.2. Usos tradicionales

Mansoa alliacea: las hojas secas son utilizadas en infusión en Surinam para tratar la fiebre y los dolores reumáticos (Hasrat *et al.*, 1997) El uso de las hojas secas en Perú incluye el tratamiento para la tos y la neumonía, en la malaria y como insecticida y como antireumático (Desmarchelier *et al.*, 1997; Pérez 2002; Arana, 2005; Itokawa *et al.*, 1992).

Mansoa hymenaea: En Sudáfrica la utilizan tradicionalmente para tratar la artritis reumatoidea y como relajante muscular (Luna, 1984). En Tailandia es utilizada como una planta ornamental porque suele dar flores de color violeta que son consideradas muy atractivas (Chirunthorn *et al.*, 2005)

Mansoa hirsuta: Según estudios llevados a cabo por Chaves & Reinhard (2003); Agra *et al* (2007 y 2008) reportan que la planta es utilizada como antifúngica, antihipertensiva, diurética y antitumoral y también para el tratamiento de la diabetes.

Mansoa standleyi: En el norte de Brasil es utilizada como una planta ornamental. La decocción de las hojas son utilizadas para lavados externos y para tratar la fatiga y dolores del lumbago en la Guayana (Guayana, Surinam y Guyana Francesa) en las Guayanas Francesas utilizan el macerado de las hojas como un insecticida contra las hormigas (Atta

sp.) en Ecuador los Waorani lo utilizan stems y hojas para tratar la artritis, fiebre y dolores musculares mientras que en Colombia utilizan las hojas para las fiebres y dolores de cabeza (Defilipps *et al.*, 2007)

Posee atributos muy semejantes a los del ajo (*Allium sativum L.*) como el aroma y el sabor, además de las sustancias químicas que presentan propiedades anticancerígenas, antilipídica, antihistamínicas y antitrombóticas (Moraes, 2008). En Brasil es cultivada por las poblaciones tradicionales como condimentos o para usos medicinales.

Trindade *et al.*, (2008) indica que las hojas constan de compuestos activos triterpénicos, flavonoides, naftoquinonas, aminoácidos y sulfatos.

2.2.3. Descripción botánica

Tabla 1 Descripción botánica de *Mansoa standleyi*

| | |
|-----------------|---|
| REINO | Plantae |
| DIVISIÓN | Magnoliophyta |
| CLASE | Magnoliopsida |
| ORDEN | Lamiales |
| FAMILIA | Bignoniaceae |
| GENERO | Mansoa |
| NOMBRES COMÚNES | <i>M. sandleyi</i> (Steierm) A.H. Gentry |
| SINÓNIMOS | Pseudocalymma standley Steierm Pachyptera standley (Steierm) A.H. Gentry (Pérez, 2002) |

Fuente: Suárez (2015)



Figura 2 Aspecto morfológico de las flores de *Mansoa standleyi* (Steud.) A. H. Gentry

Fuente: Jardim & López (2008)

En la tabla 1 se puede apreciar la descripción botánica de la especie. Poseen una zona interangular glandular; que presentan pseudoestípulas ovaladas de casi 5 mm; los folículos son opuestos, a veces en forma elíptica u ovalados con 17 x 7,5 cm, pudiendo el ápice ser obtuso a obtuso acuminado. La base puede ser aguda o redondeada obtusa ya veces desigual, los márgenes pueden ser crenados u ondulados. La superficie superior es glabra, con la venia del tipo penninervia. El pecíolo tiene alrededor de 1,5 x 2 cm. Las flores son andróginas pediculadas dispuestas en racimos axilares; los pedicelos poseen cerca de 7-10 mm, las gábitas probablemente provengan del tallo, con una dimensión aproximada de 21 cm. (Figura 2). El cáliz es simple gamo, con una media de 5-8 mm, la corola es gamopétala, membranacea, productora de néctar, acción omórfica con coloración violeta y aspecto infundibuliforme y poseen cerca de 7,5-9 cm. Los lóbulos son redondeados, los estambres son en número de cuatro y un estaminodio son homodinámicos; sus filamentos están soldados en la mitad inferior, a veces presentando un pistilo no fértil. El pedicelo de la flor mide 0,5 mm; el estilete tiene 1,8 mm de longitud; el ovario es súper, rudimentario y cilíndrico con 0,2 x 0,4 mm, bilocular con cerca de cuatro óvulos y se distribuyen a los pares en los lóculos. El disco nectario es redondeado y el fruto es del tipo alargado lineal (Andrade & da Costa, 2012).

2.2.4. Composición química del aceite de *Mansoa standleyi*

María das G.B. Zoghbi *et al.*, 2014 determinó la presencia de diallil sulfuro, metil allil disulfuro, 1-octeno-3-ol, 3 octanona, di allil propil disulfuro, diallil disulfuro, cis-diproponil disulfuro, trans- diporponil disulfuro, allil methyl trisulfuro, 3-vinil-1,2 diti-5 n, metil salicilato, 3-vinil-1,2-diti-4 n, propenil propil trisulfuro, diallil trisulfuro, diallil tetrasulfuro; la composición de la hoja y del tallo se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2 Componentes identificados en aceites de varias partes de *M. standleyi*

| Componentes | Aceite de Hoja | Aceite de tallo | Aceite de Raíz | Aceite de zarcillo | Aceite de semilla | Aceite de la pulpa del fruto |
|------------------------------|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-------------------|------------------------------|
| sulfuro de diallilo | 0,9 | 0,8 | 0,1 | 0,8 | 0,3 | 0,5 |
| metil allil disulfuro | 0,7 | 0,4 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 0,3 |
| 1-octeno-3-ol | 3,5 | 0,1 | 4 | 0,4 | - | - |
| diallil propil disulfuro | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | - |
| diallil disulfuro | 60,2 | 60,2 | 51,1 | 55,9 | 78,1 | 70,2 |
| cis-dipropenil disulfuro | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | - |
| trans-dipropenil disulfuro | 0,3 | - | 0,1 | 0,3 | - | - |
| 3-vinil-1,2-diti-5-n | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 1,2 | 0,2 | 0,4 |
| metil salicilato | 0,1 | - | - | 0,1 | - | - |
| 3-vinil-1,2-diti-4-n | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 0,6 | 0,8 |
| propenil propil tridisulfuro | 0,2 | - | 0,1 | - | - | - |
| diallil trisulfuro | 29,7 | 29,8 | 34,5 | 32,7 | 14,8 | 24,2 |
| diallil tetrasulfuro | 4,2 | 4,3 | 2,7 | 3,6 | 1,7 | 2,1 |

Fuente: Zoghbi *et al.*, (2014)

2.2.5. Aliina o sulfóxido de s-alil-cisteína (aminoácido azufrado)

La aliina es una sustancia inodora e inestable, a bajas temperaturas se mantiene inalterable, mientras que la planta o bulbo que la contenga si es machacado o triturado, se transforma en alicina y otros compuestos azufrados (tiosulfatos), por la acción de la enzima alinasa; esta actividad se la puede observar en la Figura 3. Estos últimos son muy inestables y se transforman con extrema rapidez en otros compuestos órgano sulfurados: sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo (mayoritario en la esencia de ajo), trisulfuro de dialilo y ajoenos, todos ellos solubles en medio oleoso. Se considera que 1 mg de aliina equivale a 0,45 mg de alicina (Luengo 2007).

La alicina es muy reactiva y produce derivados químicos como los ajoenos y las ditiinas (Santoyo, 2004)

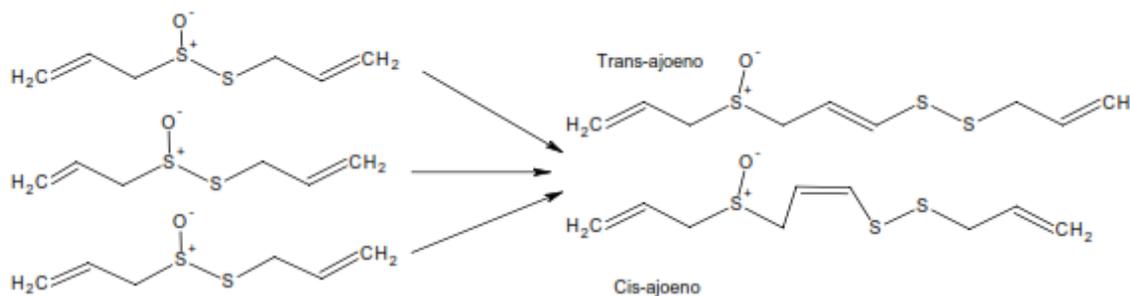


Figura 3 Descomposición de la alicina en ajoenos

Fuente: Santoyo (2004)

2.2.6. Alicina

La alicina cuya fórmula molecular es $C_6H_{10}OS_2$ y su peso molecular de 162.27 g/mol, es un líquido de color amarillo con una densidad de 1,112 g/ml e índice de refracción de 1,561 a 20°C; posee un pH cercano a 6,5, y es soluble en agua, en alcohol, éter y benceno. Es muy inestable en álcali caliente, pero muy estable en ácidos (López, 2007).

Las hojas y flores contienen esteroides de acción antiinflamatoria y antibacteriana, beta-sitosterol, estigmasteriol, ducosterol y fucosterol (Technical Data Report, 2006). También están presentes otras sustancias químicas como los carbohidratos, proteínas, alcaloides, falvonas, saponinas, naftoquinonas derivadas del Lapachol, vitamina C, E y minerales como el Selenio y el Cromo. (Calero, 2012)

2.2.7. Actividad biológica de los compuestos azufrados

Aliina: Hipotensora, hipoglucemiante

Ajoeno: Previene la formación de coágulos y ayuda a disolverlos. Antiinflamatorio, vasodilatador, hipotensor y antibiótico.

Alicina y tiosulfatos: Antibiótica, antifúngica, antiviral.

Alil mercaptano: Hipocolesterolemiante, previene la arterosclerosis, antitumoral, antidiabética e hipotensora.

Sulfuro dialilo y afines: Hipocolesterolemiante, aumento de la producción de enzimas desintoxicantes, anticancerígeno y previene daños químicos del DNA.

S-alil-cisteina y compuestos al γ -glutámico: Hipocolesterolemiante, antioxidante, quimio protectora contra el cáncer. Favorece la acción desintoxicante del hígado frente a sustancias químicas. (García *et al.*, 2000)

2.3. Extracción de componentes bioactivos

La extracción de componente bioactivos de las plantas es un proceso que se utiliza desde la antigüedad y que ahora es aprovechada en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos. Los métodos tradicionales tales como la extracción con disolventes como la maceración, obtención de aceite esencial por destilación con arrastre de vapor la que se puede realizar con alta presión hidrostática elevada y a contracorriente (Corrales *et al.*, 2009; Loginova *et al.*, 2011) las mismas se caracterizan por el empleo de gran cantidad del solvente, actualmente se aplican nuevos métodos de extracción como la extracción asistida por ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción acelerada con microondas. (Belova *et al.*, 2009; Reverchon & De Marco, 2006; Chan *et al.*, 2011)

2.3.1. Maceración

En este proceso de extracción influyen aspectos tales como naturaleza de la planta, tamaño de la partícula, humedad y las características del solvente utilizado para la extracción. Existen dos tipos de extracción la estática y la dinámica; en la estática se deja en reposo el material en estudio por un período determinado de tiempo mientras que en la dinámica se somete a movimientos constantes. (Sharapin, 2000)

2.3.2. Destilación por arrastre de vapor

Es un método utilizado para separar sustancias orgánicas que se encuentran presentes en las plantas aromáticas y cuyas moléculas son volátiles, se aplica el punto de ebullición alto y la presión de vapor baja. Generalmente esta técnica es empleada para extraer la mayoría de los aceites esenciales, en la misma se obtiene una mezcla de dos líquidos que no son solubles entre si y consiste en una vaporización a una temperatura que es menor a la de ebullición de cada uno de sus componentes volátiles por efecto de una corriente directa de agua fría, la misma que ejerce doble función la de ingresar al sistema para calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y a la vez proporciona tensión de capor al de los compuestos volátiles del aceite esencial; los vapores una vez que salen atraviesan por la cámara extractora y se enfrían en el condensador de vapor donde vuelven a adquirir su fase líquida, los dos productos que se obtienen el agua y el aceite luego son separados en un embudo de decantación (Bandoni, 2000).

2.3.3. Cromatografía de capa fina

Se basa en el reparto de dos sustancias en donde la fase estacionaria es un sólido adsorbente (silica gel) y la fase móvil es inerte con la estacionaria de tal manera que las moléculas fluyen por capilaridad. (Suárez, 2015) La relación entre la distancia recorrida por el compuesto de análisis y el disolvente desde el origen del cromatograma se lo conoce como factor de retención; hay que recalcar que cada compuesto tiene un valor constante lo que permite identificarlo a través de la bibliografía.

2.3.4. Extracción asistida por ultrasonido

El ultrasonido (US) se basa en el fenómeno de la cavitación que se da por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de las burbujas es de unos microsegundos, su implosión violenta genera, de manera localizada y transitoria (Arora *et al.*, 2004; Ashokkumar *et al.*, 2007) Las partículas sólidas y líquidas del medio vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. El uso en la extracción de productos naturales se debe a la propagación de la onda de presión ultrasónica a través del disolvente, lo que genera la cavitación, así como efectos térmicos y mecánicos, esto mejora la eficacia de la extracción. Debido al espacio limitado en el envase que lo contiene, la mayoría de las burbujas que se forman colapsan de forma asimétrica lo que genera intensas turbulencias y un aumento de circulación de la corriente líquida. La cavitación también erosiona la superficie del material vegetal y provoca la ruptura de las partículas en la superficie erosionada. (Vinator *et al.*, 2001)

Para lograr una mayor extracción de los metabolitos secundarios de una especie vegetal se debe utilizar una cantidad de energía ultrasónica que favorezca este proceso. Por ello la frecuencia, el tiempo y la intensidad de la radiación ultrasónica son parámetros que siempre deben ser evaluados en cada estudio de extracción. (Zalua *et al.*, 2014). Para la extracción de principios activos asistida por ultrasonido, se emplean temperaturas inferiores a los métodos tradicionales. Es así como para la extracción de ácido tartárico y málico de semillas de uva se ha realizado en el intervalo de 25 a 50°C (Palma & Barroso, 2002) Las propiedades químicas del disolvente, su concentración y la relación soluto-disolvente, que normalmente es conocida en productos naturales como una relación droga-menstruo, son aspectos esenciales para lograr una extracción eficiente. En general, la intensidad de la cavitación es mejor y aumenta cuando se utilizan disolventes de baja tensión superficial, presión de vapor y viscosidad (Slater *et al.*, 2010; Azuola & Vargas, 2007; Wu *et al.*, 2010)

2.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales, también conocidos como esencias, aceites volátiles, aceites etéricos o aetheroleum, son productos naturales formados por varios compuestos volátiles (Sangwan *et al.*, 2001). Según la Organización Internacional Normativa de Aceites Esenciales (ISO 9235 2013) definen como aceite esencial al producto obtenido a partir de materia prima vegetal por hidrodestilación, destilación a vapor o destilación seca o por un proceso mecánico para la obtención de un producto. Los aceites esenciales son los productos que resultan del metabolismo de las plantas aromáticas, desde el punto de vista fisiológico actúan como reguladores del agua en la planta lo que evita la deshidratación de la misma; esto explicaría la variación en la concentración de los aceites durante un ciclo fenológico; se caracterizan principalmente por ser sustancias de origen natural y que poseen un olor característico además de ser muy volátiles (Palá P. *et al.*, 2001). Los aceites esenciales están formados por una mezcla de al menos 20 a 60 compuestos entre los que encontramos a los alcoholes, ésteres, aldehídos, fenoles, cetonas, hidrocarburos y ácidos (Bruneton, 2001). Los aceites esenciales difieren de los aceites fijos o aceites grasos, tanto en propiedades químicas como físicas. Los aceites grasos contienen glicéridos de ácidos grasos y dejan una mancha permanente en el papel de filtro, mientras que los aceites esenciales contienen compuestos volátiles y desaparecen rápidamente sin dejar ninguna mancha. (Trampe y Morales, 2017) Basándose en su origen biosintético los metabolitos secundarios pueden ser divididos en tres grandes grupos como son los flavonoides y compuestos polifenólicos; los terpenoides y alcaloides dentro de los cuales encontramos a los compuestos nitrogenados y sulfurados. (Rodríguez, 2010). De acuerdo a la definición anterior esto suele excluir otros productos tales como aromáticos/volátiles obtenidos por diferentes técnicas como la extracción con disolventes, extracción de fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas. Los flavonoides poseen una estructura química de dos o más anillos aromáticos, cada uno con uno o más grupos hidroxilos ligados por un puente de carbono y entre ellos podemos encontrar a las flavonas, flavonoides, isoflavonas (Han *et al.*, 2007). Los polifenoles son los metabolitos secundarios producidos por las plantas en respuesta a la radiación UV, al ataque de insectos y organismos patógenos, así como para atraer polinizadores (Manach *et al.*, 2004). Los tiosulfinatos son compuestos organosulfurados y consisten en dos átomos de azufre ligados a una molécula de oxígeno, son compuestos altamente reactivos y se transforman en sustancias derivadas de la degradación (Benkeblia & Lanzotti, 2007). El ajo, la cebolla y otros vegetales de la especie *Allium* son fuentes ricas en tiosulfinatos. Diversos

estudios llevados a cabo con estos vegetales han demostrado sus diversos efectos antimicrobianos, farmacológicos, antioxidante, antitumoral, antifúngico, antiviral y antiasmático (Lanzotti, 2006)

