

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



“INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA CONTRA EL MOSQUITO  
Aedes aegypti EN LAS FRACCIONES DE LOS EXTRACTOS DE 5 ESPECIES  
VEGETALES Y LA ELABORACION DE UN PREPARADO LARVICIDA”

**Trabajo de Graduación presentado por:**  
**RODRIGO RENE ALFARO HERNANDEZ**  
**RENÉ DAVID DE JESÚS ARTIGA ACOSTA**  
**RENÉ ANTONIO HERNÁNDEZ FLORES**

Para optar al grado de:

**LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA**

**Septiembre 2002**

**San Salvador**

**El Salvador**

**Centroamérica**



**© 2001, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

RECTOR

DRA. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

DECANO

LIC. MARÍA ISABEL RAMOS DE RODAS

SECRETARIO

LIC. ANA ARELY CÁCERES MAGAÑA

ASESOR

LIC. RHINA ANTONIETA TOLEDO MENDOZA

JURADO CALIFICADOR

LICDA. ANA ARELY CÁCERES MAGAÑA

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

DRA. GLORIA RUTH CALDERÓN

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se determinó la actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti* en las fracciones de las especies vegetales *Annona diversifolia*, *Rauwolfia tetraphylla*, *Sansevieria quineensis*, *Ocimum micranthum* y *Yuca elephantipes*.

Estas 5 especies vegetales se seleccionaron por medio de los resultados obtenidos en la primera fase del macroproyecto “Bioensayos simples para la búsqueda de Bioactividad en extractos vegetales dentro del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo” ( CYTED ); en los que se analizaron los extractos crudos de 56 especies vegetales y 15 aceites esenciales, habiéndose obtenido resultados positivos en éstas especies por lo que se seleccionaron para continuar su estudio; para esto se recolectaron y se extrajeron con etanol al 70%, los extractos se fraccionaron con 5 solventes tomando en cuenta las distintas polaridades, obteniéndose un total de 25 fracciones, de éstas solamente 10 presentaron un 100% de mortalidad , con las que se hicieron preformulaciones para la elaboración del larvicida, las que fueron tomadas en cuenta para la formulación

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la salud se ve afectada por enfermedades virales transmitidas por artrópodos, como es el caso del dengue en sus dos formas: clásica y hemorrágica, que es transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*.

En El Salvador, durante el año 2000, la Unidad de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó 3,248 casos de dengue y se registraron un total de 26 muertes comprobadas.

Debido a que todavía no se dispone de una vacuna debidamente evaluada y comprobada para controlar la enfermedad y que la única alternativa que se presenta es controlar el vector transmisor del virus con productos químicos que son tóxicos para la salud humana tales como: el temefos, conocido popularmente como “abate”; por lo que es de suma importancia considerar otras alternativas como es la actividad larvicida contra el *Aedes aegypti*.

Tomando como base estudios realizados anteriormente con los extractos de las siguientes especies vegetales: *Annona diversifolia* (anona), *Rauwolfia tetraphylla* (amatillo), *Sansevieria quineensis* (curarina), *Ocimum micranthum* (albahaca) y *Yuca elephantipes* (izote).

Con el objetivo de aprovechar los resultados antes mencionados, la abundancia que existe en el país de las especies vegetales activas y la facilidad con que pueden ser cultivadas, se incluye en la presente investigación la determinación de la actividad larvicida contra el vector del dengue en las fracciones de las 5 especies vegetales y la elaboración de

un producto larvicida de origen vegetal, utilizando los extractos crudos de las especies vegetales activas.

En la primera fase de la investigación se realizó la revisión bibliográfica sobre las monografías de las 5 especies vegetales, aspectos generales del dengue: concepto, formas en que se manifiesta, primeras epidemias de dengue, identificación del virus; generalidades del vector; *Aedes aegypti*: distribución geográfica, clasificación sistemática, ciclo de vida; tratamiento antibacterial: control químico y control biológico.

En la parte experimental se procedió a la recolección del material vegetal en las diferentes zonas del país, considerando que los órganos a utilizar estén en las mejores condiciones, libres de insectos y materiales extraños, se utilizó el método de reflujo para la extracción con metanol al 70% como disolvente, concentrando éste por medio de un rotavapor.

Los cinco extractos se fraccionaron separadamente por el método de cromatografía en columna, utilizando los siguientes solventes: n-hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, obteniendo 25 fracciones, las cuales se concentraron y se les determinó la actividad larvicida contra el *Aedes aegypti*.

En el ensayo preliminar a 500 partes por millón (ppm) solamente diez presentaban un 100% de mortalidad: Anona- n-hexano, Anona-diclorometano, Anona-cloroformo, Anona-acetato de etilo, Anona-metanol, Amatillo-diclorometano, Curarina-diclorometano, Albahaca-diclorometano, Albahaca-metanol e Izote-metanol. Estas fracciones fueron ensayadas a concentraciones geométricas inferiores de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 ppm ; para determinar la concentración letal al 100%, las fracciones de anona-

diclorometano y anona-cloroformo fueron las que presentaron la menor concentración letal al 100%.

A las fracciones activas se les realizó también un análisis fitoquímico preliminar para determinar la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: taninos, alcaloides, Sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiotónicos, saponínicos, flavonoides y antraquinónicos.

Luego se procedió a la preformulación del preparado del larvicida ensayando los extractos crudos de las especies vegetales, así como las fracciones activas, obteniéndose los mejores resultados con el extracto de semilla de *Annona diversifolia* (anona).

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por estar conmigo en casa día de mi vida y por haberme dado fuerza y sabiduría en toda mi formación profesional.

A mis padres, María Elvira Flores de Hernández y René Hernández Girón por todo su apoyo incondicional en toda mi vida y por su motivación, esfuerzo, sabios consejos en el desarrollo de mi educación superior.

A Celina Sánchez por ser una persona súper especial y apoyo incondicional en mi carrera universitaria.

A mis Hermanas Sandra, Jacqueline y Evelyn por su esfuerzo, ayuda, consejos y por su paciencia en todos estos años.

A mis primas Cristinas Vides y Sonia Vides por siempre estar en los momentos difíciles de mi vida y preparación profesional.

A Lic. Rhina Toledo por su esfuerzo y asesoramiento profesional brindado en toda la investigación de este trabajo.

A mis compañeros de tesis, David Artiga y Rodrigo Alfaro por haber conformado un excelente grupo de investigación y por todo el esfuerzo que juntos le dedicamos a esta investigación.

A Carolina por su ayuda en esta tesis.

**René Antonio Hernández Flores**



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios todopoderoso como por ser la luz en mi camino.

A mis Padres, Teresa de Artiga y René Artiga por su apoyo, esfuerzo y comprensión durante toda mi carrera.

A mis tías, especialmente a tía Alicia y tía Ernestina **(Q.D.D.G)** por sus valiosos consejos.

A Erika y Niña Ofelia por darme la oportunidad de conocernos y por la confianza que me han brindado.

A mis primos, Orlando, George, Salvador, Beatriz, Rosalinda, Betty y Alba por su ayuda incondicional durante el desarrollo de la Investigación.

A mis mejores amigos, Carlos Guerra y Walter Guevara por sus palabra de aliento en los momentos más difíciles de mi preparación académica.

A mis compañeros de tesis, René A. Hernández y Rodrigo R. Alfaro por el esfuerzo realizado durante el desarrollo de esta investigación.

A Carolina por su apoyo en este trabajo de investigación.

**René David de Jesús Artiga Acosta.**

**Por este medio queremos agradecer a la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños (APROCSAL) por su valioso apoyo para la realización de la presente investigación ya que sin ellos no hubiera sido posible presentar estos resultados, los cuales serán de mucho beneficio para la salud del pueblo salvadoreño.**

## INDICE

	PAGINA
RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	ii
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Dengue, la Enfermedad	6
1.1 Concepto	6
1.2 Formas en que se manifiesta	6
1.2.1 Dengue Clásico (DC)	6
1.2.1.1 Manifestaciones clínicas	7
1.2.2 Fiebre Hemorrágica por dengue (FHD)	8
1.2.2.1 Manifestaciones clínicas	9
1.2.2.2 Criterios de gravedad de la FHD	9
1.2.3 Síndrome de choque por dengue	10
1.2.4 Características comunes entre la FDH y el SCD	11
1.3 Primeras epidemias de dengue	12
1.4 Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas.	13
1.5 Dengue y Dengue Hemorrágico en El Salvador.	14
1.6 El virus	15
1.6.1 Taxonomía	15
1.6.2 Estructura proteica	15

1.6.3 Penetración en las células.	16
1.7 Patogenia	16
1.7.1 Factores Macrodeterminantes	17
1.7.2 Factores Microdeterminantes	17
1.8 Diagnóstico clínico	18
1.9 Tratamiento en casos de DC	19
1.10 Tratamientos en casos de FHD y SCD	19
2. El vector : Aedes aegypti	21
2.1 Distribución Geográfica	21
2.2 Clasificación sistemática	22
2.3 Ciclo de vida y bionomía	22
2.3.1 El huevo	23
2.3.2 La larva	24
2.3.3 La pupa	25
2.3.4 El adulto	26
2.3.4.1 Alimentación	27
2.3.4.2 Ciclo gonadotrófico	28
2.3.4.3 Dispersión: rango de vuelo	28
2.3.4.4 Conductas de reposo	29
2.3.4.5 Longevidad.	30
3. Tratamiento Antivectorial	30
3.1 Campaña de eliminación de criaderos o deschatarrización	30

3.2 Control Químico.	31
3.2.1 Control Focal	31
3.2.1.1 Características del abate.	31
3.2.1.2 Método de aplicación de abate en los depósitos.	32
3.2.2 Control Perifocal	33
3.2.2.1 Aplicaciones espaciales	33
3.3 Control Biológico	35
4. Monografías de las especies vegetales	36
4.1 Annona diversifolia	36
4.2 Rauwolfia tetraphylla	38
4.3 Ocimum micranthum	42
4.4 Sansevieria quineensis	47
4.5 Yucca elephantipes	49
CAPITULO II: PARTE EXPERIMENTAL	52
1. Recursos Materiales.	53
1.1 Material vegetal	53
1.2 Cepa de Referencia	53
1.3 Control positivo	53
1.4 Material, Equipo y Reactivos	53
1.4.1 Material	53
1.4.2 Equipo	55
1.4.3 Reactivos y Solventes	55

2. Metodología	57
2.1 Recolección del material vegetal	57
2.2 Preparación de los extractos	58
2.3 Fraccionamiento de los extractos	58
2.4 Bio-ensayo larvicida usando <i>Aedes aegypti</i>	59
2.4 Obtención de las larvas en su segundo estadio	59
2.4.2 Preparación de las soluciones stock de cada fracción	59
2.4.3 Preparación de la solución utilizada como blanco	60
2.4.4 Preparación de la solución como control positivo	60
2.4.5 Determinación de la actividad larvicida	60
2.4.6 Determinación de la concentración letal al 100% (LC <sub>100</sub> )	61
2.4.7 Determinación de la dosis letal al 50% (DL <sub>50</sub> )	61
2.5 Análisis fitoquímico de las fracciones activas	62
2.6 Elaboración del preparado larvicida	67
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
CAPITULO IV: CONCLUSIONES	93
CAPITULO V: RECOMENDACIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

# CAPITULO I

## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

## **1. DENGUE, LA ENFERMEDAD**

### **1.1 Concepto**

El dengue es una enfermedad infecciosa producida por un virus de genoma ARN, al cual se le conocen cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 Y DEN-4), transmitidos por el *Aedes aegypti* como principal vector.<sup>8</sup>

Al dengue también se le conoce como: fiebre dengue, dengüero, fiebre bouque, fiebre quebrantahuesos, fiebre polca y fiebre dandy.<sup>28</sup>

### **1.2 Formas en que se manifiesta**

La enfermedad del dengue se manifiesta clínicamente en dos formas principales:

- a. Dengue Clásico; también llamado fiebre del dengue (FD)
- b. Dengue Hemorrágico; (DH), también llamado fiebre hemorrágica del dengue (FHD), que a veces se presenta con síndrome de choque por dengue (FHD/SCD).<sup>8</sup>

26

#### **1.2.1 Dengue Clásico (DC)**

Es una enfermedad febril aguda que se caracteriza por un comienzo repentino, con fiebre que dura de 3 a 7 días, es un padecimiento autolimitado que no pone en riesgo la vida del paciente, aunque su convalecencia puede prolongarse varios días o semanas con gran debilitamiento físico y cierto grado de apatía.<sup>23</sup>



### 1.2.1.1 Manifestaciones Clínicas

El cuadro clínico varía según la edad del paciente:

#### a) Lactantes y pre-escolares

- Fiebre de 1 a 5 días
- Faringitis
- Rinitis
- Tos Leve

#### b) En escolares

- Fiebre súbita elevada 39 a 41°C
- Cefalea frontal
- Rash muscular pasajero en las primeras 24-48 horas
- Bradicardia relativa
- Del segundo al sexto día, náuseas, vómitos y anorexia severa
- Después del sexto día aparecerá un segundo rash que no brota en la palma de las manos y plantas de los pies y que puede confundirse con escarlatina
- Edema de pies y manos
- Convulsiones febriles que ameritan punción lumbar.<sup>28</sup>

### c) Adultos

El cuadro clínico es más acentuado

- Fiebre alta de 3 a 7 días
- Escalofríos
- Cefaleas severas
- Dolor retro-ocular
- Dolor en músculos y articulaciones
- Rash, que se inicia en el tronco y luego en las extremidades
- Adenopatías cervicales algunas veces dolorosas
- Vómitos
- Dolor óseo
- Mialgias
- Quebrantamiento general
- Enrojecimiento de conjuntivas oculares.<sup>8, 28</sup>

### **1.2.2 Fiebre hemorrágica por dengue (FHD) o Dengue Hemorrágico (DH)**

Las infecciones del dengue clásico casi nunca conducen a la muerte sin embargo, en 1953 y 1954, apareció en las Filipinas un síndrome del dengue que a diferencia del DC, este se manifestó principalmente en los niños y causó síntomas graves con hemorragias y shocks en los jóvenes pacientes. Al síndrome se le llamó fiebre hemorrágica por dengue.<sup>25</sup>

### **1.2.2.1 Manifestaciones Clínicas**

Las manifestaciones clínicas de la FHD son las mismas del DC más:

- Prueba de lazo o torniquete positiva
- Hemorragia vaginal
- Daño o disfunción en la capa de células epiteliales que recubren los vasos linfáticos y sanguíneos
- Trombocitopenia (menos de 100,000 plaquetas por  $\text{mm}^3$ )
- Hemorragia nasal producida por la irritación local de las mucosas nasales
- Hemorragias de las encías
- Hemorragias gastrointestinales
- Manchas muy pequeñas de color rojo diseminadas en las extremidades, axilas, la cara y el paladar
- Congestión facial
- Anorexia
- Daño renal
- Hepatomegalia.<sup>26</sup>

### **1.2.2.2 Criterios de gravedad de la FHD**

La gravedad de la FHD se clasifica en cuatro grados:

- Grado I: Fiebre acompañada de síntomas generales no específicos (escalofríos, dolores articulares, cefaleas, diarrea, etc.), la única manifestación hemorrágica es una prueba del torniquete positiva.
- Grado II: Además de los síntomas del Grado I, existe hemorragia espontánea en forma de hemorragia cutánea solamente o sangramiento en otra localización.
- Grado III: Insuficiencia circulatoria que se manifiesta en el pulso rápido y débil, el estrechamiento de la tensión diferencial (20 mmHg o menos) o la hipotensión con la piel fría y húmeda y agitación.
- Grado IV: Choque profundo con presión arterial y pulso imperceptibles. Los grados III y IV constituyen el síndrome de choque por dengue.
- La presencia simultánea de trombocitopenia con hemoconcentración diferencia a la FHD (grados I y II) de la fiebre por dengue.<sup>28</sup>

### **1.2.3 Síndrome de choque por dengue (SCD)**

Después de algunos días de fiebre el estado del paciente empeora bruscamente y se manifiesta el SCD.

Coincidiendo con el descenso de la temperatura o poco después se pueden presentar:

- Coloración azulada de la piel alrededor de la boca

- Insuficiencia circulatoria
- Los pacientes parecen letárgicos
- Pulso más rápido y débil
- La piel se torna fría, con manchas y congestionada
- Peligro de muerte si no se administra el tratamiento adecuado
- Generalmente los pacientes fallecen por congestión pulmonar y falla cardiaca
- Mala coagulación de la sangre
- Hipotensión
- Piel fría y húmeda.<sup>26</sup>

#### **1.2.4 Características comunes entre la FDH y el SCD**

- Situación hematológica anormal en la que el número de plaquetas esta disminuido debido a la destrucción de tejidos en la médula ósea
- Bajos y anormales niveles de sodio en la sangre provocadas por la excreción inadecuada de agua.
- Alteraciones en algunas enzimas del hígado
- Presencia de cantidades excesivas de proteína en la orina.
- Alteraciones del sistema nervioso central (convulsiones, espasmos, alteraciones de la conciencia, parálisis ligera o parcial transitoria).<sup>26</sup>

### 1.3 Primeras epidemias de dengue

Algunos autores consideran que los primeros brotes epidémicos de los que se tuvo información ocurrieron en la isla de Java en 1779 y en Filadelfia, un año después. Según otros, la primera epidemia ocurrió en Europa (Cádiz y Sevilla), en 1784.

En 1827 se tuvo información de la primera pandemia en el Caribe y en la costa Atlántica de Estados Unidos, a partir del puerto de Virginia.

La segunda pandemia (1848 – 1850) incluyó la Habana, Nueva Orleans y otras ciudades y se asoció a abortos y partos prematuros así como a hemorragias .

La tercera pandemia (1879-1880) incluyó también el Caribe (Bermudas, Cuba, Panamá, Puerto Rico, Islas Vírgenes y Venezuela). Por esa época, del otro lado del mundo, en Queensland Australia, ocurrieron epidemias de dengue en 1879, 1885 y 1897.

En la Habana en 1897 se presentó una epidemia de dengue con manifestaciones hemorrágicas que procedió al brote hemorrágico de Texas, en ese mismo año, y al brote de la Florida de 1898 y 1899.

En África, en 1921, ocurrió una epidemia de dengue con 40,000 casos en la ciudad de Durban, África del Sur. Retrospectivamente se admite que fue provocada por el DEN-1.

En Grecia hubo una epidemia muy importante en 1927-1928, en la cual el 90% de la población de Atenas fue infectada, con casi un millón de casos notificados y 1,250 muertos.<sup>8</sup>

En Panamá ocurrió un discreto brote epidémico con algunos casos de FHD. Nicaragua tuvo una epidemia de varios miles de casos incluyendo ciento de pacientes con FHD y trombocitopenia.

Costa Rica se había mantenido sin la enfermedad hasta 1993, año en el cual tuvo una epidemia de más de 5,000 casos de DC por el serotipo 1. Posteriormente se introdujo el DEN-3 y ha continuado con varios miles de casos de dengue cada año.

En general, toda América Central y México ha sido y continúa siendo una sub-región con intensa actividad del dengue, lo cual incluye a Honduras y Belice.<sup>8</sup>

### **1.5 Dengue y Dengue Hemorrágico en El Salvador.**

El Salvador no sufrió de grandes epidemias durante varios años. Incluso de 1940 a 1977 el país, al igual que el resto de América Latina, vivió un período de calma casi por completo del zancudo transmisor de esta enfermedad. En 1965 se declaró internacionalmente a El Salvador libre de *Aedes aegypti*. Se mantuvo un silencio epidemiológico de 13 años.

En julio de 1978 reaparece la enfermedad, como un patrón de actividad clínica bianual y con incidencia estacional, coincidente a la salida del invierno (Agosto- Noviembre), en este año se reportaron un total de 18,004 casos de DC (ver anexo N° 14).

El año de 1979 fue otro año crítico ya que se presentaron 23,207 casos de dengue común, siendo hasta la fecha el mayor número confirmado.

En 1982 se registraron 5,166 casos de DC identificándose el serotipo I.

En 1987 se registraron 2,836 casos de DC, 78 casos de FHD y se identificó el serotipo II.

En 1990 se presentaron 1,381 casos de DC y se identificó el serotipo IV.

En 1995 se reportaron 9,658 casos de DC y 125 casos de FHD incluyendo 5 defunciones. En este año se identificó por primera vez el serotipo III (ver anexo 14).<sup>42</sup>

En el año 2000 El Salvador sufrió el peor de los embates del dengue (ver anexo 16). En una sola semana se registraron 306 casos de dengue y en total se confirmaron 3,248, de estos 411 fueron FHD y se registró un total de 26 muertes comprobadas de los cuales 25 fueron niños menores de 10 años y un adulto.<sup>42, 27</sup>

### **1.5.1 Situación actual del dengue en EL Salvador**

Según las estadísticas de la organización Panamericana de la Salud (OPS), El Salvador ocupa el séptimo lugar entre los países con más muertos por dengue en América Latina, durante el periodo de 1997 a 2001 con 34 fallecidos. En los primeros lugares están países como Colombia con 178, Venezuela 112, México 51 y Brasil 50, pero sus poblaciones son superiores. En lo que El Salvador está arriba de forma indiscutible es en el porcentaje de personas que mueren, luego de contraer el dengue hemorrágico ya que tienen una tasa de mortalidad del 3.88% mientras Colombia es apenas de 1.01%, y Venezuela 0.44%.

En Centroamérica, El Salvador se lleva el segundo lugar en número de víctimas, solo detrás de Nicaragua que tiene 44 muertes en el mismo período.

En el año 2002 El Salvador sufre una nueva epidemia, hasta el 29 de junio la Unidad Nacional de Epidemiología de Ministerio de Salud Pública confirmó un total de 1664 casos de DC y 133 de FHD, incluyendo 6 muertes confirmadas por el Laboratorio.



Los departamentos con mayor casos de dengue reportados son San Salvador, Santa Ana y La Libertad (ver anexo 15). Las zonas urbanas y densamente pobladas como Soyapango e Ilopango son las que registran el mayor número de casos confirmados.

