

Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio

Evaluation of the Toxic Effect from Eupatorium Microphyllum L.F. (Asteraceae) Extracts on Aedes Aegypti Larvae (Diptera: Culicidae) in Laboratory Conditions

Álvaro Rozo,¹ Cristina Zapata,² Felio J. Bello³

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad tóxica de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. sobre larvas de IV estadio del mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus), bajo condiciones de laboratorio. Se utilizaron extractos acuosos en concentraciones del 500 mg L⁻¹, 1.500 mg L⁻¹ y 2.500 mg L⁻¹ y acetónicos en concentraciones de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹. Los bioensayos se realizaron por triplicado, cada uno con 20 larvas, expuestas durante 24 horas a 150 mL de solución. En todos los ensayos biológicos se emplearon grupos control. En la evaluación de los extractos acetónicos, se empleó un control negativo para evitar que la mortalidad de las larvas ocurriera a causa del solvente. Los extractos acuosos mostraron acción moderadamente baja en la mortalidad de larvas, menor del 20%. Por el contrario, la acción de los extractos acetónicos se observó a 10 y 20 mg L⁻¹, con 15% de mortalidad, mientras que a 30 y 40 mg L⁻¹ se registraron 22 al 38% de mortalidad, en tanto que a 50 mg L⁻¹ la mortalidad fue del

95,4% con resultados estadísticos altamente significativos. Las concentraciones de los extractos acetónicos mostraron ser las más eficientes para el control de los mosquitos seleccionados. Ambos tipos de extractos mostraron efecto tóxico en larvas de *A. aegypti*; sin embargo, se observó mayor efecto en los extractos acetónicos en relación con los extractos acuosos de *E. microphyllum*, lo cual constituye una alternativa viable en la búsqueda de nuevos larvicidas a partir de compuestos naturales.

Palabras clave: *Eupatorium microphyllum*, *Aedes aegypti*, bioensayos, extractos acuosos y acetónicos, concentraciones letales CL₅₀ y CL₉₅.

Recibido: 12 de mayo de 2008

Aceptado: 10 de junio de 2008

¹ MSc. Departamento de Ciencias Básicas; Universidad de La Salle, Bogotá, DC, Colombia.

² MSc. Departamento de Ciencias Básicas; Universidad de La Salle, Bogotá, DC, Colombia.

³ PhD. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, DC, Colombia. Correo electrónico: fbello@urosario.edu.co.

Summary

In the present work the toxic activity of extracts of *Eupatorium microphyllum* L.F. was evaluated on 4th instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus), under laboratory conditions. Aqueous extracts were utilized in concentrations of 500 mg L⁻¹, 1,500 mg L⁻¹ and 2,500 mg L⁻¹ and acetone in concentrations of 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹. The bioassays were carried out for triplicate each one with 20 larvae, exposed for 24 hours to 150 mL of solution. In all the bioassays were employed control groups. In the evaluation of the acetone extracts, a negative control was employed to avoid that the mortality of the larvae to occur on account of the solvent. The Aqueous extracts showed low moderate action in the mortality of larvae, less

INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti es un mosquito doméstico, vector de diversos arbovirus. Su mayor importancia epidemiológica radica en ser el principal transmisor de dengue y fiebre amarilla; sin embargo, en otras latitudes también ha sido reportado como vector de filariasis humana [1,2].

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala una constante dispersión y reinfestación de *A. aegypti* en diversas regiones de América, con frecuentes e importantes epidemias de dengue en Argentina, Colombia, Bolivia, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, México, Estados Unidos y todos los países de Centroamérica y el Caribe [3]. Este fenómeno amenaza extenderse hasta la actualidad; particularmente, en Colombia, los primeros brotes de dengue, asociados con los serotipos 2 y 3, se presentaron en la década de los setenta y, desde 1984 hasta nuestros días, han circulado los 4 serotipos, lo que periódicamente ha originado brotes de la enfermedad, los cuales han

than 20%. On the contrary, the action of the acetone extracts was observed to 10 and 20 mg L⁻¹ with 15% of mortality, while to 30 and 40 mg L⁻¹ were registered 22 to 38% of mortality. However, to 50 mg L⁻¹ the mortality was of 95.4% with highly significant statistical results. The concentrations of the acetone extracts showed to be the most efficient for the control of the mosquitoes selected. Both types of extracts showed toxic effect in larvae of *A. aegypti*, nevertheless, greater effect in the acetone extracts was observed relating to the aqueous extracts of *E. microphyllum*, which constitutes a viable alternative in the search of new larvicides from composed natural.