2.4.1. Principales usos de los aceites esenciales

La eficacia de los aceites esenciales y sus constituyentes varía según el perfil fitoquímico del extracto vegetal y el objetivo entomológico. La gran mayoría suelen reportar respuesta en insecto blanco, ejerciendo efectos insecticidas o reducción e interrupción en el crecimiento de los insectos en varias etapas de la vida, la mayoría de los estudios relacionados muestra efectos inmediatos (toxicidad aguda o repelencia) de los aceites esenciales sobre un número de artrópodos, frecuentemente sobre la base de ensayos que duran menos de 48 h. (Trampe y Morales, 2017). Como ejemplo de las plantas y partes utilizadas se pueden mencionar los estudios realizados por Liang *et al.*, (2017) con la *Artemisa dubia* la parte utilizada las flores como insecticida natural contra el *Tribolium castaneum* y *Liposcelis bostrychophila*. Guo en el 2017 realizó un estudio en la *Juniperus formosana* la parte utilizada las hojas como insecticida y repelente contra *Tribolium castaneum* y *Liposcelis bostrychophila*; también hay estudios de Feitosa-Alcantara (2017) en donde utilizo las hojas de la *H. pectinata* con la posibilidad de uso como nuevo insecticida contra la *Atta texdens* y *rubropilosa Forel*. Tabari M.A. (2017) determinó la capacidad de control de plagas del fruto *Allium sativum*; Tabari M.A. (2017) también realizó un estudio sobre la capacidad repelente de mosquitos y larvicida de la *Pelargonium roseum* utilizando las hojas frescas contra el *Culex pipiens*; Oliveira B.M (2017) realizó un estudio de la capacidad insecticida de las hojas de la *Aristolochia trilobata* contra el *Atta texdens* y *Acromyrmex balzani* esto por mencionar unos pocos estudios que se han realizado con aceites esenciales. Una de las grandes desventajas de los aceites esenciales, es que en su gran mayoría se desconoce su modo de acción, existe una gran cantidad de bioensayos realizados que ayudan a conocer en qué etapa del insecto que es utilizando como blanco objeto de estudio y los mismos suelen tener efectos, pero se desconoce su forma de acción (Liao *et al.*, 2016)

2.4.2. Forma de acción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales suelen penetrar combinados y aumentar la biodisponibilidad. La mayor propiedad relacionada es que disrumpe la bicapa lipídica de las células. Algunos tienen forma de acción específicos que los convierten en buenos sinergistas, los derivados

semisintéticos tienen un factor sinérgico de dos a seis veces cuando se combinan con Insecticidas botánicos (Belzile *et al.*, 2000), pero las piperamidas tienen un notable factor de sinergia de 11 cuando se combinan con piretrina tienen profundos efectos sobre el transcriptoma del citocromo P450 (Jensen *et al.*, 2006). Los monoterpenos acíclicos o monocíclicos son moléculas volátiles pequeñas, por lo tanto, están implicados en la transmisión de señales aerotransportadas desde las plantas hasta los insectos (Lichtenthaler HK. 1999). Priestley *et al.*, (2003) en su estudio demostró que varios monoterpenos son neurotóxicos para los insectos. Algunos receptores descritos son las neuronas GABA-gated y GABA asociados a canales de cloro, los cuales suelen alterar la sinapsis de GABA Un ejemplo de esto es el eugenol actúa a través del sistema octopaminérgico activando receptores para la octopamina, que es un neuromodulador (Enan E.E., 2005). Algunos otros monoterpenos actúan sobre la acetilcolinesterasa inhibiéndola, perturbando así más eficazmente la actividad celular y los procesos biológicos de los insectos. (Millsetal *et al.*, 2016).

2.5. Radicales libres y estrés oxidativo

De acuerdo a Atrous *et al.*, (2015) y Starlin & Gopalakrishnan (2013) los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados los cuales son muy inestables y tienen la capacidad de reaccionar con otras moléculas. Derivan de tres elementos básicos como Oxígenos, nitrógenos y azufre, creando de esta manera especies reactivas de oxígeno conocidas como ROS; especies reactivas de nitrógenos conocidas como RNS y especies reactivas de azufre RSS. Carochó & Ferreira (2013) y El-Bahr (2013); realizaron una descripción de la composición de ROS e indican que estos incluyen los radicales libres como el anión superóxido (O_2^-), radical superhidróxido (HO_2), radical hidróxilo (OH) el radical de óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); el oxígeno molecular (O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito (ONOO). Los RNS en cambio derivan de NO por reacción con O_2 y la formación de ONOO⁻. Los RSS se forman fácilmente a partir de la reacción de ROS con los tioles.

2.6. Polifenoles

En la naturaleza existen muchos compuestos que presentan una estructura molecular la misma que se caracteriza por la presencia de anillos fenólicos; estos compuestos se llaman polifenoles y se originan en las plantas las mismas que sintetizan una gran cantidad como parte de sus metabolismos secundario. Algunos polifenoles son parte de las funciones

fisiológicas de las plantas; otros los utilizan como un mecanismo de defensa. (Quiñones & Aleixandre 2012) Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico) estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. (Quiñones & Aleixandre 2012) El proceso de biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de la planta tiene lugar a través de dos rutas primarias: la del ácido shiquímico y la de los poliacetatos (Bravo, L 1998). La ruta del ácido shiquímico depende de la luz. La condensación de dos productos fotosintéticos como la eritros-4fosfato (que se origina en la vía de las pentosas fosfato) y el fosfoenolpiruvato (originario de la glucólisis) se inicia en los plastos; luego de las modificaciones se obtiene el ácido shiquímico del que derivan algunos fenoles. (Quiñones & Aleixandre 2012). La vía del ácido shiquímico continúa con la adición de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato lo que da lugar a la fenilalanina, el cual es un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina forma parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, la que cataliza la acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente este ácido se transforma en ácido *p*-cumárico por que se incorpora un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La coenzima A (CoA) la CoA-ligasa, transforma el ácido *p*-cumárico en *p*-cumaroilCoA, que es conocido como un precursor activo de la mayoría de fenoles de origen vegetal. (Quiñones & Aleixandre 2012) La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA y luego de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Luego de una reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos y por ciclación posterior se forma una gran variedad de compuestos aromáticos. (Quiñones & Aleixandre 2012) En la Figura 4 podemos entender mejor el esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en plantas CoA= Coenzima A.

2.6.1. Propiedades de los polifenoles

Efectos Vasodilatadores: Estudios realizados en ratas demostraron que los compuestos polifenólicos presentes en el vino tinto inducen una relajación del endotelio-dependiente. (Pérez *et al.*, 2006; Zenebe & Pechánova, 2003)

Efecto antilipémico y antiterogénico: Tiene la propiedad de mejorar el perfil lipídico, de este modo puede prevenir el desarrollo y aparición de la arterosclerosis. (Aviram *et al.*, 1994)

Efecto antitrombótico: De Gaetano *et al.*, 2002 en su estudio demostraron que el efecto antiagregante puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular.

Efecto antiinflamatorio: Se han realizado diversos estudios que implican a las células y a las moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica en el proceso de la lesión vascular asociado a la arterosclerosis. (Hansson & Hermansson, 2011; Crescente *et al.*, 2009).

Efecto apoptótico y antipoptótico: La apoptosis o muerte celular programada es una forma conocida de suicidio celular que esta genéticamente definida y que tiene lugar de forma fisiológica durante la morfogénesis y la renovación tisular. Las células en proceso de apoptosis reducen su tamaño y fragmentan el tejido genético. (Alves & Checler 2001; Erusalimsky JD 2009)

2.6.2. Métodos para determinar polifenoles

Los métodos que existen son cualitativos y cuantitativos.

2.6.2.1. Cualitativos

Perfil biodimensional de los polifenoles: Es realizado por cromatografía bidimensional en capa delgada de celulosa de acuerdo a la metodología estandarizada (Markham, K.R. 1982)

Análisis de flavonoides y ácidos hidroxinámicos: Se emplea el sistema de solventes TBA (terbutanol- ácido acético-agua 3:1:1) para la primera dimensión y ácido acético para la segunda dimensión Wagner & Bladt, 1996)

Proantocianidinas: Se realiza por cromatografía bidimensional empelando como solventes secBAA (butanol secundario-ácido acético-agua, 6:1:2) para la primera dimensión y ácido acético al 6% para la segunda dimensión (Markham, K.R 1982)

2.6.2.2. Cuantitativos

Cuantificación de fenoles totales: Ricco & Wagner (2015) establecieron en su estudio que estos análisis permiten cuantificar el contenido de hidroxilos fenólicos presentes en el material a analizar (extractos), independientemente de la naturaleza de cada componente. Los métodos más utilizados son los de Método de Fohlin Ciocalteu y el Método de Price y Butler

Método de Fohlin Ciocalteu: El ión fenolato es oxidado mientras que el reactivo es reducido, formando un complejo color azul (cromóforo) (Quiñones & Alexandre 2012).

Método de Price y Butler: El ion fenolato es oxidado mientras que el ión férrico es reducido a ión ferroso, que se detecta mediante la formación de un complejo azul con el reactivo ferricianuro de potasio, el que se conoce como azul de Prusia. (Quiñones & Aleixandre 2012)

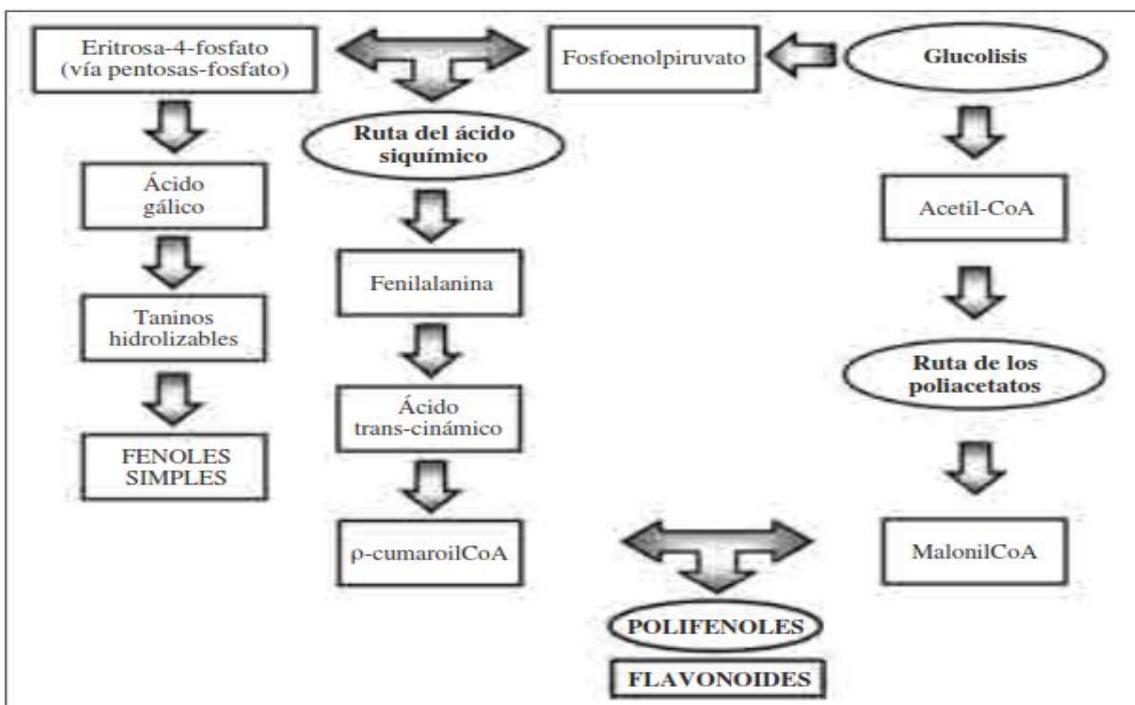


Figura 4 Ruta biosintética de los polifenoles en plantas

Fuente: Quiñones & Aleixandre (2012)

2.7. Enfermedades transmitidas por vectores

Las principales enfermedades humanas transmitidas por vectores son el paludismo, el dengue, la filariasis linfática, la enfermedad de Chagas, oncocercosis, leishmaniasis, fiebre chikunguña, enfermedad por el virus de Zika, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y la esquistosomiasis. Desde 2014 se han producido grandes brotes de dengue, paludismo, fiebre chikunguña, fiebre amarilla y enfermedad por el virus de Zika a nivel mundial. (OMS, 2017)

Las principales enfermedades transmitidas por vectores representan alrededor del 17% de la carga mundial estimada de enfermedades transmisibles y causan más de 700.000 muertes al año. Las zonas tropicales y subtropicales son las más afectadas. Más del 80% de la población mundial vive en zonas en las que hay riesgo de contraer al menos una de las principales enfermedades transmitidas por vectores. El riesgo de infección es particularmente elevado en pueblos y ciudades, donde los mosquitos *Aedes* y *Culex* proliferan gracias a un hábitat

favorable y donde hay mucho contacto con los seres humanos. (Minai & Ohta, 2003)

De acuerdo al Servicio Nacional de control de enfermedades transmitidas por vectores artrópodos (SNEM, 2017) las enfermedades de mayor prevalencia en la provincia de Pastaza eran Dengue, Paludismo, y Fiebre amarilla cuyo agente transmisor es el mosquito adicionalmente se presentan casos de Leishmaniasis y Chagas.

Mosquitos. Orden Díptera: Culicidae

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) a la cual pertenecen los comúnmente denominados zancudos o mosquitos y cuenta con 42 géneros y 3477 especies en el mundo; 131 de estas especies pertenecen a los géneros: *Anopheles*, *Aedes psorophora* y *Culex* (Badii, 2006); son considerados como vectores importantes de la emergencia y re-emergencia de enfermedades de importancia mundial como la fiebre amarilla, zika, paludismo, dengue, encefalitis equina el virus del Nilo Oriental. (Navarro *et al.*, 2015)

Como podemos observar en la Figura 5 poseen una Proboscide larga, los machos tienen antenas plumosas, presentan ausencia de ocelos, sus alas son alargadas con escamas a lo largo de las venas marginales, la vena subcostal (SC) se encuentran bien desarrollada la misma que finaliza más allá de la parte media del ala, la vena RS posee tres escamas y finalmente la vena C se proyecta cerca del ápice (Gualdrón L. J., 2007).

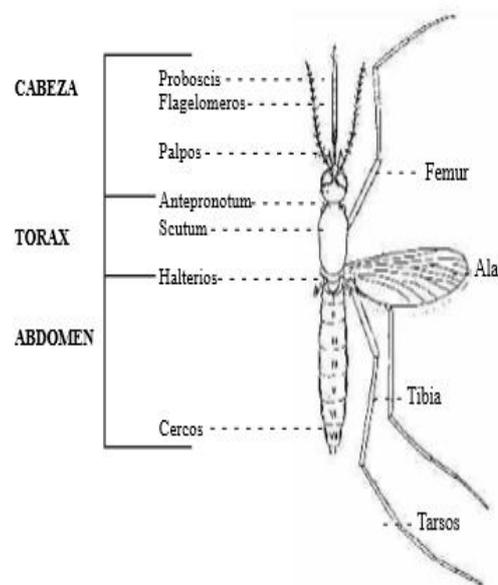


Figura 5 Esquema del mosquito con sus principales apéndices

Fuente Gualdrón L. J., 2007

Las hembras son hematófagas y es necesaria la hematofagia para realizar la ovipostura de huevos; sus hábitos de alimentación son diurnos, generalmente en cercanía a los domicilios de los humanos, con gran afinidad a realizar la alimentación sobre el hombre, los machos se alimentan del néctar de las flores (Salvatella, 2009). Los estados inmaduros se desarrollan preferiblemente en depósitos de agua y los criaderos son variados, constituidos por agua con un alto grado de materia orgánica, con detritos en proceso de fermentación, en ambientes sombreados, cercanos a los lugares de descanso del hombre. (Brewer *et al.*, 1987)

2.7.1. Ubicación taxonómica

La ubicación taxonómica se la puede apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3 Jerarquía taxonómica del *Culex*

| | |
|------------|------------------|
| ORDEN | <i>Diptera</i> |
| FAMILIA | <i>Culicidae</i> |
| SUBFAMILIA | <i>Culicinae</i> |
| TRIBU | <i>Culicini</i> |
| GÉNERO | <i>Culex</i> |

Fuente: Gualdrón L. J., 2007

2.7.2. Distribución geográfica del mosquito

La distribución de los culícidos y el desarrollo de las arbovirosis están influenciadas por temperatura, lluvia, condiciones geográficas, humedad, topografía, huéspedes, reservorios los que son factores determinantes para la distribución de *Culex spp.* Los mismos que pueden influir en la capacidad de los mosquitos para transmitir arbovirus (Fernández *et al.*, 2013; Guhl *et al.*, 2007; Lira-Noriega & Peterson, 2014). Algunas especies invernan en la etapa de huevo, los mismos que fueron depositados por la última generación de adultos de la temporada, o como hembras adultas ya apareadas que pasan el invierno en sitios protegidos (Rey, 2001).