## **1.6 El virus**

La fiebre amarilla, en 1902 y la fiebre del dengue, en 1907, constituyeron las dos primeras enfermedades humanas cuya causa quedo nítidamente establecida: un virus filtrable y submicroscópico.<sup>8</sup>

### **1.6.1 Taxonomía**

Los virus del dengue pertenecen a la familia flaviviridae, con otros 60 tipos de virus, todos ellos transmitidos por artrópodos. Todos los flavivirus comparten determinantes antigénicos comunes que parecen estar asociados con la nucleocápside.<sup>8</sup>

### **1.6.2 Estructura proteica**

El virión maduro tiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside o proteína del núcleo, la proteína M, asociada con la membrana y la proteína E de la envoltura .

La formación de la proteína M a partir de un precursor (Proteína Pre M) parece ser un hecho crucial en la morfogénesis del virus. Aunque la función de esta proteína no es clara, resulta en un aumento de la infectividad viral y en una reorganización de la estructura de la superficie del virus.

La proteína C es el primer polipéptido viral sintetizado. Como es rica en residuos de lisina y arginina, es capaz de actuar con el ARN viral.

resulta en un aumento de la infectividad viral y en una reorganización de la estructura de la superficie del virus.

La proteína C es el primer polipéptido viral sintetizado. Como es rica en residuos de lisina y arginina, es capaz de actuar con el ARN viral.

La glicoproteína E es la mayor de la envoltura y es responsable por la neutralización del virus y la hemaglutinación de los eritrocitos de ganso.<sup>8</sup>

### **1.6.3 Penetración en las células.**

La penetración a la célula del huésped se puede hacer por dos mecanismos: la envoltura viral se puede fusionar con la membrana celular, con la deposición inmediata de la nucleocápside dentro del citoplasma. El otro mecanismo consiste en que la membrana plasmática se invagina y forma endosomas alrededor del virus todavía envuelto.<sup>8</sup>

## **1.7 Patogenia**

El virus del dengue infecta macrófagos, linfocitos y células endoteliales, tal como ocurre en otras fiebres hemorrágicas virales, la célula diana es el fagocito mononuclear, en cuyo interior se replica el virus, pero a diferencia de otras, en la FHD se produce un fenómeno inmunopatológico “facilitación” o aumento de la infección mediado por anticuerpos heterotípicos no- neutralizantes.<sup>8</sup>

### **1.7.1 Factores Macrodeterminantes**

Los factores macrodeterminantes de las epidemias de dengue tienen que ver con el ambiente, tanto físico como social.

Los factores del ambiente físico de mayor importancia son la latitud entre 35° norte y 35° sur, la altitud inferior a los 2,200 m, la temperatura entre 15- 40 °C y la humedad relativa, de moderada a alta.

Entre los factores del ambiente social se incluyen la densidad de la población, la urbanización no planificada, las viviendas inadecuadas y los desagües tupidos, el mal provisionamiento de agua (ausencia del agua corriente, agua almacenada por más de siete días, recipientes en mal estado y sin tapas), la mala recolección de desechos sólidos y, en general, la situación socioeconómica.<sup>8</sup>

### **1.7.2 Factores Microdeterminantes**

Los factores microdeterminantes son diversos, pero pueden agruparse según estén relacionados con el huésped, el virus y los vectores.

El más importante de los factores del huésped parece ser la presencia de anticuerpos preexistentes contra un serotipo diferente al que está circulando y la edad, estando los niños más expuestos a las formas graves que los adultos. Otros factores del huésped son el sexo, y se ha considerado que las personas del sexo femenino son más propensas a que la infección se complique y agrave, la etnia, existiendo una franca predisposición a que personas con el

fenotipo blanco presenten FHD/SCD en comparación con las de fenotipo negro. Además como factores del huésped, se tiene a los factores genéticos, las enfermedades crónicas y la nutrición.

Otro conjunto de factores importantes son los relacionados con el virus y entre estos factores están: nivel de viremia, patogenicidad o virulencia de cepas, el tipo de secuencia de los serotipos y la variación genética.

Respecto a los factores relacionados con los vectores se encuentran: abundancia y focos de proliferación, edad y densidad de hembras adultas, disponibilidad de huéspedes, frecuencia de la alimentación, características de la cepa y capacidad vectorial.<sup>8</sup>

## **1.8 Diagnóstico clínico**

El diagnóstico clínico de un caso aislado de FD puede ser muy difícil para el médico sino utiliza el criterio epidemiológico; a pesar de que existen los criterios internacionales para considerar a un enfermo como un caso de FD. Para ese caso aislado, la única certeza del diagnóstico de dengue depende de la confirmación serológica o virológica por parte del laboratorio.

La FHD/SCD si tiene un cuadro clínico característico, integrado por: fiebre, alguna manifestación hemorrágica, trombocitopenia ( $100,000 \times \text{mm}^3$ ) y alguna evidencia de extravasación de líquido por aumento de la permeabilidad vascular, hemoconcentración expresada con aumento del 20% del hematocrito.<sup>8</sup>

### **1.9 Tratamiento en casos de Dengue Clásico (DC)**

Reposo absoluto de 3 a 5 días

Bajar la fiebre con:

Medios Físicos

Acetaminofen: en niños dosis diaria de 60 mgs/kg de peso, fraccionada cada 4-6 horas.

En adultos dosis de 500 mg, cada 4-6 horas.

Tomar líquidos en abundancia (agua, jugos naturales, suero oral)

Prohibir la utilización de todo medicamento que contengan ácido acetil salicilico o derivados pirazolónicos, no es recomendable utilizar estos medicamentos, ya que favorecen el apareamiento de trastornos hemorrágicos.<sup>23</sup>

### **1.10 Tratamientos en casos de FHD y SCD**

Todo caso de dengue clasificado como FHD, se procederá a hospitalizarlo y vigilar sus signos vitales.<sup>28</sup>

#### **Indicaciones:**

- En los casos de deshidratación como consecuencia de la fiebre alta, anorexia y vómito, se recomienda proporcionar abundantes líquidos por vía oral. La rehidratación principalmente en niños deberá hacerse bajo vigilancia médica ya que pueden presentarse signos de insuficiencia cardiaca.

- Signos vitales cada hora
- Balance hídrico con estricto horario
- Medir orina cada hora
- En caso de rehidratación parental, como primera medida utilizar lactato de Ringer o Hartman
- Reevaluar en forma continua, cuadro clínico y resultado de laboratorio para determinar terapéutica a seguir.<sup>28</sup>

El SCD es una emergencia médica y para su atención, la medida más importante es la reposición del volumen circulante, siendo esencial la administración de líquidos que actúan como expansores del plasma.<sup>28</sup>

### **Indicaciones**

- Ingreso inmediato a cuidados intensivos
- Observación y mantenimiento cuidadoso de signos vitales cada dos horas durante las primeras 48 horas.
- Reposición inmediata de plasma
- Autoconvulsionantes: de elección difenil hidantoína sódica, como segunda opción fenobarbital.
- Transfusión de sangre fresca
- Balance hídrico estricto
- Medir presión venosa central, y el resto de medidas mencionadas en la FHD
- Aislamiento del paciente.<sup>28</sup>

## **2. EL VECTOR : Aedes aegypti**

### **2.1 Distribución Geográfica**

El Aedes aegypti es originario del cinturón tropical de África, donde ocurren dos formas: una doméstica y una selvática. En la región de las Américas solo se conoce la forma doméstica y es el único transmisor del virus del dengue. La llegada del Aedes aegypti al Continente Americano probablemente fue en los barriles con agua en los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas en el siglo XVI.<sup>3</sup>

El Aedes aegypti es una especie de las regiones tropicales y sub- tropicales del globo, generalmente dentro de los límites de 35° de latitud norte, donde se encuentran varias ciudades sureñas de los Estados Unidos y 35° de latitud sur donde están las ciudades de Santiago y Buenos Aires.<sup>10, 30</sup>

La distribución del Aedes aegypti también está limitada por la altitud. La forma urbana ha sido registrada a 2,121 m. sobre el nivel del mar en la India y a 2,200 m. en Colombia, en donde la temperatura anual media es de 17°C, más allá del Ecuador raramente se encuentra por encima de las 1,000 m. de altura.<sup>10</sup>

## 2.2 Clasificación sistemática

La clasificación sistemática lo ubica dentro del orden Díptera que comprende la mayoría de los insectos llamados moscas, y es de los ordenes con mayor número de especies. Dentro del suborden Nematocera se acomoda en la familia culicidae, donde están todos los mosquitos. El genero es Aedes, el subgénero Stegomyia y la especie es aegypti.<sup>3</sup>

## 2.3 Ciclo de vida y bionomía

Se introduce el término bionomía para explicar las asociaciones de todas las etapas de vida del mosquito con su medio ambiente.

Los cambios morfológicos que tiene que experimentar el Aedes aegypti a través de toda su vida son complejos, el hecho de tener que vivir en el agua cierto tiempo y luego desplegarse al ambiente aéreo requieren desde aparatos bucales diferentes (masticador como larva y picador chupador como adulto hembra) hasta formas de locomoción totalmente opuestas: movimientos natatorios de su cuerpo en el agua contra la presencia de un par de alas para vuelo horizontal, vertical y a diferentes velocidades. Las fases del ciclo de vida del Aedes aegypti son huevo, larva (4 mudas con sus 4 estadios respectivos), pupa y adulto diferenciándose en sexos como macho y hembra (ver anexo 1). Los insectos que presentan las 4 fases mencionadas durante su metamorfosis se llaman holometábolos.<sup>3</sup>



### 2.3.1 El huevo

La cantidad de huevos que una hembra puede poner en una sola oviposición es afectada por diferentes factores como: tamaño de su cuerpo, magnitud del volumen de sangre ingerida, calidad proteica de la sangre que ingirió, edad, etc. En general, se acepta un rango mínimo de 20 y un máximo de 120 huevecillos por ovipostura.<sup>3</sup>

Los huevos del *Aedes aegyti* son de aproximadamente 1 mm de longitud, tienen forma de cigarro, son blancos primero pero a los diez días se oscurecen hasta ponerse casi negros y son más tersos que los huevos de la mayoría de los especies que se creían en recipientes (ver anexo 2).<sup>8, 10</sup>

El mecanismo que utiliza el vector del dengue para poner sus huevos es de importancia en las acciones de control, la hembra se posa sobre la pared del recipiente, a escasos centímetros arriba del nivel del agua. En este punto aún con humedad, pega los huevos a la pared uno por uno, se requiere hasta 48 horas para que ellos embrionen y después de esto estén listos, ya sea para eclosionar si el recipiente es llenado con agua y los humedece, o para permanecer deshidratados pero viables por días, semanas, meses y a veces hasta por 2 años.

Los huevecillos para eclosionar requieren de un estímulo; usualmente es el agua que los impregna, pero el mecanismo más específico que se acepta es la disminución del oxígeno disuelto en el agua del criadero. El oxígeno disuelto comienza a reducirse debido a varios factores:

- a) La caída violenta de las gotas de lluvia y el movimiento que produce.
- b) Al paso de las horas.

Los criaderos con materia orgánica, tierra seca, hojas caídas y hierba, resultan mejores productores de larvas recién eclosionadas. Sin embargo un exceso de materia orgánica tiene efecto opuesto y las aguas pestilentes son rechazadas por la hembra.<sup>3</sup>

La capacidad de resistencia de los huevos a la desecación es uno de los principales obstáculos para su control. Esta condición permite que los huevos puedan transportarse a grandes distancias en recipientes secos. Por lo tanto, la eliminación de mosquitos adultos y larvas en una localidad, no imposibilita la resisfestación a través de huevos que hayan permanecido ocultos en recipientes secos.<sup>23</sup>

### **2.3.2 La larva**

Las larvas de *Aedes aegypti* son exclusivamente acuáticas. Después de su eclosión del huevo, las larvas pasarán por 4 mudas. Puesto que no tienen un esqueleto, la única forma de aumentar de tamaño es desechar la cubierta externa de todo su cuerpo. A la etapa de la larva entre cada muda se le llama estado, estadio o instar. La velocidad de crecimiento depende directamente de la temperatura del agua o ambiente. En días cálidos con temperatura promedio arriba de 25° C, el último instar se alcanza en 72 horas. En días frescos el desarrollo larval se retarda y pueden requerirse hasta 15 días para llegar hasta adulto.<sup>3</sup> Los tres primeros estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto estadio demora más tiempo y la larva aumenta más en tamaño y peso. Bajo rigurosas condiciones de baja temperatura o escasez de alimento, el cuarto estadio larval es capaz de prologarse por varias semanas antes

de transformarse en pupa. En un ambiente estable la mayor mortalidad de los estadios inmaduros ocurre generalmente durante los dos primeros estadios larvarios.<sup>3, 10</sup>

Las larvas de *Aedes aegypti* presentan una cabeza ovoide, tórax y un abdomen de 9 segmentos. El segmento posterior y anal del abdomen tiene cuatro branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón, o tubo de aire para la respiración en la superficie del agua (ver anexo2).<sup>10</sup>

Las larvas de *Aedes aegypti* se reconocen por sus movimientos sinuosos al nadar, porque evitan la luz, el sifón es más corto que en la mayoría de los otros culicinos y por tener relativamente redondeada la punta del tubo del aire que las pone en contacto con la atmósfera.<sup>8</sup>

### **2.3.3 La pupa**

Después del cuarto instar la larva comienza a secretar una cubierta por todo su cuerpo que finalmente la encierra, es la pupa, con semejanza al capullo de la mariposa (ver anexo 4). Su función es la metamorfosis del estadio larval al del adulto. Las pupas no se alimentan y solo flotan y nada con sus aletas caudales. Dos trompetas respiratorias en su cabeza le permiten el intercambio gaseoso. El estado pupal es necesario para que puedan llevar a cabo los cambios en su cuerpo que le permitan la invasión del ambiente aéreo, así como cambiar su dieta a líquidos llenos de proteínas para formar sus huevos: la sangre. Así, durante 24 a 48 horas, los tejidos del cuerpo larval desarrollan las alas en el tórax, tres pares de patas, un aparato bucal modificado para picar, ovarios, glándulas salivales y enzimas digestivas apropiadas para degradar su futuro alimento sanguíneo.<sup>3</sup>

Las pupas del *Aedes aegypti* son diferentes a las de otros insectos holometabólicos porque reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como vibraciones y se desplazan activamente por todo el recipiente. Cuando las pupas están inactivas, se mantienen en la superficie debido a su flotabilidad, esta propiedad facilita la emergencia del insecto adulto. El estado de pupa dura generalmente dos o tres días.<sup>23</sup>

#### **2.3.4 El adulto**

Usualmente la emergencia del mosquito adulto de la cubierta pupal es durante el fotoperíodo, ya sea temprano en la mañana o crepuscular. El mosquito se le sale en cuestión de minutos por el cefalotórax y queda reposando parado sobre la película de agua. Antes de una hora hace su primer vuelo corto y se posa sobre un lugar seco. Su cuerpo está aún suave y requiere menos de 24 horas para endurecerse y poder realizar vuelos largos. La proporción de sexo es aproximada a 1:1 de machos y hembras; pero puede haber variación en proporciones de 0.6:0.4 siendo más los machos. Es decir, si una hembra ovipuso 100 huevos, si todos sobrevivieron la fase inmadura se producirían 50 hembras y 50 machos.<sup>3</sup>

El macho se puede diferenciar de la hembra por sus antenas plumosas, que son los receptores de sonido que utilizará para identificar el vuelo de las hembras para posteriormente intentar la cópula. El macho también debe esperar cuando mucho 24 horas para permitir que su aparato genital rote 180°, y esté listo para poder ganchar a la hembra por la punta de su abdomen durante el apareamiento. La dieta del macho será de líquidos con azúcares

básicamente, y los tomará de las flores, o frutos disponibles de la naturaleza. Después de copular o inseminar a una hembra morirá en menos tiempo que las hembras. Durante el cortejo, las hembras pueden hacer enjambres de pocos individuos, el macho reconoce este ruido producido por la frecuencia del movimiento de sus alas, vuela hacia el enjambre y en el aire, gancha con sus genitales a la hembra, ambos caen luego al suelo, y en cuestión de segundos, la insemina vaciando sus testículos para llenar la espermateca. Lo más frecuente es que los machos sigan a las hembras cuando ellas buscan el huésped para alimentarse y tengan éxito al copularlas. Así la hembra queda fecundada de por vida, y cada vez que oviposite los huevos saldrán fecundados antes de salir por el esperma del mismo padre. Después de inseminar a la hembra, el macho le coloca una sustancia conocida como matrona y producida por sus glándulas accesorias; la matrona hará que la hembra no sea receptiva a otras cópulas posteriores, a pesar del intento de otros machos.<sup>3</sup>

#### **2.3.4.1 Alimentación**

Las hembras se alimentan de la sangre de la mayoría de los vertebrados, pero demuestra una marcada predilección por el hombre. El propósito primordial de la alimentación sanguínea es proporcionar una fuente de proteínas para el desarrollo de los huevos. La alimentación sanguínea y la postura se lleva a cabo principalmente durante las primeras horas o a la media mañana y en la media tarde o en el anochecer.<sup>23</sup>

#### **2.3.4.2 Ciclo gonadotrófico**

Generalmente después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, el *Aedes aegypti* con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez en cada postura, especialmente si es perturbado de estar completamente lleno de sangre. Si una hembra completa su alimentación sanguínea (2-3 mg de sangre), desarrollará y pondrá aproximadamente 100 huevos. Por consiguiente, las alimentaciones sanguíneas escasas producen menos huevos por lotes y una alimentación muy reducida no los produce.<sup>23</sup>

Normalmente, el intervalo de la alimentación sanguínea y la postura es de 3 días en condiciones óptimas de temperatura y la hembra puede alimentarse de sangre nuevamente el mismo día que pone los huevos. La hembra prefiere aguas relativamente limpias, claras, transparentes, a las turbias y contaminadas con un contenido orgánico alto.<sup>23</sup>

Los huevos de un mismo lote son distribuidos entre varios recipientes.<sup>10</sup>

#### **2.3.4.3 Dispersión: rango de vuelo**

La distancia que una hembra infectiva de *Aedes aegypti* se puede desplazar es importante para conocer el perímetro epidemiológico de la distribución de nuevos casos. Para el personal de control es importante para delinear el alcance del terreno donde aplicaran medidas focales de control.

La dispersión es comúnmente descrita como un vuelo fortuito con el viento jugando a menudo como un factor importante; mientras que la migración es a menudo considerada como

más vinculada a la biología y supervivencia de las especies, y es un vuelo más controlado y persistente.<sup>3</sup>

Por lo general, una hembra no vuela a una distancia superior a los 50 m. durante su vida, y a menudo permanece en la misma casa donde emergió si se encuentran disponibles los huéspedes adecuados, sitio de reposo y de postura sin embargo, si los recipientes adecuados no están presente, una hembra grávida puede volar hasta 3 km. en busca de sitio para poner sus huevos. Los machos se dispersan menos que las hembras.<sup>10</sup>

#### **2.3.4.4 Conductas de reposo**

Cuando los mosquitos no están apareándose, en busca de un huésped o no se encuentran en vuelo de migración estos procuran un sitio oscuro para reposar. Los sitios de reposo más comunes están en los interiores de las casa, en las alcobas, baños y cocinas y solo ocasionalmente en el exterior en la vegetación del jardín. Las superficies de reposo preferidas son las paredes, el mobiliario y los artículos colgantes tales como prendas de vestir, toallas, cortinas y mosquiteros. La acción de reposar se lleva a cabo mayormente sobre superficies verticales y algunas veces se posan sobre el cielo raso o debajo de muebles tales como camas.<sup>10</sup>

#### **2.3.4.5 Longevidad.**

Los adultos de *Aedes aegypti* pueden permanecer vivos en el laboratorio durante meses, pero en la naturaleza, por lo general, viven solamente unas pocas semanas. Muchos adultos mueren al momento de emerger o poco tiempo después pero la supervivencia diaria es bastante constante. Con una mortalidad típica diaria de 10%, la mitad de los mosquitos morirá durante la primera semana y el 95% durante el primer mes. A pesar de la gran reducción en números, si la original población emergente es grande, la resultante población vieja será suficientemente grande para transmitir una enfermedad y mantener una epidemia.<sup>10</sup>

### **3. Tratamiento Antivectorial**

El tratamiento consiste en la destrucción del *Aedes aegypti* en su fase larvaria o adulto por medios mecánicos (eliminación de criaderos o deschatarrización), químicos y biológicos.<sup>29</sup>

#### **3.1 Campaña de eliminación de criaderos o deschatarrización**

Consiste en la eliminación efectiva de recipientes desechables de los patios o jardines de las casas, es una medida complementaria a la abatización. Demanda un esfuerzo mayor, pues requiere de la cooperación de autoridades municipales, el ejército, grupos no gubernamentales, empresa privada, grupos religiosos y los medios de comunicación. Usualmente son focalizados en barrios o colonias en donde la transmisión es alta. La actividad se concreta principalmente en los días inhábiles.