Key words: *Eupatorium microphyllum*, *Aedes aegypti*, bioassays, aqueous and acetone extracts, lethal Concentrations LC₅₀, LC₉₅.

sido transmitidos por *A. aegypti*. Varias investigaciones señalaron que en Colombia los casos reportados de fiebre amarilla entre 2003 y 2005 provienen principalmente de zonas selváticas [3-7]. Se han considerado dos casos transmitidos por especies de mosquitos diferentes al vector doméstico, probablemente de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*. No obstante, existe el riesgo latente de la urbanización de la enfermedad, debido a la presencia de *A. aegypti* en la cercanía de algunas áreas enzoóticas del país [6].

Para el control de los vectores adultos de *A. aegypti*, corrientemente se utilizan insecticidas piretroides de acción residual en paredes y sitios de reposo de estos mosquitos. Con frecuencia también se usan insecticidas organofosforados (principalmente temefos) que se aplican mediante tratamiento focal y perifocal en los sitios de cría de las larvas. Sin embargo, los problemas de la aplicación de estos insecticidas químicos de carácter comercial están relacionados con la creciente resistencia

que ocasionan en los mosquitos y también por la contaminación ambiental que generan [8-9]. En Colombia se evidenció la resistencia de *A. aegypti* a insecticidas como el DDT en 13 poblaciones; en un 54% a la lambda-cialotrina; 8 poblaciones fueron resistentes a temefos [10]. En consecuencia, una alternativa de control surge del concepto de manejo integrado de plagas, incluyendo controladores biológicos, manejo ambiental y utilización de insecticidas de origen vegetal, los cuales proporcionan modos de acción novedosos y reducen el riesgo de resistencia cruzada [11-12].

En el contexto anterior, se hace necesario evaluar insecticidas vegetales que presenten la ventaja de ser opciones de bajo riesgo para el ser humano, efectivos en el control de mosquitos e inoocuos para el ambiente. Las propiedades antes señaladas que se logran con los insecticidas de productos naturales, además de su bajo costo, posibilitaría un amplio uso en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades [11].

La mayoría de los insecticidas vegetales son extractos constituidos por un grupo de ingredientes activos de diversa naturaleza química. Desde el punto de vista de la resistencia, la baja estabilidad de los insecticidas vegetales, se convierte en un factor positivo pues la probabilidad de que dos extractos sean iguales es mínima, en razón a que la presión ejercida por el insecticida sobre los mosquitos no es siempre la misma. Esto se debe a que, aunque en el extracto se encuentren los mismos principios bioactivos, no siempre se encontrará en las mismas concentraciones. En general, la resistencia por parte de los insectos tarda más tiempo en desarrollarse cuando se usa una mezcla de ingredientes activos naturales, que cuando se utiliza cualquiera de sus componentes por separado, lo cual puede deberse a que es más difícil detoxificar un complejo de sustancias que un solo compuesto [13].

Las evaluaciones realizadas con extractos acuosos de plantas [14-18], extractos acetónicos [19-21] y aceites vegetales [22-23] contra larvas de mosquitos, han incrementado la lista a más de 140 especies de plantas con propiedades larvicidas, número inicialmente reportado por Grainge y Ahmed [24]. Entre las plantas que se han destacado contra larvas de mosquitos se encuentran las del género *Annona*: *A. bullata* (Rich), *A. densicoma* (Mart), *A. glabra* (L), *A. muricata* y *A. squamosa* (L), tóxicas para larvas de los mosquitos *A. aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles* spp. De las anteriores plantas se han extraído nueve principios activos pertenecientes a las acetogeninas y a los alcaloides, los cuales se encuentran principalmente en la corteza y la semilla, aunque también se han reportado en raíz, fruto y hoja. En Colombia, recientemente se evaluó la toxicidad de extractos etanólicos de *A. muricata*, *Melia azedarach* y *Ricinus communis* sobre larvas de IV estadio de *A. aegypti*, con resultados que fueron caracterizados por los autores como promisorios para el control de este mosquito [12].