De acuerdo a la Gaceta del Ministerio de Salud del Ecuador publicado de la Semana epidemiológica 45 el año 2015 fue un año epidémico a causa del dengue, luego se ha presentado un decremento de los casos reportados, las provincias en donde se presenta mayor incidencia de casos confirmados hasta la fecha son Manabí, Guayas, Santo Domingo, el Oro, Los Ríos y Orellana donde se concentran el 89,99% de los casos (Gaceta epidemiológica del Ministerio de Salud Pública Sive Alerta, 2017).

2.7.3. Ciclo biológico del mosquito

El mosquito durante su desarrollo pasa sucesivamente por las siguientes fases: huevo, larva, pupa e insecto adulto este proceso recibe el nombre de ciclo de vida (Gualdrón L. J., 2007).

2.7.3.1. Huevos



Figura 6 Huevos de mosquito

Fuente Kauffman et al., 2017

Después de la copulación y de haberse alimentado la hembra suele reposar en lugares tranquilos preferiblemente en rincones libres de luz donde tenga un fácil acceso a fuentes de agua para colocar sus huevos en llamados paquetes o balsas de 100 a 200 huevos los mismos que son fecundados durante la postura, para lo cual puede hacer posturas parciales, dando origen a varios focos de infección (Gualdrón L. J., 2007). Tras la postura los huevos flotan en el agua y forman una especie de balsa que los mantiene unidos sobre la superficie. Son de contorno oval, elíptico y alargado dotados de simetría bilateral. Presentan una capa que se denomina exocórrion, que le da protección al huevo frente al medio ambiente (McGavin 2002) Estos paquetes tienen de 3 a 5 mm de largo de 2 a 3 días para lo cual necesitan mucha humedad cerca. En épocas tropicales, el período de incubación, o desarrollo del embrión, es corto, generalmente dos o tres días, pero puede prolongarse hasta por más de 5 días si la temperatura es baja. Se puede observar en la Figura 6 que son pequeños, oscuros y difícilmente visibles, resisten la desecación por muchos meses (hasta 2 años) Cuando el huevo desecado es mojado la acción bacteriana de la materia orgánica contenida en el agua disminuye la tensión de oxígeno y proporciona el estímulo necesario para que se produzca la eclosión (Nelson, 1986; Gualdrón L. J., 2007).

2.7.3.2. Larvas



Figura 7 Larva de mosquito.

Fuente: Rey, 2001

Luego de eclosionar, la larva del mosquito pasa por varias etapas de crecimiento mientras se alimenta continuamente y se transformará en un insecto que pasa de su forma natatoria acuática, a una volante terrestre. Debido a que las larvas están cubiertas con una dura cutícula protectora, necesitan pasar por una serie de mudas para poder crecer (Rey, 2001). Tiene el cuerpo alargado, dividido en 3 partes (Cabeza, Tórax y abdomen) lo cual se puede apreciar en la figura 7. La larva necesita pasar por 4 fases, cada una de éstas es mayor que la que le precede (I, II, III, IV). El pasar del periodo de larva I a Larva IV estadio, toma aproximadamente 5- 7 días a una temperatura que oscilan entre 25 y 30°C, a medida que crecen cambian de piel. Las larvas se alimentan de detritus orgánicos suspendidos en el agua (Gualdrón L. J., 2007).

2.7.3.3. Pupa

Transcurrido el estadio cuarto el desarrollo del mosquito adulto comienza, para esta fase tiene el cuerpo dividido en dos partes: céfalo-tórax y el abdomen, en el dorso del cefalotórax se encuentran los dos (2) tubos respiratorios pequeños y gruesos, en esta fase tiene forma de coma como se observa en la figura 8, poseen movimientos que se pueden manifestar por saltos y una locomoción lenta, el abdomen es un poco curvo y está separado del céfalo-tórax. En esta fase no se alimentan y el proceso dura aproximadamente 2 días a una temperatura entre 25 y 39°C (Gualdrón L. J., 2007).



Figura 8 Pupa de mosquito

Fuente: Rey, 2001

2.7.3.4. Adulto

Generalmente el mosquito macho suele emerger primero, y se queda cerca del sitio de crianza esperando a que las hembras salgan. En promedio, los mosquitos hembra viven de 3-6 semanas, pero pueden vivir hasta 5 meses; la vida de los machos es mucho más corta.

En regiones de clima tropical, los mosquitos adultos se mantienen activos durante todo el año, sin embargo, en otros sitios la actividad cesa cuando la temperatura disminuye a menos de 60°F (Rey, 2001). Generalmente el modo de posar es en forma paralela a la superficie también lo puede hacer en las paredes, muebles y en los objetos colgantes como la ropa. El mosquito en esta etapa posee un período de vida de 3 a 8 semanas. El tiempo de evolución de huevo a adulto dependen de las condiciones de temperatura y la alimentación de la larva; podemos observar en la figura 9 como se produce este proceso; el mismo que puede oscilar entre los 12 a 15 días (Gualdrón L. J., 2007).

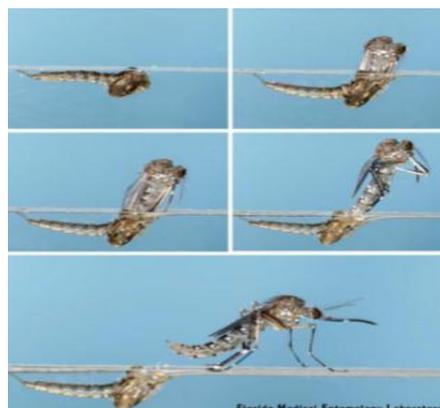


Figura 9 Emergencia del mosquito adulto

Fuente: Rey, 2001

2.7.4. Control de vectores

Los métodos para el control de vectores son químicos, biológicos y botánicos (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2017).

2.7.4.1. Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos se clasifican de acuerdo a su toxicidad, naturaleza química y según su función.

2.7.4.1.1. Según toxicidad

Para su clasificación se tiene en cuenta la dosis letal 50 (DL50), la cual se define como la cantidad de una sustancia que al ser suministrada a animales de experimentación mata al 50% de esa población (Eddleston *et al.*, 2005).

2.7.4.1.2. Según su naturaleza química

La clasificación de los plaguicidas según su origen químico y sus características y pueden ser de origen natural, hasta totalmente sintéticos. Entre estos tenemos: Inorgánicos, vegetales extraídos de diversas partes de vegetales, Organosintéticos y microorganismos vivos. (Fernández & Fernández, 2010)

Inorgánicos: Fabricados a partir de metales como cobre, plomo, arsénico

Vegetales Extraídos De Diversas Partes De Vegetales, como las piretrinas

Organosintéticos: Sintetizados por el hombre en el laboratorio (organoclorados, organofosforados, carbamatos)

Microorganismos: Vivos Virus, bacterias y hongos utilizados en el control biológico de plagas

2.7.4.1.3. Según su función

Pueden ser insecticidas, fungicidas, herbicidas y rodenticidas (Guidelines for Legislation on the Control of Pesticides Food and Agriculture Organization of the United Nations.,1989.).

2.7.4.1.3.1. Insecticidas

Organoclorados: endrín, aldrín, DDT, lindano, toxafeno

Organofosforados: paratión, clorpyrifos, diazinon, diclorvos, malation, dimetoato

Carbamatos: aldicarb, carbofuran, propoxur, car-baril.

Piretrinas y piretroides:resmetrina, bioresmetrina, aletrina, decametrina, permetrina.

Otros: Ivermectina.

2.7.4.1.3.2. Fungicidas

Sales de cobre: oxiclورو de cobre y sulfato de cobre.

Derivados de la ftalimida: captafol

Dinitrofenoles: dinitro-orto-cresol

Dithiocarbamatos: maneb, zineb, mancozeb.

2.7.4.1.3.3. Herbicidas:

Bipiridilos: paraquat, diquat Glifosato

2.7.4.1.3.4. Inorgánicos:

Sulfato de tálio, anhídrido arsenioso, fosfuro de aluminio, fosfuro de zinc.

2.8. Mecanismo de acción de los organofosforados

Los organofosforados desarrollan su toxicidad a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas. Los pesticidas organofosforados reaccionan con la zona esterásica de la enzima colinesterasa formando una unión estable que, si no se rompe mediante el tratamiento, se hace irreversible, quedando la enzima inhabilitada para su función normal. La pérdida de la función enzimática permite la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuro efectoras causando efectos muscarínicos, en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos produciendo efectos nicotínicos y en el sistema nervioso central (SNC) (Eddleston *et al.*, 2004; Eldefrawi *et al.*, 1983).

2.8.1. Manifestaciones clínicas por intoxicación

Las intoxicaciones con compuestos organofosforados pueden generar tres cuadros clínicos: la intoxicación aguda, el síndrome intermedio y una neurotoxicidad tardía.

Intoxicación aguda genera un conjunto de signos y síntomas denominados síndrome colinérgico el cual se presenta como consecuencia de la excesiva estimulación de los receptores de acetilcolina, y que se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y excesiva actividad secretora. La aparición de este cuadro varía entre pocos minutos hasta doce horas posterior al contacto con el tóxico, dependiendo de la edad del paciente, la cantidad ingerida y la toxicidad intrínseca del organofosforado (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Universidad de Antioquia 2005) en los niños

los efectos nicotínicos se observan con mayor frecuencia que en los adultos (Opawoye & Haque T. 1998).

El síndrome intermedio aparece posterior a los efectos agudos, es decir 24 - 48 horas después de la exposición, pero antes que la neuropatía retardada; se caracteriza por debilidad de los músculos proximales de las extremidades, flexores del cuello, lengua, faringe y músculos respiratorios, con compromiso de la función respiratoria, disminución o ausencia de los reflejos miotendinosos y compromiso de pares craneales (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, 2005.) En Colombia se ha observado que los agentes más asociados a la aparición de este síndrome son el fentión, dimetoato, monocrotofos y metamidofos (Instituto Nacional de Salud Colombia- Subdirección de Vigilancia y Control. Intoxicación Aguda por Plaguicidas. Primer Semestre de 2007; Instituto Nacional de Salud - Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia, 2018)

La neurotoxicidad tardía se presenta principalmente con los compuestos que contienen flúor; puede iniciarse entre una a cuatro semanas después de la exposición aguda al tóxico. Dentro de los organofosforados que más se han asociado se encuentran el leptofox, mipafox, clorpirifox, triclorfón, fentión y diazinón. (Salvi *et al.*, 2003)

Todos estos plaguicidas son efectivos, pero su fabricación representa elevados costos, elevada actividad residual que significa daños al ambiente y a la salud de las personas, y los vectores están desarrollando tolerancia a estos productos. Esto está llevando a la búsqueda de alternativas eficaces que minimicen los efectos colaterales. (Salazar *et al.*, 2017).

2.9. Tratamientos botánicos

Conti *et al.*, (2010) en su estudio demostraron que el uso de insecticidas botánicos basados en aceites esenciales obtenidos de plantas es una alternativa muy beneficiosa debido a su efectividad, rápida degradación y pocos efectos adversos en el medio ambiente. Las especies con mayor actividad como biocidas son: *Allium sativum*, *Mansoa alliacea*, *Petiveria alliacea*, *Gallesia integrifolia*, *Capsicum annum* y *Chenopodium ambrosioides*. (Salazar *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2014).

Neem (*A. indica*) Es un árbol originario de la India el cual es reconocido por sus propiedades insecticidas; crecen en zonas tropicales y subtropicales de Asia, actualmente se cultiva en regiones cálidas de México. Son capaces de provocar diversos efectos en los insectos, tales como inapetencia, retraso del crecimiento, disminución de la capacidad de fecundación, trastornos en las fases de muda, defectos morfológicos y cambios de comportamiento

(Gajmer *et al.*, 2002; Banchio *et al.*, 2003; Wandscheer *et al.*, 2004).

Abdelouaheb *et al.*, (2009) llevo a cabo un estudio donde verificó que las concentraciones neem de 0,35 mg/L afectaron de manera significativa el desarrollo y la estabilidad de las larvas del género de los culícidos, también logro obtener la reducción de la fecundidad de las hembras y pocos adultos sobrevivieron, disminuyo la duración de los estadios larvales y el tiempo de desarrollo del insecto.

Ajo (*A. sativum*) La obtención de esencias y extractos del ajo da lugar a la obtención de la alicina la misma que tiene una vida media de horas hasta días en función del disolvente de extracción utilizado y del pH del medio, en condiciones ácidas la alinasa, enzima responsable de la formación de alicina se inactiva, en Asia Central, se ha encontrado que en el ajo existen diferentes compuestos que presentan efectos en la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antiasmática, fúngica y larvicida (Malkeja *et al.*, (1990); Nasir *et al.*, (2015) llevo a cabo un estudio en el que pudo determinar la inhibición larvicida y pupicida del mosquito.

Tabaco (*N. tabacum*) Es utilizado en diferentes partes del mundo ya que posee propiedades fungicida, insecticida y acaricida; las mismas que son atribuidas a su componente principal; la nicotina, dicho metabolito actúa de manera tóxica en el contacto e ingestión, también muestra afinidad por los receptores colinérgicos-nicotínicos, a los que estimula generando parálisis sostenida y muerte del vector. (Fuentes-Contreras *et al.*, 2007).

Eucalipto Tiene muchas propiedades benéficas para la salud humana y animal así como para el control de plagas debido en gran medida a sus principios activos entre los que se encuentran el eter óxido terpénico cineol o b-pineno, g-pineno, p-cimeno, camfeno, a-felandreno, b-felandreno, limoneno, mirceno, así como también hidrocarburos sesquiterpénicos (1% de aromadendrenos, b-cariofileno, a-gurjuneno), alcoholes monoterpénicos, sesquiterpénicos y aldehídos alifáticos (Alonso, 1997; Hmamouchi *et al.*, 1990)

Mansoae alliacea Posee propiedades antiinflamatorias y antibacterianas; le han podido determinar presencia de estigmasterol, β sitosterol, daucosterol y fucosterol. (Monserrate, 2014). Uno de los componentes sulfurados importantes es la Aliina que por oxidación enzimática se transforma en alicina, el cual es un producto intermedio en la formación de los derivados disulfurados de alilo constituyentes finales del aceite esencial; cuando es cortado o triturado libera una enzima llamada alinasa y esta enzima convierte a la aliina en alicina (Sánchez *et al.*, 2016), la misma que se encuentra presente en la *Mansoa*.

***Curcuma longa* (L)(Zingiberales: Zingiberaceae):** conocida vulgarmente como “yuquilla”

o raíz de madras. Nativa de las indias orientales. El rizoma contiene un aceite esencial rico en monoterpenos y sesquiterpenos a los que se le atribuyen propiedades anti escleróticas, diuréticas y antiinflamatorias. (Leyva *et al.*, 2008)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de biología y química ambiental de la Universidad Estatal Amazónica ubicada en el Km2 ½ vía Napo (paso lateral), en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza. Las condiciones ambientales que posee el Puyo son: Altitud de 954 m.s.n.m, sus coordenadas son 1°28'02"S 77°59'50"O, la humedad relativa que caracteriza a la zona es del 85%, su temperatura es de 25,9°C y la pluviosidad es de 45000 mm/año. El tiempo del estudio fue de 8 meses. Estas características se observan en la Figura 10.



Figura 10 Georreferenciación de Universidad Estatal Amazónica

3.2. Tipo de investigación

Para evaluar el efecto larvicida de extractos *Mansoa standleyi* sobre larvas de mosquito *Culex spp.* se utilizó la investigación experimental y de observación en condiciones de laboratorio. Se desarrollo en los laboratorios de Biología y de Química del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad Estatal Amazónica.

3.3. Métodos de investigación

Observación El estudio comenzó con la observación e identificación en el Estereomicroscopio de la larva objeto de estudio: la observación continua durante todo el tiempo que duro la inhibición larvaria.

Experimental Al producto de la destilación (hidrolato) se le realizo una cromatografía de capa fina para la identificación de la aliina. A los extractos acuosos, etéreo y etanólico se le realizo una determinación de polifenoles.