El impacto de la eliminación de recipientes puede ser alto si se consigue que la población entienda que clase de contenedores son los que debe eliminar. Un segundo efecto muy benéfico que trae una campaña de deschatarrización es que concientiza a la comunidad acerca de su problema de dengue y la hace tomar las precauciones recomendadas.<sup>29</sup>

### **3.2 Control Químico.**

En la actualidad se tiende a limitar el uso de los productos químicos para el tratamientos de los recipientes que no puedan ser eliminados o tratados de otro modo y para situaciones de emergencia. El control químico es aplicable tanto en la forma inmadura o larvas y en adultos del vector.<sup>29</sup>

#### **3.2.1 Control Focal**

La aplicación de larvicidas o el control focal de *Aedes aegypti*, se utiliza en las situaciones en que la reducción de criaderos es solo parcialmente efectiva.<sup>3</sup>

En El Salvador y Guatemala se está utilizando el larvicida llamado Temefos, conocido popularmente como abate.<sup>29</sup>

##### **3.2.1.1 Características del abate.**

El abate es un insecticida órganofosforado muy eficaz como larvicida y de baja toxicidad para los mamíferos y otros animales. El abate mata por ingestión, por ello no tiene

insecticida, en forma de aerosol, en grandes espacios, para lo cual las máquinas fraccionan el insecticida en gotas diminutas que tienen un tamaño ideal para impactar a los insectos. El uso de menos de 4.6 litros /Ha (manzana) de un insecticida concentrado suele considerarse como una aplicación ULV. Las nieblas frías pueden aplicarse con maquinas portátiles, generadores montados en vehículos o mediante avionetas fumigadoras.<sup>29, 30</sup>

En salud pública, las nieblas frías se aplican con máquinas portátiles de tipo motomochila y manuales, con las cuales se efectúan los tratamientos en el interior de las viviendas.<sup>30</sup>

### **Insecticidas utilizados en forma de nieblas frías contra el *Aedes aegypti***

<i>Nombre</i>	<i>LD<sub>50</sub> (mg/Kg)</i>	<i>Clasificación</i>
▪ Deltametrina	135	Moderadamente peligroso
▪ Resmetrina	2000	Ligeramente peligroso
▪ Biorresmetrina	7000	Remotamente peligroso
▪ Permetrina	500	Moderadamente peligroso
▪ Cipermetrina	250	Moderadamente peligroso
▪ Lambda-cihalotrina	144	Moderadamente peligroso
▪ Piretroides <sup>29</sup>		

El insecticida utilizado en El Salvador como niebla fría durante la epidemia del 2002 es el Solfac (ver anexo 17).

### **3.3 Control Biológico**

Varios organismos son enemigos naturales de los estadios larvarios del *Aedes aegypti*, estos incluyen a algunos hongos, bacterias, hemípteros acuáticos, náyades de libélulas, y larvas de mosquitos. En el caso de los mosquitos adultos sus enemigos naturales incluyen. arañas,

lagartijas, aves, murciélagos y en el caso de los huevos hormigas, ácaros y polillas. Aunque se han llevado a cabo pruebas de laboratorio y pruebas de campo en pequeña escala con varios de estos depredadores y parásitos, todavía ninguno ha sido utilizado operacionalmente en campañas en gran escala. Sin embargo, algún éxito se ha logrado con los peces parivivos, Poecilia reticulata, en cisternas y barriles en el área del Caribe.<sup>10</sup>

#### 4. MONOGRAFÍAS DE ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS.

##### 4.1 Annona diversifolia

**NOMBRE CIENTÍFICO:** Annona diversifolia<sup>35</sup>

**FAMILIA:** Annonaceae<sup>35</sup>

**NOMBRES COMUNES:** En El Salvador: anona blanca, anona rosada, anona roja.<sup>31, 40</sup>

En México: ilama, izlama, iflamatzapotl ( traducido como “el zapote de la vieja mujer” ), hilama y papuasa.<sup>36, 40</sup>

En Guatemala: anona blanca, pause del anona.<sup>40</sup>

##### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:**

Árbol pequeño que no sobrepasa los 25 pies (7.5m).<sup>36</sup> Cultivado por su excelente fruta, de menor porte que el guanabo. Ejemplares maduros de esta especie pueden ser vistos durante el período de julio a septiembre.<sup>31</sup>

La fruta es cónica, en forma de corazón u ovoide globulosa, cerca de 15 cm de largo, puede pesar como 2 libras. La pulpa puede ser blanca o rosada, es cremosa, aromática y dulce ( ver anexo N° 12 ).<sup>35, 40</sup> Las hojas son oblongas, gabras o ligeramente velludas, los pedúnculos son opuestos a las hojas, con flores solitarias de color rojo oscuro (marrón) en ciertos árboles y amarillo verdoso ligeramente teñido de rojo en otros, cáliz pequeño, con tres dientes cóncavas, corola de 3 pétalos verdosos por fuera, amarillentos por dentro, globulosos en la base.<sup>31, 35</sup> Las semillas son pequeñas, oblongo ovoides, coriáceas, lisas, con endospermo agrietado y de color café o marrón.<sup>31</sup>

## ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Es nativa y crece salvaje en colinas de la costa del sudoeste de México a la costa pacífica de Guatemala y El Salvador.<sup>40</sup>

## CLIMA

Es terminantemente tropical, crece naturalmente no más arriba de 2000 pies (610m) en México; se cultiva hasta 5000 pies (1524m) en El Salvador; hasta 5900 pies (1800m) en Guatemala. Crece mejor en áreas donde hay una estación seca larga seguida por precipitación. En áreas en que es escasa la precipitación se irriga el árbol.<sup>40</sup>

## COMPOSICIÓN QUÍMICA

El análisis fitoquímico preliminar de las hojas demostró tener: Sesquiterpenlactonas, flavonoides, triterpenos y taninos.<sup>12</sup> La corteza contiene, flavonoides, Sesquiterpenlactonas, taninos. Las semillas de las anonáceas contiene altas concentraciones de acetogeninas dentro de las cuales se encuentra la asimicina con propiedades insecticidas, polisacáridos heterogéneos galactomanosa y ácidos grasos libres.<sup>6</sup>

## FARMACOLOGÍA

Uno de los trabajos más recientes del Doctor Andrés Navarrete sobre la Annona diversifolia ha demostrado tener efectos anticonvulsionantes en animales en animales de laboratorio. La potencia del activo de esta planta es mayor que de algunos de los fármacos que se encuentran en el mercado. Su uso puede ser muy benéfico en el tratamiento de la epilepsia.<sup>41</sup> Las larvas del mosquito *Aedes aegypti* en su segundo estadio presentan sensibilidad al extracto etanólico de la semilla con una LC<sub>100</sub> de 62.5 ppm.<sup>17</sup>

### Valor nutritivo por 100g de la porción comestible

Humedad	71,5 g
Proteína	0,447 g
Gordo	0,16 g
Fibra	1,3 g
Ceniza	g 1,37
Calcio	magnesio 31,6
Fósforo	magnesio 51,7
Hierro	0,70 magnesios
Caroteno	0,011 magnesios
Tiamina	0,235 magnesios
Riboflavina	0,297 magnesios
Niacin	magnesio 2,177

\* Según análisis hechos en El Salvador.<sup>40</sup>

### USOS ETNOMÉDICOS.

Contra la diarrea ya que la fruta verde es muy astringente. De esta familia, en corteza y raíz existe un compuesto curariforme que puede ser utilizado como anticonvulsivante, antiespasmódico y relajante. La corteza es utilizada para tratar convulsiones e inflamaciones.<sup>31</sup>

## 4.2 Rauwolfia tetraphylla

**NOMBRE CIENTÍFICO:** Rauwolfia tetraphylla<sup>1</sup>

**FAMILIA:** Apocynaceae<sup>1</sup>

**NOMBRES COMUNES:** Amatillo (El Salvador), Alcotán, Cabamuc, Chalchupa,  
Matacoyote, Señorita, Viborilla.<sup>1</sup>

### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Arbusto semileñoso, de 1-4 m de alto, ramificado, finamente pubescente, con abundante látex. Hojas en 3-5 verticilos, delgadamente oblongas a anchamente ovado elípticas, 2-13 de largo, agudas u obtusas. Inflorescencia condensada, más corta que las hojas, pocas flores, glabras o puberulentas; corola muy pequeña, estambres insertos a la mitad de la corola. Frutos en forma de drupa subglobosa, 5-8 mm de diámetro, color rojo que se torna negro al madurar.<sup>1</sup>

### **HABITAT.**

Nativa de México, Centroamérica, El Caribe y Norte de Sud América en matorrales secos o húmedos, frecuente como crecimiento secundario tropical o maleza en campos abandonados y orilla de caminos hasta 2000 msnm; introducida en la India.<sup>1</sup>

### **HISTORIA.**

Género de más de 100 especies tropicales; en América se han descrito 35 especies, dos descritas en Guatemala. La planta usada como droga en Asia es *Rauwolfia serpentina*, que no crece en América, pero se usan indistintivamente.<sup>1</sup>

## **AGRICULTURA.**

La planta crece silvestre, se reproduce por recolección. Se sugiere iniciar su domesticación y cultivo; se propaga por semillas. Las semillas tienen una germinación del 50% después de 8 meses de cosecha, unas 8 plantas son capaces de producir semillas para una ha<sup>2</sup>; se siembran en un suelo húmífero-arenoso, germina a 12-15 días, al tener 15-20 cm se transplanta al campo definitivo a la sombra donde se poda al inicio y al final de la época de lluvias. Las hojas se pueden usar frescas o secadas a la sombra; la raíz se colecta en época seca en plantas de 3-5 años y se seca a la sombra.<sup>1</sup>

## **COMPOSICIÓN QUÍMICA**

El tamizaje fitoquímico de la planta completa indica la presencia de alcaloides, glicósidos cardiotónicos, taninos y triterpenos. Contiene múltiples alcaloides (ajmalicina, ajmalina, aricina, carpagina, chalchupina (A, B), deserpidina, heterofilina, isoreserpina, raujemidina, reserpina, reserpilina, reserpina, rauwolscina, tetrafilicina, tetrafilina,  $\alpha$ -yohimbina).<sup>1</sup>

## **FARMACOLOGÍA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Estudios antibacterianos demuestran que los extractos acuosos y etanólico de la planta completa son inactivos contra E. Coli y S. aureus. Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas no presenta actividad contra hongos patógenos (A. Flavus, E. Floccosum, M. Gypseum, T. Rubrum) a 200 mg/ml.<sup>1</sup> El extracto etanólico de las hojas, tallo y corteza presenta una LC<sub>100</sub> de 250 ppm contra las larvas de Aedes aegypti en su segundo estadio.<sup>21</sup>



## **FARMACOGNOSIA**

La materia médica es raíz u hojas secas, que deben reunir las características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos. En la revisión de literatura realizada se encontraron muy pocas referencias sobre la relación entre la actividad farmacológica atribuida y la composición química, ni estudios tendientes a la formulación de productos fitofarmacéuticos. Los alcaloides totales varían entre 2-4% en las raíces y 1-4% en las hojas. La chalchupina tiene actividad; la rauwolscina es hipotensora pero no sedante; la desperidina (canescina, recanescina) aislada de la raíz tiene actividad sedante e hipotensora; la ajmalina y serpentinina son hipotensoras, sedantes y antiarrítmicas, la  $\alpha$ -hiombina es hipotensora y reguladora de la circulación sanguínea. La reserpina tiene un peso molecular de 608 gr/mol y es usada en la industria farmacéutica como antihipertensivo y tranquilizante.<sup>1</sup>

## **USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.**

La decocción de raíz se usa oralmente para tratar malaria, mordeduras de culebras, dolor de estómago, bajar la presión arterial, como depurador y febrífugo. La infusión de hojas se usa para tratar disentería y malaria. La savia o látex se usa en hidropesía y tos crónica, se aplica en ojos inflamados y edema; la corteza se usa para desintegrar muelas. Tópicamente se usa el cocimiento de tallos o frutos machacados en emplastos para la mordedura de serpientes, piquete de avispas y alacranes; el cocimiento y hojas del tallo se usa para curar úlceras, sarna, sífilis y otras enfermedades cutáneas, la ceniza de la planta quemada se aplica en las heridas para evitar infecciones; la decocción de la raíz se usa para bajar la hipertensión y tratar afecciones orales y erisipela; el extracto de la corteza con aceite sirve para curar sarna

y otras afecciones cutáneas. El látex se usa para caries dentales, fortalecer las encías y colirio oftálmico. Los frutos machacados se usan para tratar tinea. A la hoja, tallo, corteza y raíz se les atribuye propiedad febrífuga, antimalarica y sedante. A la Sabia o látex se le atribuye propiedad catártica, diurética, emética y expectorante.<sup>1</sup>

### **INDICACIONES TERAPÉUTICAS**

Por su uso tradicional, la validación experimental, y la falta de toxicidad aguda demostrada, su uso oral está indicado en el tratamiento de hipertensión. Se recomienda administrar 2-3 veces al día 2-4 g en infusión o 2-4 ml de la tintura 1:10 en alcohol 35%.<sup>1</sup>

### **TOXICOLOGÍA**

El extracto etanólico de la planta completa produce ligero efecto sedante en peces (40 ppm) y toxicidad (500 ppm). El fruto es generalmente tóxico; el látex puede causar dermatitis. Los síntomas de intoxicación por los frutos son: dolor de la boca, constricción faríngea, náusea, vómitos y aun la muerte.<sup>11</sup>

### 4.3 Ocimum micranthum

**NOMBRE CIENTÍFICO:** Ocimum micranthum<sup>1</sup>

**FAMILIA:** Labiadas<sup>24</sup>

**NOMBRES COMUNES:** El Salvador: Albajaca de gallina,<sup>5</sup> Albahaca montes.<sup>34</sup>

Honduras: Albahaca de monte, Albahaca, Albahaca de gallina.<sup>5</sup>

Nicaragua: Albahaca de monte.<sup>5</sup>

Otros: Albahaca cimarrona, Basen, Cacahun.<sup>34</sup>

#### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Es una hierba anual, pequeña de hasta 50 cm de alto, de olor agradable, tallos erectos, ramosos y cuadrados, hojas enteras, dentadas, opuestas, ovadas y aserradas de 4 cm de largo por 3 de ancho, flores bilabiadas de color blanco o moradas, de 4 mm de largo, sobre pedicelos de 4 a 7 mm de largo, en verticilos, puestos en espigas de 3 a 10 cm ( ve anexo N° 12 ). Semillas negras de 1 mm.<sup>5, 7</sup>

#### **HÁBITAT.**

Se dice que es originaria de Asia Tropical, pero algunos autores afirman que es originaria de Centroamérica. Crece silvestre en climas cálidos y terrenos fértiles, muy raras veces en lugares frescos.<sup>5</sup>

#### **AGRICULTURA.**

Se obtiene por recolección en las regiones de crecimiento silvestre. Se recomienda iniciar actividades de manejo, domesticación y cultivo para garantizar su disponibilidad. Empíricamente se multiplica por esquejes que se enraízan en el suelo cernido y se transplantan a filas de 40 cm. Las hojas se secan a la sombra.<sup>1</sup>

## COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Contiene triterpenos y aceite esencial. El aceite está presente en toda la planta y tiene más de 20 compuestos, el aceite de las hojas contiene: eugenol (20.5%), 1,8-cineol (20.0%),  $\beta$ -cariofileno (19.2%),  $\gamma$ -elemento (16.0%),  $\beta$ -Salineno (4.7%),  $\beta$ -elemento (4.6%), linalool (2.7%), spirosesquiterpeno,  $\beta$ -pineno y terpineol (1%), también contiene  $\alpha$ -hemeleno, trans-ocimeno, aromadendreno, iso-eugeno, mirceno y nerolidol.<sup>1, 5</sup>

El aceite de las flores contiene:  $\gamma$ -elemento (41.1%),  $\beta$ -cariofileno (18.9%),  $\beta$ -salineno (14.0%),  $\beta$ -elemento (8.5%), 1,8 Cineol (7.0%), linalool (3.1%), espiro y azulensesquiterpenos (3.1%), el aceite esencial del tallo contiene:  $\gamma$ -elemento (32.4%),  $\beta$ -cariofileno (20.5%),  $\beta$ -salineno (11.8%), 1,8 cineol (10.8%),  $\beta$ -elemento (9.2%), espi y azulensesquiterpenos (4.3%), terpineol (1.6%), linalool (1.0%).<sup>1</sup>

## FARMACOLOGÍA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El extracto acuoso de hojas es activo contra *S. aureus*. El extracto acuoso de la semilla muestra actividad contra bacterias Gram positivas y micobacterias.<sup>7</sup> El extracto etanólico no tiene actividad diurética medida por caterización de la vejiga de ratas, no es antihipertensiva ni aumenta la frecuencia cardiaca en ratas espontáneamente hipertensas. El extracto acuoso de hojas produce bradicardia en ratas y gatos.<sup>1</sup> El extracto etanólico de hojas y tallo presentó una  $LC_{100}$  de 125 ppm contra larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio.<sup>21</sup> La actividad biológica se atribuye principalmente a su aceite esencial, que le confiere propiedad aromática, antiséptica, aperitiva, digestiva, carminativa, espasmolítica, insecticida y sedante.<sup>1</sup>

### **USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.**

El cocimiento e infusión de las hojas se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarrea, disentería, gastralgia, parásitos), respiratorias (bronquitis, catarro, fiebre, resfrió, tos) y nerviosas, dolor de oído y cabeza, halitosis, vértigo, infección renal y reumatismo. Tópicamente se usa en baños y cataplasmas para tratar afecciones dérmicas (llagas, úlceras, verrugas), tumores y parásitos del ganado; la tintura de sus hojas se usa para hacer fricciones en gota y reumatismo; la hoja fresca machacada se aplica para eliminar miasis nasal de género lucila, el polvo de hojas secas se aspira para congestión nasal y el jugo de hojas frescas para el lavado de ojos. El cocimiento de la raíz se usa para tratar malaria y paludismo; la corteza es cianogenética y se usan en problemas digestivos (cólera). Las semillas son mucilaginosas, diuréticas y nutritivas, por vía oral se usan para tratar afecciones digestivas y tópicamente para tratar llagas y úlceras.<sup>34</sup> Se le atribuyen propiedades: antisépticas, antigotosa, antiinfecciosa, aromática, astringente, calmante, carminativa, diurética, espasmolítica, estomáquica, estornutatoria, febrífuga, rubefaciente, sudorífica y vermífuga.<sup>1, 34</sup>

### **OTROS USOS POPULARES.**

Las hojas frescas y secas se usan para sazonar comidas y ensaladas. El olor de las hojas frescas es repelente para larvas, insectos y mosquitos, razón por la que se cuelgan ramas frescas en las viviendas; tiene uso aromático, ornamental y cosmético.<sup>1</sup>

También se asocia al cultivo de los tomates para repeler a la mosca blanca.<sup>44</sup>

## **USOS EN COSMÉTICA.**

En cosmética se utiliza para el cuidado del cuello y parte posterior del rostro. Para esto, un aceite tonificante macerado, en un poco de aceite de oliva virgen y un puñado de hojas de albahaca tiernas previamente trituradas. Recubra totalmente las hojas con el aceite y déjelo macerar tres o cuatro días. Aplique golpeando suavemente sobre el cuello y la parte inferior de la cara, para facilitar la penetración. Dejar actuar durante media hora. Luego aplicar agua de rozas o de azahar. Además, la albahaca, por su acción sedante sobre el sistema nervioso, puede utilizarse como antiarrugas en el caso que estas sean producto de la expresión y la mímica de una persona.<sup>37</sup>

## **INDICACIONES TERAPÉUTICAS**

Por su actividad aperitiva, digestiva y espasmolítica esta indicada por vía oral en el tratamiento de digestiones lentas, meteorismo, espasmo gastrointestinal, vómitos, dolor de estomago, tos convulsiva y jaqueca. Se recomienda administrar 3 veces al día una dosis de 3-5 g / tasa de infusión o decocción. Para aplicación tópica están indicadas las lociones, esencias y el polvo en el tratamiento de heridas, eczema y dolores musculares. Por su actividad vermífuga está indicada la aplicación de la planta fresca machacada en el tratamiento de miasis nasal.<sup>1</sup>

### **Preparación popular y dosis.**

Para dolor de cabeza, muelas y cuerpo se cocinan 5 hojas para un vaso de agua y se toman 3 vasos al día. Para la tos y el corazón se cocina la raíz con anís y miel de palo y se da una copita 3 ó 4 veces al día. Contra llagas, úlceras y granos se tuesta la hoja y se muele

aplicándola sobre la parte afectada cada día. Para la vista se pone una semilla en el ojo. Contra el paludismo se cocinan en agua 7 raíces y se cuele, dándose baños durante 9 días. Para la sordera y dolor de oídos se muelo el cogollo tierno y se aplica en el oído.

Para los nervios, insomnio e indigestión se prepara el té de 3 cogollos en 1/2 litro de agua (dos vasos) hervida; tomar una tasa 3 veces al día. El té también se recomienda como regulador menstrual, tomándose 1 tasa durante 7 días.<sup>24</sup>

#### **4.4 Sanseviria quineensis**

**NOMBRE CIENTIFICO:** Sanseviria quineensis<sup>7</sup>

**FAMILIA:** Agavaceae<sup>7</sup>

**NOMBRES COMUNES:** Curarina, Lengua de Suegra, Lengua del diablo, Espada del diablo, Espada de Judas.<sup>20</sup>

**FORMA DE PROPAGACIÓN:** Asexual<sup>13</sup>

#### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Planta común plantada en los jardines, a menudo formando setas.<sup>20</sup> Hierbas suculenta, con un rizoma rastrero del que salen grupos de 1 hasta 6 hojas lanceoladas, angostas, de 50-140 cm de largo y 5 a 9 cm de ancho aproximadamente; de color verde oscuro con una banda marginal amarilla.<sup>7</sup> Flores fragantes, nocturnas, blancas, tubulares de 3.8 mm de largo, crecimiento sobre un racimo erecto de 75 cm de largo que sale del rizoma.<sup>7</sup>

#### **HABITAT Y DISTRIBUCIÓN.**

Cultivado o naturalizado en El Salvador como ornamental o como cerco de las casas. Originaria de África Tropical.<sup>7, 21</sup>

#### **COMPOSICION QUÍMICA:**

El análisis fitoquímico resultó positivo para las pruebas de taninos, glicósidos saponínicos y Sesquiterpenlactonas.<sup>21</sup>

Según pruebas cualitativa de saponinas realizada por valoración biológica (índice hemolítico) muestra un índice de 1:5000, y la valoración física (método de la espuma) muestra que la mayor dilución en la que se produce una espuma de 1 cm de altura durante



15 minutos fue de 1:1000. con los resultados anteriores se comprueba la presencia de saponinas en la planta.