Eupatorium microphyllum es un arbusto conocido vulgarmente como "patinegra", "trébol aromatizador", "chilca", "salvia" o "jarilla" que suele encontrarse en las región andina de Colombia. Presenta ramas pequeñas, tallos cortos redondos, hojas opuestas pecioladas, ápice agudo acuminado, base más o menos angosta de 5-8 mm de larga y de 4-5 mm de ancha, haz verde oscuro, envés blanco lanuginoso, con bordes festonados; inflorescencia en corimbos terminales, ramificados, tubulosos de 1,5 cm de ancho por 7 mm de longitud; cabezuelas homógamas, con flores hermafroditas de color lila, 25-35 flores; involucro cilíndrico de unos 0,5 cm; receptáculo subconvexo, desnudo y papo o vilano lila [25].

Las especies del género *Eupatorium* se han reconocido como útiles por sus efectos medici-

nales ya que se han preconizado como digestivos, carminativos, emenagogos, febrífugos, antisépticos, antiinflamatorios, antimicrobianos y anticancerígenos [25-27].

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar, por primera vez, la actividad tóxica de extractos acuosos y acetónicos de *Eupatorium microphyllum* sobre larvas de IV estadio de *A. aegypti*, en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se efectuó en el Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.

Preparación del material vegetal

El material vegetal (arbustos de *E. microphyllum*) se recolectó en varios sitios de la Sabana de Bogotá y en el municipio de Machetá, Cundinamarca, Colombia (5°37'00"LN- 73°37'00"LO). La preparación de la muestra y los extractos se realizó según las metodologías propuestas por Rodríguez y Lagunas [14], Bowers et al [16] y Sánchez et al [18].

Las plantas se recolectaron en etapa de floración. Luego, todo el material vegetal (flores, tallos, hojas y raíz) se secó por ventilación natural y bajo sombra por 48 a 60 horas hasta obtener un peso constante por pérdida de agua. Posteriormente se molió el material vegetal (tallos, hojas, flores y raíces) en un molino eléctrico, hasta obtener un polvo fino.

Preparación de los extractos

La preparación de los extractos acuosos crudos se realizó en maceración por 24 horas en una proporción de 5, 15 y 25 g por 100 mL de agua destilada (P/V), respectivamente, con concentraciones finales de 500 mg L⁻¹, 1.500 mg L⁻¹ y 2.500 mg L⁻¹. Luego se llevó a cabo la filtración al vacío a través de un papel de filtro Whatman N° 1.

Posteriormente se preparó el extracto acetónico, mediante maceración en frío por 48 horas, en una proporción de 75 g de polvo de la planta por 500 mL (P/V) de acetona grado analítico. Luego se evaporó el solvente en un rotavapor tipo *flash* a presión reducida y temperatura constante (temperatura de ebullición de la acetona 56,2°C), hasta obtener el extracto concentrado, sin presencia del solvente. A partir del extracto crudo se prepararon las concentraciones de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹.

Bioensayos

La evaluación de la toxicidad se efectuó con larvas de IV estadio, recién emergidas del mosquito *A. aegypti*, cepa Riohacha, colonizada en el Laboratorio de Entomología de la Universidad de La Salle [28].

Extracto acuoso

Se seleccionaron cuatro grupos con 20 larvas cada uno: tres experimentales y uno control en vasos de plástico de 150 mL de capacidad con 50 a 70 mL de las respectivas concentraciones (500 mg L⁻¹, 1.500 mg L⁻¹ y 2.500 mg L⁻¹) para los experimentales y agua para el control.

Extracto acetónico

Se utilizaron siete grupos larvales: dos como control con dosis del extracto cero por ciento, uno con solvente y el otro con agua, para verificar que la mortalidad de las larvas no ocurriera a causa de la acetona, y los 5 restantes con las concentraciones experimentales de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los bioensayos se establecieron bajo un diseño experimental completamente aleatorio, a una temperatura promedio de 27°C, humedad relativa de 69±10%, con 12 horas de fotoperiodicidad. A

las 24 horas después de la aplicación de los tratamientos se verificó la mortalidad de las larvas.

