

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIÓLOGICO AGROPECUARIAS



EXTRACTOS VEGETALES CON POTENCIAL EN EL CONTROL
DEL VECTOR *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)



TESIS

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

PRESENTA

JEREMI ALEJANDRO MENDOZA MANJARREZ

XALISCO NAYARIT, AGOSTO DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

C. DR. JUAN DIEGO GARCIA PAREDES.
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP.
PRESENTE.

Xalisco Nayarit, 7 agosto de 2017

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la Tesis titulada: Extractos vegetales con potencial en el control del vector *Aedes aegypti* L., que presenta el C. **Jeremi Alejandro Mendoza Manjarrez**, para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agrícolas, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para su titulación.

Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Director: Dr. Agustín Robles Bermúdez.

Asesor: Dr. Jhonathan Cambero Campos.

Asesor: Dra. Martha Elva Ibarra Estrada

Oficio de impresión

DEDICATORIAS

A Dios.

Por darme la fortaleza para alcanzar una meta más en la vida y por guiarme por el camino de la felicidad.

A mi Madre.

María Consuelo Manjarrez García. Por darme la vida y formarme como un ciudadano con valores.

A mis Hermanos.

Hugo Enrique y Hernán Francisco. Por estar siempre apoyándome, deseo compartirles este logro.

A mi Esposa.

Alicia Viera Villegas. Por su amor, paciencia y comprensión.

A mis Hijos.

Jerali y Alejandro. Motivo de mi existencia, esperando les sirva de ejemplo en el futuro.

A mis Suegros.

Alicia Villegas Serrano y Santana Viera Hernández. Por todo el apoyo y cariño que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit, por darme la oportunidad y formarme como profesional, por lo que le estaré siempre agradecido.

Al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACyT). Por otorgar el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mi Comité Tutorial:

- Dr. Agustín Robles Bermúdez.
- Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos.
- Dra. Martha Elva Ibarra Estrada.

Responsables de este logro, por su apoyo, consejos y recomendaciones para que esta investigación culminará satisfactoriamente.

A mis compañeros y amigos de la Unidad Académica de Agricultura.

Al personal de la Secretaria de Salud de Nayarit, por proporcionar el material biológico.

A mis compañeros del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

A los maestros que a lo largo de mi carrera contribuyeron en mi formación profesional con su esfuerzo, dedicación y conocimientos.

Gracias por compartir su conocimiento y tener la paciencia para guiarme en este trabajo, sobre todo por el gran apoyo que me regalaron.....

¡Muchas Gracias!

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 General	2
1.1.2 Específico	2
1.2 Hipótesis	2
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Importancia del dengue, zika y chicungunya	3
2.2 Etapas de desarrollo de <i>Aedes aegypti</i>	3
2.2.1 Huevo	4
2.2.2 Larva	4
2.2.3 Pupa	4
2.2.4 Adulto	5
2.3 Control de <i>A. aegypti</i> en México	6
2.4 Plantas con actividad insecticida	6
2.4.1 Neem	7
2.4.2 Guanábana	8
2.4.3 Venadillo	8
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Ubicación del experimento	9
3.2 Material biológico	9
3.3 Relación de tratamientos	10
3.4 Diseño experimental y tamaño de la unidad experimental	10
3.5 Extracción de los activos de las plantas	10
3.5.1 Guanábana	10
3.5.1.1 Proceso de secado	10
3.5.1.2 Molienda	11

	Página
3.5.2 Venadillo	11
3.5.3 Neem	11
3.6 Bioensayos	11
3.7 Variables evaluadas	12
3.7.1 Mortalidad	12
3.7.2 CL ₅₀	12
3.8 Análisis estadístico	13
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 Resultados	14
4.1.1 Análisis Probit	14
4.1.2 Análisis de varianza	15
4.1.3 Prueba de medias (Tukey _{0.05}) para la variable mortalidad	16
4.1.3.1 Extracto de guanábana	16
4.1.3.2 Extracto de neem	16
4.1.3.3 Extracto de venadillo	16
4.2 Discusión	20
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	23
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	24

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

No.		Página
	Figuras	
1.	Ciclo de vida del mosquito <i>A. aegypti</i>	5
2.	Ovitrapa	9
	Cuadros	
1.	Tratamientos utilizados en el en el control del vector <i>Aedes aegypti</i> .	10
2.	Condiciones de laboratorio para bioensayos de <i>A. aegypti</i> .	13
3.	Concentraciones letales de extractos aplicados a larvas de <i>A. aegypti</i> .	14
4.	Relación tiempo-mortalidad.	15
5.	Análisis de varianza para variable mortalidad utilizando extractos vegetales.	15
6.	Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de guanábana.	17
7.	Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de neem.	18
8.	Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de venadillo.	19

RESUMEN

EXTRACTOS VEGETALES CON POTENCIAL EN EL CONTROL DEL VECTOR *Aedes aegypti* L.