Según el método del Dr. Huiria para la determinación cuantitativa de esmilagenina se encontró un rendimiento de Sapogeninas totales de 6.19 g lo que equivale al 6.19% de materia seca. El punto de fusión obtenido fue de 186 °C, el producto aislado se mezcló con esmilogenina pura y el punto de fusión se mantuvo. Comparando el producto aislado en este trabajo con esmilogenina pura dieron exactamente el mismo Rf.41.<sup>21</sup>

### **ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Estudios con extractos etanólicos y acuosos de hoja y tallo; el resultado obtenido fue la toxicidad presentada por los peces en una concentración de 40 ppm en un periodo de 12 horas.

En pruebas de sensibilidad microbiana, los extractos etanólicos y acuosos de tallo y raíz presentaron actividad antimicrobiana con las cepas E. Coli y S. aureus no presentaron actividad microbiana los extractos etanólicos y acuosos de la hoja.<sup>21</sup>

Es importante hacer notar que la curarina y sus derivados son inactivos cuando se administran por vía oral, a menos que se ingieran dosis altas. La presencia de saponinas en la planta contribuye a la toxicidad que presenta ante los peces.

El extracto etanólico de las hojas y tallo presentó una LC<sub>100</sub> de 125 ppm contra las larvas de Aedes aegypti en su segundo estadio.<sup>21</sup>

### **USOS MEDICINALES.**

Mordedura de serpientes, picadura de animales ponzoñosos, rabia, afecciones de la piel, llagas, para potencia sexual.<sup>21</sup>

Mordeduras de serpientes: Machacar 3 hojas y sacar el jugo; tomar  $\frac{1}{2}$  taza.<sup>21</sup>

También se prepara un cataplasma de la hoja molida, colocar 3 veces al día durante 7 días.<sup>7</sup>

Picaduras de animales: cocinar 1 hoja o penca y tomar 1 tacita al día.<sup>21</sup>

Rabia: la hoja se cocina o se prepara una horchata.<sup>7, 21</sup>

#### 4.5 Yucca elephantipes.

**NOMBRE CIENTÍFICO:** Yucca elephantipes.<sup>7</sup>

**FAMILIA:** Agaveceae.<sup>7</sup>

**NOMBRE COMUN:** Izote.<sup>7</sup>

#### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

Es una de las plantas más versátiles del mundo, es una planta arquitectónica.<sup>33</sup> Planta arbórea, de 3 a 10 m. de alto; tallo en forma de una columna, con pocas ramas cortas y densas; el tronco y la parte inferior de las ramas desnudas, corteza áspera. Las hojas son largas, angostas, en forma de lanza o puñal, terminadas en aguijón, son duras y firmes de 70 cm de largo, van apretadas en torno al tallo ( ver anexo N° 12 ). Flores blancas o cremosas, campanuladas, cerca de 4 cm de largo en grupos de 3 a 8 en un racimo de 75 cm de largo. Fruto carnoso en forma de baya o capsular con semillas comprimidas.<sup>7</sup>

#### **HÁBITAT O DISTRIBUCIÓN.**

El izote tiene sus orígenes en México y América Central.<sup>33</sup>

Es cultivada en Honduras y El Salvador como ornamental o cerco vivo.<sup>7</sup>

#### **COMPOSICIÓN QUÍMICA.**

Contiene un esteroide llamado esmilagenina y saponina. Las hojas contienen alcaloides, taninos, triterpenos, glicósidos saponínicos; la corteza taninos, trieterpenos, glicósidos saponínicos y la raíz glicósidos saponínicos. Las flores contienen ácido ascórbico, niacina y tiamina.<sup>7</sup>

**Valor nutritivo por 100g de flores comestibles.**

Calcio.....	40mg
Fósforo.....	85 mg
Hierro.....	2.4 mg
Caroteno.....	0.144 mg
Tiamina.....	0.2 mg
Riboflavina.....	0.175 mg
Niacina.....	1.9 mg
Vitamina C.....	560 mg

El contenido de calcio es muy alto en el corazón o corteza (370 mg/100 g).<sup>33</sup>

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas, corteza y raíz no tuvieron actividad Inhibitoria para E. Coli y S. aureus.<sup>7</sup>

**USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.**

Para acelerar el parto, despertar el apetito, artritis, tos, diabetes, asma, dolor de oídos, tos con flema y persistente por la noche, dolor de pecho al toser, hervor de pecho, catarro y malestar general.<sup>7</sup> En la medicina moderna las flores se consideran como un tónico estomacal y se valoran para acción diurética. En Guatemala la decocción del corazón del tronco o tallo se toma para dolencia del riñón.<sup>33</sup>

**FORMA DE PREPARACIÓN Y DOSIS.**

**Acelerar el parto:** Cocer en ½ botella de agua 9 cogollos de izote; tomar una tasa cada

4 horas. También se prepara la decocción de los cogollos con clavito, papaya y pito; o se le puede agregar manzanilla.

**Tos:** Se toma el cocimiento de los cogollos con flores de sauco y raíz de maltuerce.

**Despertar el apetito:** Tomar la decocción de la planta o se agregan los cogollos a la comida.

**Diabetes:** Preparar la decocción de la planta. Tomar varias tasas al día.

**Artritis y Asma:** Preparar la infusión de dos cogollos de izote en tres litros de agua.

**Dolor de oídos:** Se asa la hoja y se coloca el jugo en la región afectada.

**Catarro, tos con flema, bronquitis, nauseás y malestar general:** Poner a hervir 3 ó 5 hojas tiernas de aproximadamente ½ litro de agua. Tomar una tasa cada 2 ó 3 horas hasta aliviarse.<sup>7</sup>

## **TOXICOLOGÍA.**

Los extractos acuosos y etanólicos fueron altamente tóxicos para peces.<sup>7</sup>

**CAPITULO II**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

## Recursos Materiales.

### 1.1 Material vegetal

Nombre de las especies vegetales utilizadas:

Nombre Científico	Nombre Común
<i>Annona diversifolia</i>	Anona
<i>Rauwolfia tetraphylla</i>	Amatillo
<i>Sansevieria quineensis</i>	Curarina
<i>Ocimum micranthum</i>	Albahaca
<i>Yucca elephantipes</i>	Izote

### 1.2 Cepa de Referencia

Huevos de mosquito *Aedes aegypti*.

### 1.3 Control positivo

Solución de Aletrina 1000ppm

### 1.4 Material, Equipo y Reactivos

#### 1.4.1 Material

Ampolla de separación de 125 ml

Agitadores de vidrio

Algodón estéril

Arena de mar

Arena de río

Aro metálico

Balones volumétricos de 10, 25, 50, 100, 250, 400, 600, 1000 ml

Bolsas plásticas negras

Cajas de petri con tapadera hermética

Cápsula de porcelana

Columnas cromatográficas

Embudos de vidrio

Espátulas

Gasa estéril

Gradilla

Guantes de goma

Malla de asbesto

Micropipetas de 10, 100  $\mu$ l

Micropipetas de 8 canales

Microplacas de 96 pozos

Mortero y pistilo

Papel filtro

Pelum

Pinzas de extensión

Pinzas de sostén

Pipetas volumétricas de 5, 10 ml

Probetas de 10, 25, 50, 100 ml

Termómetros



Tijeras de podar

Trípode

Tubos de ensayo

Vidrios de reloj

#### **1.4.2 Equipo**

Balanza analítica

Balanza granataria

Baño de maría

Estereoscopio

Estufa

Fuente de luz blanca

Hot plate

Microscopio

Refrigeradora

Rotavapor

#### **1.4.3 Reactivos y Solventes**

Acetato de etilo

Acetato de plomo al 5% y 10%

Ácido clorhídrico 1N y [ ]

Ácido pícrico

Ácido sulfúrico [ ]

Agua de grifo reposada

Agua destilada

Aletrina

Amoníaco

Anhídrido acético

Benceno

Clorhidrato de hidroxilamina

Clorhidrato de quinina al 5%

Cloroformo

Diclorometano

Dicromato de potasio al 5%

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Etanol al 70% y 90%

Gelatina al 2%

Hidróxido de potasio

Incaparina

Metanol

N-hexano

Nitroprusiato de sodio 2N

Reactivo de Dragendorff

Reactivo de Keller-Kelliani

Reactivo de Salkowski

Reactivo de Wagner

Sílica gel de columna

Sub-acetato de plomo al 5%,TS

Tricloruro de hierro

## 2. Metodología

### 2.1 Recolección del material vegetal

La recolección de las especies vegetales se realizó en diferentes zonas del país (El Salvador), observando que los órganos no estuvieran dañados, ni contaminados con plagas.

Nombre Científico	Nombre Común	Órganos recolectados	Lugar de Recolección
<i>Annona diversifolia</i>	Anona	Semillas	San Salvador
<i>Rauwolfia tetraphylla</i>	Amatillo	Hojas, tallo y corteza (frescas)	Carretera al Puerto de La Libertad
<i>Sansevieria quineensis</i>	Curarina	Hojas y tallo (frescas)	Los Naranjos (Sonsonate)
<i>Ocimum micranthum</i>	Albahaca	Hojas y tallo (frescas)	Los Planes de Renderos (San Salvador)
<i>Yucca elephantipes</i>	Izote	Hojas y tallo (frescas)	Los Naranjos (Sonsonate)

Para realizar la recolección se utilizó tijeras de podar y bolsas de plástico grandes de color negro.

## **2.2 Preparación de los extractos.**

Para la obtención de los extractos utilizar 3 kilogramos de órganos frescos (hojas, tallos, corteza y semillas) de las especies vegetales. Lavar Los órganos frescos con abundante agua de grifo, enjuagar con agua destilada y cortar en trozos pequeños.

Colocar los trozos pequeños de cada especie vegetal por separado en un balón con capacidad para 5 litros, agregar etanol al 70% hasta cubrirlos, reflujar en un aparato para reflujo provisto de camisa térmica y termostato por 8 horas a una temperatura de 70 °C.

Filtrar el extracto etanólico obtenido a través de un embudo de vidrio provisto de algodón para que el extracto etanólico quede libre de impurezas. Concentrar en un rotavapor a una temperatura de 40 °C y a 90 revoluciones por minuto (rpm) hasta recuperar la mayoría del solvente y el extracto tome una consistencia viscosa. Colocar el extracto obtenido ( 50 gr ) en una cápsula de porcelana, cubrir con papel glacil y guardar en un lugar fresco.

## **2.3 Fraccionamiento de los extractos**

- A. Mezclar homogéneamente 50g del extracto viscoso obtenido de cada especie vegetal con 15g de silica gel de columna hasta obtener un polvo fino seco.
- B. Preparación de las columnas cromatográficas: En 5 columnas cromatográficas de 70 cm de altura por 3.5 cm de diámetro, agregar a cada columna una torunda de algodón, 70g de silica gel de columna hasta empacarlas, posteriormente adicionar por separado en cada una de las 5 columnas el polvo fino y seco que se obtuvo en el paso A, finalmente colocar otra torunda de algodón sobre el polvo fino y seco.

Eluir las columnas utilizando un litro de cada uno de los siguientes solventes de acuerdo a su polaridad: n-hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, obteniendo 5 fracciones de cada especie vegetal. Concentrar cada una de las fracciones líquidas utilizando el rotavapor a una temperatura de 40 °C y a 90 rpm hasta recuperar la mayoría del solvente y las fracciones tomen consistencia viscosa.

Determinar la actividad larvica de las fracciones, utilizando la metodología siguiente.

## **2.4 Bio-ensayo larvica usando *Aedes aegypti***

El método a utilizar para la determinación de la actividad larvica contra el *Aedes aegypti* es el protocolo de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

### **2.4.1 Obtención de las larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio**

Colocar un trozo de papel filtro que contiene los huevecillos de *Aedes aegypti* en un vaso de precipitado de 1000 ml que posee 600 ml de agua de grifo reposada por 72 horas y adicionar una pizca de incaparina para la nutrición de las larvas. Tapar el vaso de precipitado con gasa estéril e incubar los huevecillos por 24 horas a una temperatura de 25-28 °C.

### **2.4.2 Preparación de las soluciones stock de cada fracción**

Pesar 10 mg de cada una de las fracciones viscosas obtenidas y disolver en 50µl de dimetilsulfóxido (DMSO), colocar la solución obtenida en un balón volumétrico de 10ml y

llevar a volumen con agua de grifo reposada para obtener soluciones con una concentración de 1000ppm (5µg /ml).

#### **2.4.3 Preparación de la solución utilizada como blanco**

Preparar el blanco mezclando 5µl de DMSO con 95µl de agua de grifo reposada por 72 horas.

#### **2.4.4 Preparación de la solución utilizada como control positivo**

El reactivo utilizado como control positivo fue la Aletrina. Pesar 10mg de aletrina, disolver con 5ml de agua de grifo reposada por 72 horas, transferir la solución obtenida a un balón volumétrico de 10ml y llevar a volumen con agua de grifo reposada. (la concentración de Aletrina es igual a 1000ppm)

#### **2.4.5 Determinación de la actividad larvicida**

Probar cada una de las 25 fracciones en un ensayo preliminar a 500 ppm por triplicado y solamente las fracciones con un 100% de mortalidad se deben ensayar con otras diluciones inferiores. Realizar el ensayo en un microplato que contiene líneas de micropozos designados con letras “A” hasta la “H”. Llenar el microplato desde la línea “B” hasta la “G” con 100 µl de agua de grifo reposada por 72 horas.

Adicionar a las líneas “A” y “B” 100 µl de las soluciones stock de las fracciones, seleccionar 3 columnas para cada fracción de los extractos, extraer alícuotas de 100 µl de la línea “B” y transferir a la línea “C”, continuar el procedimiento anterior hasta completar la línea “G”. La línea “H” le corresponde al blanco.

Adicionar a cada micropozo una suspensión de 100 µl que contenga de 10 a 15 larvas. Incubar los microplatos en un lugar oscuro por 24 horas a una temperatura de 25-28 °C,

observar los micropozos a los 30 minutos y a las 24 horas utilizando un microscopio binocular y una fuente de luz blanca. Las larvas vivas siguen en movimiento, mientras que las muertas caen al fondo o se van a la interfase agua-aire.

Realizar el mismo procedimiento para la solución de aletrina que se utiliza como control positivo.

Las fracciones que presenten un 100% de mortalidad a 500 ppm se deben ensayar con las concentraciones inferiores siguientes: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, y 7.81 ppm.

#### **2.4.6 Determinación de la concentración letal al 100% (LC100)**

Para determinar la LC100 de las fracciones, observar los micropozos a los 30 minutos y a las 24 horas. El mínimo de concentración en que todas las larvas del micropozo estén muertas se considera como la LC100.

#### **2.4.7 Determinación de la dosis letal al 50% (DL<sub>50</sub>)**

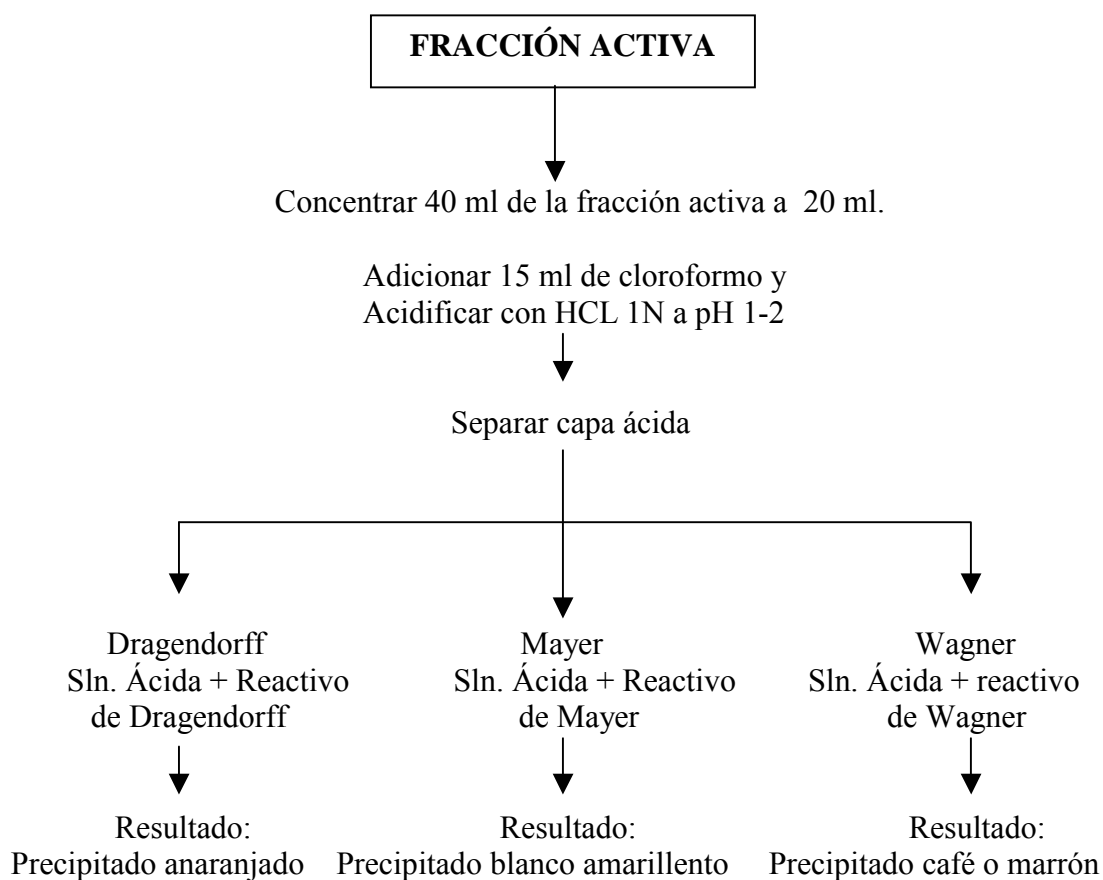
La mortalidad promedio se calcula utilizando el Programa Finney para el Análisis probiótico de datos experimentales para el cálculo de la DL50, el cual es un software diseñado especialmente para este tipo de bioensayos, propiedad de CYTED en el se introduce el numero de diluciones realizadas en el microplato, luego aparece en el monitor tres columnas a llenar, en la primera se introduce el numero total de larvas colocadas, en la segunda columna el total de larvas muertas y en la tercera la concentración, todo esto correspondiente a cada micropozo. Una vez completadas las columnas, el programa hace un análisis probit calculando

la DL50 correspondiente a los extractos que presentan un 100% de mortalidad en el ensayo preliminar.

## 2.5 Análisis fitoquímico de las fracciones activas

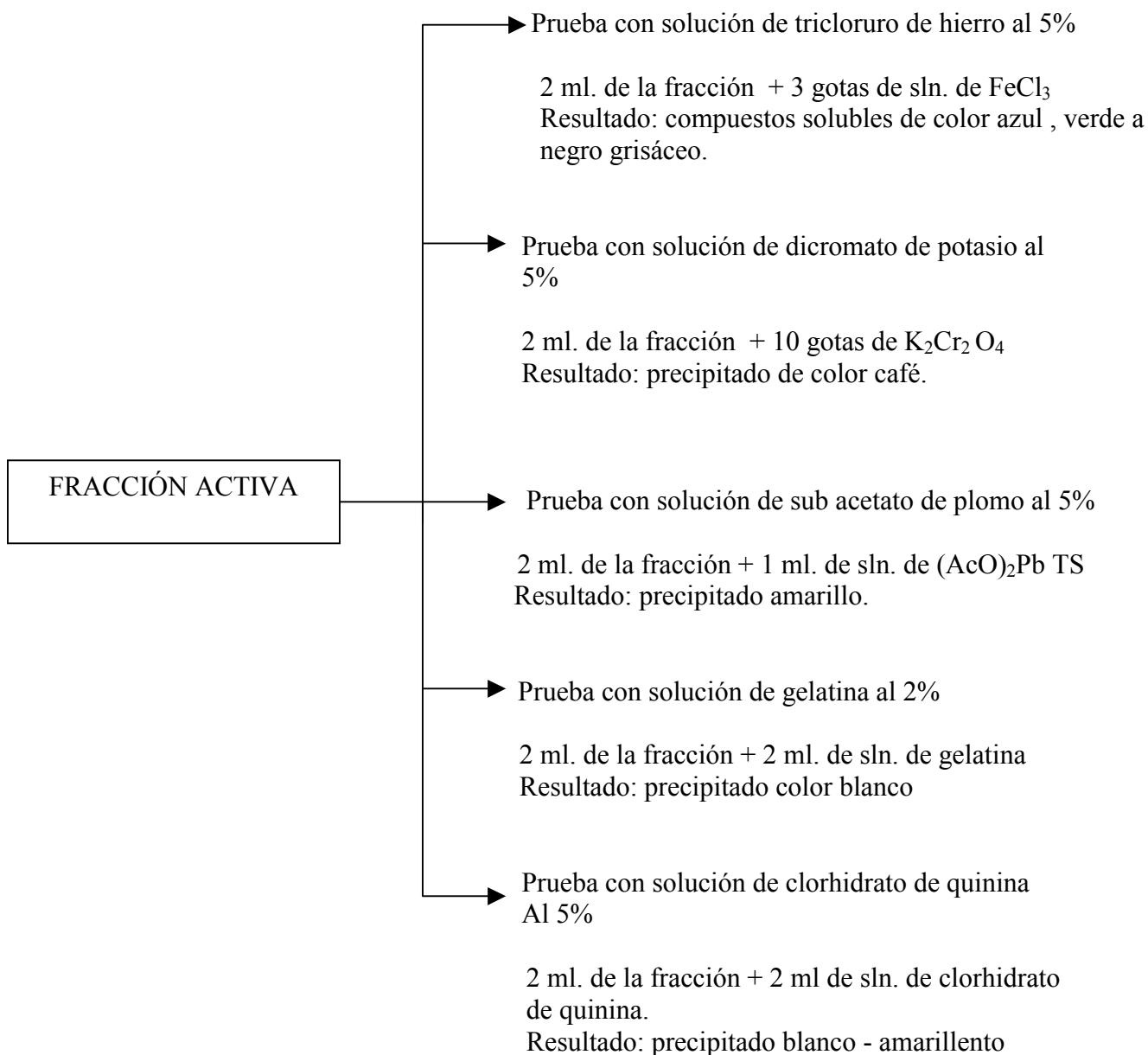
Realizar a cada una de las fracciones que presenten un 100% de mortalidad en el ensayo preliminar a 500 ppm las siguientes pruebas para identificar los metabolitos presentes.