Medición. Durante todo el estudio se observaba de manera diaria para confirmar el comportamiento frente a los diferentes tratamientos analizando el comportamiento y realizando la lectura de la inhibición.

3.4. Material vegetal

3.4.1. Localización y muestreo

Se realizó un muestreo en una plantación privada en la parroquia Tarqui como se observa en la Figura 11, se seleccionaron plantas de tres años de edad, a fin de poder recabar suficiente material para la extracción. Se tomaron muestras compuestas de las partes aéreas (3 kg aproximadamente) a fin de analizar: extractos en diferentes solventes, aceite esencial y el hidrolato.

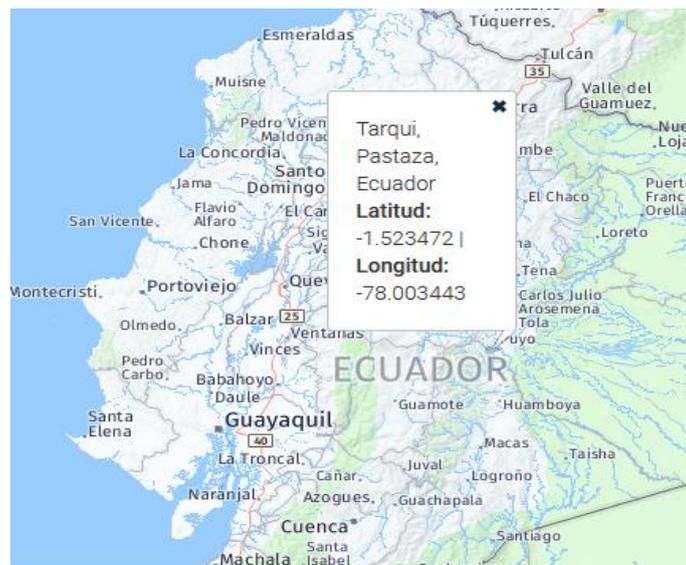


Figura 11 Georreferenciación de sitio de muestreo de planta

3.4.2. Clasificación taxonómica

Las partes aéreas de *M. standleyi* fueron recolectadas en la Parroquia Tarqui de la provincia de Pastaza, Ecuador. La identificación taxonómica fue realizada por el especialista, Dr. David Neill y un espécimen entregado al herbario ECUAMZ con la colección número David Neill 18407, una muestra se conserva para referencias futuras.

3.4.3. Obtención del aceite esencial de *Mansoa standleyi*

Un 1 kg de hojas frescas de *Mansoa standleyi* se sometió a destilación por arrastre de vapor con 4 litros de agua, durante ciento veinte minutos, para lo cual se utilizó el equipo extractor por arrastre con vapor de agua hecho de material de acero inoxidable del Laboratorio de Química de la Universidad Estatal Amazónica. El condensado fue recolectado en un embudo de decantación para separar el aceite de la fase acuosa o hidrolato, los mismos fueron almacenados en frasco ambar y almacenado a 4°C por separado, para luego evaluar su capacidad inhibitoria frente a las larvas. El mismo procedimiento se utilizó para 1 kg de tallo de *Mansoa standleyi*.

3.4.4. Determinación del rendimiento del aceite de *Mansoa standleyi*

Para la determinación del rendimiento se tomó en cuenta el peso total de la materia vegetal destilada y la cantidad de aceite esencial obtenido. El resultado fue obtenido aplicando la siguiente fórmula :

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M1}{M2} \times 100$$

M1 = Masa final del aceite

M2 = Masa inicial de la parte de la planta

100 = Factor matemático

3.4.5. Preparación de las concentraciones del aceite esencial y del hidrolato de *Mansoa standleyi*

Una vez obtenido el aceite se aplicó la metodología de Carlos Granados-Echegoyen *et al.*, (2014) para preparar la disolución del aceite esencial de la hoja de *M. standleyi* a partir de los 0,00649 ml y la disolución del aceite esencial del tallo de *M. standleyi* a partir de los 0,004787 ml de aceite obtenidos, este aceite se diluyó con 10 ml de agua destilada que contenía polisorbato 20 al 0,01%, el mismo que sirvió como emulsionante de la solución, se sometió a baño de ultrasonido por 30 minutos para facilitar la dilución del aceite, se obtuvo una concentración de 0,0649 % o 649 ppm para aceite de hoja y 0,0478 % o 478 ppm para aceite de tallo. A partir de esta disolución inicial tanto de hoja como de tallo se realizaron las siguientes diluciones de 400, 300, 200 y 100 ppm; las que se utilizaron para el bioensayo con larvas de *Culex* spp. del tercer y cuarto instar.

Para el hidrolato se aplicó la metodología de Carlos Granados-Echegoyen *et al.*, (2014) para preparar las diferentes concentraciones del hidrolato tanto de hoja como de tallo se tomaron 5 ml del material obtenido y se diluyó en 10 ml de agua destilada de esta concentración inicial del 50% de esta disolución inicial se realizaron las diluciones de 40%, 30% y 20% de, se utilizaron para el bioensayo larvas del tercer y cuarto instar.

3.4.6. Preparación de extractos crudos de *Mansoa standleyi*

El material vegetal se secó en una estufa de aire forzado a 35°C (hasta tener peso constante) luego se molió el material por separado en un molino y se almaceno la muestra para los análisis respectivos. Para preparar los extractos crudos se pesó 2 g de material seco molido de hoja como de tallo en forma separada y se le añadió 100 ml de los solventes objeto de estudio (agua destilada, etanol y éter de petróleo) en un Erlenmeyer. Cada uno de los extractos con sus respectivos solventes fueron sometidos a un baño de ultrasonido a 35°C por 30 minutos utilizando el equipo Bransonic ultrasonic Bath. Al utilizar este tipo de extracción se aprovecha la capacidad del disolvente de absorber y transmitir la energía de la onda ultrasónica, determina la eficiencia del proceso (Rodríguez *et al.*, 2014). Transcurrido el tiempo se realizó una filtración para separar el líquido del sólido utilizando papel filtro y se eliminó el remanente. El solvente obtenido fue removido del extracto utilizando un rotavapor con presión reducida del Laboratorio de Bromatología de la Universidad Estatal Amazónica, esto se realizó del solvente menos polar al más polar de acuerdo a su temperatura de ebullición. Este extracto foliar seco de etanol y éter de petróleo obtenido será diluido en

agua o en agua con polisorbato 20 al 0,01% y el extracto acuoso solo fue diluido con agua. Todos fueron llevados a baño de ultrasonido por 30 minutos a 35°C. El extracto fue almacenado en frasco ámbar a temperatura de refrigeración y este fue considerada la solución biocida inicial en ppm, a partir de la cual se realizaron las demás diluciones.

3.4.7. Identificación aliina: Cromatografía de capa fina

El hidrolato se analizó en el laboratorio de química de la Universidad Estatal Amazónica mediante cromatografía de capa fina, siguiendo la metodología de Kanaki & Rajani (2005); Sabha (2011), para lo cual se realizó la preparación de la capa móvil con etanol, ácido acético glacial y agua destilada en proporción de 2:1:1. Una vez que se saturó la cámara se procedió a realizar una línea base en la sílica gel a 1 cm de la base. En esta línea se colocaron aproximadamente 10 µl de la muestra, se esperó a que se seque y se la concentro hasta unas 3 veces. Una vez seca se procedió a colocarla en forma perpendicular en la cámara saturada y se la dejó hasta que el recorrido ascendiera hasta las 2/3 partes de la placa (aproximadamente 20 minutos). Transcurrido ese tiempo con ayuda de un atomizador se le aspergea ninhidrina y se deja secar en la estufa. Se tomó como referencia el Rf de la aliina ante la falta de un estándar.

Para calcular la Rf se aplicó la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

3.4.8. Determinación de Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu

Los extractos acuoso, etéreo y etanólico se analizaron cualitativamente en el laboratorio de química de la Universidad Estatal Amazónica, y se realizó la identificación de polifenoles en cada uno de los extractos, para lo cual se siguió la metodología de Radice *et al.*, (2017) se colocó en matraces aforados de 10 ml 40 µl de cada extracto y 0,1 ml del reactivo preparado de Folin- Ciocalteu se esperó 10 minutos y se añadió en cada envase 500 µl de carbonato de sodio, se cubrió con papel de aluminio sin obstaculizar la línea de enrase, luego se procedió a enrasar a 10 ml con agua destilada se procedió a homogenizar bien y se dejó en reposo por dos horas protegido de la luz, transcurrido ese tiempo se realizó la lectura espectrofotométrica a 765 nm de longitud de onda en el Espectrofotómetro marca Spectronic

tanto de extractos como de blanco por duplicado. Los resultados se expresaron en mg/L, a través de la expresión basada en el modelo de calibración de ácido gálico.

$$C = \frac{(A+0,0028)}{0,0734}$$

Dónde:

C = concentración en mg/L

A = absorbancia de las diluciones de la muestra

3.5. Actividad larvicida

3.5.1. Colección y mantenimiento de larvas

Para la colección de los individuos se siguió la metodología aplicada en de Lester & Pike (2003), un conjunto de trampas para postura (Ovitrampas) fueron utilizadas para la colección de dípteros. Cada frasco experimental (boca ancha de aproximadamente 500 ml) consto de una paleta de fibra prensada, colocada en posición vertical con el lado áspero expuesto. Las trampas de postura fueron colectadas en el transcurso de tres días posteriores a su colocación, al quinto día y luego de una semana, debido que el crecimiento está influenciado por las condiciones climáticas, al frasco se le coloco agua encontrada en el sitio del muestreo, suficiente (Salazar & Moncada, 2004) para facilitar la ovoposición, las tarrinas se colocaron en lugares tranquilos, sombreados, protegidos de la lluvia y animales. Las ovitrampas se instalaron tres veces en el año, considerando los meses en los que se hayan presentado más casos de enfermedades metaxénicas. Una vez colectadas las trampas, se colocaron a las larvas en un envase plástico para su posterior análisis taxonómico en laboratorio para ser separadas de acuerdo a su estadio larvario.

3.5.2. Identificación de las larvas

Las larvas obtenidas fueron llevadas al laboratorio Biología de la Universidad Estatal Amazónica y fueron mantenidas en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad en el laboratorio, se les proporciono comida para peces hasta que lleguen al tercer y cuarto

instar. Se realizó la identificación de las larvas obtenidas de acuerdo a las claves de WRBU website http://wrbu.org/mqID/mq_gnra/culex.htm (Walter Reed Biosystematics Unit, 2001) y Amy E. Snell (2005) y con ayuda del Estereomicroscopio electrónico; se analizaron las características referentes a la cabeza, tórax y sifón, así como la forma característica de respirar. Se determinó que los palpos maxilares fueran de menor tamaño que la proboscidea, las cerdas postespinales se encontraran ausentes; el halterio tenía forma de corazón y las pleuras torácicas fueran sin escamas blanquecinas .

Una vez identificadas las larvas, se las colocaron en un recipiente de plástico con aproximadamente 500 ml de agua, libre de cloro, con una temperatura controlada que se encuentre entre los 20 y 30°C, en un ambiente tranquilo, libre de luz y se les proporcionó alimento para peces para garantizar el desarrollo larvario. (Ventosilla et al, 2001, Rojas *et al.*, 2002). Esta actividad se realizó para garantizar el crecimiento hasta el tercer o cuarto instar larvario.

3.5.3. Actividad larvicida

La actividad larvicida se evaluó midiendo la mortalidad efectiva en el tercer y cuarto instar larvario del *Culex* spp. se determinó a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos, se siguió la metodología aplicada por Carlos Granados-Echegoyen *et al.*, (2014).

Para establecer el bioensayo se utilizaron grupos de 10 larvas las que fueron seleccionadas y colocadas en los tubos de ensayo con 20 ml de agua destilada con tween y 1 ml del tratamiento. Los bioensayos con varias concentraciones fueron realizados siguiendo la metodología descrita en World Health Organization. (1981); Álvarez-Londoño et al., (2013) se realizaron tres réplicas totalizando 90 larvas por tratamiento (esta actividad dependió en gran medida de las larvas vivas que se podían capturar en cada trampa y principalmente de las condiciones ambientales que predominaron durante este trabajo que en muchos casos alargó el proceso de captura de larvas. (Más, et al., 2009) para determinar mortalidad larval entre 50 y 95 %. Se llevo el control con agua destilada con tween 20 al 0,01% (Control Negativo) y otro temephos al 1 % (Control Positivo) (Álvarez-Londoño et al.,2013), esto se lo puede observar en la tabla 4. Se comparó el movimiento de la larva con el control negativo. Las larvas fueron consideradas muertas cuando se las tocaba y no mostraban movimiento alguno en respuesta al estímulo presentado.

Tabla 4 Diseño experimental para determinar de la Actividad Larvícida del Aceite esencial e Hidrolato

| TRATAMIENTO | CONCENTRACIÓN pmm | TRATAMIENTO | CONCENTRACIÓN % |
|-------------|----------------------|-------------|--------------------|
| T7 | 649 | T9 | 50 |
| | 400 | | 40 |
| | 300 | | 30 |
| | 200 | | 20 |
| | 100 | | Polisorbato |
| | Polisorbato | | Control |
| | Control | | 50 |
| | Control | | 40 |
| T8 | 478 | T10 | 30 |
| | 400 | | 20 |
| | 300 | | Polisorbato |
| | 200 | | Control |
| | 100 | | 50 |
| | Polisorbato | | 40 |
| | Control | | 30 |
| | Control | | 20 |

3.5.4. Inhibición del desarrollo de Pupa

Una vez que han transcurrido de 5-7 días, tiempo en el cual la larva *Culex* spp. alcanza su desarrollo, se convierte en pupa. En esta actividad se determinó cuanto tiempo el extracto fue capaz de alargar el proceso de transformación de larva a pupa, esta actividad se evaluó por más de 20 días posterior a la aplicación de los tratamientos.

La fase experimental consistió en tubos de ensayo con 20 ml de agua destilada para el extracto acuoso y 20 ml de agua con tween para los extractos etanólico y etéreo. Cada unidad experimental se le adiciono 1 ml de del tratamiento utilizando tres replicas. Fueron evaluadas en las concentraciones obtenidas que se obtuvieron, dándole principal énfasis a las concentraciones de las 300ppm, 200 ppm y 100 ppm. Se llevo el control con agua destilada con tween 20 al 0,01% (Control Negativo) y otro temephos al 1 % (Control Positivo) esto se puede observar en la Tabla 5. (Álvarez-Londoño *et al.*,2013). Se controlo en forma diaria si la larva o pupa sin movimiento aparente o no mostraron un movimiento normal cuando fueron estimuladas. El número de larvas utilizados por tratamiento fue de 90. La viabilidad

de larva y pupa se estimó por el conteo de número de individuos que se convirtieron en pupa y se expresa en porcentaje acorde al número inicial de individuos tratados, se siguió la metodología aplicada por Carlos Granados-Echegoyen *et al.*, (2014).

Tabla 5 Diseño experimental para determinar de la inhibición del desarrollo de Pupa en los extractos

| TRATAMIENTO | CONCENTRACIÓN ppm | TRATAMIENTO | CONCENTRACIÓN ppm |
|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
| T1 | 920 | T4 | 770 |
| | 750 | | 500 |
| | 600 | | 300 |
| | 400 | | 200 |
| | 300 | | 100 |
| | 200 | | |
| | 100 | | |
| | Polisorbato | | Polisorbato |
| | Control | | Control |
| T2 | 390 | T5 | 140 |
| | 300 | | 100 |
| | 200 | | 80 |
| | 100 | | 40 |
| | Polisorbato | | Polisorbato |
| | Control | | Control |
| T3 | 430 | T6 | 340 |
| | 300 | | 300 |
| | 200 | | 200 |
| | 100 | | 100 |
| | | | 50 |
| | Polisorbato | | Polisorbato |
| | Control | | Control |

3.6. Tratamientos de datos

3.6.1. Diseño experimental

En la presente investigación se utilizó el método de extracción con arrastre de vapor para la obtención del aceite esencial de *Mansoa standleyi*. Se realizaron 3 repeticiones.

Para la preparación de los extractos se utilizó el método de baño de ultrasonido y concentrado en rotavapor por duplicado. Se realizaron en total 10 tratamientos con tres replicas, teniendo como resultado 30 experimentos de hoja como para tallo. El ensayo fue establecido bajo un diseño aleatorio.

3.6.2. Tratamiento aplicado

Según el diseño experimental se realizaron diez tratamientos con sus respectivas combinaciones descritos en la tabla 6.

Tabla 6 Tratamientos

| TRATAMIENTOS | CÓDIGO |
|--------------|--------|
| T1 | Ac H |
| T2 | Ac T |
| T3 | Et H |
| T4 | Et T |
| T5 | E H |
| T6 | E T |
| T7 | A H |
| T8 | A T |
| T9 | H h |
| T10 | H t |

3.6.3. Unidades experimentales

Según el diseño experimental se obtuvieron 30 unidades experimentales detalladas en la tabla 7.