Jeremi Alejandro Mendoza Manjarrez. Maestro en Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nayarit. 2017

El presente tuvo el objetivo de evaluar la toxicidad del extracto de neem, guanábana y venadillo contra el vector *A. aegypti* en sus diferentes estadios larvales. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología Agrícola de la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit. Se utilizó el vector *A. aegypti*, el cual se recolectó en el estado de Nayarit durante el año 2016. Para la recolección de los huevos del mosquito se utilizaron ovitrampas. Por cada especie vegetal se utilizaron cinco concentraciones de extractos: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 μL^{-1} de neem; 500, 1000, 1250, 1500, 2000 μL^{-1} de venadillo y 500, 1182, 1500, 2000, 2500 μL^{-1} de guanábana. Se realizó la extracción de los activos de las plantas por medio de métodos de extracción simples. Se cuantificó la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 horas. Posteriormente, se estableció la concentración letal media (CL_{50} - 96 horas) y sus respectivos intervalos de confianza a un 95 % de acuerdo al método PROBIT. La guanábana provocó mayor mortalidad de 69.1 % en un periodo de 24 a 96 horas. El extracto de neem indujo un 53.9 % de mortalidad en las primeras 24 horas y el extracto de venadillo manifestó actividad larvicida en in periodo de 24 a 96 horas de 58.7.

ABSTRACT

Extracts plant with potential in the vector control *Aedes aegypti* L.
Jeremi Alejandro Mendoza Manjarrez. Master in biological sciences
Universidad Autónoma de Nayarit. 2017

The research was conducted in the laboratory of Parasitology agricultural of the unit academic of Agriculture of the University Autónoma of Nayarit, with the objectives of the toxicity of neem extract, guanábana and venadillo in vector *a. aegypti* in its different larval stages; as well as mean lethal concentration (CL₅₀- 96 H) of *a. aegypti* exposed to the extracts and know what is the best summary of the three applied in the larval control of *a. aegypti*. We used the vector *a. aegypti*, which was collected in the State of Nayarit in the year 2016. Ovitrap were used for the collection of the eggs. Is used five concentrations of three plant extracts: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 μL^{-1} of neem; 500, 1000, 1250, 1500, 2000 μL^{-1} of venadillo and 1182, 500, 1500, 2000, 2500 μL^{-1} of Cherimoya. Is made the extraccion of plant assets. Mortality was measured at 24, 48, 72 and 96 hours. Later was established the median lethal concentration (CL₅₀ - 96 hours) and their respective 95% confidence intervals according to the method PROBIT. The results indicated: 1. all tested extracts showed toxicity larvicide against *a. aegypti*, however, some behave better than others with the passage of time, since all induce some mortality on larvae, but its degradation in one is slower, causing the larvicidal effect extends or is shortened. 2. Extract best results arrojo was custard, since it resulted in increased mortality in a 24 hour period and followed by inducing mortality up to 96 hours. 3 of neem and venadillo extracts were larvicidal activity only in 24 hours and 4. The plant extracts, are a tool for very important pest control, which is to begin to develop more comprehensive and professional, in all sectors, since the effect caused by third parties are minimal, compared to the current chemical compounds.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El dengue, zika y chicungunya son enfermedades virales transmitidas por mosquitos. Su importancia radica en los efectos económicos y sociales que ocasionan. En 2014 se destinaron 3,200 millones de pesos en servicios médicos en atención a la población (OMS, 2015). En México se reportaron 14,443, 6094 y 621 casos de dengue, zika y chicungunya, respectivamente. En 2016 para Nayarit se registraron 277, 29 y 46 casos de dengue, zika y chikungunya, para cada enfermedad (SINAVE/DGE, 2016). Actualmente, no existe vacuna efectiva para estas enfermedades, por lo que la principal medida de prevención es el control del vector transmisor en su fase larvaria o adulta.