### 2.5.1 Ensayos para determinar alcaloides

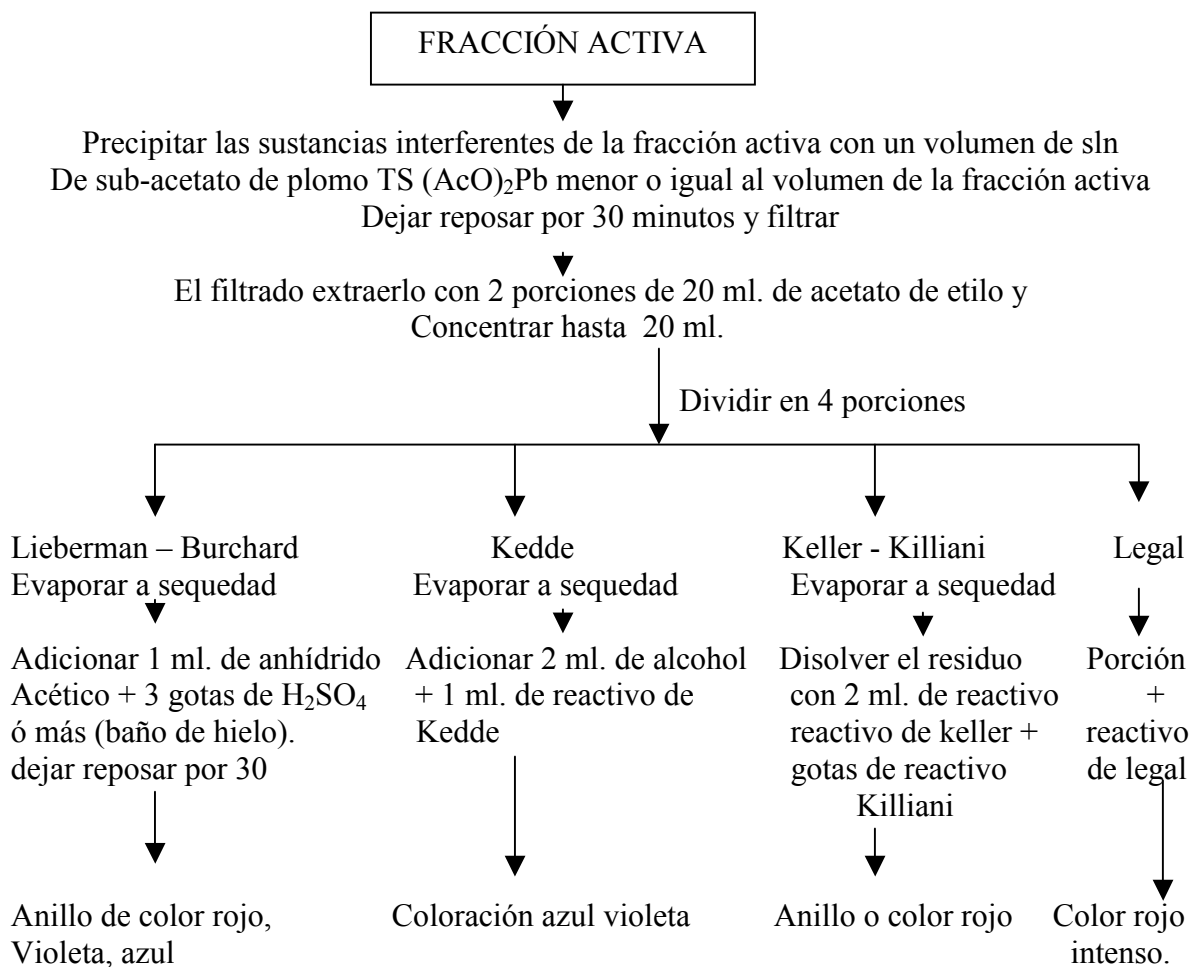




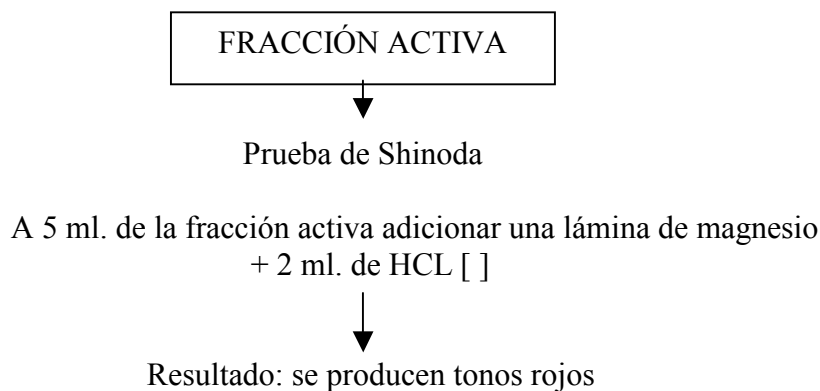
### 2.5.2 Ensayos para determinar Taninos



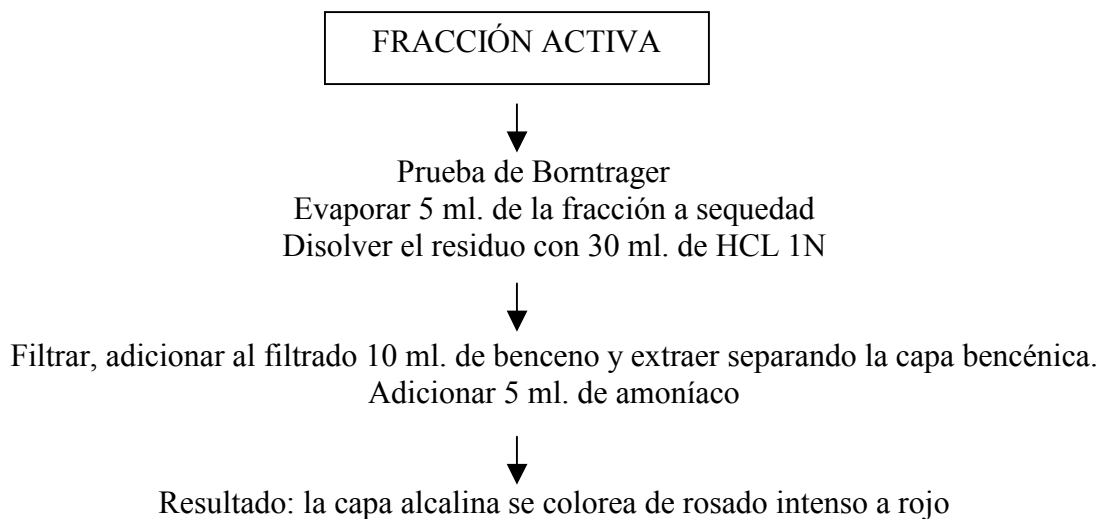
### 2.5.3 Ensayos para determinar glicósidos cardiotónicos



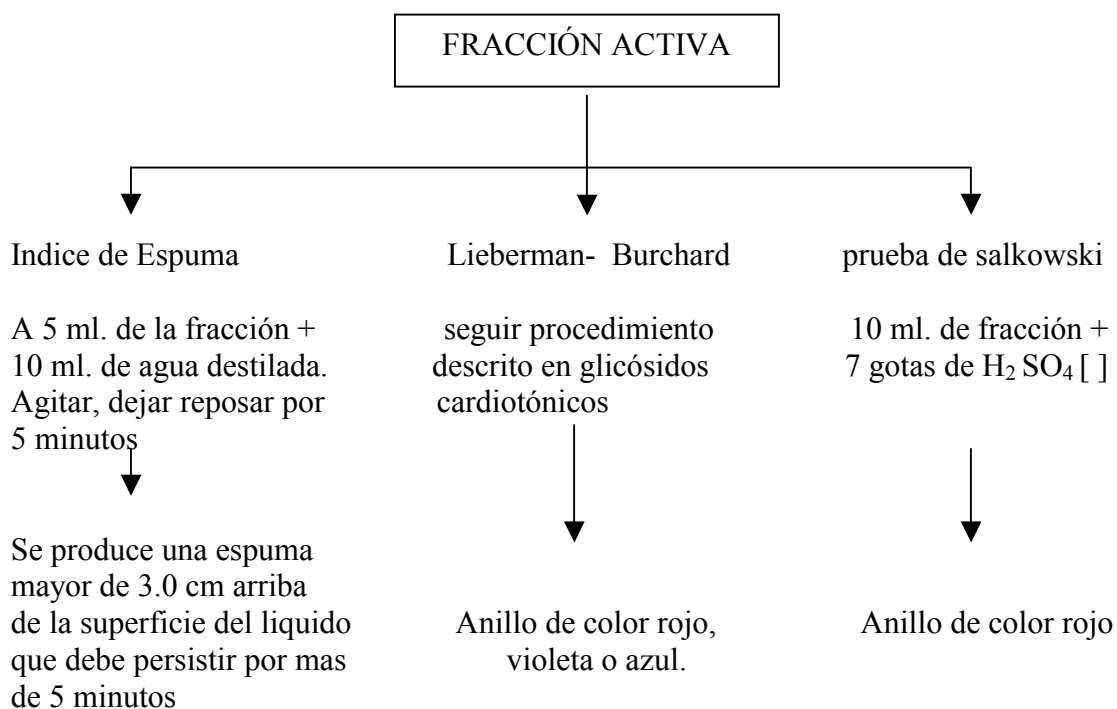
### 2.5.3 Ensayos para determinar glicósidos Cardiotónicos



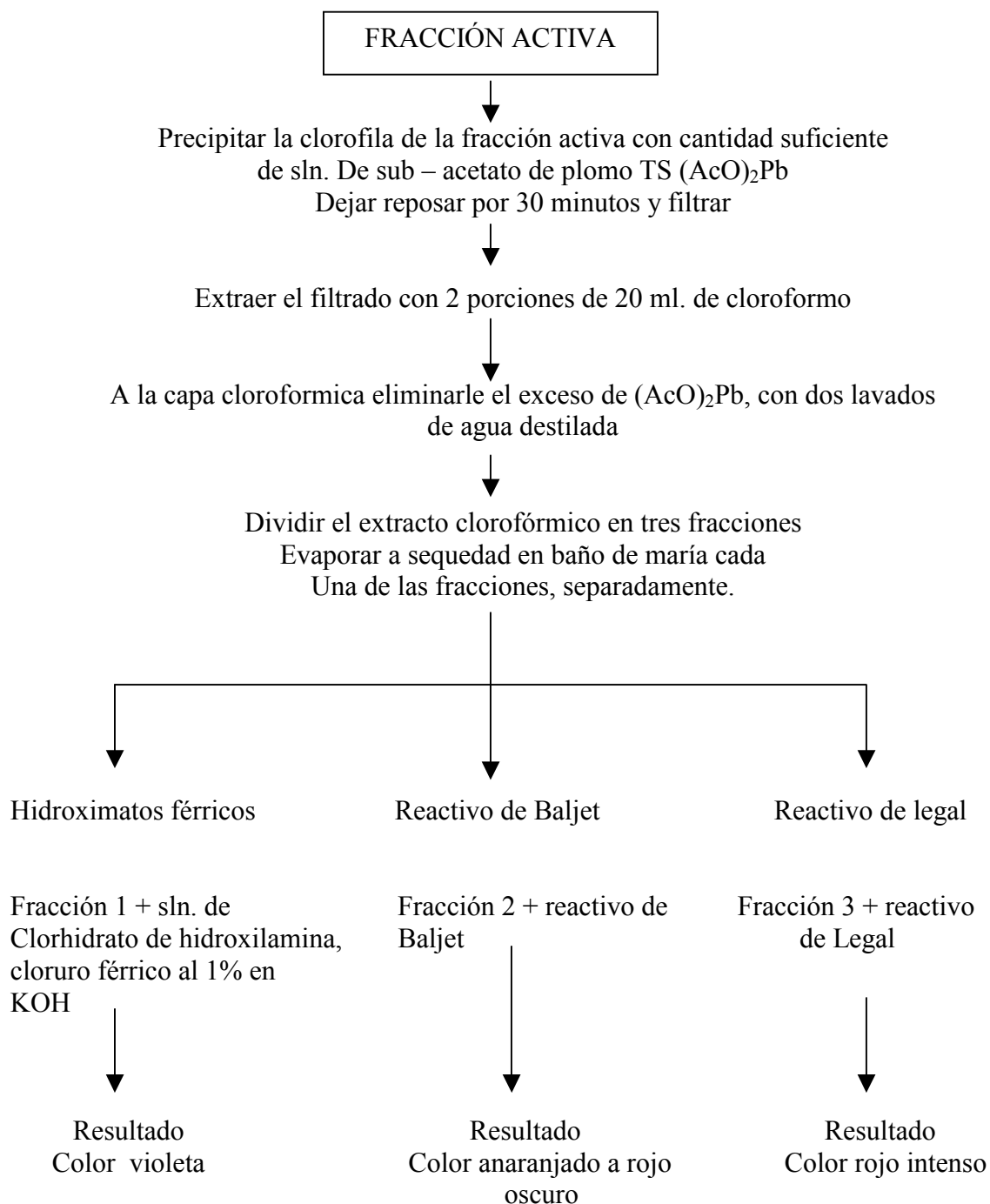
### 2.5.5 Ensayos para determinar Antraquinonas.



### 2.5.6 Ensayos para determinar glicósidos saponínicos



### 2.5.7 Ensayos para determinar Sesquiterpenlactonas



## **2.6 Elaboración del preparado larvicida**

### TÉCNICA.

1. Limpieza y Sanitización.
2. Requisición de materia prima y equipo.
3. Lavar la arena de río y con agua destilada y Secar.
4. Tamizar la arena de río.
5. Colocar la arena en una estufa a una temperatura de 100 °C.
6. En un beaker y con ayuda de una espátula, utilizando una balanza granataria pesar 1g de extracto o fracciones de la semilla de anona
7. Pesar en una cápsula de porcelana 10 gr. de arena de río tamizada.
8. Agregar la muestra en la cápsula de porcelana y mezclar con ayuda de una espátula hasta homogenizar completamente para obtener un polvo suelto.
9. Colocar la mezcla del paso anterior en una porción de material llamado pelum y sellarlo.

### **Técnica para determinar la efectividad del preparado larvicida .**

1. Colocar en un recipiente de vidrio 1 litro de agua de chorro reposada por 72 horas.
2. Agregar al recipiente 60 larvas de *Aedes aegypti*.
3. Adicionar el preparado larvicida al recipiente que contiene las larvas
4. Observar y anotar el número de larvas muertas a los 30 min., a las 24, 48 y 72 horas.

**CAPITULO III**

**RESULTADOS Y**

**DISCUSION**

Cuadro N° 1

*Resultados de Ensayos Preliminares de las fracciones de las 5 especies vegetales a 500 p.p.m.*

Extractos de las especies vegetales	Fracciones (solventes)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
			30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
<b>Annona diversifolia</b>	N- Hexano	14	0	14	11	0	11	11	0	11
	Diclorometano	15	0	15	12	0	12	12	0	12
	Cloroformo	14	0	14	10	0	10	15	0	15
	Acetato de etilo	12	0	12	14	0	14	14	0	14
	Metanol	12	0	12	11	0	11	10	0	10
<b>Rauwolfia tetraphylla</b>	N- Hexano	11	0	5	12	0	3	13	0	5
	Diclorometano	12	0	12	13	0	13	11	0	11
	Cloroformo	14	0	2	14	0	1	10	0	1
	Acetato de etilo	10	0	1	11	0	0	12	0	0
	Metanol	15	0	0	10	0	0	11	0	0
<b>Sanseviria quineensis</b>	N- Hexano	14	0	0	10	0	0	10	0	0
	Diclorometano	13	0	13	10	0	10	11	0	11
	Cloroformo	10	0	2	12	0	3	14	0	3
	Acetato de etilo	11	0	2	11	0	1	13	0	1
	Metanol	12	0	1	13	0	2	10	0	1
<b>Ocimum micranthum</b>	N- Hexano	11	0	7	10	0	4	10	0	5
	Diclorometano	12	0	12	12	0	12	11	0	11
	Cloroformo	11	0	5	11	0	6	11	0	4
	Acetato de etilo	10	0	0	11	0	0	12	0	0
	Metanol	14	0	14	11	0	11	13	0	13
<b>Yuca elephantipes</b>	N- Hexano	11	0	0	14	0	0	14	0	0
	Diclorometano	13	0	5	12	0	3	11	0	5
	Cloroformo	10	0	0	12	0	0	10	0	0
	Acetato de etilo	12	0	0	14	0	0	11	0	0
	Metanol	14	0	14	10	0	10	14	0	14

Cuadro N° 2

*Resultados del Bioensayo de las fracciones de las 5 especies vegetales a 500 p.p.m.*

Extractos de las especies vegetales	Fracciones (solventes)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
			30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
<b>Annona diversifolia</b>	N- Hexano	11	0	11	12	0	12	10	0	10
	Diclorometano	10	0	10	12	0	12	11	0	11
	Cloroformo	12	0	12	10	0	10	14	0	14
	Acetato de etilo	11	0	11	14	0	14	13	0	13
	Metanol	10	0	10	15	0	15	12	0	12
<b>Rauwolfia tetraphylla</b>	N- Hexano	13	0	4	13	0	5	10	0	4
	Diclorometano	14	0	14	11	0	11	14	0	14
	Cloroformo	11	0	1	10	0	0	12	0	1
	Acetato de etilo	10	0	0	11	0	1	10	0	0
	Metanol	10	0	0	14	0	0	12	0	0
<b>Sansevieria quineensis</b>	N- Hexano	14	0	0	12	0	0	15	0	0
	Diclorometano	15	0	15	11	0	11	12	0	12
	Cloroformo	12	0	3	10	0	3	11	0	4
	Acetato de etilo	11	0	1	15	0	2	10	0	1
	Metanol	10	0	0	13	0	1	15	0	1
<b>Ocimum micranthum</b>	N- Hexano	11	0	5	10	0	4	13	0	6
	Diclorometano	11	0	11	11	0	11	12	0	12
	Cloroformo	11	0	6	11	0	5	10	0	5
	Acetato de etilo	10	0	0	12	0	0	10	0	0
	Metanol	14	0	14	12	0	12	10	0	10
<b>Yuca elephantipes</b>	N- Hexano	13	0	0	13	0	0	12	0	0
	Diclorometano	12	0	6	11	0	5	14	0	6
	Cloroformo	14	0	0	10	0	0	11	0	0
	Acetato de etilo	10	0	0	10	0	1	13	0	1
	Metanol	15	0	15	11	0	11	12	0	12



**Cuadro N° 3**  
***Fracciones de las especies vegetales que presentaron un 100% de mortalidad en el Bioensayo a 500 ppm.***

Nombre Científico	Nombre Común	Fracciones
<b>Annona diversifolia</b>	<b>Anona</b>	<b>N- Hexano Diclorometano Cloroformo Acetato de etilo Metanol</b>
<b>Rauwolfia tetraphylla</b>	<b>Amatillo</b>	<b>Diclorometano</b>
<b>Sansevieria quineensis</b>	<b>Curarina</b>	<b>Diclorometano</b>
<b>Ocimum micranthum</b>	<b>Albahaca</b>	<b>Diclorometano Metanol</b>
<b>Yuca elephantipes</b>	<b>Izote</b>	<b>Metanol</b>

**Cuadro N° 4**

*Resultados obtenidos con la fracción de N- Hexano de Anona a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	11	0	11	10	0	10	15	0	15
250	10	0	10	14	0	14	11	0	11
125	14	0	14	13	0	13	11	0	11
62.5	13	0	6	11	0	5	10	0	8
31.25	12	0	1	10	0	0	12	0	1
15.62	10	0	0	12	0	0	12	0	0
7.81	12	0	0	11	0	0	13	0	0

**LD<sub>50</sub> = 51.7352ppm.**

**Cuadro N° 5**

*Resultados obtenidos con la fracción de Diclorometano de Anona a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N1 de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	12	0	12	11	0	11	10	0	10
250	11	0	11	14	0	14	12	0	12
125	10	0	10	15	0	15	11	0	11
62.5	12	0	12	10	0	10	13	0	13
31.25	12	0	12	11	0	11	11	0	11
15.62	14	0	14	10	0	10	10	0	10
7.81	10	0	6	13	0	8	10	0	6

**LD<sub>50</sub> = 3.8157ppm**

Cuadro N° 6

*Resultados obtenidos con la fracción de Cloroformo de Anona a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	11	0	11	14	0	14	12	0	12
250	11	0	11	15	0	15	13	0	13
125	10	0	10	12	0	12	15	0	15
62.5	10	0	10	13	0	13	10	0	10
31.25	12	0	12	10	0	10	11	0	11
15.62	14	0	14	10	0	10	10	0	10
7.81	11	0	4	12	0	5	10	0	3

**LD<sub>50</sub> = 3.9817ppm.**

Cuadro N° 7

*Resultados obtenidos con la fracción de Acetato de etilo de Anona a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	15	0	15	14	0	14	11	0	11
250	11	0	11	14	0	14	13	0	13
125	14	0	14	12	0	12	11	0	11
62.5	12	0	12	15	0	15	10	0	10
31.25	12	0	10	10	0	8	12	0	11
15.62	10	0	4	11	0	3	12	0	2
7.81	12	0	0	11	0	0	14	0	0