Análisis estadístico

La corrección de mortalidad se efectuó con base en la ecuación de Abbott [29]. No se tuvieron en cuenta mortalidades menores al 4% y superiores a 12%, en cuyo caso, el experimento se repetía. Los bioensayos se establecieron bajo un diseño experimental completamente aleatorio (cada individuo utilizado para el experimento fue seleccionado al azar de la población total de la colonia). Los datos de mortalidad se analizaron con los modelos Probit [30] (Logit y Log) para determinar la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración letal al 95% (CL₉₅). Además, para comparar dichos modelos en función de los valores de significancia sobre la mortalidad larval y seleccionar el más ajustado, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y el test de Hosmer y Lemeshow [31].

RESULTADOS

Mortalidad larvaria de extractos de larvas con los extractos acuosos y acetónicos de *E. microphyllum*

Concentraciones de 500 mg L⁻¹, 1.500 mg L⁻¹ y 2.500 mg L⁻¹ de los extractos acuosos de

E. microphyllum alcanzaron mortalidades de 8,3%, 11,6% y 19,29%, respectivamente, siendo este último valor moderadamente bajo.

Concentraciones de 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹, de los extractos acetónicos de *E. microphyllum* registraron, para la mortalidad larval, los siguientes valores: 5, 15, 22,2, 38,6 y 95,4%, respectivamente. Se observa el aumento de las concentraciones en proporción directa al incremento de la mortalidad, alcanzando un valor significativamente alto la concentración de 50 mg L⁻¹.

Modelos estadísticos en la mortalidad larvaria por extractos acuosos y acetónicos de *E. microphyllum*

La utilización de un análisis de varianza y del test Hosmer y Lemeshow [31] para comparar los modelos Logit, Probit y Log, al emplear extractos acuosos extraídos de los arbustos, mostraron valores de *p* mayores a 0,05, los cuales indicaron, en todos los casos, ningún efecto estadísticamente significativo sobre la mortalidad de los insectos (tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones letales CL₅₀ y CL₉₅, intervalos de confianza bajo los modelos Logit, Probit y Log en la mortalidad de larvas *A. aegypti*, por extractos acuosos a 500 mg L⁻¹, 1500 mg L⁻¹ y 2500 mg L⁻¹

Concentración	Modelo	CL (mg L ⁻¹)	LI	LS
CL ₅₀	Logit	4.351,157	2.774,179	5.928,136
	Probit	4.676,637	2.865,626	6.487,649
	Log	3.852,517	2.618,854	5.086,181
CL ₉₅	Logit	8.794,388	4.869,589	1.2719,19
	Probit	9.401,506	5.111,041	1.3691,97
	Log	4.963,765	3.167,968	6.759,561

CL = concentración letal. LI = límite inferior. LS = límite superior.

Contrariamente, con el uso de extractos acetónicos se registraron valores de p menores de 0,01, indicando efectos altamente significativos sobre la mortalidad larval. Sin embargo, al comparar los valores de los tres modelos (Logit, Probit y Log) se constató que el más ajustado correspondió a los datos del modelo Log, en

razón a la menor diferencia entre los valores del límite superior e inferior.

En la tabla 2 se muestran los datos de las concentraciones letales CL_{50} y CL_{95} . Los valores del modelo Log coinciden, en ambas concentraciones letales, con la mayor mortalidad larval alcanzada a 50 mg L^{-1} , dependiente de los extractos acetónicos de *E. microphyllum*.

Tabla 2. Concentraciones letales CL_{50} y CL_{95} , intervalos de confianza bajo los modelos Logit, Probit y Log en la mortalidad de larvas de *A. aegypti*, por extractos acetónicos a 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} , 40 mg L^{-1} y 50 mg L^{-1}