Desde 1960 las campañas para controlar las poblaciones de *Aedes* se basan en la aplicación de insecticidas sintéticos, ingredientes activos como el temefos, diclorvos, piretrinas entre otros. Sin embargo, la aplicación de moléculas químicas, tienen efectos adversos en el ambiente, afectan a insectos no blanco y controladores naturales, son tóxicos a mamíferos, además generan el desarrollo de resistencia del vector a insecticidas (Reither y Nhatan, 2003).

En Nayarit, al igual que todo México, el insecticida que se utilizó de 1957 a 1999 fue el DDT (dicloro difenil tricloroetano). Durante este periodo se utilizaron 69,545.4 toneladas (Gallardo Díaz, *et al.*, 2000), cantidad considerada excesiva por ser un producto altamente persistente y acumulativo en las cadenas tróficas.

Por esta razón, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) replantea, el uso de los recursos disponibles en cada territorio, para aprovechar su potencial en el control de vectores (OPS, 2001). En respuesta a esta problemática es necesaria la búsqueda de soluciones sustentables con reducido riesgo a la salud humana, bajo costo económico y ambiental como el uso de extractos vegetales. El control alternativo, es uno de los métodos de control más antiguos de plagas insectiles, se reportan metabolitos secundarios con efecto sobre ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos, entre éstos los mosquitos (Grainge y Ahmed, 1988) y (Padin, *et al.*, 2002).

Existen diversos reportes de especies vegetales que tienen efecto insecticida y larvicida contra vectores de los géneros *Culex*, *Anopheles*, y de las especies *A. aegypti* y *A. albopictus* (Carvalho, 2003). Una de las plantas reportadas con efectos insecticidas es el neem (*Azadirachta indica*) que posee meliantról, salanin, nimbin y nimbidin entre otros (National Research Council, 1992; Royal Garden Botanic, 2006). La guanábana (*Anona muricata*) presenta metabolitos secundarios como flavonoides (quercetina) y esteroides (β -sitosterol, estigmasterol) (Joshi *et al.*; 1992; Seetharaman, 1986). Las semillas de venadillo (*Swietenia humilis*) contienen, al menos 11 humilinoídes a los cuales se les adjudican las propiedades insecticidas (Jiménez *et al.*, 1998; Karr y Cotas, 1998).

Con base al manejo químico del vector que es sustentado en aplicaciones frecuentes y de diversos grupos químicos, el desarrollo de resistencia del insecto a insecticidas, la contaminación de mantos freáticos, se replantea la necesidad de evaluar estrategias más sustentables al ambiente.

1.1 Objetivos.

1.1.1 General.

Evaluar la actividad larvicida de extractos naturales para el control de *Aedes aegypti*.

1.1.2 Específicos.

Conocer la efectividad biológica del extracto de neem, guanábana y venadillo contra el vector *Aedes aegypti*.

Determinar dosis óptima y estadio larvario para la aplicación de tres extractos vegetales para el manejo de *Aedes aegypti*.

1.2 Hipótesis.

Al menos uno de los extractos vegetales utilizados registrará mortalidad en larvas de *A. aegypti*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del dengue, zika y chicungunya.

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades virales transmitidas por mosquitos son un reto para la salud pública en el mundo. Al mes de octubre del 2015, de 1, 887,521 de casos sospechosos y 459,159 casos confirmados, se registraron 916 muertes atribuidas al dengue. En México, reportan 139,966 casos sospechosos y confirmados 14,935, para una tasa de 121.0 habitantes por cada 100000 y un total de 19 muertes (OMS, 2015).

Más de 2,500 millones de personas; es decir, más de dos quintas partes de la población mundial viven en zonas de riesgo de contraer estas enfermedades. Además, 100 países reportan la presencia en su territorio de las enfermedades mencionadas. Destaca el continente americano como una región de las más afectadas (Guzmán y Kouri, 2002).

El dengue, zika y chicungunya son enfermedades febriles agudas. Generalmente se eleva la temperatura, junto con otras manifestaciones muy características, como vómito, dolor de cabeza, y dolor en músculos y articulaciones. Estas enfermedades son transmitidas por la picadura del mosquito hembra *A. aegypti* la cual ingiere el virus cuando se alimenta de individuos enfermos. Después de 8 a 12 días de incubación *A. aegypti* puede transmitir el virus a otros humanos durante su ingesta de sangre que utiliza para su alimentación de la cual extrae principalmente el aminoácido isoleucina, con el cual madura sus huevos (Watts *et al.*, 1987 y Nelson, 1986).