**LD<sub>50</sub> = 6.0510ppm.**

Cuadro N° 8

*Resultados obtenidos con la fracción de Metanol de Anona a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	14	0	14	12	0	12	11	0	11
250	11	0	11	15	0	15	11	0	11
125	12	0	12	11	0	11	14	0	14
62.5	12	0	12	10	0	10	12	0	12
31.25	14	0	14	10	0	10	12	0	12
15.62	10	0	8	13	0	11	10	0	7
7.81	11	0	1	10	0	2	10	0	1

**LD<sub>50</sub> = 5.2146ppm.**

Cuadro N° 9

*Resultados obtenidos con la fracción de Diclorometano de Amatillo a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	15	0	15	14	0	14	13	0	13
250	13	0	4	15	0	5	15	0	4
125	12	0	0	13	0	0	10	0	0
62.5	10	0	0	10	0	0	11	0	0
31.25	12	0	0	12	0	0	14	0	0
15.62	11	0	0	10	0	0	12	0	0
7.81	13	0	0	12	0	0	11	0	0

**LD<sub>50</sub> = 238.4301ppm.**

Cuadro N° 10

*Resultados obtenidos con la fracción de Diclorometano de Curarina a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	11	0	11	11	0	11	14	0	14
250	12	0	9	10	0	8	11	0	9
125	10	0	2	10	0	1	11	0	1
62.5	13	0	0	11	0	0	10	0	0
31.25	14	0	0	15	0	0	12	0	0
15.62	10	0	0	12	0	0	13	0	0
7.81	11	0	0	14	0	0	13	0	0

**LD<sub>50</sub> = 183.3615ppm.**

Cuadro N° 11

*Resultados obtenidos con la fracción de Diclorometano de Albahaca a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	10	0	10	11	0	11	12	0	12
250	14	0	3	11	0	2	12	0	2
125	15	0	0	10	0	0	10	0	0
62.5	12	0	0	12	0	0	10	0	0
31.25	11	0	0	11	0	0	11	0	0
15.62	10	0	0	13	0	0	13	0	0
7.81	13	0	0	10	0	0	14	0	0

**LD<sub>50</sub> = 192.3953ppm.**

Cuadro N° 12

*Resultados obtenidos con la fracción de Metanol de Albahaca a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	13	0	13	12	0	12	14	0	14
250	10	0	1	14	0	0	13	0	1
125	14	0	0	12	0	0	15	0	0
62.5	12	0	0	11	0	0	10	0	0
31.25	11	0	0	13	0	0	12	0	0
15.62	11	0	0	12	0	0	11	0	0
7.81	13	0	0	11	0	0	14	0	0

**LD<sub>50</sub> = 249.6597ppm.**

Cuadro N° 13

*Resultados obtenidos con la fracción de Metanol de Izote a concentraciones geométricas inferiores*

CONCENTRACIÓN (ppm o ug/ml)	Micropozo N° 1			Micropozo N° 2			Micropozo N° 3		
	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas		N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas		30 min.	24 horas
500	10	0	10	14	0	14	12	0	12
250	12	0	0	11	0	1	10	0	2
125	14	0	0	11	0	0	15	0	0
62.5	14	0	0	14	0	0	10	0	0
31.25	12	0	0	12	0	0	14	0	0
15.62	10	0	0	15	0	0	13	0	0
7.81	15	0	0	11	0	0	10	0	0

**LD<sub>50</sub> = 251.1927ppm.**

### Cuadro N° 14

*Cuadro resumen de las mínimas concentraciones que presentaron un 100% de mortalidad de las fracciones de las 5 especies vegetales.*

Nombre Científico	Nombre Común	Fracción	[ ] p.p.m.
Annona diversifolia	Anona	N- Hexano	125
		Diclorometano	15.62
		Cloroformo	15.62
		Acetato de etilo	62.5
		Metanol	31.25
Rauwolfia tetraphylla	Amatillo	Diclorometano	500
Sansevieria quineensis	Curarina	Diclorometano	500
Ocimum micranthum	Albahaca	Diclorometano	500
		Metanol	500
Yuca elephantipes	Izote	Metanol	500

**Cuadro N° 15**  
**Resultados obtenidos con las concentraciones geométricas inferiores del control positivo (Aletrina)**

<b>Ensayo N° 1</b>			
Concentración ppm o ug/ml	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30min.	24horas
500	14	0	14
250	10	0	10
125	12	0	12
62.52	11	0	11
31.25	15	0	15
15.62	14	0	11
7.81	11	0	6

**LD<sub>50</sub> = 6.0145 ppm 0 ug /ml.**

**Cuadro N° 16**  
**Resultados obtenidos con las concentraciones geométricas inferiores del control positivo (Aletrina)**

<b>Ensayo N° 2</b>			
Concentración ppm o ug/ml	N° de larvas vivas	N° de larvas muertas	
		30min.	24horas
500	10	0	10
250	15	0	15
125	13	0	13
62.52	12	0	12
31.25	10	0	10
15.62	11	0	7
7.81	14	0	4

**LD<sub>50</sub> = 6.1759 ppm 0 ug /ml.**



**Cuadro N° 17**  
**Resultado de pruebas fitoquímicas de las fracciones activas.**

Nombre de la Fracción Activa	TANINOS					Conclusión
	Tricloruro de Hierro	Dicromato de Potasio	Subacetato de Plomo	Solución de Gelatina	Clorhidrato de Quinina	
Anona - N-Hexano	-	-	-	-	-	<b>Negativo</b>
Anona - Diclorometano	+	-	+	+	+	<b>Positivo</b>
Anona - Cloroformo	+	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
Anona - Acetato de etilo	+	-	+	+	+	<b>Positivo</b>
Anona - Metanol	+	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
Amatillo - Diclorometano	-	-	-	-	-	<b>Negativo</b>
Curarina - Diclorometano	-	-	+	-	-	<b>Negativo</b>
Albahaca - Diclorometano	-	-	-	-	-	<b>Negativo</b>
Albahaca - Metanol	+	-	-	-	-	<b>Negativo</b>
Izote- Metanol	+	+	+	+	+	<b>Positivo</b>

Cuadro N° 18

*Resultado de pruebas fitoquímicas de las fracciones activas.*

Nombre de la Fracción Activa	Alcaloides				Sesquiterpenlactonas			
	Dragendorff	Mayer	Wagner	Conclusión	Baljet	Legal	Hidroximatos Férricos	Conclusión
Anona + N-Hexano	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo
Anona + Diclorometano	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo
Anona + Cloroformo	-	-	-	Negativo	+	+	+	Positivo
Anona + Acetato de etilo	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo
Anona + Metanol	+	+	+	Positivo	+	+	+	Positivo
Amatillo + Diclorometano	+	+	+	Positivo	-	-	-	Negativo
Curarina + Diclorometano	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo
Albahaca + Diclorometano	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo
Albahaca + Metanol	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo
Izote-Metanol	-	-	-	Negativo	-	-	-	Negativo

**Cuadro N° 19****Resultado de pruebas fitoquímicas de las fracciones activas.**

Nombre de la Fracción Activa	Glicósidos Cardiotónicos				Conclusión	Antraquinonas	
	Lieberman-Burchard	Kedde	Keller - Killiani	Legal		Bonitrager	Conclusión
Anona + N-Hexano	+	-	-	+	Negativo	-	Negativo
Anona + Diclorometano	+	-	-	+	Negativo	-	Negativo
Anona + Cloroformo	+	-	-	+	Negativo	-	Negativo
Anona + Ace - tato de etilo	+	-	-	+	Negativo	-	Negativo
Anona + Metanol	+	-	-	+	Negativo	-	Negativo
Amatillo + Diclorometano	-	-	-	-	Negativo	-	Negativo
Curarina + Diclorometano	+	-	-	-	Negativo	-	Negativo
Albahaca + Diclorometano	+	-	-	-	Negativo	-	Negativo
Albahaca + Metanol	+	-	-	-	Negativo	-	Negativo
Izote- Metanol	-	-	-	-	Negativo	-	Negativo

**Cuadro N° 20**

**Resultado de pruebas fitoquímicas de las fracciones activas.**

Nombre de la Fracción Activa	Glicósidos Saponínicos				Flavonoides	
	Lieberman-Burchard	Salkowski	Método de la Espuma	Conclusión	Shinoda	Conclusión
Anona + N-Hexano	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Anona + Diclorometano	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Anona + Cloroformo	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Anona + Ace - tato de etilo	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Anona + Metanol	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Amatillo + Diclorometano	-	-	-	Negativo	-	Negativo
Curarina + Diclorometano	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Albahaca + Diclorometano	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Albahaca + Metanol	+	+	+	Positivo	-	Negativo
Izote- Metanol	+	+	+	Positivo	-	Negativo

**Cuadro N° 21***Cuadro resumen de las pruebas fitoquímicas de las fracciones activas*

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Fracción</b>	<b>Metabolitos Secundarios Presentes</b>
Anona	N- Hexano	Alcaloides, Sesquiterpenlactonas y glicósidos saponínicos
	Diclorometano	Taninos, Sesquiterpenlactonas y glicósidos saponínicos
	Cloroformo	Taninos, Sesquiterpenlactonas y glicósidos saponínicos
	Acetato de etilo	Taninos, alcaloides sesquiterpenlactonas y glicósidos saponínicos
	Metanol	Taninos, alcaloides sesquiterpenlactonas y glicósidos saponínicos
Amatillo	Diclorometano	Alcaloides
Curarina	Diclorometano	Glicósidos saponínicos
Albahaca	Diclorometano	Glicósidos saponínicos
	Metanol	Glicósidos saponínicos
Izote	Metanol	Glicósidos saponínicos y latinos

Cuadro N° 22

***Ensayos para determinar la eficacia del producto larvicida elaborado con fracciones de las especies vegetales.***

<b>Especie vegetal</b>	<b>Fracción</b>	<b>Cantidad de fraccion (muestra) en el formulado.</b>	<b>N ° de Larvas vivas</b>	<b>N° de larvas muertas a 30 min.</b>	<b>N° de larva muertas a 24 horas.</b>
Anona	N - Hexano	0.5g	60	0	5
	Diclorometano	0.5g	60	0	5
	Cloroformo	0.5g	60	0	6
	Acetato de etilo	0.5g	60	0	10
	Metanol	0.5g	60	0	60
Amatillo	Diclorometano	0.5g	60	0	2
Curarina	Diclorometano	0.5g	60	0	3
	Diclorometano	0.5g	60	0	3
Albahaca	Metanol	0.5g	60	0	20
Izote	Metanol	0.5g	60	0	10

**Cuadro N° 23**

*Ensayos para determinar la eficacia del producto larvicida elaborado con los extractos de las especies vegetales.*

<b>Especie Vegetal</b>	<b>Cantidad de extracto en el formulado.</b>	<b>N° de larvas vivas</b>	<b>N° de larvas muertas a 30 min.</b>	<b>N° de larvas muertas a 24 horas.</b>	<b>Observación</b>
Anona	1.0g	60	0	60	Mato todas las larvas, pero el agua pierde un poco sus características organolépticas, se torna de color café-amarillento.
Amatillo	1.0g	60	0	60	Mata todas las larvas pero queda el agua de color verde, el agua sus características organolépticas y la planta es toxica.
Albahaca	1.0g	60	0	60	Mata todas las larvas se torna de color verde el agua y con olor punzante alterandose sus características organolépticas.
Curarina	1.0g	60	0	60	Mata todas las larvas se torna el agua de color verde y se produce un olor desagradable a las 24 horas.
Izote	1.0g	60	0	50	No mata todas las larvas y altera las características organolépticas del agua.

## **Discusión de resultados de los ensayos a 500 ppm con las fracciones de las 5 especies vegetales.**

En el ensayo preliminar realizado a 500 ppm, sólo en las siguientes fracciones: Anona- n-hexano, Anona- diclorometano, Anona-cloroformo, Anona- acetato de etilo, Anona-metanol, Amatillo-diclorometano, Curarina-diclorometano, Albahaca-diclorometano, Albahaca-metanol e Izote-metanol, se observó que las larvas se encontraban flotando en la interfase agua-aire o inmóviles en el fondo de los micropozos, por lo tanto las fracciones antes mencionadas presentaron un 100% de mortalidad contra las larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio (ver cuadros N° 1 y 2) y fueron ensayadas con otras diluciones geométricas inferiores.

Los microplatos que se utilizaron para la realización de los ensayos preliminares se observaron a los 30 minutos y a las 24 horas, tiempo estipulado en el protocolo de CYTED; pero las fracciones Amatillo-n-hexano, Albahaca-n-hexano, Albahaca-cloroformo e Izote-diclorometano se dejaron en observación durante otras 24 horas más, debido a que estas fracciones presentaron aproximadamente un 50% de mortalidad contra las larvas de *Aedes aegypti* en las primeras 24 horas (cuadros N° 1 y 2). Sin embargo no se observó ninguna alteración en el número de larvas muertas en 24 horas más en las fracciones antes mencionadas.

Las fracciones restantes no presentaron actividad larvicida a 500 ppm debido a que todas las larvas seguían en movimiento sinuoso, aunque en algunas fracciones se observó una pequeña cantidad de larvas muertas (1 ó 2 larvas), esto se pudo deber posiblemente a que no había alimento ya que en este estadio las larvas necesitan alimentarse de lo contrario ocurre su muerte.



## **Discusión de resultados obtenidos en el bioensayo larvicida con las fracciones que presentaron un 100% de mortalidad a 500 ppm.**

De las 25 fracciones analizadas en el ensayo preliminar a 500 ppm solamente diez fracciones presentaron un 100% de mortalidad contra las larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio (ver cuadro No. 3) y estas fracciones fueron ensayadas con diluciones geométricas inferiores de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81ppm

### **Annona diversifolia.**

En los cuadros No. 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados de las fracciones de la *Annona diversifolia* y estos demuestran que las fracciones Anona-diclorometano y anona cloroformo presentaron una  $LC_{100}$  (mínima concentración en que todas las larvas están muertas) de 15.62 ppm y  $LD_{50}$  obtenida utilizando el programa Finney fue de 3.8157 ppm para la fracción de Anona-diclorometano y de 3.9817 ppm para la fracción de Anona-cloroformo. Con la fracción de Anona-metanol y anona-acetato de etilo se obtuvo una  $LC_{100}$  de 31.25 ppm y 62.5 ppm, estas fracciones presentaron una  $LD_{50}$  de 5.2146 ppm y 6.0570 ppm respectivamente. La fracción de *Annona diversifolia* que presentó la  $LC_{100}$  mas alta fue la Anona-n-hexano con un valor de 125 ppm y un  $LD_{50}$  de 51.7352ppm.

En estudios realizados, sobre la actividad larvicida en el extracto crudo de la semilla de *Annona diversifolia* se obtuvo una  $LC_{100}$  de 62.5ppm.<sup>17</sup>

Las especies vegetales de la familia de las Annonáceas contienen en sus semillas altas concentraciones de acetogeninas dentro de las cuales se encuentran las asimicina la cual posee actividad insecticida presente en las semillas de *Annona cherimola*, también poseen ácidos grasos libres que en estudios anteriores han demostrado tener alta actividad insecticida. En las

larvas de *Plutella*, *Maculipennis*, *Diatarazia* y *Ataracea* los extractos de las semillas de algunas especies del genero *Annona* actúan como veneno estomacal. El tóxico principal es un glicérido de uno o mas ácidos hidroxilados, por lo que éste glicérido puede ser el causante de la actividad larvicida contra el *Aedes aegypti* en el caso de las semillas de la *Annona diversifolia*. Según el cuadro No. 21 se encontró en el análisis fotoquímico taninos, sesquiterpenlactonas, glicósidos saponínicos y alcaloides los cuales por sinergia le dan a las diferentes fracciones la actividad larvicida.

Además se observa que al fraccionar el extracto a las diferentes polaridades utilizadas, todas ellas muestran actividad larvicida y tomando en cuenta la composición química de cada una de ellas (cuadro No. 21) no se puede adjudicar a un solo metabolito su actividad.

La  $LC_{100}$  de las fracciones Amatillo-diclorometano, curarina-diclorometano, albahaca-diclorometano, albahaca-metanol e izote-metanol fue de 500ppm. En la información bibliográfica no se encontró nada al respecto sobre actividad larvicida de estas especies, solamente sobre el olor de las hojas frescas de la *Ocimum micranthum* el cual es utilizado como repelente de insectos y el aceite esencial tiene actividad insecticida. Pero no se debe confundir lo que es repelente con actividad larvicida, ni actividad insecticida con actividad larvicida ya que son actividades muy diferentes.

En cuanto a la actividad larvicida presentada por estas fracciones, posiblemente se deba a los metabolitos secundarios reportados como positivos aunque este es un trabajo preliminar, se necesitan hacer análisis mas específicos, además debe seguirse fraccionando para poder llegar a las moléculas activas.

En los cuadros 17, 18,19, 20 y 21 se muestran los resultados de las diez fracciones activas las cuales poseen en su composición química una serie de metabolitos secundarios de interés en la investigación desarrollada.

Los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico de las fracciones que presentan un 100% de mortalidad contra las larvas de Aedes aegypti a 500 ppm sirven para determinar los metabolitos secundarios que han sido arrastrados en el fraccionamiento de las especies vegetales y a la vez proporcionan un marco de referencia sobre el grupo de componentes o metabolitos secundarios a los cuales atribuirles en forma general la actividad larvicida.

Comparando los resultados obtenidos con el control positivo de aletrina (ver cuadro 15 – 16) se encontró que la muestra geoméricamente activa resulto ser de 31.25 ppm, con una  $LD_{50}$  de 6.1759 y 6.0145 en los 2 ensayos realizados y en las fracciones de anona correspondientes a diclorometano y cloroformo se obtuvo un valor de actividad a 15.62 ppm respectivamente y con la fracción de metanol a 31.25 ppm esto indica que el valor de actividad de la aletrina de 31.25ppm se consigue con la fracción de metanol anona a la misma concentración pero con  $LD_{50}$  menor, pero con las fracciones de diclorometano y cloroformo se observo actividad mayor que con el control positivo ya que las  $LD_{50}$  de ambos resulto ser de 3.81 y 3.9817 respectivamente, las fracciones Anona- diclorometano y Anona- cloroformo presentan mayor actividad larvicida que la aletrina.

## **Discusión de Resultados del producto larvicida**

A partir de los resultados obtenidos con las fracciones que presentaron  $LC_{100}$  (10 fracciones) se comenzaron a realizar ensayos de formulación del producto larvicida y su efectividad.

En el cuadro No 22 se presentan los resultados obtenidos con dichas fracciones, se utilizó 0.5 gr. de cada fracción en elaborar el producto, en un litro de agua reposada, en donde fueron colocadas 60 larvas e introduciendo el producto en el recipiente. Observándose que a 30 minutos no se obtuvo ninguna larva muerta en ninguna fracción, y a 24 horas solamente en la fracción anona-metanol, se obtuvo la muerte de todas las larvas en las fracciones albahaca-metanol e izote-metanol se murieron 20 y 10 larvas respectivamente, con el resto de fracciones solamente murieron algunas.

La razón por la cual se obtuvieron estos resultados es que la mayoría de fracciones presentan características no polares y el agua es polar por lo tanto se produjo problema de solubilidad.

En el caso de las fracciones metanólicas estas se acercan más a la polaridad del agua por lo cual el larvicida se disolvió un poco y mató algunas larvas tal como se observa en el cuadro 22, esto fue notorio pues el agua del recipiente donde se encontraban las larvas se tornó un poco opaca y amarillenta en el caso de la anona-metanol y un tono más verde en albahaca-metanol e izote-metanol.

Tratando de darle solución a este problema se utilizó Tween 80 para poder hacer compatible en solubilidad las fracciones, pero el inconveniente fue que se necesitaba mucha

cantidad de tween 80, haciendo este residuo muy fluido para poderlo incorporar con la arena, además le impartía mucho color al agua alterando sus características organolépticas.

Se puede concluir que el mejor resultado fue la fracción de anona-metanol y que no era conveniente formular el producto por lo descrito anteriormente. Además que el agregar tween 80 aumenta el costo del producto.

Se considera que la elaboración del preparado larvicida con fracciones podría ser desarrollado con fines industriales ya que para la obtención de estas fracciones se necesitan disolventes y estos tienen precios elevados, además procesos complicados de laboratorio.

Se efectuaron además ensayos de formulación con los extractos utilizando 1 gr. de cada uno de ellos para formular cada producto larvicida.

En el cuadro N°. 23 se muestra los resultados obtenidos, observándose que anona, amatillo, albahaca y curarina mataron en su totalidad las larvas a las 24 horas no así el izote que solamente mato 50 larvas.

Las zonas de la capital en donde se ha diagnosticado mayor crecimiento de zancudos, así como el mayor número de casos de dengue clásico y hemorrágico son aquellos municipios y colonias en donde existe una sobrepoblación y cuyo mayor problema es el abastecimiento de agua, ya que en esos lugares esta si llega es por horas y las personas deben guardar el precioso líquido el cual sirve para todas las necesidades básicas como lavar, comida y aseo personal. Por tal razón las características organolépticas del agua son importantes mantenerlas sino el producto será rechazado.

Según el cuadro 23 el amatillo, albahaca, curarina cambian el color del agua a verde y la anona lo altera en menor proporción.

Después de analizar los resultados se concluye que tanto las fracciones como los extractos presentaron dificultades en diferentes aspectos en cuanto a la formulación y por ende en la eficacia del producto por lo que se considera que con este trabajo se presentan las bases para que se siga continuando esta investigación y que cumpla todas las características para tal fin.

El producto elaborado se sugiere que puede ser utilizado para ser agregado en aguas contaminadas, depósitos o en todo aquello que no sea aguas para consumo humano.