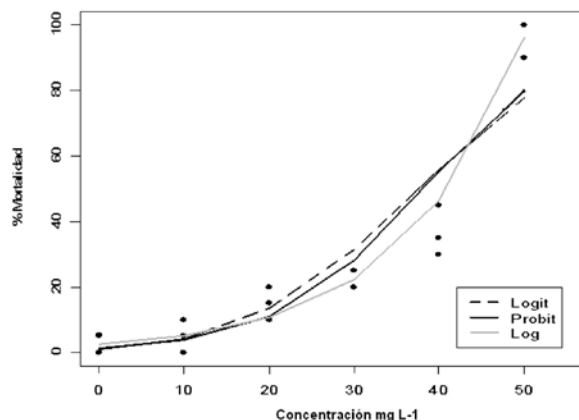
Concentración	Modelo	CL (mg L^{-1})	LI	LS
CL_{50}	Logit	38,136	35,936	40,337
	Probit	37,722	35,376	40,068
	Log	41,081	39,873	42,290
CL_{95}	Logit	63,723	58,296	69,150
	Probit	64,101	58,667	69,534
	Log	49,830	49,262	50,399

CL = concentración letal. LI = límite inferior. LS = límite superior.

En la gráfica 1 se aprecian los tres modelos ajustados y las mortalidades observadas. En este gráfico se verifica lo obtenido con el test de

Hosmer y Lemeshow [31], es decir, el modelo que mejor describe el conjunto de datos es el modelo Log.

Gráfica 1. Mortalidad en larvas de IV estadio de *A. aegypti*, por extractos acetónicos a 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} , 40 mg L^{-1} y 50 mg L^{-1}



DISCUSIÓN

Los bioensayos con extractos acuosos a las concentraciones de 500 mg L⁻¹, 1.500 mg L⁻¹ y 2.500 mg L⁻¹ mostraron acción moderadamente baja en la mortalidad de larvas de IV estadio del mosquito *A. aegypti*, menor del 20%. Brattsten [32] reporta este fenómeno de mortalidad baja debido a que los insectos son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos exógenos para hacerlos más hidrofílicos y, generalmente, menos tóxicos. Probablemente esta habilidad fisiológica evolucionó en el mosquito para detoxificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso.

En la actualidad no existen reportes de extractos de la especie *E. microphyllum* utilizados para control de insectos transmisores de enfermedades, pero sí de otras especies de dicho género con efecto citotóxico, antitumoral y antileucémico [33-34]. En contraste con los resultados obtenidos a partir de los extractos acuosos, en los cuales no fue significativa la mortalidad larval del mosquito *A. aegypti*, otros estudios desarrollados por Rodríguez y Lagunas [14] demostraron que las plantas del género *Annona* son potencialmente tóxicas para larvas de *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* y *Anopheles sp.*, en ensayos evaluativos tanto con extractos acuosos como acetónicos. Con los tratamientos del extracto acuoso de *A. squamosa* al 25% se presentó mortalidad larval de *C. quinquefasciatus* mayor del 20%. A la vez, los resultados de mortalidad por el extracto acetónico a la dosis 0,01% evidenciaron un rango de efectividad del 100%, en larvas de IV estadio de *C. quinquefasciatus*. Otros autores, como Sánchez et al [18], utilizaron extractos acuosos de *A. muricata* a una dosis del 66% y determinaron el 100% de mortalidad de larvas de *A. aegypti*. Por su parte, Phukan y Kalita [35] mencionan bioactividad

tóxica relativamente alta a partir de extractos acuosos en una concentración de 70 mg L⁻¹ de *Litsea salicifolia* contra *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*. Sin embargo, hubo algún grado de coincidencia en la eficacia de los extractos acetónicos, tanto en los trabajos antes señalados como en el presente, en el cual se alcanzó mortalidad larval hasta del 95,4%.

A partir de los resultados de los modelos estadísticos, en la mortalidad ocasionada por los extractos acuosos, se observó que para este conjunto de datos no fue significativa en ninguno de los modelos propuestos, lo cual indica que el extracto vegetal acuoso en sus diferentes concentraciones no tuvo efectos sobre la tasa de mortalidad; por lo tanto, las concentraciones letales no fueron confiables porque el modelo arrojó como resultado la no efectividad de éstas en la mortalidad larval del mosquito *A. aegypti*.