2.2 Etapas de desarrollo de *A. aegypti*

A. aegypti, es un insecto holometábolo, de metamorfosis completa. El ciclo biológico está compuesto por cuatro etapas que se describen a continuación:

El ciclo de vida del mosquito *A. aegypti* (Figura 1).

2.2.1 Huevo.

Los huevos de *A. aegypti* miden aproximadamente un milímetro de longitud, son depositados uno a uno al nivel del agua los cuales se adhieren a las paredes del recipiente o contenedor del medio. La fecundación ocurre al momento de la postura del huevo, debido a que los espermatozoides en la hembra se almacenan inmediatamente después de ocurrir la cópula en una estructura denominada espermateca. El óvulo al pasar por el oviducto al nivel de esta estructura se fusiona con un espermatozoide e inicia el desarrollo embrionario. El embrión dentro del huevo es capaz de resistir largos períodos de desecación por meses o hasta por más de un año; al volver a tener contacto con el agua la acción bacteriana de la materia orgánica disminuye la tensión de oxígeno y estimula la eclosión en aproximadamente 15 minutos. Esta latencia del huevo, es uno de los principales obstáculos para los programas de control sobre este vector (Nelson, 1986).

2.2.2 Larva.

Los estadios larvales son el período de crecimiento y desarrollo del estado biológico de la larva. Éstas se alimentan prácticamente durante todo el día de cualquier materia orgánica acumulada en las paredes y en el fondo del recipiente. Las larvas utilizan sus sedas bucales, que tienen forma de abanico, para captar alimento. Después del segundo estadio, la cápsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, el tórax y el abdomen crecen considerablemente durante cada fase. La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, disponibilidad de alimento y densidad de larvas en el criadero. Las larvas del cuarto estadio, requieren más tiempo para su desarrollo, aumenta considerablemente su tamaño y peso. En condiciones de baja temperatura o escasez de alimento puede prolongarse por varias semanas. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras para garantizar la fecundación (Nelson, 1986).

2.2.3 Pupa.

Las pupas no se alimentan. Su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a las de otros insectos holometabólos por presentar reacciones inmediatas a estímulos externos tales como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. Cuando están inactivas flotan en la superficie, esta propiedad facilita

la emergencia del adulto. El estadio de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergen alrededor del 88 % de los adultos en cuestión de 48 horas (Méndez *et al.*, 1996).

2.2.4 Adulto.

Nelson (1986), menciona que la función más importante del adulto de *A. aegypti* es la reproducción. Las características principales son la coloración oscura, presentan una marca en forma de lira en el tórax, además tienen manchas plateadas a los lados del tórax y abdomen, y patas con anillos blancos.

Actualmente la única forma de controlar a este vector es mediante la implementación de estrategias de manejo del vector en los diferentes estados biológicos. Específicamente, en las etapas de huevo con agentes de control biológico, larva o pupa mediante campañas de descacharrización, aunado a la eliminación de reservorios del vector, además en etapa adulta con la aplicación de insecticidas químicos (Rose, 2001).

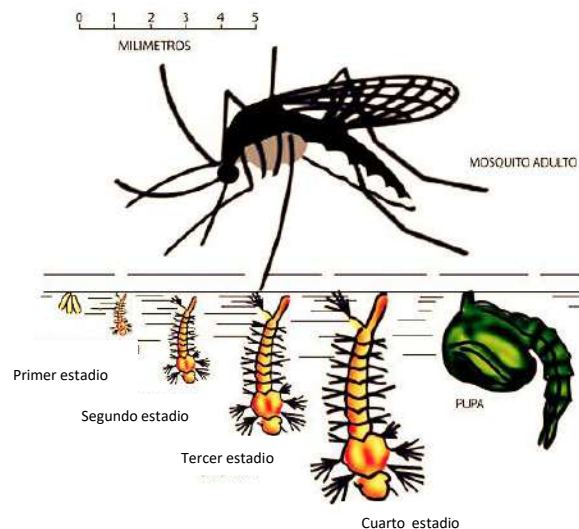


Figura 1. Ciclo de vida del mosquito *A. aegypti*.