Tabla 7 Diseño experimental de aceite y extractos

| | |
|-----------------------------------|----|
| Número de tratamientos | 10 |
| Número de repeticiones | 3 |
| Número de unidades experimentales | 30 |

3.6.4. Análisis estadístico

Se llevo a cabo la comparación de la, DL_{50} y DL_{90} , la efectividad larvicida de cada tratamiento, la susceptibilidad de la larva y el intervalo de confianza fueron calculados utilizando la regresión Probit a través del programa IBM SPSS Statistics versión 22.2013.

3.6.5. Variables

3.6.5.1. Variables dependientes

Actividad Larvicida

Inhibición del desarrollo de pupa

3.6.5.2. Variables independientes

Concentración del aceite esencial, hidrolato y extractos.

3.7. Recursos humanos y materiales

| Lugares | Equipos | Reactivos | Utensilios | Humano |
|---|--|---|---|--|
| Laboratorio de Biología de la Universidad Estatal Amazónica | Estereomicroscopio electrónico | Petroleum benzine, for analysis boiling range 40-60°C ACS, ISO Merck KGaA,64271 | 100 tarrinas de polipropileno (Diámetro de boca de 125 mm, una altura de 48 mm una base de 103 mm y un volumen de 460 ml) | Dra. Génova Cabrera Estudiante de postgrado Responsable de ejecutar el proyecto |
| Laboratorio de Química de la Universidad Estatal Amazónica | Estufa de ventilación forzada marca Memmert Modelo SFE700 Serie G7100031 | Ethanol absolute for analysis EMSURE ACS, ISO, Reag, Ph Eur Merck, KGaA 64271 | 100 paletas de fibra prensada, 3 goteros de plástico capacidad 3 ml, Linterna | Dr. David Neill PhD. Docente Investigador Responsable de la identificación taxonómica |
| Laboratorio de Bromatología de la Universidad Estatal Amazónica | Molino Marca Thomas Modelo 33752-e15 Serie 60407 | Agua Destilada | Pinzas entomológicas, malla para mosquito de plástico | Ing. Ricardo Abril PhD Docente Investigador Responsable de la recolección técnica del material vegetal |
| | Equipo Extractor por Arrastre con | Tween 20 $C_{54}H_{14}O_{26}$ | Contenedores de plástico con tapa de | Ing. Pedro Ríos Msc. Docente Investigador |

| | | | | |
|--|---|-----------------------------------|---|--|
| | Vapor de agua de acero inoxidable | | capacidad 10 litros | Tutor responsable del seguimiento del proyecto, direccionamiento o en la colección e identificación larvaria |
| | Branson Ultrasonic Bath CPX Series Modelo Branson 3800 | Temephos proporcionado o por SNEM | 500 tubos de ensayo con tapones de algodón, 7 Gradillas | Dr. Luis Bravo PhD. Docente Investigador Cotutor Responsable de del seguimiento del proyecto y direccionamiento o en la destilación y los análisis de Polifenoles y Cromatografía de capa fina |
| | Rotavapor con presión reducida marca Yamato modelo RE 200 | Ácido Acético Glacial | 12 matraces aforados de capacidad de 100 ml | |
| | Balanza electrónica marca OHAUS Capacidad 4000 g | Ninhidrina al 2% | Cabina de vidrio para cromatografía, placa con silica gel | |

| | | | | |
|--|---|--|--------------------|--|
| | Balanza Analítica Marca OHAUS Modelo PIONER | | Frasco de spray | |
| | Espectrofotómetro marca Spectronic Modelo Genesys 5 Long de onda 765 nm | | | |

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento del aceite

La destilación por arrastre de vapor de la hoja nos dio un aceite de color amarillo y un fuerte olor a ajo. En cambio, la destilación del tallo nos dio un aceite de color transparente con un marcado olor a ajo y a leña húmeda.

El rendimiento de la hoja fue de 0,000649 % y el rendimiento del tallo fue de 0,000478 % lo cual es relativamente bajo en comparación al 0,05% concordando con el trabajo de Zoghbi *et al.*, (2002) cuya especie fue recolectada en el estado de Pará-Brasil. En contraste con el trabajo de Olivera *et al* (2013) cuya especie vegetal fue recolectada en el bosque húmedo tropical del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP), que reporta un rendimiento de 0,6 % a partir de hojas frescas, siendo el reporte más alto de rendimiento para esta especie. Condori *et al.*, (2013) obtuvo un rendimiento de 0,006428% para la hoja y 0,00000005 % para la corteza de *Mansoa alliacea* comparando con nuestro estudio su rendimiento es mucho más bajo en la corteza del tallo que el de nuestro tallo, en todos estos estudios se utilizó el equipo clevenger lo que pudo haber influido en facilitar un mejor rendimiento. Sin embargo, el bajo rendimiento sería debido a los factores como, el tipo y edad de las hojas, factor ambiental y los tratamientos silviculturales (Mantero *et al.* 2007). Cuyo rendimiento corresponden al lugar donde crecen las plantas, el clima ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos, la luz, temperatura y precipitaciones tienen un efecto marcado sobre su presencia en las plantas. (Fluck H. ,1955)

4.2. Identificación aliina: Cromatografía de capa fina

En las cromato placas del subproducto acuoso del aceite esencial de hoja y tallo podemos observar la presencia del compuesto objeto de estudio que indica que el proceso de extracción permite la obtención de compuestos de interés. El resultado obtenido se puede observar en la Figura 12, la presencia del compuesto es notable, la separación es adecuada.

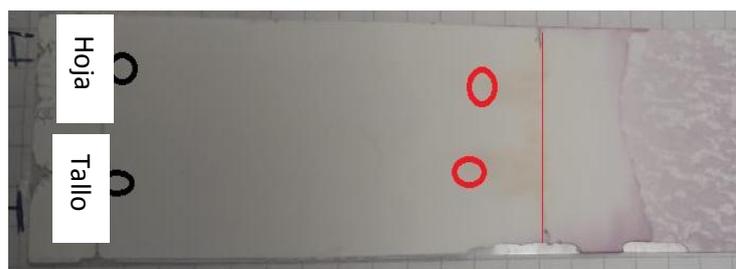


Figura 12 TLC de hidrolato de hoja y tallo de *M. standleyi* para evidenciar presencia de aliina

El Rf reportado para la aliina es de 0,45 por Kanaky & Rajani (2005) en el ajo de bulbo. Para el análisis de materias material vegetal y preparaciones a base de las mismas, el Thin-Layer Chromatography (TLC) es superior a otras técnicas analíticas instrumentales porque es simple y económico y requiere una limpieza mínima de la muestra. A pesar de ser una técnica muy sensible, el resultado que se obtuvo fue de un Rf hoja de 0,83 y el Rf tallo fue de 0,8 lo que discrepa del obtenido en el ajo de bulbo reportado por Kanaky & Rajani (2005) y la coloración reportada por Shaalan et al., (2005) cuya investigación nos indica que la coloración característica de la corrida de aliina es rosada a roja. Pero está dentro de los rangos reportados por Roja & Rojas (2017) en la raíz de la *Petiveria alliacea* cuyo resultado es as cercano al nuestro y concluyo que al tener un Rf de 0,89 probablemente el compuesto mayoritaria sería el dibencil trisulfuro el mismo que ha sido ha sido estudiado y se ha demostrado que posee efectos citotóxicos, inmunoestimulantes y antiparasitario. De acuerdo a Calero, A (2012) se podría asumir que conforme avanza la madurez en las hojas de *Mansoa alliacea*, se incrementa la presencia de aliina, y podría ser el estado ideal de corte de la hoja en la cosecha, para lograr el máximo contenido del principio funcional. Probablemente en nuestra muestra al tratarse de partes tomadas del principio de la planta, la hoja el tallo se encontraron menos maduras dando por resultado que la cantidad de aliina fue muy baja para la sensibilidad del método.

4.3. Identificación polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu

Los extractos acuoso, etéreo y etanólico se analizó en el laboratorio de química de la Universidad Estatal Amazónica, y se realizó la identificación de polifenoles. Esta actividad la aparición de color violeta, azul o azul oscura se consideró positiva, la lectura se realizó a 765 nm. Como podemos ver en la Tabla 8 y Figura 13 se puede observar una mayor presencia de polifenoles en el acuoso hoja, acuoso tallo y etanólico tallo etanólico hoja y en etéreo la sensibilidad del método proporciono una lectura muy baja, en un estudio realizado por

Silveira, G.D. (2014) logro establecer el límite de detección para el Ácido Gálico de 0,098 mg/L.

Tabla 8 Cálculo del contenido de polifenoles

| EXTRACTO | Ac H | Ac T | Et H | Et T | E H | E T |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cálculo de C | 3,015 | 2,606 | 4,602 | 1,537 | 0,038 | 0,038 |
| Concentración mg/L | 753 | 651 | 11,5 | 384 | 0,09 | 0,09 |

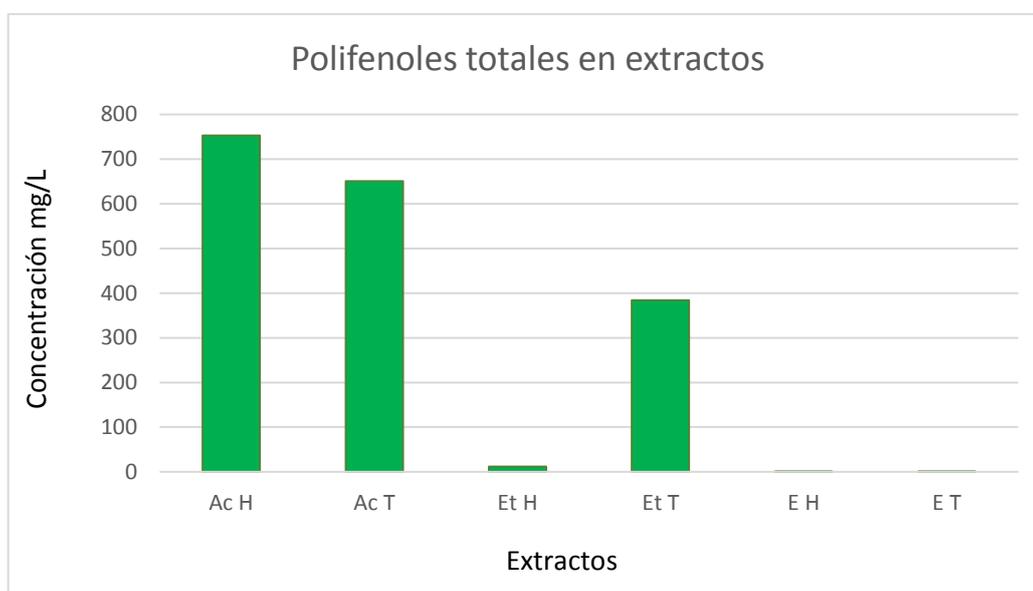


Figura 13 Contenido de Polifenoles totales en extractos de *Mansoa standleyi*

Verma *et al.*, (2011) pudieron demostrar que la forma de actuar del extracto acuoso es produciendo hipolipidemia y estos efectos se los atribuyen a los compuestos organosulfurados, flavonoides y polifenoles presentes en el extracto. Silveira, G.D. (2014) en su estudio encontró compuestos como ácido ferúlico 0,0679 mg/L, ácido ρ – cumárico 1,302 mg/L y ácido Resveratrol (estilbenoide) los mismos que fueron cuantificados, frente al radical superóxido la fracción acetato de *Mansoa alliacea* demostró tener una mejor actividad antioxidante in vitro ($70,85 \pm 4,06\%$). También hay que recordar que, además, la especie *Mansoa alliacea* tiene compuestos órganos sulfurados en su constitución lo que también puede contribuir a la mayor actividad antioxidante de esa especie frente a ese radical.

E. Plazas-González (2015) realizó un ensayo de toxicidad en *Artemia salina* de los compuestos fenólicos presentes en fruto, hojas y flores de *Cavendishia bracteata* Hoerold,

Gaultheria erecta Vent, *Thibaudia floribunda* Kunth, *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Sm, *Bejaria resinosa* Mutis ex L. f. y *Disterigma alaternoides* (Kunth) Nied obteniendo como resultado que los extractos de los frutos de *M.rupestris* y *G.erecta* poseen un CL 50 superior a 1000 ppm, mostrando que a la mayor concentración ensayada no se afectó a la mitad de la población de este crustáceo. Esta información, permite constatar que la toxicidad presentada por los extractos polifenólicos probada en animales es relativamente baja sobre todo en el caso de una ingesta moderada. Esto podría deberse a su baja absorción y a su metabolismo rápido.

4.4. Actividad larvicida

La tabla 9 nos muestra el resultado de la susceptibilidad del tercer y cuarto instar larvario del *Culex* spp. frente al aceite esencial de las hojas de *M. standleyi*. Las concentraciones evaluadas fueron de 649 a 100 ppm. El comportamiento luego de las 24 horas de aplicación de las 649 ppm muestra el 100% de efectividad lo cual causo el 100% de mortalidad; con valores de la DL₅₀ y DL₉₀ de 359,20 y 617,33 respectivamente. El comportamiento luego de las 36 horas de la DL₅₀ y DL₉₀ de 354,51 y 604,21 respectivamente se observó que iba bajando de forma gradual. Luego de las 48 horas de aplicación los valores de la DL₅₀ y DL₉₀ de 239,40 y 469,21 respectivamente. Y finalmente el comportamiento luego de las 72 horas de valores los efectos tóxicos de las 649 y 400 ppm se alcanzó el 100% de efectividad lo que causo el 100% de mortalidad; los valores de la DL₅₀ y DL₉₀ de 189,86 y 303,67 respectivamente estos valores bajaron considerablemente comparados con el de las 24 horas.

Tabla 9 Actividad Larvicida por 72 horas consecutivas del aceite esencial de hojas de *M. standleyi* en larvas del 3er y 4to instar de *Culex* spp.

| CONCENTRACIÓN ppm | % muerte 24 HORAS | % muerte 36 HORAS | % muerte 48 HORAS | % muerte 72 HORAS | Control | Polisorbato |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|-------------|
| 649 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 400 | 47 | 50 | 77 | 100 | 0 | 0 |
| 300 | 27 | 27 | 57 | 77 | 0 | 0 |
| 200 | 17 | 17 | 57 | 73 | 0 | 0 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DL 50 | 359,20 | 354,51 | 239,40 | 189,86 | | |
| DL 90 | 617,33 | 604,21 | 469,21 | 303,67 | | |

La tabla 10 nos muestra el resultado de la susceptibilidad del tercer y cuarto instar larvario del *Culex* spp. frente al aceite esencial de tallo de *M. standleyi*. Las concentraciones

evaluadas fueron de 478 a 100 ppm, el comportamiento luego de las 24 horas de aplicación de las 478 y 400 ppm muestra el 100% de efectividad lo cual causo el 100% de mortalidad, con valores de la DL₅₀ y DL₉₀ de 77,901 y 385,999 respectivamente. El comportamiento luego de las 36 horas de aplicación de las 478, 400 y 300 ppm muestra el 100% de efectividad lo cual causo el 100% de mortalidad, sus valores de la DL₅₀ y DL₉₀ de 23,207 y 268,537 respectivamente. El comportamiento luego de las 48 horas de aplicación de las 478 a 150 ppm muestra el 100% de efectividad lo cual causo el 100% de mortalidad efectividad y valores de la DL₅₀ y DL₉₀ se mantenían constantes.

Tabla 10 Actividad Larvicida por 72 horas consecutivas del aceite esencial del tallo de *M. standleyi* en larvas del 3er y 4to instar de *Culex spp.*

| CONCENTRACIÓN ppm | % muerte 24 HORAS | % muerte 36 HORAS | % muerte 48 HORAS | % muerte 72 HORAS | Control | Polisorbato |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------|
| 478 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 400 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 300 | 50 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 200 | 50 | 76 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 150 | 47 | 70 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 100 | 23 | 53 | 75 | 100 | | |
| DL 50 | 77,90 | 23,20 | 23,20 | 23,20 | | |
| DL 90 | 385,99 | 268,53 | 268,53 | 268,53 | | |

A partir de los hallazgos encontrados, acepto la hipótesis que establece que es posible lograr un nivel de inhibición de larvas de *Culex spp.* si se logra caracterizar el efecto larvicida del aceite esencial de *Mansoa standleyi* en dosificaciones que no sobrepasen las 600 ppm frente a tiempos de exposición inferiores a 72 horas. El aceite esencial de hoja a las 48 horas presenta una DL₅₀ de 239,40; sin embargo, el tallo presenta una DL₅₀ de 23,20 a las 36 horas demostrando de esta manera ser más tóxico que la hoja. En la Figura 14 se puede observar el comportamiento de la DL₅₀ el aceite esencial de hoja y el del tallo. Granados-Echegoyen *et al.*, (2014) lograron una inhibición larvaria con 800 ppm de aceite esencial de la hoja de *Mansoa alliacea* y una DL₅₀ de 267,33. Sin embargo Pérez-Pacheco *et al.*, (2004) obtuvieron resultados menos alentadores ya que sólo obtuvieron un 20% de mortalidad como máxima mortalidad. Las larvas que murieron en su estudio tendieron a emerger deformes de la pupa quedando atrapados dentro de la cavidad de la piel del insecto.