Por el contrario, los extractos acetónicos presentaron diferentes niveles de mortalidad larval. Así, para las dosis del 10 mg L⁻¹ y 20 mg L⁻¹ fue moderadamente baja, la mortalidad fue menor del 15%, mientras que en las dosis de 30 mg L⁻¹ y 40 mg L⁻¹ fue moderadamente alta (22-38%), y para la concentración de 50 mg L⁻¹, la mortalidad fue alta y muy significativa. Así mismo, los parámetros de los modelos estadísticos permitieron establecer que el extracto acetónico en la concentración de 50 mg L⁻¹ presentó un efecto estadísticamente significativo sobre la mortalidad larval, tal como se registró en el análisis de varianza en los modelos cotejados y concomitantemente tuvo el mayor grado de coincidencia con las concentraciones letales obtenidas.

En un trabajo reciente realizado en Colombia, Parra et al [12], evaluaron la actividad de extractos etanólicos obtenidos de las semillas de *A. muricata*, *Melia azedarach* y *Ricinus*

communis contra larvas de IV estadio de *A. aegypti* y nauplios de *Artemia salina*, encontrando que el más activo de estos vegetales fue *R. communis* con una concentración letal media de 860 ppm y una concentración letal, al 95%, entre 450 y 1.400 ppm, seguido por el extracto de *A. muricata*, con una LC_{50} de 900 ppm y LC_{95} entre 380 y 1.300 ppm. Finalmente, la menor toxicidad la tuvo *M. azedarach* con una LC_{50} de 1.800 y LC_{95} entre 1.500 y 2.100 ppm. Estos resultados, comparados con los obtenidos en el presente trabajo, muestran que los extractos acetónicos de *E. microphyllum* (CL_{50} de 41.081 ppm y CL_{95} de 49.830 ppm) fueron más activos sobre las larvas del mosquito *A. aegypti*, en razón a que las concentraciones de los extractos requeridas para lograr tales tasas de mortalidad fueron menores.

Los valores de la estadística de Hosmer y Lemeshow [31], para los tres modelos considerados, permite señalar que la prueba de Log es

la que más se ajusta a los resultados obtenidos. Para la presente investigación, sólo este modelo describe satisfactoriamente el comportamiento de la mortalidad en relación con la concentración de extracto vegetal; por tanto, es recomendable usarlo para la estimación de las concentraciones letales CL_{50} y CL_{95} en investigaciones de este tipo, bajo condiciones de laboratorio.

En conclusión, la utilización de los extractos de *E. microphyllum* contra las larvas de IV estadio de *A. aegypti*, principalmente los acetónicos a las mayores concentraciones usadas en el presente trabajo (40 mg L⁻¹ y 50 mg L⁻¹), permiten validarlos como potenciales larvicidas naturales contra esta especie de mosquito y, probablemente, también contra otras de la familia *Culicidae*. Sin embargo, se requiere la evaluación a nivel de campo para poder determinar, además de la toxicidad contra los mosquitos en su hábitat natural, la estabilidad de los compuestos y su impacto a nivel ambiental.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de La Salle y a la Universidad del Rosario por la financiación de esta investigación. Al Departamento de Investigaciones de la Universidad de La Salle por el apoyo brindado y, particularmente, a la doctora Estrella Cárdenas, por la asesoría y colaboración recibida en el desarrollo del presente trabajo. Al auxiliar del laboratorio de Entomología de la Universidad de La Salle, Gilberto Torres, por suministrar las muestras del insecto y su colaboración en el mantenimiento de este material biológico.

REFERENCIAS

1. Tabachnick WJ. The yellow fever mosquito. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease. *Am Entomol* 1991;37:14-29.
2. Maillard M, Marston A, Hostettmann K. Search for molluscicidal and larvicidal agents from plants. In M Balandrin, *Human Medicinal Agents From Plants*, Washington DC: American Chemical Society; 1993.
3. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guía para su prevención y control. *Publicación Científica*; 548. Washington D.C; 1997, p. 109.