# CAPITULO IV

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. Los componentes químicos presentes en los extractos y fracciones son los responsables de la actividad larvicida actuando sinérgicamente.
2. En la información consultada sobre cada especie vegetal, no se encontró reportada la actividad larvicida por lo cual los resultados de esta investigación enriquece dicha información.
3. En el ensayo preliminar a 500 ppm solamente en las fracciones Anona-diclorometano, Anona-cloroformo, Anona-n-hexano, Anona-acetato de etilo, Anona-metanol, Amatillo-diclorometano, Curarina-diclorometano, Albahaca-diclorometano, Albahaca-metanol e Izote-metanol las larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio presentaron sensibilidad en un 100%.
4. Según los resultados obtenidos en la investigación, demuestran que la especie vegetal que posee mayor actividad larvicida es la *Annona diversifolia* (semilla) debido a que todas sus fracciones presentaron actividad larvicida.
5. Las fracciones de Anona-diclorometano y Anona-cloroformo presentaron una  $LC_{100}$  (mínima concentración a la cual todas las larvas están muertas) mas baja, siendo esta de 15.62 ppm.
6. En base a los resultados obtenidos en el bioensayo larvicida, concluimos que este es un método sencillo que puede ser aplicado en países subdesarrollados, obteniéndose resultados confiables en forma rápida y el costo es relativamente bajo.



7. De las 5 especies vegetales utilizadas en la investigación el extracto de la semilla de *Annona diversifolia* es el mas idóneo para la elaboración del preparado larvicida, debido a que es el que altera en menor proporción las características organolépticas del agua y que presenta una  $LC_{100}$  mas baja con respecto a los otros extractos.
8. La mayoría de las fracciones presentan el inconveniente de solubilidad no así las fracciones metanólicas que se acercan mas a la polaridad del agua.
9. La fracción que mejores resultados dio en la elaboración y eficacia larvicida fue anona-metanol aunque cambio un poco las características organolépticas del agua.
10. Se concluye que formular el producto con fracciones podría desarrollarse con fines industriales por el tipo de procesos y disolventes que se necesitan.
11. Las fracciones de diclorometano y cloroformo de anona mostraron una  $LD_{50}$  menor que la del control positivo de aletrina.
12. La fracción de metanol – anona presentó igual concentración geométrica activa a 31.25ppm. pero su  $LD_{50}$  fue inferior con respecto a la de aletrina.
13. Con el presente trabajo se sientan las bases para continuar esta investigación con el fin de encontrar un producto que cumpla con todas las características, además poder seguir fraccionando y poder llegar hasta la o las moléculas activas que dan el efecto larvicida

# CAPITULO V

## RECOMENDACIONES

## RECOMENDACIONES

1. Los extractos crudos de las especies vegetales y las fracciones se deben concentrar en el rotavapor a una temperatura de 40 °C, con el fin de evitar la inactivación de los metabolitos presentes.
2. Si las fracciones obtenidas no son utilizadas inmediatamente, se deben almacenar en un lugar fresco y en recipientes de color ámbar y bien cerrados, para evitar su descomposición y contaminación microbiana.
3. El almacenamiento de los huevecillos de *Aedes aegypti* se debe realizar en un lugar seco y fresco, ya que comprobamos que a temperaturas altas estos se inactivan.
4. Para la obtención de resultados confiables es recomendable que la fuente de luz blanca que se utiliza para observar los micropozos que contienen las larvas de *Aedes aegypti* en su segundo estadio sea lo mas débil posible debido a que las larvas son sensibles al calor producido por fuentes de luz fuertes.
5. Debe tomarse en cuenta que la mortalidad de algunas larvas, se puede deber a la densidad de estas en el recipiente, por lo tanto se recomienda poner a eclosionar una pequeña cantidad de huevecillos de *Aedes aegypti*.
6. Debido a que el análisis fitoquímico únicamente brinda resultados cualitativos acerca de metabolitos presentes en las fracciones activas analizadas se recomienda continuar los estudios

7. Dar a conocer los resultados obtenidos en la investigación realizada a Organizaciones interesadas y unir esfuerzos para la creación de un insectario para que contribuya en gran medida a las investigaciones que se realizan en la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
8. Las autoridades de la Universidad deben realizar gestiones con Organismos Internacionales, no gubernamentales o el gobierno para la compra de equipo más específico como cromatografía líquida de alta potencia (HPLC), espectrofotómetros, etc., que ayude a realizar mejores investigaciones.
9. Se debe tomar en cuenta algunas condiciones para el tratamiento y mantenimiento de las larvas tales como: el agua debe permanecer en reposo por 72 horas antes de colocar los huevecillos, también debe estar a temperatura ambiente y fuera del alcance de la luz solar, se alimentan con incaparina.
10. Al finalizar la investigación de la actividad larvicida, las larvas sobrevivientes se les debe agregar 5 ml de metanol o agua hervida.

## BIBLIOGRAFÍA

### LIBROS

1. CACERES, Armando. Plantas de uso Medicinal en Guatemala, 1ª edición, Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos, Guatemala, 1996. pág. 67-70, 131 y 132.
2. DOMÍNGUEZ, X.A., Métodos de Investigación Fitoquímica, 1ª edición, Editorial Limusa, México D.F., 1973. pág. 39,87 y 88.
3. FERNÁNDEZ, Idelfonso. Biología y Control de Aedes aegypti, Manual de operaciones, 1ª edición, Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León , 1999. págs. 13-23 y 56-61.
4. GENNARO ALFONSO, R. “Farmacia Práctica de Rémington”, 19ª edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 1998. págs. 1839-1840
5. GUPTA, MAHABIR P. “270 Plantas medicinales Iberoamericanas” 1ª edición, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo, CYTED, Santa fe de Bogota D. C. Colombia, 1995. págs. 320 y 321.
6. HARPER, S. H.; POTTER, C. and GUILLHAM, E. M. “Annona Species as insecticides” Chemical Abstracts, 1948. pág. 1700, Vol.42.
7. HOUSE, P. R.; TORRES, C.; LAGOS-WHITES, T.; OCHOA, L.;RIVAS, M. ; “ Plantas Medicinales comunes de Honduras”, 1ª edición, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, UNAH, Laboratorios de Histología Vegetal y Etnobotánica, Tegucigalpa, Honduras 1995. Págs. 313, 411 y 495.

8. MARTÍNEZ TORRES, ERIC, Dr. “ Dengue y Dengue Hemorrágico.” 1ª edición, Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes, 1998. Págs.
9. JARAMILLO, T; A.C.G. Dengue y Dengue Hemorrágico en Colombia desde la colonia hasta 1995. 9ª edición, Tribuna Médica, 1996, Colombia, Págs.. 3-6.
10. JORDAN, M. N.; SUAREZ, M. F.; ARCHILA, L. F. and GUZMÁN, J.; “ The Distribution of *Aedes aegypti* at High Elevation in Colombia.” 1983. Págs. 3-14, 18, 19, 21 y 23.
11. KAGAN, J., BENY, J.P., CHANG, G., DHAWAN, S.N. JAWORSKI, J.A., KAGAN, E.D., KASNER, P.D., MURPHY, M. And ROGERS, J.A.(1983) The Phototoxicity of some 1,3-butadienes and related thiophenes against larve of the mosquito *Aedes aegypti* and of the fruit fly *Drosophylas melanogaster* insecta. *SCI Applic.* Págs. 4, 337-381.
12. PLANTER, Obtención y Aprovechamiento de extractos vegetales de la flora Salvadoreña. 1ª edición El Salvador. Editorial Universitario, UES-OPS, 1989.
13. STANDLEY, Paul C.; “ Flora de Guatemala.” 1ª edición. Guatemala 1978. Págs. 80 y 81
14. TREASE, GEORGE EDWARD; EVANS, WILLIAM C. ; *Farmacognosia.* 1ª edición, Editorial Continental, S. A. de C. V. , México 1971. Págs. 173-176
15. TYLER, BRADV, ROBERTS, James E. *Farmacognosia*, 2ª edición, Librería el Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1979. Págs. 89-94.

16. ZARROUG, I.M.A., NUGUD., A.D., BASHNIR, A.K, and MAGEED, A.A. (1988) Evaluation of sudanese plant extracts as mosquito larvicides. *Int. J. crude Res.* 26, 77-80.

### **TRABAJOS DE GRADUACION**

17. CARRANZA HURTADO, J. A., PÉREZ CÁRCAMO, C. V., REYES MADRILES, M.A., “Determinación de la actividad larvicida contra de los extractos de veintiséis especies vegetales contra el mosquito *Aedes aegypti*” El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2001.
18. CARREÑO, L. “Contribución al estudio químico cualitativo de 50 especies de la flora salvadoreña”. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 1971.
19. GALLEGOS GONZÁLEZ, C.I., MELÉNDEZ LÓPEZ, D.I. “Determinación de la Bioactividad de 26 especies de la flora salvadoreña mediante el bioensayo interacción con ADN por cromatografía líquida de alta resolución”. El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2000.
20. LAINEZ, ANA JULIA. “ Investigación de Sapogeninas Esteroidales en *Sansevieria quineesis* ( Espada del diablo ).” El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 1970. Pág. 6
21. RIVAS ORELLANA, S. C., TURCIOS VILLATOR, I. N. “Determinación de la actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti* de los extractos de

veinticinco especies vegetales utilizadas por la población materno infantil” El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2001.

22. SANCHES ESPINAL, Nelly del Carmen. “Estudio etnobotánico y Farmacognóstico de quince plantas medicinales de El Salvador (zona oriental)” El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 1980.

### **PUBLICACIONES**

23. CENTRO LATINOAMERICANO PARA ESTUDIOS Y PROMOCIÓN DE LA SALUD, “ Manual de control del dengue.” 1995. Págs.
24. HOUSE PAÚL, LAGOS SONIA, TORRES CORINA, “ Manual popular de 50 plantas medicinales en Honduras. ” 1ª edición, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, 1989. Págs. 31 y 32.
25. LABORATORIOS BAYER, “ Revista de Salud Pública, Tema Principal Dengue.” 1998. Págs. 12, 22, 27, y 28
26. LANUQUE, María Cecilia, “ El Mercurio de la Salud.” Julio 1998, N° 21.
27. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL (MSPAS)  
Dirección de Medicina Preventiva, Unidad de Epidemiología, Reporte Epidemiológico Semanal. El Salvador, enero-diciembre San Salvador. Enero 2001.  
Dirección General de Salud Pública.
28. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL (MSPAS),  
“ Manual Técnico para la Prevención y Control del dengue en El Salvador.” 1993.  
Págs. 14-18 y 27-41.



29. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL, PROGRAMA NACIONAL DE VECTORES, “ Manual de Vigilancia y Control Entomológico de *Aedes aegypti* vector del dengue en Guatemala.” Septiembre 2001. Págs. 6-12
30. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Métodos de control del *Aedes aegypti*. Presentación en El Salvador 2000. Págs. 5, 6, 10, 19, y 20.
31. PANKIA, “ Boletín Informativo IBLL.” Abril-Junio 1995, N° 2.
32. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS, “ Recopilación de usos medicinales de diferentes especies.” Agosto 1990. Pág. 11

#### **PAGINAS WEB**

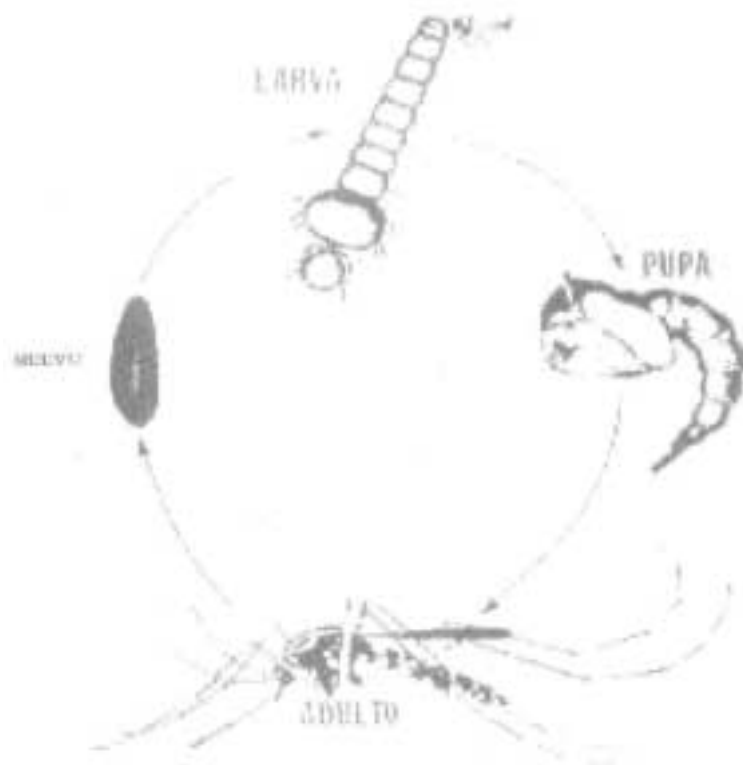
33. <http://gardens.co.nz/features/yuccas.htm>
34. [http://members.fortunecity.es/natura2001/plmd/albahaca\\_clavo.htm](http://members.fortunecity.es/natura2001/plmd/albahaca_clavo.htm)
35. <http://membres.tripod.fr/agricola/frutales/annona.html>
36. [http://www.echonet.org/eln&herbs/eln\\_catalog/fruittreesF-L.htm#illama](http://www.echonet.org/eln&herbs/eln_catalog/fruittreesF-L.htm#illama)
37. [http://www.exponatural.com/la\\_belleza\\_vegetal.shtml](http://www.exponatural.com/la_belleza_vegetal.shtml)
38. <http://www.geocities.com/regionamazonica/paginas/detalles/plantas17.html>
39. <http://www.netsalud.sa/cr/ ms estadist/enferme/deng 01.htm>
40. [www.hort.purdue.edu/newcrop/nexus/annona\\_diversifolia\\_nex.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/nexus/annona_diversifolia_nex.html)
41. [www.jornada.unam.mx/2001/jul01/010709/cien-galeria.html](http://www.jornada.unam.mx/2001/jul01/010709/cien-galeria.html)
42. [www.mspas.gob.s.v.](http://www.mspas.gob.s.v.)

43. [www2.ops.org.s.v](http://www2.ops.org.s.v).

44. [www.semillas silvestres.com](http://www.semillas-silvestres.com)

# **ANEXOS**

ANEXO N° 1

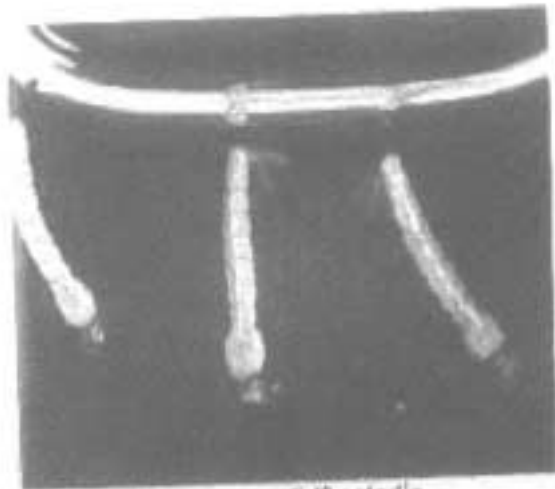


CICLO DE VIDA DEL AEDES AEGYPTI

## ANEXO N° 2



Huevo individual de *Aedes aegypti*



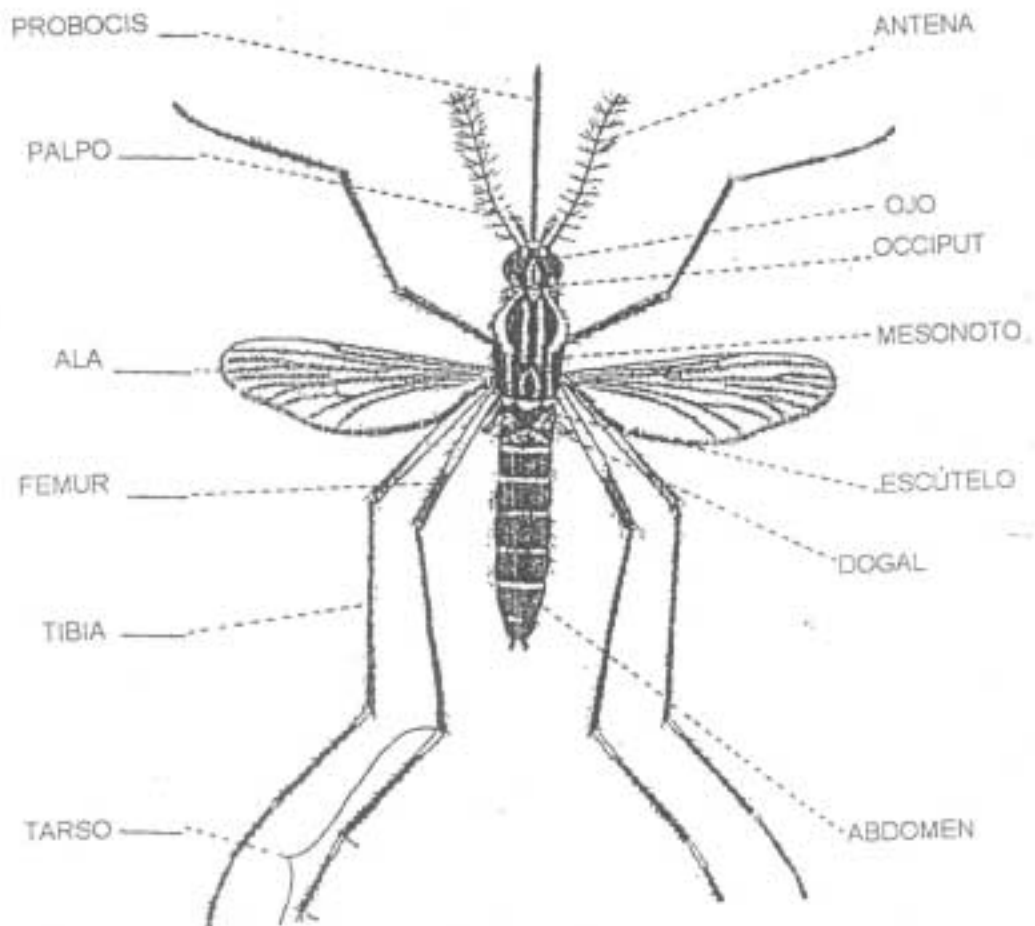
Larvas de *Aedes aegypti* 4º estadio

## ANEXO N° 3

### Huevos de *Aedes aegypti*

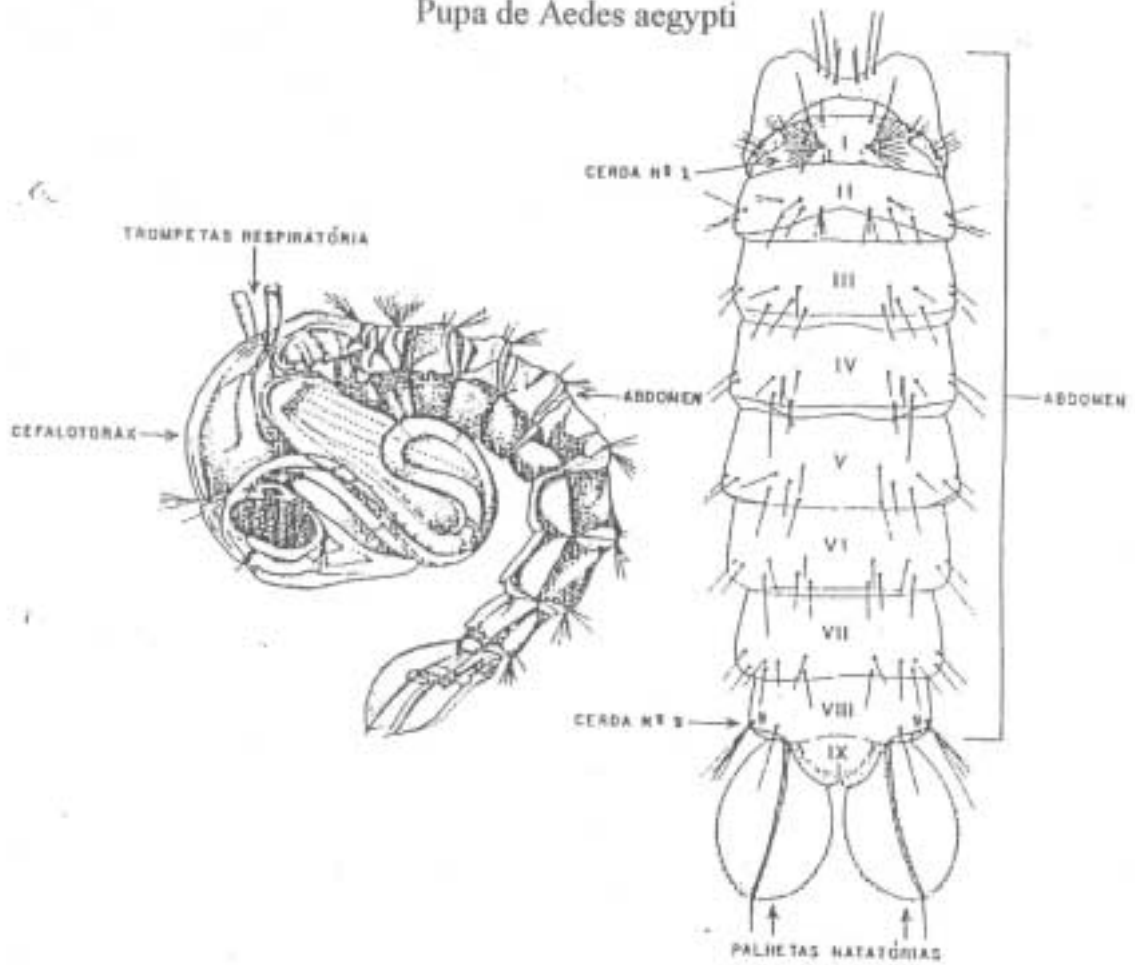


**Aedes aegypti en su estado adulto.**



## ANEXO Nº 4

### Pupa de *Aedes aegypti*





## ANEXO N° 5

### Como eliminar los criaderos de zancudos

- Pilas: Mantener un desagüe continuo y lavar con mascón las paredes y bordes cada cinco días, o depositarle la bolsa matalarvas que dura 60 días.
- Huecos de los árboles: Rellenar con cemento o arena.
- Matas o floreros con agua: Cambiar el agua y lavar las raíces cada 5 días; o rellenar con arena húmeda.
- Canaletas: Limpiar y mantener en buen estado.
- Barriles: Cada cinco días lavarlos con mascón antes de cambiar el agua y mantenerlos tapados. Si no se están utilizando, voltearlos para que no colecten agua.
- Latas, estopas de coco y todos los recipientes descartables: Recoger y depositar en el tren de aseo o enterrar.
- Lanchas: Mantenerlas tapadas, lavarlas cada cinco días y mantenerlas sin agua.
- Blocks: Colocarlos en forma que no retengan agua o rellenar con arena y cemento.
- Ollas, cántaros: Mantenerlas tapadas o cambiar el agua y lavarlas cada cinco días.