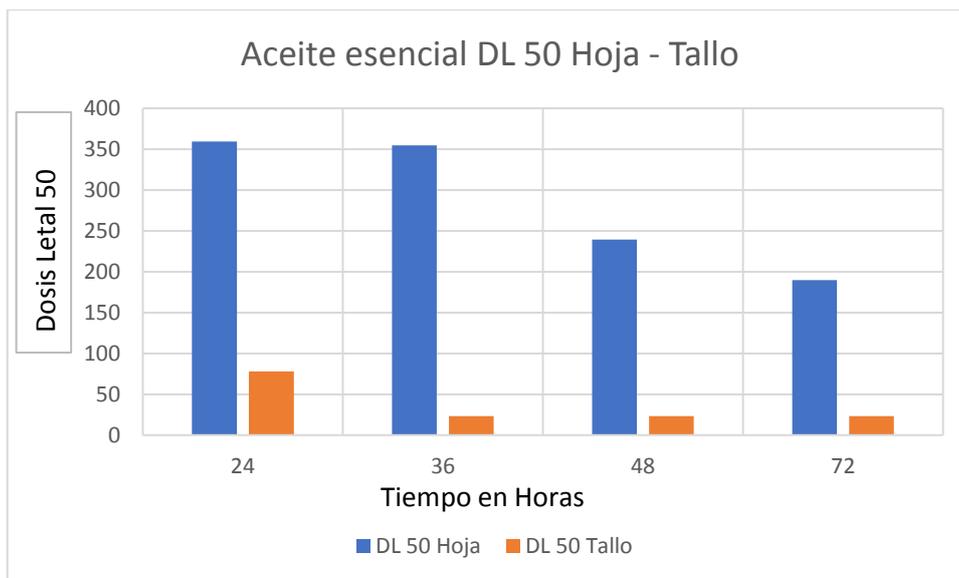


Figura 14 Comportamiento de la Dosis Letal 50 del Aceite esencial de Hoja y Tallo de *Mansoa standleyi*

De acuerdo a un estudio de Murty *et al.*, (1997) que realizo en adultos de *Culex quinquefasciatus*. Tabasum *et al.*, (1993) observo que los extractos de las plantas afectan la morfología del produciendo una pigmentación en la larva y alteraciones en el abdomen y cabeza. Estudios de Misra T.N. (1991 y 1995) en su estudio determinaron que el disulfuro de dialilo y el trisulfuro de dialilo poseen actividad larvicida para *Culex pipiens* los mismos que se encuentran presentes en el aceite esencial tanto de tallo como de hoja de acuerdo al estudio de María das G.B. Zoghbi *et al.*, 2014 los que determinaron la presencia de diallil sulfuro, metil allil disulfuro, 1-octeno-3-ol, 3 octanona, di allil propil disulfuro, diallil disulfuro, cis-dipropionil disulfuro, trans- dipropionil disulfuro, allil methyl trisulfuro, 3-vinil-1,2 diti-5 n, metil salicilato, 3-vinil-1,2-diti-4 n, propenil propil trisulfuro, diallil trisulfuro, diallil tetrasulfuro.

Tabla 11 Actividad Larvicida del hidrolato de hojas de *M. standleyi* en larvas del 3er y 4to instar de *Culex spp.*

| CONCENTRACIÓN % | % muerte 24 HORAS | % muerte 36 HORAS | % muerte 48 HORAS | % muerte 72 HORAS | Control | Polisorbato |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------|
| 50 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 40 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 83 | 83 | 97 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 47 | 47 | 63 | 0 | 0 |
| DL 50 | 0 | 10,81 | 10,81 | 8,64 | | |
| DL 90 | 0 | 20,46 | 20,46 | 15,15 | | |

El hidrolato de las hojas *M. standleyi* fue evaluado en larvas del tercer y cuarto instar larvario en concentraciones de 50 a 10% lo que se observa en la Tabla 11. Ninguna de las concentraciones evaluadas mostró actividad a las 24 horas. Los tratamientos de 50 al 30% mostraron 100% de efectividad a las 36 horas de inoculación, con una DL50 de 10,81 y una DL90 de 20,462. A las 48 horas de inoculación el tratamiento al 20% mostro más del 83% de efectividad con una DL50 de 10,81 y una DL90 de 20,46. A las 72 horas de inoculación el tratamiento al 20% mostro más del 97% de efectividad y una DL50 de 8,64 y una DL90 de 15,15. Durante todo el análisis se obtuvo nula formación de pupa en todas las concentraciones.

Tabla 12 Actividad Larvicida del hidrolato del tallo de *M. standleyi* en larvas del 3er y 4to instar de *Culex spp.*

| CONCENTRACIÓN % | % muerte 24 HORAS | % muerte 36 HORAS | % muerte 48 HORAS | % muerte 72 HORAS | Control | Polisorbato |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------|
| 50 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 40 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 73 | 90 | 100 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 70 | 73 | 73 | 0 | 0 |
| DL 50 | 0 | 7,90 | 6,92 | 7,86 | | |
| DL 90 | 0 | 21,24 | 16,28 | 12,78 | | |

El hidrolato del tallo *M. standleyi* fue evaluado en larvas del tercer y cuarto instar en concentraciones de 50 a 10% lo que se observa en la Tabla 12. Ninguna de las concentraciones evaluadas mostró actividad a las 24 horas. Las concentraciones de 50 al 30% mostraron 100% de efectividad a las 36 horas de inoculación, DL50 de 7,90 y una DL90 de 21,94. A las 48 horas de inoculación la concentración al 20% mostro más del 90% de efectividad con una DL50 de 6,96 y una DL90 de 16,28. A las 72 horas de inoculación las concentraciones de 50 al 20% mostraron 100% de efectividad y una DL50 de 7,86 y una DL90 de 12,78. Durante todo el análisis se obtuvo nula formación de pupa en todas las concentraciones.

En la Figura 15 se puede observar el comportamiento del hidrolato de hoja y el del tallo. podemos observar la Granados-Echegoyen *et al.*, 2014 en su estudio determinó que el hidrolato de la hoja de otra especie de *Mansoa* obtuvo que al 20 y 10 % lograba inhibición del 100% luego de las 24 horas lo cual no concuerda con este estudio en el que posterior a las 24 horas la inhibición a los 20 y 10% es de 83 y 47% respectivamente; sin embargo, los resultados al 20% del tallo a las 36 horas se obtuvo el 73 y 70% de inhibición. Uno de los

factores que influyen en esto es que en el tallo que fue utilizado para este estudio fue tomado de las partes aéreas en donde se encuentran la parte más joven de la planta donde según estudios de Aguilar et, al 2005; Zhao, 2010 determinaron que los niveles endógenos de auxina son mucho mayores en tejidos jóvenes las mismas que participan en la defensa contra patógenos, Los resultados obtenidos nos permiten considerar que el subproducto del aceite esencial tanto de tallo como de hoja pueden ser utilizados como una alternativa para el control de este mosquito.

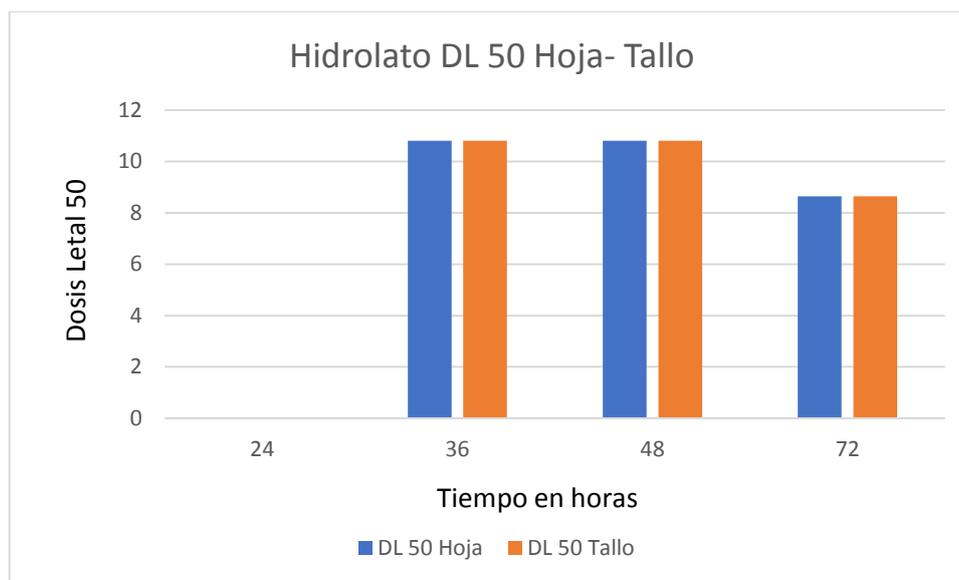


Figura 15 Comportamiento de la Dosis Letal 50 del Hidrolato de Hoja y Tallo de *Mansoa standleyi*

4.5. Inhibición del desarrollo de Pupa

Los extractos de las plantas lograron una inhibición cuando se aplicaron las concentraciones utilizadas. En el T1 podemos observar que en una concentración de 300 ppm mostró una inhibición del crecimiento del 0% mientras que los T3 y T4 mostraron una inhibición de 100 %, el T5 en la concentración de 140 ppm mostro una inhibición del 100% Estos tratamientos mostraron una inhibición del crecimiento larvario comparado con el control. En el control sin aplicación de tratamiento la formación de pupa fue del 100% en 13 días. El número de larvas muertas y vivas fue contado, mostrando que las larvas de *Culex spp.* son más susceptibles a los extractos de T4, T5 y T6 como podemos observar en la Figura 17 en comparación con el T1. En la Tabla 13 podemos observar el porcentaje de pupa formada en cada tratamiento. El T1 y T2 muestra cero mortalidades comparado con el T3, T4, T5 y T6 a concentraciones de 200 y 100 ppm.

Tabla 13 Extractos acuosos, etanólico y etéreo y su efecto en el desarrollo de pupa

| TRATAMIENTO | CONCENTRACION ppm | Nº LARVAS | DURACIÓN DÍAS | % PUPA FORMADA |
|-------------|----------------------|-----------|------------------|-------------------|
| T1 | 920 | 30 | 14 | 0 |
| | 750 | 30 | 14 | 100 |
| | 600 | 30 | 14 | 100 |
| | 400 | 30 | 14 | 100 |
| | 300 | 30 | 14 | 100 |
| | 200 | 30 | 14 | 100 |
| | 100 | 30 | 14 | 97 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |
| T2 | 390 | 30 | 18 | 100 |
| | 300 | 30 | 18 | 100 |
| | 200 | 30 | 18 | 100 |
| | 100 | 30 | 18 | 100 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |
| T3 | 430 | 30 | 27 | 0 |
| | 300 | 30 | 27 | 0 |
| | 200 | 30 | 27 | 0 |
| | 100 | 30 | 27 | 0 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |
| T4 | 770 | 30 | 28 | 0 |
| | 500 | 30 | 28 | 0 |
| | 300 | 30 | 28 | 0 |
| | 200 | 30 | 28 | 0 |
| | 100 | 30 | 28 | 0 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |
| T5 | 140 | 30 | 28 | 0 |
| | 100 | 30 | 28 | 0 |
| | 80 | 30 | 28 | 0 |
| | 40 | 30 | 28 | 0 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |
| T6 | 340 | 30 | 28 | 0 |
| | 300 | 30 | 28 | 0 |
| | 200 | 30 | 28 | 0 |
| | 100 | 30 | 28 | 0 |
| | 50 | 30 | 28 | 0 |
| | Polisorbato | 30 | 13 | 100 |
| | Control | 30 | 0 | 0 |

El extracto acuoso tanto de hoja como de tallo, a concentraciones de 300 y 200 ppm no mostraron mayor reducción en la formación de pupa comparada con el control sin embargo alargaron la vida de la larva en un 47% en el Ac H y un 63% en el Ac T. El Et H y ET T a concentraciones de 300 y 200 ppm mostraron mayor reducción en la formación de larva comparada con el control sin embargo alargó la vida en un 90% en hoja y un 93% en tallo. El extracto etéreo de hoja y tallo a una concentración de 100 ppm muestra mayor reducción en la formación de pupa comparada con el control sin embargo alargó la vida en un 93%.

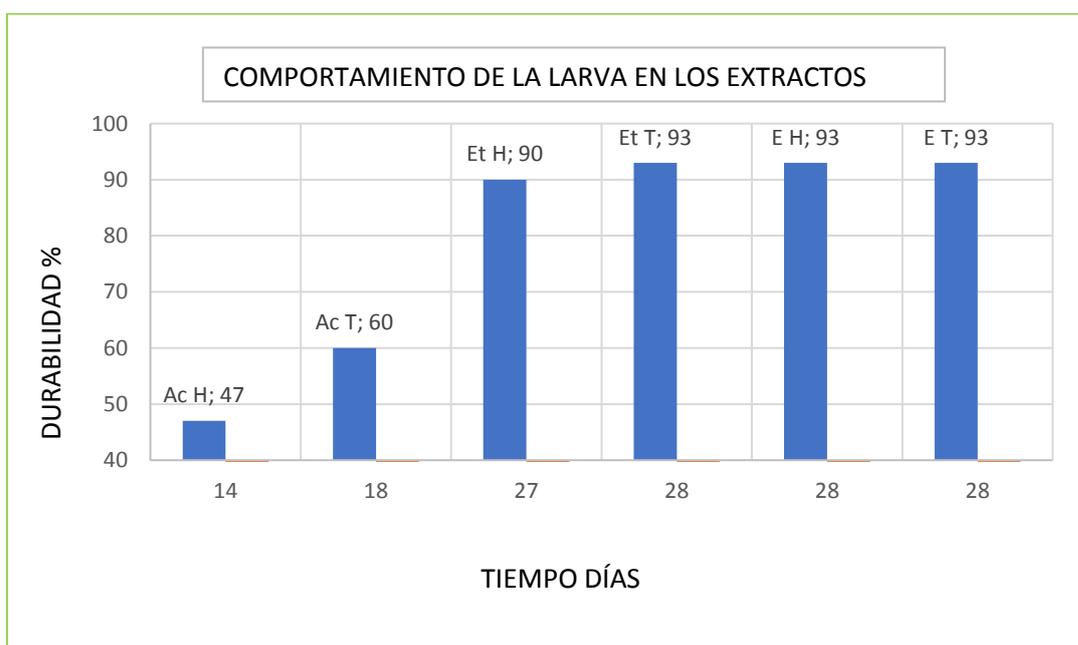


Figura 166 Viabilidad del tiempo de vida larvaria el porcentaje de desarrollo de pupa

El efecto de los extractos polares en el crecimiento y desarrollo de la larva del mosquito no ha sido investigado de manera profunda. Shaalan *et al.*, (2005) en su estudio determinó que los metabolitos secundarios de muchas plantas muestran efectos en el crecimiento y desarrollo de los estados larvarios, causando un alargamiento del tiempo del estadio de larva a pupa, inhibición de la motilidad, anomalías morfológicas y mortalidad.

De acuerdo a Mulla M.S (1991) la inhibición de la regulación del crecimiento es atribuida a la presencia de compuestos que minimizan la hormona juvenil en los artrópodos, en su estudio demostró que los inhibidores del crecimiento muestran un alto margen de seguridad para los organismos acuáticos. La duración del impacto es relativamente corta. Sharma *et al.*, (2011) en su estudio determinaron que el extracto de hexano logró tener un mayor potencial como larvicida

En este estudio podemos observar que extracto etanólico de tallo y el etéreo de hoja y tallo alargaron el tiempo de vida a 28 días guardando relación con el estudio de Sharma & Srivastava (2011) quienes obtuvieron una buena eficacia larvicida de los extractos de hexano y de éter de petróleo, estos resultados los obtuvieron después de las 48 horas de exposición a los extractos. Chirunthorn *et al.*, 2005 en su estudio sobre *Mansoa hymenae* determinaron que los extractos del éter de petróleo y etanólico presentaban citotoxicidad sobre los camarones en salmuera y presentaban una gran capacidad antioxidante.

4.6. Conclusiones

En este estudio se comprobó la actividad larvicida luego de la aplicación el aceite esencial y del hidrolato tanto de tallo como de hoja, se pudo observar que existe una mejor actividad del tallo atribuido a sus componentes, adicionalmente se realizó la cromatografía de capa fina para poder determinar la presencia de aliina en la fase acuosa del destilado (hidrolato), también se logró determinar el contenido de polifenoles en los extractos acuosos, etanólico y etéreo.