4. Groot SJ, Gacharná MG. Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986; 6: 101-106.
5. Rodríguez G, Velandia M, Boshell J. Fiebre amarilla. La enfermedad y su control. Bogotá: División de Biblioteca y Publicaciones, INS; 2003, p.47.
6. Velandia MP. La fiebre amarilla y su control. *Biomédica* 2004; 24:5-6.
7. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional-INS. Sivigila. Consolidados de las semana 47 a 52, 2005, p. 381.
8. Urano AF, Maciel VM, Craveiro AA, Lacerda MI, Braga M, Fontenele E. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 569-571.
9. Coria C, Almiron W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M. et al. 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol* 2008; 99: 3066-3070.
10. Santacoloma L, Brochero HL, Chaves B. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de *A. aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) en cinco departamentos de Colombia. *Memorias XIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical*. Ibagué. Colombia; 2007, p. 175.
11. Arnason JT, Philogene BJ, Morand P. *Insecticides of plants origin*. Washington, DC: Americal Chemical Society; 1989, p. 213.
12. Parra G, García C, Cotes J. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Revista CES Medicina*. 2007; 21:47-54.
13. Bowers WS, Ohta T, Cleere JS, Marcella PA. Discovery of insects anti-juvenile hormones in plants. *Sci*. 1976 193: 542-547.
14. Rodríguez HC, Lagunas R. Combate de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) con sustancias acuosas vegetales. *Primer Encuentro Estatal sobre Entomología Médica y Veterinaria*. Cuernavaca: Morelos; 1989, p. 133-142.
15. Rivera RI. Toxicidad de extractos acuosos vegetales en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tesis de licenciatura. *Parasitología Agrícola*, UACH. Chapingo, México; 1992, p. 59.
16. Bowers WS, Sener B, Evnas H, Bingol F, Erdogan I. Activity of Turkish medicinal plants against mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Insect Sci Appl* 1995; 16:339-242.
17. Chansang U, Zahir NS, Bansiddhi J, Boonruad T, Thongsrirak P, Mingmuang J, Benjapong N, Mulla MS. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* vahl) from Thailand. *J Vector Ecol* 2005; 30:195-200.
18. Sánchez MC, González N, González E. Efecto larvicida de extractos acuosos vegetales sobre *Aedes aegypti*. *Manejo Integrado de Plagas* 1997; 45:30-33.
19. Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Ghouse BS, Arumugam S, Himalayan B. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae. *Fitoterapia* 2000; 71:553-555.
20. Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, et al. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol-a bioactive carbohydrate. *Chem Biodivers* 2005; 2:684-68.
21. Rahuman AA, Venkatesan P. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitol Res*. En Prensa. 2008.
22. Ho SH, Goh PM, Lee KM. Evaluation of two pine oil-based formulations of kits against various life stages of *Aedes aegypti*. *Inter Pest Cont* 1992; 34:180-181.

23. Samarasekera R, Weerasinghe IS, Hemalal KP. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. *Pest Manag Sci* 2008; 64:290-295.
24. Grainge MS, Ahmed. Handbook of plants pest-control properties. New York: John Wiley & Sons; p. 470, 1988.
25. García-Barriga H. Flora medicinal de Colombia. Tomo III Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; p. 296-299, 1975.
26. El-Seedia HR, Oharaa BT, Sataa N, Nishiyama S. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 2002; 81:293-296.
27. Sasikumar M, Pichai A, Doss A. Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. *Fitoterapia* 2005;76:100-103.
28. Ardila A, Escovar J, Bello F. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biomédica* 1995; 25:65-75.
29. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925; 18:265-267.
30. Raymond M. Presentation d' un programme "Basic" d' analyzes log-probit pour microordinateur. *Cah ORSTOM. Serie Entom Med Paras* 1985; 28:117-121.
31. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. New York: John Wiley; 1989, p. 660.
32. Brattsten LB. Inducibility of metabolic insecticide defenses in boll weevils and tobacco budworm caterpillars. *Pest Biochem Physiol* 1987; 27:13-23.
33. Kupchan SM, Maruyama M, Hemingway RJ, Hemingway JC, Shibuya S, Fujita T. Structural elucidation of novel tumor-inhibitory sesquiterpene lactones from *Eupatorium cuneifolium*. *J Org Chem* 1973; 38:2189-2196.
34. Takahashi T. Hiyodorilactones A and B, new tumor inhibitory germacradienolides from *Eupatorium sachalinense*. *Makino Chem Lett* 1978; 12:1345-1348.
35. Phukan S, Kalita MC. Phytopesticidal and repellent efficacy of *Litsea salicifolia* (Lauraceae) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Indian J Exp Biol* 2005; 43:472-474.