- Juguetes: Guardar bajo techo los útiles, los inservibles eliminarlos en la basura.
- Recipientes de comida para animales: Lavarlos y cambiarles el agua cada cinco días.
- Llantas: Destruir, llenar con tierra, aplicar aceite quemado o guardar bajo techo y no colocarlas sobre el techo, para que no retengan agua.
- Botellas vacías: Volcar, ponerlas bajo techo o botarlas a la basura.
- Huecos en los tapias: Llenar con cemento o arena los bloques y tubos expuestos.
- Lotes baldíos: Chapear y mantenerlos limpios.
- Floreros en los cementerios: Hacer agujeros en el fondo o rellenar con tierra o arena, y los inservibles botarlos a la basura.

## ANEXO N° 6

### Estadísticas sobre el aumento de casos de dengue

#### Peligro por dengue

De enero al 18 de mayo

■ El incremento del índice larvario y el aumento de casos de dengue clásico son algunos de los factores que están poniendo en riesgo a la población de contraer la enfermedad.



Fuente: Unidad Nacional de Epidemiología

# No hay abate para combatir zancudo

La cantidad de abate que se utilizaba para eliminar las larvas de zancudos en un año, se terminó en el 2000 en sólo cuatro meses. La intensa campaña en contra del dengue y la austeridad han agotado el insecticida



## ¡Cuidado el Día de los Difuntos!

La encargada de Salud Ambiental, Elizabeth Granados, solicitó a la población que acostumbra llevar flores a los cementerios que este 2 de noviembre no lleve consigo un posible criadero de zancudos.

◆ Los cubos o floreros se pueden convertir en criaderos del zancudo *aedes aegypti*.

◆ Aunque los cubos se llenen con arena, es igualmente riesgoso, ya que con el tiempo la arena se lava y el recipiente se llena de agua, lo que lo convierte en criadero de zancudos.

Teresa Cubías  
*El Diario de Hoy*

La campaña en contra del zancudo *aedes aegypti*, transmisor de la mortal enfermedad del dengue hemorrágico, ha cambiado repentinamente debido a que las Unidades de Salud agotaron su existencia de abate, la sustancia empleada para matar las larvas del zancudo.

La encargada de Salud Ambiental del Ministerio de Salud, Elizabeth Granados, explicó que la falta del insecticida se debe a que el año pasado utilizaron más de 40 mil kilos de abate en cuatro meses, cantidad que, por lo general, utilizaban para un año.

Granados reconoció que la austeridad económica no les permite comprar las cantidades suficientes de abate que se necesitarían para repartir a la población.

Asimismo, aseguró que la lucha en contra del zancudo no depende sólo del uso de abate, sino de otras medidas alternativas que la población debe aplicar en sus casas para matar a las larvas de zancudos.

Granados declaró que uno de los mayores problemas que detectaron fue que la población no em-

pleba adecuadamente el insecticida.

La especialista aseguró que han comprado una dotación de abate, pero debido a trámites burocráticos aún no se ha recibido.

## Lucha de todos

La encargada de Salud Ambiental advirtió que si la población no colabora en eliminar la larva del zancudo se puede repetir la triste historia de muerte de niños, como sucedió en el 2000, cuando murieron más de 30 menores por el dengue hemorrágico.

En los últimos días, Salud reportó un incremento de casos de dengue clásico y hemorrágico en los departamentos de Santa Ana y La Libertad.

Añadió que la transición entre la época lluviosa y el verano, suele multiplicar la cantidad de zancudos en el país.

Granados informó que están trabajando en coordinación con el Ministerio de Agricultura para buscar formas biológicas para matar las larvas, como es el uso de "chímolos" que devoran las larvas, entre otras.

Asimismo, advirtió que los depósitos de agua estancada en llantas viejas, latas y otros recipientes albergan a las larvas.

## ANEXO N° 8

Huevecillos de *Aedes aegypti* a punto de eclosionar



## ANEXO N° 9

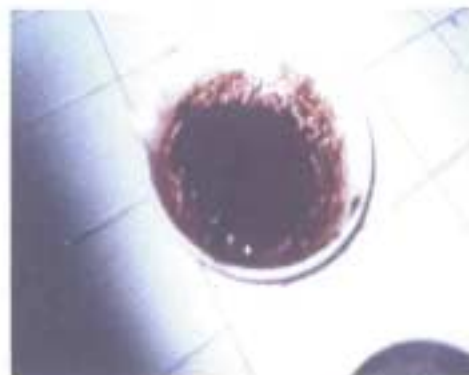
Semillas de Anona en maceración



Concentrando el extracto etanólico en un rotavapor



Extracto de semilla de anona obtenido



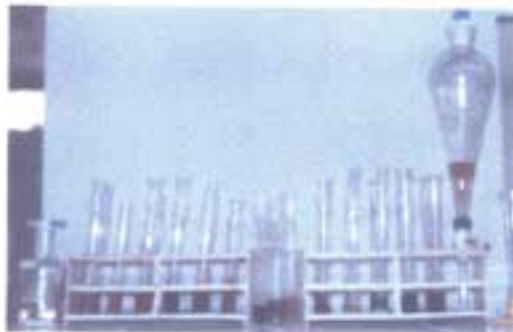


## ANEXO N° 10

Soluciones stock de cada fracción.



Pruebas fitoquímicas de las fracciones activas



## ANEXO N° 11

Tamización de la arena de río



Preparado larvicida



Ensayos para determinar la eficacia del preparado larvicida





**ANEXO No 12**

**Especies Vegetales**

**Annona diversifolia**



**Yucca elephantipes**



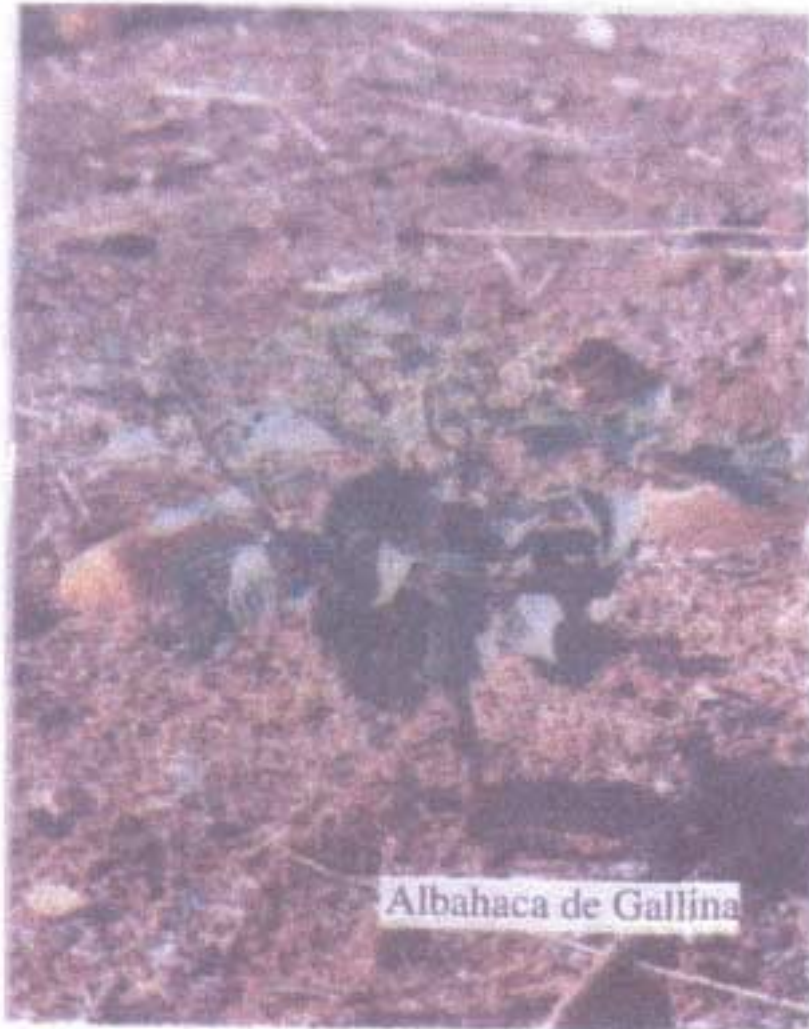
**Rauwolfia tetraphylla**



**Sansevieria quineensis**



**Ocimum micranthum**



### ANEXO N° 13

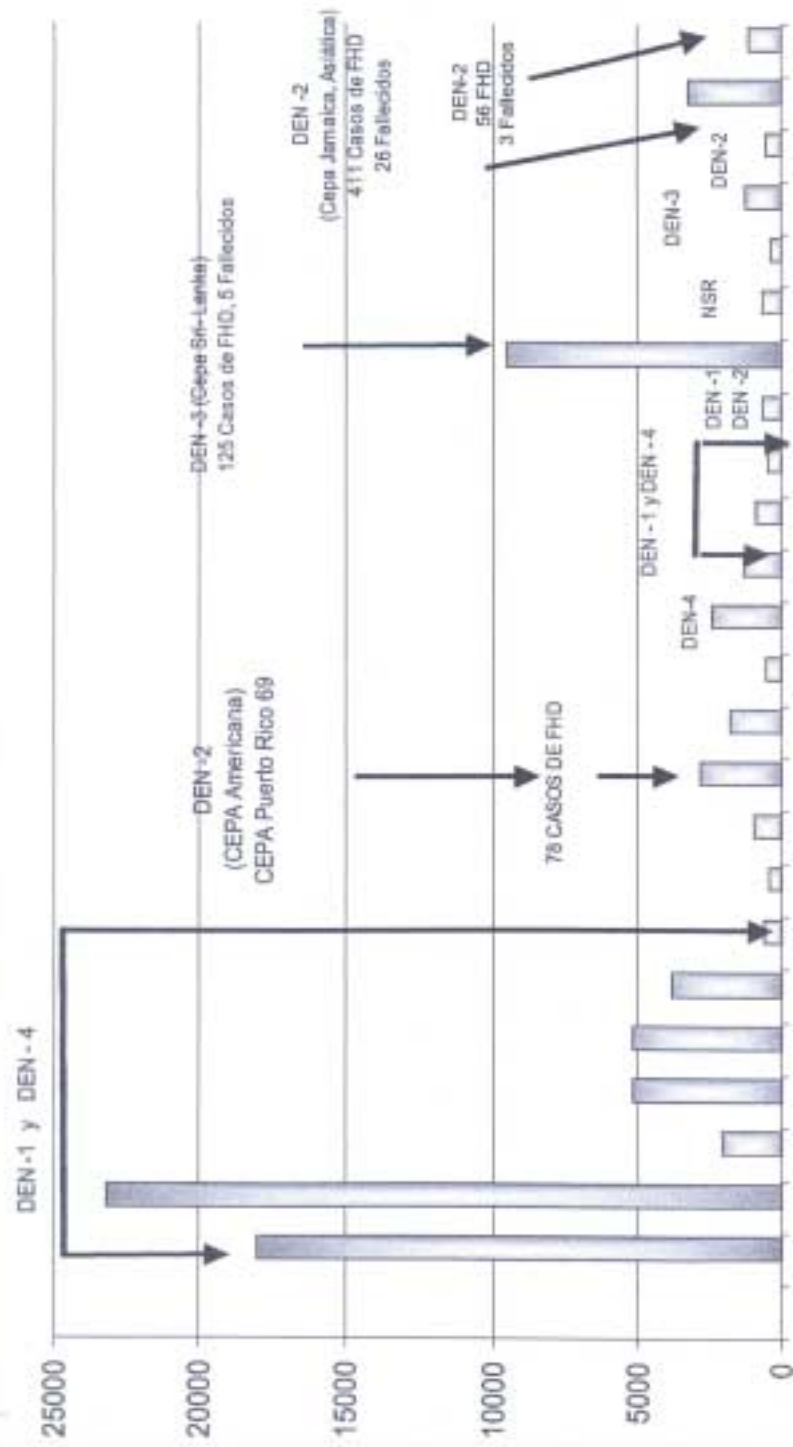
Diagrama del microplato utilizado en el bioensayo larvicida

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
<b>A</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>B</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>C</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>D</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>E</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>F</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>G</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<b>H</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	500 0.500	250 0.250	125 0.125	62.5 0.0625	31.25 0.03125	15.625 0.015625	7.8125 0.0078125						Blanco DMSO y agua

DILUCIONES GEOMETRICAS



# Casos de dengue clásico, desde 1965 hasta 2001



AÑOS	1965	1976	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
IDC	0	18004	23207	2060	5186	5166	3834	560	425	516	2836	1786	515	2381	3272	864	448	668	9030	624	366	1206	556	3248	1120

1965 se declaró internacionalmente a El Salvador libre de Aedes aegypti. Se mantuvo un silencio epidemiológico de 13 años



## ANEXO N° 15

Casos de dengue confirmados por departamento del  
30 de diciembre de 2001 al 29 de junio de 2002.

Departamento	Casos 2002	Sem.26(02)	Tasa *
San Salvador	1046	77	49.98
Santa Ana	267	30	46.66
Cabañas	43	5	27.30
Cuscatlan	48	2	23.46
La Libertad	136	13	18.81
Chalatenango	32	1	16.06
Ahuachapan	51	2	15.30
San Vicente	17	2	10.01
La Union	23	0	8.30
Usulután	27	2	7.36
La Paz	20	1	6.87
San Miguel	31	4	6.21
Sonsonate	29	1	6.15
Morazan	3	0	1.75
total	1773	140	27.16





## ANEXO N° 17

Insecticida utilizado en El Salvador en forma de niebla fría.

**Solfac**<sup>UBV</sup>  
UBV 1.5

**Ultra bajo volumen**

**Contra mosquitos, moscas, cucarachas y otros**

#### Composición Química:

Ester O -cloro-3'-terciál-4'-fluro-bencílico del ácido 2,2-dimetil-3-diclorovinil- -cistrane-ciclopropanocarboxílico; Cyano (4-fluro-3-phenoxyphenyl)-methyl-3- (2,2-dicloroethenyl)-(2,2-phenoxyphenyl)-methyl-3-(2,2-dicloroethenyl)-2,2- dimethyl-cyclopropanocarboxylate (C.A.).....	1.5 % p/p
Solventes.....	98.5 % p/p
Total.....	100.00 % p/p

Solvente : Xileno

#### ALTO, LEA ESTA ETIQUETA ANTES DE USAR EL PRODUCTO

Los trabajos con este preparado deben encargárselos a personal capacitado en su uso de manejo.

#### MEDIDAS DE PRECAUCIÓN:

No respirar la neblina de aspersión. No ingerir el producto o su mezcla. Lavar con suficiente agua y jabón las partes descubiertas del cuerpo, los equipos de fumigación y otros recipientes que hayan estado en contacto con el producto. No aplique sobre alimentos, viveros, superficies que entren en contacto con alimentos ni agua potable.

Este producto es inflamable y no debe almacenarse cerca de fuentes de calor ni condición de llama.

**GUÁRDASE BAJO LLAVE EN UN SITIO FRESCO Y SECO, FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS, ANIMALES DOMÉSTICOS Y DE PERSONAS NO FAMILIARIZADAS CON SU USO. SEPARADO DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS O FORRAJEROS. NO APLICAR DIRECTAMENTE SOBRE UTENSILIOS DE COCINA. DESTRUIR EL ENVASE DESPUÉS DE SU USO.**

#### SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN:

Se puede presentar salivación, náusea, temblor, respiración frígida, hipersensibilidad al tacto y al sonido, sensación de hormigueo o quemadura en cara y brazos. Puede irritar ojos, nariz y garganta.

#### PRIMEROS AUXILIOS:

**Inhalación:** Alejar al paciente del área contaminada llevándolo a un lugar fresco y aireado. Manténgalo en reposo.

**Ingestión:** No provocar el vómito por riesgo a aspiración pulmonar. Acuda al médico y muéstrelle esta etiqueta.

**Contacto con los ojos:** Lavar por varios minutos con agua y jabón. **Contacto con la piel:** Lavar por varios minutos con agua y jabón.

**Tratamiento Médico y Antídoto:** Se desconoce el antídoto específico. En caso de ingestión: Lavado estomacal, dar purgantes salinos. Debido a que la piel contaminada tiene un mayor poder de absorción no se deben usar solventes orgánicos para limpiarla. Seguir tratamiento sintomático.

**PROTECCIÓN AL AMBIENTE:** Tóxico a peces y abejas. No contaminar fuentes de agua con residuos ni lavado de equipos.

**INSTRUCCIONES DE USO:** Solfac UBV es un insecticida de gran poder inicial, está formulado especialmente para el control de plagas en almacenes, bodegas, fábricas,

hoteles, transportes y todo lugar donde se presenten insectos dañinos al hombre, alimentos, mercadería, etc.

**Solfac UBV** deberá ser empleado con equipo UBV o termonebulizadores (Swinglog). **Solfac UBV** se recomienda para el control, entre otras plagas de:

Caranaras: Pulgones sp Bicho sp Bicho sp	Mosquitos, moscas Anopheles sp Culex sp Formica caracasana Solenostoma caracasana
Homípteros: Lepidos: Lepidos saccharis	Formicas: Pulex sp Tenebrionida Tenebrionida
Ordo: Dermápteros: Achele (Gribos) sp	Pulgos: Pulex irritans
Forficulípteros: Forficulípteros sp	Pulgos: Pediculus sp Dermestes Ceras sp
Dermaptera: Dermaptera sp	Triplaxia irritans
Blatella: Blatella sp	Acaros: Mesos especies
Dermaptera: Dermaptera sp	

#### DOSEIFICACIÓN:

**Solfac UBV** se emplea con mezclas de Diesel, Kerosen, aceite mineral o aceite agrícola en la proporción de 4.5 partes de solvente por 1 de **Solfac UBV**. La mezcla se prepara en un recipiente adecuado, se agita y se vierte en el depósito del equipo de aplicación. La neblina se dirige desde 1 a 2 metros de distancia de los lugares infestados. Para tratar el ambiente se aplica la neblina hasta que cubra completamente el espacio disponible. La neblina deberá permanecer el máximo tiempo posible en el ambiente tratado y se podrá ingresar a los locales, sólo cuando ésta haya desaparecido completamente.

<b>País:</b> Guatemala: El Salvador: Honduras: Nicaragua: Costa Rica: Paraguay: Rep. Dom.: Cuba:	<b>No. Registro:</b> PH-306-2000 PH-436 534-269-61 017-501 5-3-97 MS007-025-PB1 51400 2042 146-07	<b>Regente:</b> Dr. Eduardo Santos Dr. Juan J. Franco T. Dr. Marco Tula Figueroa Lic. Juan Gómez Dr. Gerardo Vello C. Dr. Luis Reyes D.
--	---	---

## ANEXO N° 18

### PROTOCOLO

Bioensayo larvicida usando *Aedes aegypti*, protocolo utilizado en CIFLORPAN

1. Los huevos de *Aedes aegypti* son obtenidos de la Sección de Insectario y Bioterio del Ministerio de Salud Pública, en platos petri.
2. Los huevos son almacenados a una temperatura de entre 25-28 °C.
3. Para cada serie de pruebas una pieza de papel filtro es cortada e incubada por 24 horas con agua de grifo reposada por 72 horas en un envase tapado con un pedazo de gaza.
4. Se pesa entre 0.7 a 1.5 mg de muestras (Extractos o compuestos puros). Para asegurar una rápida disolución de las muestras, se utiliza un sonificador.
5. Las muestras lipofílicas son disueltas en 50 µl de DMSO y llevado a una concentración de 1000 ppm (µl/ml) con agua de grifo reposada. Las muestras polares son disueltas en agua destilada y llevadas con agua de grifo reposada hasta una concentración de 1000 ppm (µl/ml).
6. Los compuestos y extractos son ensayados en un screening preliminar de 500 ppm (µl/ml) y solamente aquellos con 100% de mortalidad a ésta concentración son ensayados en otras diluciones inferiores geométricas
7. El microplato es llenado desde la línea B hasta la G con 100 µlL de agua de grifo reposada. A la fila A y B se les añade 100 µl de las muestras

(paso 5). Se seleccionan tres columnas para cada muestra. A partir de la segunda, se mezcla varias veces por succiones repetidas y se extraen alícuotas de 100  $\mu$ l y son transferidas a la línea C, se continua el mismo procedimiento anterior hasta completar la línea G. La línea H corresponde al blanco que contiene 100  $\mu$ l de una solución formada por 50  $\mu$ l de DMSO y 950  $\mu$ l de agua de grifo reposada.

8. Luego, 100  $\mu$ l de una suspensión conteniendo entre 10 a 15 larvas de *Aedes aegypti* son añadidos en cada micropozo.
9. los microplatos son incubados en un lugar obscuro por 24 horas a una temperatura de 25-28 °C.
10. La LC<sub>100</sub> se determina a los 30 minutos y a las 24 horas. La evaluación es hecha observando cada pozo con un microscopio binocular 10x y una fuente de luz. Las larvas vivas pueden ser vistas moviéndose, mientras que las muertas caen al fondo o pueden ser vistas en la interfase aire-agua.
11. Para cada muestra el mínimo de concentración en que todas están muertas es considerada como la LC<sub>100</sub>
12. Las larvas vivas pueden ser matadas añadiéndole 100  $\mu$ l de metanol o etanol en cada micropozo antes de verterlos al sumidero.