Una vez analizados los resultados se puede aceptar la hipótesis, ya que se logró evidenciar el efecto larvicida del aceite esencial y del hidrolato en dosificaciones que no sobrepasaron las 600 ppm en tiempos de inhibición menores a las 72 horas de exposición.

Los diez tratamientos evaluados muestran control sobre las larvas en el tercer y cuarto estadio de *Culex* spp. En condiciones de laboratorio el aceite esencial de tallo muestra mayores niveles de control con una mortalidad del 100% en el 86% de las disoluciones, el aceite esencial de hoja mostro un 100% de efectividad solo en el 40% de las disoluciones; el hidrolato de tallo muestra mayores niveles de control con una mortalidad del 100% en el 80% de las disoluciones, el aceite esencial de hoja mostro un 100% de efectividad solo en el 60% de las disoluciones. Los extractos con mayor actividad de inhibición larvaria fueron los de tallo y hoja tanto de etanol como de éter, los que alargaron su tiempo de desarrollo 6 veces más de lo normal y finalmente produciendo la muerte de la larva. Dicho control es variable en proporción directa a la concentración, tipo de extracto y tiempo de exposición.

Se realizó la cromatografía de capa fina para determinar la presencia de aliina en el hidrolato, sin embargo, los resultados mostraron que se encontraba en una concentración que no permitió su lectura. Se pudo cuantificar los polifenoles totales en los extractos en donde se obtuvo que en el extracto acuoso de hoja la concentración fue de 753 mg/L y en el etéreo tanto de tallo como de hoja fue 0,09 mg/L sin embargo, los estudios sobre la *M. alliacea* atribuyen su capacidad antioxidante a los organosulfurados, es necesario realizar más estudios sobre el comportamiento de los polifenoles en la inhibición del desarrollo de la pupa ya que hasta ahora se ha podido demostrar que tienen actividad antioxidante como la de inhibir el crecimiento de células del cáncer.

Finalmente, este estudio se convierte en un pilar importante para el desarrollo de un preparado vegetal con efecto inhibitor en larvas *Culex* spp, que ha permitido aprovechar las

potencialidades de una especie vegetal propia de la provincia, y que al desarrollarse el estudio en campo dándole el enfoque agroindustrial no alimenticio, permitirá fomentar y dinamizar la economía de la provincia.

4.7. Recomendaciones

- Al haberse llevado a cabo en ambiente controlado y escala laboratorio hay que realizar la segunda fase que consiste en la ejecución a nivel de campo; tomando en cuenta su resistencia a la deshidratación, temperatura ambiental y evitar realizar este trabajo en época de lluvia ya que influye en la eclosión de la larva, por lo que se recomienda realizar el estudio a nivel de campo con el hábitat de su desarrollo para calcular los tiempos de inhibición y alargamiento de vida larvaria.
- En este proyecto no se ha realizado un estudio sobre la toxicidad y los riesgos en la salud humana lo cual se debería de realizar previo a su uso comercial.
- Este tipo de investigación es preferible realizarla en épocas de poca lluvia para tener una buena colección de larvas para que no se alargue el trabajo.
- Para la verificación de larvas en las trampas y posterior colección es recomendable realizarla con un equipo que permita optimizar el tiempo.
- En caso de no contar con el equipo, fuera de mucha utilidad realizar un estudio sobre los diferentes métodos de destilación y cuál de ellos brinda mayor rendimiento de aceite para *Mansoa standleyi*.
- Existen estudios de inhibición larvaria sobre la especie *M. alliacea* y muy pocos sobre la *M. standleyi*, se sugiere realizar un estudio comparativo entre las dos especies para poder demostrar cual posee mejor capacidad inhibitoria.

4.8. Bibliografía

- Abdelouaheb, A., Nassima R., Nouredine S. (2009). Larvicidal activity of a neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. *Biological Sciences*. 2: 15-22.
- Abril S. R. V., Ruiz V.T. E., Alonso L. J., Viáfara B. D., Ríos G. P. D., Aguinda V. J. K., Vega P. I. (2016). El uso de Plantas medicinales por la población rural de la provincia de Pastaza en la amazonia ecuatoriana. *Acta Amazónica* [hptt://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201600305](http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201600305).
- Aguilar, C. M., Melgarejo, L. M., & Romero, M. (2005). Fitohormonas. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología, 39-62.
- Agra MF, Franca PF, Barbosa-Filho JM (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bra Farmacogn* 17: 114-140
- Agra MF, Silva KN, Basilio IJLD, Franca PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18:472-508
- Alonso J.R. (1997) Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. Ed. ISIS ediciones SRL. pp.202-217 Buenos Aires- Argentina
- Álvarez-Londoño, J. C., Duarte-Gandica, I., Aguirre-Obando, O. A., & Jiménez-Montoya, J. A. (2013). Control del vector del dengue utilizando fracciones etéreas de dos plantas (Asteraceae) como larvicidas. *Revista de Salud Pública*, 15, 227-236.
- Amy E. Snell (2005) Identification keys to larval and adult female mosquitoes (Diptera: Culicidae) of New Zealand, *New Zealand Journal of Zoology*, 32:2, 99-110, DOI: 10.1080/03014223.2005.9518401
- Arana VF (2005) Control de *Hipsiphyla grandella* Zeller en plantaciones de *Cederela odorata* L. (cedro rojo) con *Mansoa alliacea* (Lam.) A.H. Gentry (ajo sacha) *Conocimiento* 8: 59-67
- Araujo EC, Silveira ER, Lima MA, Neto MA, de Andrade IL, Lima MA (2003). Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martisii* Benth. *J Agric Food Chem*; 51:3260-
- Arora M, Claus-Dieter O, Knud, M. Cavitation inception on microparticles: A self-propelled particle accelerator. *Physical Review Letters*. 2004;93: 174501-04
- Ashokkumar M, Mason TJ. Sonochemistry. Kirk-Othmer (2007) *Encyclopedia of*

Chemical Technology, John Wiley & Sons.

- Aviram, M., & Rosenblat, M. (1994). Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *Journal of lipid research*, 35(3), 385-398.
- Atrous, H., Benbettaieb, N., Hosni, F., Danthine, S., Blecker, C., Attia, H., & Ghorbel, D. (2015). Effect of γ -radiation on free radicals formation, structural changes and functional properties of wheat starch. *International journal of biological macromolecules*, 80, 64-76.
- Azuola R, Vargas P. (2007) Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*.;20(4): 30-40.
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial Universidad Nacional de la Plata. Argentina
- Belova VV, Voshkin AAV, Kholkin AI, Payrtm AK. (2009) Solvent extraction of some lanthanides from chloride and nitrate solutions by binary extractants. *Hydrometallurgy*.;97: 198–203.
- Belzile A-S, Majerus SL, Podeszinski C, Guillet G, Durst T, Arnason JT. (2000). Dillapiol Derivatives as Synergists: Structure Activity Relationship Analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66:33-40
- Benkeblia N. & Lanzotti V. (2007). Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food*, 1, 193-201
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Brewer M, Bufa L, Almirón W, (1987) *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipens pipens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Argentina. *Rev Per Entomol*; 29 :69-72
- Bruneton, J. (2001) Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S.A.
- Cabello L.I. (1998) “Registro y Control de Calidad de Recursos y Productos Naturales de uso en Salud”; Lima, Perú.
- Calero, Andrés (2012) Evaluación agroindustrial de ajo del monte (*Mansoa alliacea*)

Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial. Quito.
Recuperado de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/48666/1/CD-4459.pdf>

- Castro D., Jaber J., Serna R., Martínez M., Urrea P., Muñoz K., Osorio E., Osorio E. J. (2013). Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. 2 ed. Rionegro. Universidad Católica del Oriente, p 13
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Chan CH, Yussoff R, Ngoh GC, Kung FWL. Review microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J of Chromatography A*. (2011);1218: 6213–25.
- Chaves S.A.M.,Reinhard KJ (2003). Paleopharmacology and pollen: theory, method and application. *Mem I Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1): 207-211
- Chirunthorn R., Supavita T, Intaraska N, Kummee S, Junkong N, Chisorn B, Itharat A (2005). Study on biological activities of *Mansoa hymenae* (DC.) A. Gentry leaf extracts. *J. Sci. Technol* 27 (suppl. 2): 489-495
- CONTI, B.; CANALE, A.; BERTOLI, A., GOZZINI, F.; PISTELLI, L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 107 (6): 1455-1461.
- Condori, M. O., Arizaca, J. F., Zavaleta, T. V., & Borda, E. O. (2013). Propiedades Físicoquímicas y Bioactivas in Vitro del Aceite Esencial de *Mansoa alliacea* (LAM.) A. GENTRY. *Ceprosimad*, 2(1), 96-102.
- Corrales M, García AF, Butz P, Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*. (2009);90: 415–21.
- Crescente, M., Jessen, G., Momi, S., Hölzje, H. D., Gresele, P., Cerletti, C., & de Gaetano, G. (2009). Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level Functional and modelling studies. *Thrombosis and haemostasis*, 101(02), 336-346.
- Da Costa, C. A., & Checler, F. (2011). Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism. *Cellular signalling*, 23(6), 963-968.
- De Gaetano, G., De Curtis, A., Di Castelnuovo, A., Donati, M. B., Iacoviello, L., &

- Rotondo, S. (2002). Antithrombotic Effect of Polyphenols in Experimental Models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 174-188.
- DeFilippis RA, Maina SL, Crepin J (2007) Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinamm French Guiana) <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/MedPlantsGuil>. Pdf p52, accessed on Sep 28, 2018
 - de Oliveira BM, Melo CR, Alves PB, Santos AA, Santos AC, (2017). Essential Oil of *Aristolochia trilobata*: Synthesis, Routes of Exposure, Acute Toxicity, Binary Mixtures and Behavioral Effects on Leaf - Cutting Ants. *Molecules* 22
 - Desmachelier C, Repetto M, Coussio J, Llesuy S, Ciccía G. (1997) Total reactive antioxidant potential (TRAP)of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru) *Int J Pharmacog.* 35: 1-9
 - Dirección Seccional de Salud de Antioquia (2005), Universidad de Antioquia. Guías de manejo de pacientes Intoxicados.
 - DUKE, J.A., (1989). Foods as Pharmaceuticals, in: Simon, J.E., Kestner, A. and Buehrle, M.A., Eds. *HERB'S* 89, 166-176
 - Eddleston M, Hillips M R. (2004) Self Poisoning with Pesticides. *British Medical Journal*; 328:42-4.12.;
 - El-Bahr, S. M. (2013). Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Science international*, 1(5), 111-117.
 - Eldefrawi M E, Eldefrawi A T. (1983) Neurotransmitter Receptors as Targets of Pesticides. *Journal of Environmental Science and Health*; 18:65-88).
 - Enan EE. 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol* 35:309 -21
 - Erusalimsky, J. D. (2009). Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *Journal of Applied Physiology*, 106(1), 326-332.
 - E. Plazas-González, “Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas Preliminary phytochemical screening , antioxidant , and toxic activity evaluation of six species of colombian Ericaceas,” *Rev. Cuba. Plantas Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 182–199, 2015.

- Fernández, D. G., Mancipe, L. C., & Fernández, D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84-92.
- FERNÁNDEZ, M.D.C.M., SAINT JEAN, Y., CALLABA, C.A.F., BROCHE, R. G y LEYVA, M. (2013) Contribución al conocimiento de la distribución y aspectos biológicos de algunas especies de mosquitos en Haití. In *Anales de biología*. 55-63
- Fluck H. The influence of climate o the active principles in medicinal plants (1955). *J Pharm Pharmacol*;7(6):361-83.
- Fuentes-Contreras, E., Basoalto E., Sandoval C., Pavez P., Leal C., Burgos R. 2007. Evaluación de la eficacia, efecto residual y de volteo de aplicaciones en pretrasplante de insecticidas nicotinoides y mezclas de nicotinoide-piretroide para el control de *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) en tabaco. *Agricultura Técnica*. 67(1):16-22.
- García G. L.J; Sánchez M.F.J (2000) Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*) Vol 50 N°3
- Gajmer, T., Singh R., Saini R.K., Kalidhar S.B. (2002). Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L.) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 126, 238-243
- Gentry AH. (1992); A Synopsis of Bignoniaceae Ethnobotany and Economic Botany. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 79: 53-64
- GUHL, F., AGUILERA, G., PINTO, N. Y VERGARA, D. (2007). Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatomíneos (Reduviidae:Triatominae) en Colombia. *Biomédica*, 27,143-162
- Guidelines for Legislation on the Control of Pesticides Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1989). <http://www.fao.org/AG/AGP/AGPP/Pesticid>.
- Granados-Echegoyen Carlos, Pérez-Pacheco Rafael, Soto Hernández Marcos, Ruiz-Vega Jaime, Lagunez-Rivera Luicita, Alonso-Hernández Nancy, Gato-Armas Rene (2014) Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliacium* (Bignoniaceae). *Asia Pacific Journal of Tropical Medicine*

- Gualdrón L. J., (2007). Manual de vigilancia entomológica de dengue, leishmaniasis, chagas, malaria y fiebre amarilla. 1: 5-7
- Guo S, Zhang W, Liang J, You C, Geng Z, (2016). Contact and repellent Activities of the Essential Oil from *Juniperus formosana* against Two Stored Product Insects. *Molecules* 21:504
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*, 12(3), 204.
- HMAMOUCI M, TANTAOUI-ELERAOKI A, ES-SAFIN, AGOUMI A 1 (1990) Mise en évidence des propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles d'Eucalyptus. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 24 (4), 362-366, France
- Instituto Nacional de Salud Colombia- Subdirección de Vigilancia y Control. Intoxicación Aguda por Plaguicidas. Primer Semestre de 2007. <http://www.ins.gov.co/index.php?idcategoria=14707>.
- Instituto Nacional de Salud - Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia- División Centros de Control de Enfermedades. Definiciones de Caso para los Eventos de Notificación Nacional. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA. <http://www.ins.gov.co/> Recuperado 23 de octubre del 2018
- Itokawa H, Matsumoto K, Morita H, Takeya K. (1992). Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry* 31: 1061-1062
- James WO. *The Alkaloids*.t1(1950). New York: Academic Press;.p.525.
- Jardim, M. A. G., & Lopes, I. L. M. (2008). Fenologia, biologia floral e germinação de plantas aromáticas: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.(Lamiaceae) e *Mansoa standleyi* (Steerm.) AH Gentry (Bignoniaceae) Museu Paraense Emilio Goeldi.
- Jensen HR, Scott IM, Sims SR, Trudeau VL, Arnason JT. (2006). The effect of a synergistic concentration of a *Piper nigrum* extract used in conjunction with pyrethrum upon gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol*15:329-39
- Kanaki, N. S., & Rajani, M. (2005). Development and validation of a thin-layer chromatography-densitometric method for the quantitation of alliin from garlic (*Allium sativum*) and its formulations. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1568-1570.

- Karr LL, Cotas JR. Insecticidal properties of d-limonelene. *J Pest Sci* 1998;13:287-9025.
- Kauffman, E., Payne, A., Franke, M. A., Schmid, M. A., Harris, E., & Kramer, L. D. (2017). Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. mosquitoes. *Bio-protocol*, 7(17).
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of chromatography A*, 1112,3-22
- Lemes M, Rodríguez C, Reyes M, Echevarria I. (1998). Efecto de las condiciones de cultivo sobre el rendimiento de follaje y el porcentaje de aceite en hojas de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Rev Cubana Plant Med*;3(1):37-41.
- Lester PJ, Pike AJ 2003. Container diameter and water depth influence population dynamics of the mosquito *Culex pervigilans* (Diptera: Culicidae) and its associated predators in New Zealand. *Journal of Vector Ecology* 28: 267-274.
- LEYVA, M.; TACORONTE, J.; MARQUETTI, M.; SCULL, R.; MONTADA D. RODRÍGUEZ Y. YIRIAN R.; (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana Medicina Tropical* 60 (1): 78-82
- LEYVA, M.; TACORONTE, J.; MARQUETTI, M.; SCULL, R.; TIOMNO, O.; MESA, A.; MONTADA, D. (2009). Utilización de aceites esenciales de pináceas endémicas como una alternativa en el control del *Aedes aegypti*. *Revista Cubana Medicina Tropical* 61 (3): 239-243.
- Liao M, Xiao JJ, Zhou LJ, Liu Y, Wu XW, (2016). Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. *PLoS One* 11:e0167748
- Liang JY, Guo SS, Zhang WJ, Geng ZF, Deng ZW, 2017. Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from *Artemisia ubia* and its main compounds against two stored product pests. *Nat Prod Res*:1-5
- Lichtenthaler HK. 1999. The - Deoxy-D-Xylulose -5 -Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:47-65
- LIRA-NORIEGA, A. Y PETERSON, A.T. (2014). Range-wide ecological niche comparasion of parasite, hosts and dispersers in vector-borne plant parasite system. *Journal of Biogeography*, 41 (9), 1664-1673
- Lohmann LG (2007). A new generic classification of Bignoniaceae (Bignoniaceae based on molecular phylogenetic data and morphological synapomorphies. *Ann*

Missouri Bot Gard. In Press.

- Loginova V, Vorobiev E, Bals O, Lebovka NI. (2011) Pilot study of counter current cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering.*;102: 340–7.
- López L. M. (2007) el ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM. España Volumen 26, N° 1.* pp 18-81
- López, J., Pérez, J. (2010) Fitoquímica y valor ecológico de olor a ajo en los vegetales. *Medicina Naturista. Vol 4. N| 1 I.S.S.N.:1576-3080* 15-23
- Luengo, M. T. L. (2007). El ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Offarm: farmacia y sociedad*, 26(1), 78-81.
- Luna L.E. (1984) The healing practices of a Peruvian shaman. *J Ethnopharmacol* 11: 123-133
- Gaceta Epidemiológica, SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA ECUADOR Metadato Sive Alerta 2017
- Gaceta Epidemiológica, SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA ECUADOR Metadato Sive Alerta 2018
- Han, X., Shen, T. & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 950-988
- Hasrat JA, De Backer JP, Vanquelin G, Vlintinck AJ (1997) Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptor binding activity. *Phytomedicine* 4: 59-65
- MAIA J.G.S.;M.D.G.B & Andrade E.H.A. Plantas aromáticas da Amazonía e seus óleos essenciais. Museu Paranse Emilio Golde. Colecao Adolpho Ducke, 2001, 173 p.
- Malkeja A. N, Bailey J. M.(1990). Antiplatelet constituents of garlic and onions. *Agent Actions.* 29:360-363.
- Manach, C., Scalbert, A. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79,727-747
- Mantero C., Mantero, C.1.; García, C.2.; Rodríguez, P.2.; Escudero, R.1; Priore, E.3 y Menéndez, (2007). “Potencialidad para la producción de aceites esenciales en especies de Eucaliptus cultivadas en Uruguay”. Proyecto de Bioproducción de terpenos a partir de desechos de la industria forestal agrociencias, Vol XI N° 2. p23.

- Más, I. G., Araújo, B. M., Inchaurre, A. A., Roldán, I. P., Moreno, A. G., & Román, P. R. (2009). Manual de laboratorio de Parasitología. 12. Insectos Dípteros. *REDUCA (Biología)*, 2(5).
- Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification (Vol. 31). London: Academic press.
- Mills C, Cleary BJ, Gilmer JF, Walsh JJ. (2004). Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J Pharm Pharmacol* 56:375 -9
- Minai M, Hosaka Y, Ohta N. Historical view of schistosomiasis japonica in Japan: implementation and evaluation of disease-control strategies in Yamanashi Prefecture. *Parasitol Int.* 2003 Dec, 52(4):321-6.
- Misra TN, Singh RS, Pandey, HS 1991. Aliphatic compounds from *Adenocalymma alliaceum* leaves. *Phytochemistry* 30: 541-543. 41
- Misra TN, Singh RS, Pandey HS, Prasad C, Sharma SC 1995. A novel pentacyclic triterpene acid from *Adenocalymma alliaceum* leaves. *J Nat Prod* 58: 1056-1058. 42
- Monserrate V. (2014) Elaboración de un condimento para carnes a partir de hojas deshidratadas de *Mansoa alliacea* de origen ecuatoriano (Ajo sachá) con actividad antioxidante. Recuperado el 4 de diciembre del 2017, de: www.dspace.spol.edu.ec/bistream/123456789/1/tesis%20terminada%20cd.pdf
- Moraes, M:L., (2008) Tradicao e modernidade no uso de essencias. *Informativo do Museu Paraense Emilio Goeldi. Destaque Amazonia*, 24:1-8
- Mulla, M. S. (1991). Insect growth regulators for the control of mosquito pests and disease vectors. *Chinese J. Entomol. Spec. Publ.* (6), 81-91.
- Muñoz, J. A. V., Staschenko, E., & Ocampo, C. B. D. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)/Insecticidal activity of essential oils from native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198.
- Murty, U. S., Sriram, K., & Jamil, K. (1997). Effect of leaf extract of *Polyalthia longifolia* (Family: Annonaceae) on mosquito larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say of different habitats. *International pest control*, 39(2), 52-53.
- McGAVIN G. 2002. Essential Entomology. An order-by-order. Oxford University Press. P 697
- Nasir, S., Nasir, I., Yousaf, I., & Zaib, I. (2015). Larvicidal and pupicidal action of

kitchen used plant extracts against *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci*, 3, 68-71.

- Navarro Juan Carlos, Sandra Enríquez Sandra, Duque Paul, Campaña Yesenia, Benítez-Ortíz Washington (2015). New mosquito species records for Ecuador, from Puluahua volcano (Andes) and Napo province (Amazon). *Journal of Entomology and Zoology Studies*.
- Nelson, Michael J. (1986) *Aedes Aegypti*. Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. REF: PNSP 86-63 p: 4-8
- Olivera, M., Flores, J., Vásquez, T., & Ocsa, E. (2013). Propiedades fisicoquímicas y bioactivas in vitro del aceite esencial de *Mansoa alliacea* (LAM.) A. Gentry. *El Ceprosimad*, 2(1), 96-102pp.
- Opawoye A D, Haque T. (1998) Insecticide/Organophosphorus Compound Poisoning in Children . *Annals of Saudi Medicine*;18:171-2.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Métodos complementarios de lucha anti vectorial. Recuperado el 1 diciembre de 2017, de http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/complementary_methods/es/
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Respuesta mundial al control de vectores. Recuperado el 14 octubre de 2018, de http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/complementary_methods/es/
- Palá-P; Pérez, A; Velasco, A; Sanz, J; Conejero, F.(2001). Seasonal variation in the chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic an Ecology*, 29, 663-672
- Palma M, Barroso CB. (2002) Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Anal Chim Acta*.;458: 119–30.
- Pérez D (2002) Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región de Ucuyali. *Folia Amazónica* 13: 87-108
- Pérez-Pacheco, R., Rodríguez Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes Belmont, R., & Ramírez Valverde, G. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta zoológica mexicana*, 20(1), 141-152.
- Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J., & Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function

and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free radical research*, 40(10), 1054-1065.

- Plantas Vasculares, S. (2013). Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares. Recuperado de: www.thecompositaehut.com.
- Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB. 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* 140:1363 -72
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Radice, M., Bravo, L., Perez, M., Cerda, J., Tapuy, A., Riofrío, A., ... & Chiurato, M. (2017). Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6(1), 55-64.
- Reverchon E, De Marco I. (2006) Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit Fluids.*;38: 146–66.
- Revilla J., (2001) Plantas da Amazonia. Oportunidades económicas e Sustentáveis. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial y Tecnológico
- Rey, J. R. (2001). *The Mosquito*.
- Ríos, M.; Koisoil, M.; Borgtoft, H.; Granda, G. (2007). *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, Retos y Perspectivas*. Quito: Abya Yala, 652p.
- Ricco, R. A., Agudelo, I. J., & Wagner, M. L. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52(2), 161-174.
- Rodríguez Iván, (2010). Evaluación de plantas medicinales con potencial en el control biológico del vector transmisor del dengue *Aedes aegypti*, 15-16.
- Rodríguez-Riera, Z., Robaina-Mesa, M., Jáuregui-Haza, U., Blanco-González, A., & Rodríguez-Chanfrau, J. E. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, 139-147.
- Rojas, E. R. B., González, R. D. L. A. G., Medrano, A. J. M., De, P. O. A. T., &

- Biólogos, Q.(2010) Actividad De Extractos Vegetales Sobre Larvas De Insectos De Importancia En Entomología Médica.
- Ruiz L., Ruiz L., Maco M., Cobos M., Gutierrez A. – Ñ., Roumy V. (2011) Plants used by native Amazonian groups from Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 917-921
 - Sabha D., (2011) Pharmaceutical and chemical analysis of the components carrying and antiplatelet activity of extracts from *Allium ursinum* and *Allium sativum*. Dissertation for acquiring educational and scientific degree “Doctor of Philosophy”
 - Sadeghi R, Hadizadeh R. N., Jamshidnia A. (2017). Immunological Responses of *Sesamia cretica* to *Ferula ovina* essential Oil. *J Insect Sci* 17
 - Salazar, A. T., Scalvenzi, L., Lescano, A. S. P., & Radice, M. (2017) *Ethnopharmacology, biological activity and chemical characterization of Mansoa alliacea*. A review about a promising plant from Amazonian region.
 - Salazar, M. J., & Moncada, L. I. (2004). Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomédica*, 24(4), 385-92.
 - Salvatella R, (2009). Consultor nacional de OPS/OMS en Uruguay, Instituto de Higiene, *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762)(Diptera, Culicidae), el vector del dengue y la fiebre amarilla.
 - Salvi R, Lara D, Ghisolfi E, Portela L, Dias R, Souza D. (2003) Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides . *Toxicological Sciences*. 2003;72:267-271
 - Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3–21
 - Santoyo D.S. (2004) Alimentos funcionales (compuestos azufrados) Facultad de Ciencias. Madrid. Recuperado el 14/10/2018 http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ssantoyo/funcionales/compuestosazufrados.pdf
 - Servicio Nacional de control de enfermedades transmitidas por vectores artrópodos SNEM (2017) PROYECTO DE VIGILANCIAY CONTROL DE VECTORES

PARA LA PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES METAXENICAS EN EL ECUADOR. 2013-2017 p 4-74

- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. RIPROFITO Colombia
- Shaalan, E. A. S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel-Wahab, H., & Mansour, A. H. (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment international*, 31(8), 1149-1166.
- Sharma, P., Mohan, L., & Srivastava, C. N. (2011). Larvicidal activity of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Entomological Research*, 41(6), 216-220.
- Silveira, G. D. D. (2014). ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA.
- Starlin, T. H., & Gopalakrishnan, V. K. (2013). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and ARN.—an in vitro study. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 6, 152-157.
- Stevens WD, Ulloa C, Pool A, OM Flora de Nicaragua. (2001) Missouri Botanical Garden Press, St. Louis Missouri.
- Suárez Karen (2015) Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible. Tamizaje fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y actividad biológica de *Mansoa alliacea*. 23-30
- Tabassum, R., Naquvi, S. N. H., Jahan, M., & Khan, M. Z. (1993). Toxicity and abnormalities produced by plant products against *Culex fatigans*. *Proc Pak Cong Zool*, 13, 387-393.
- Tang M. (2007) Producción de plantas amazónicas con propiedades cosméticas y/o medicinales y sus productos derivados en el ámbito de la Cordillera Escalera, con fines de consumo interno y exportación. Proyecto Bosques del Chinchipe 1 46
- Technical Data Report. (2006) Ajo Sacha (*Mansoa alliacea*) Recuperado de <http://www.rail-tree.com/reports/ajos-sacha-tech-report.pdf>.
- Thetburantham V., (1987) Dictionary of ornamental plants of Thailand. Bangkok: O.S. Printing House, p. 27-28
- Trampe, J. D. J. L., & Morales. F. (2017) USO DE LOS ACEITES ESENCIALES EN EL CONTROL DE PLAGAS. *Artrópodos y Salud* Vol. 7

- Trindade, N.S.; Arruda, A.C.; Almeida, E.S.; Souza, J.R.V.; Lobato, M.P.; Souza, R.F.; Arruda M.S.P. (2008) Triterpenos isolado das folhas de *Mansoa standleyi* (Bignoniaceae). In: 48° Congresso de química na protecao ao mei ambiente. Recuperado el 1/10/2018 (www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/7/7-222-2563.htm)
- Tomás, S. H. M., Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. D. J. R., & López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 221-238.
- Ventosilla, P., Infante, B., Merello, J. y Chauca, J. (2001), Guía de Prácticas para la Producción de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, OPS/OMS/ROW/IMTAvH.
- Verma, P. R., Deshpande, S. A., Kamtham, Y. N., & Vaidya, L. B. (2012). Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects from an aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) leaves in rats. *Food chemistry*, 132(3), 1251-1257.
- Vinatoru TM, Paniwnyk L, Mason TJ.(2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem.*;8: 137-42.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Walter Reed Biosystematics Unit, (2001). *Systematic Catalog of Culicidae*. Smithsonian Institution, Washington, DC, USA. <http://wrbu.org>
- Wandscheer, C. B, Duque J. E, da Silva MAN., Fukuyama Y., Wohlke J.L., Adelman J., Fontana J.D. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*. 44, 829-835.
- Ward, R. A. (1992). Third supplement to 'A catalog of the mosquitoes of the World'(Diptera: Culicidae). WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC.
- World Health Organization. (1981). *Instructions for determining the susceptibility resistance of mosquito larvae imsecticides*. Geneva, VBC: World Health Organization.

- Wu CI, Wang YS, Chen NG, Wu CY, Chen CH. Ultrasound ionization of biomolecules *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24: 2569–74.
- Zalua Rodríguez-Riera, Malvis Robaina-Mesa, Ulises Jáuregui-Haza, Alejandro BlancoGonzález y Jorge E. Rodríguez-Chanfrau. (2014) Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, Vol. 45, pp. 139-147,
- Zenebe, W., Pechanova, O., & Andriantsitohaina, R. (2003). Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res*, 52(4), 425-32.
- Zoghbi, M., Ramos, L., Maia, J., da Silva, M., Luz, A. (1984) Volatile sulphides of the Amazonian garlic bush. *J. Agric. Food Chem.*; 32:1009-1010
- Zoghbi, M. D. G. B., Andrade, E. H. A., & Maia, J. G. S. (2002). Volatile constituents from *Adenocalymma alliaceum* Miers and *Petiveria alliacea* L., two medicinal herbs of the Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 133-135.
- Zoghbi M. d. G. B., Oliviera J., Skelding G. M., Guilhon P. (2009) The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19 (3): 795-804
- Zoghbi M. d. G.B., Raimunda A. Pereira and Giselle do S.L. de Lima. (2014) Volatiles from *Mansoa standleyi* (Steerm.) A.H. Gentry, *Journal of essential oil Research*; 22:3, 247-249, DOI: 10.1080/10412905.2010.9700316

4.9. Anexos



Fotografía 1 Trampas para colección de larvas



Fotografía 2 Contenedor de larvas



*Fotografía 3 Especie identificada como Mansoa standleyi
Estereomicroscopio*



Fotografía 4 Identificación de Larva en



Fotografía 5 Destilación del material vegetal



Fotografía 6 Aceite obtenido de hoja



Fotografía 7 Aceite obtenido del tallo



Fotografía 8 Secado del material en estufa



Fotografía 9 Molienda del material vegetal



Fotografía 10 Baño ultrasónico



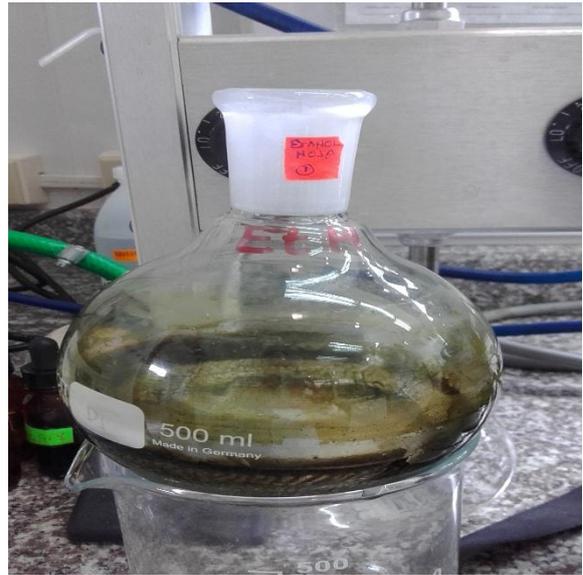
Fotografía 11 Extractos obtenidos



Fotografía 12 Determinación de polifenoles



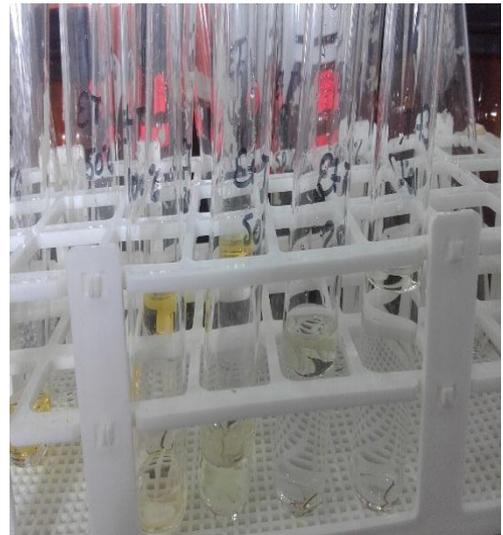
Fotografía 13 Concentrado en Rotavapor



Fotografía 14 Extracto resultante



Fotografía 15 Extractos foliares



Fotografía 16 Pruebas de inhibición



Fotografía 17 Pruebas de inhibición



Fotografía 18 Pruebas de inhibición