2.3 Control de *A. aegypti* en México.

En 1963, México fue declarado libre del vector *A. aegypti*. Esto se logró con la implementación de la campaña sanitaria dirigida a erradicar la fiebre amarilla a través de la Organización Panamericana de la Salud después de la segunda Guerra Mundial utilizándose grandes dosis de DDT. Sin embargo, cuatro años más tarde se volvió a detectar la presencia del vector en el país

En México, el organismo encargado del control de mosquito *A. aegypti* es el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. El tratamiento dirigido a la fase acuática y adulta del mosquito, consiste en aplicar insecticidas organofosforados y piretroides, autorizados por la Secretaría de Salud Pública de México, con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002. Específicamente, para el tratamiento larvario se utiliza el temephos del grupo de los organofosforados y para la fase adulta se aplica la cipermetrina y deltametrina como insecticidas piretroides. En México, como tratamiento previo a las aplicaciones químicas contra larvas de mosquito, se lleva a cabo un control cultural, que consiste en descacharrizar las viviendas o lugares donde existen contenedores de agua y en los cuales puedan desarrollarse larvas (Morrison *et al.*, 2008).

Desde hace más de 40 años, el control químico es el tratamiento utilizado para el manejo del mosquito. Sin embargo (y a pesar de su eficacia), su uso conlleva riesgos a largo plazo, como contaminación, efectos a la salud humana, desequilibrios ecológicos y el desarrollo de resistencia del insecto, aunado a la persistencia del químico en el ambiente y el impacto ecológico negativo que tienen estos compuestos. Por estas razones, la OPS (2001) propuso el llamado control selectivo de vectores, que involucra el uso de recursos disponibles en un determinado territorio y al alcance de la comunidad. El propósito fue adaptar y adecuar medidas para el control de vectores, que permitió el surgimiento de recursos alternativos como los extractos naturales provenientes de plantas, como opciones viables (Weinzierl y Henn, 1992).

2.4 Plantas con actividad insecticida.

Una alternativa que actualmente muestra gran potencial en el manejo de insectos plaga, es el uso de productos naturales o mejor conocidos como bioinsecticidas. Gran variedad de especies vegetales, producen sustancias que al ser aplicadas provocan repelencia, deterrencia y mortalidad en los insectos.

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y el venadillo (*Swietenia humilis* Zucc), ambas especies de la Familia Meliaceae, son especies reconocidas con propiedades insecticidas (Standley, 1920). Las plantas del género *Annona*, como *A. bullata*, *A. densicoma*, *A. glabra*, *A. muricata* y *A. squamosa* también reportan acción insecticida contra larvas de mosquitos. De estas especies, se sustrajeron nueve principios activos pertenecientes a las acetogeninas y alcaloides, los cuales se encuentran principalmente en la corteza y la semilla; aunque también en raíz, fruto y hoja (Santos y Salatino, 2000).

Los disolventes que se utilizan para la extracción de los principios activos de las plantas son agua, etanol, acetona, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo y hexano, lo que denota que varias sustancias activas están relacionadas en esta actividad, desde las muy polares que se extraen con agua hasta las no polares que se extraen con hexano. De la acetona (solvente de polaridad intermedia), se extraen la mayor parte de compuestos activos (Rodríguez y Nieto, 1997).

Los insecticidas de origen vegetal tienen la ventaja de ser más biodegradables que las moléculas químicas sintéticas. Son relativamente fáciles de obtener, bajo costo, ya que los extractos se pueden preparar mediante tratamientos con baja tecnología y ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos de alto costo (McLaughlin *et al*, 1998; Leatemia e Isman, 2004).

2.4.1 Neem.

El neem posee propiedades plaguicidas basadas principalmente en su contenido de azadiractina (AZA). Estas propiedades incluyen actividad insecticida, principalmente antialimentario, repelente y reguladora del crecimiento de los insectos (NRC, 1992).

La azadiractina es un fuerte antialimentario, regulador hormonal del crecimiento, y con efectos reproductivos negativos. El efecto antialimentario varía marcadamente entre las especies, y son los lepidópteros los más sensibles. Asimismo, el efecto fisiológico sobre el crecimiento, muda y reproducción son consistentes entre especies, aunque la cutícula e intestinos pueden proveer barreras a la bioefectividad en algunas especies (Mordue y Blackwell, 1993).

2.4.2 Guanábana.

La familia de las Anonaceae, a la cual pertenece la guanábana, es de las más promisorias para la obtención de bioinsecticidas (Saxena *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 2004). De las semillas se aisló un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estos compuestos policétidos cuentan con una prometedora actividad antitumoral, antiparasitaria e insecticida (Rupprecht *et al.*, 1990). Las acetogeninas exhiben su potencial bioactivo a través de una reducción de los niveles de Trifosfato de Adenosina (ATP) que inhibe el complejo I, que afecta directamente el proceso de transporte de electrones en la mitocondria y causa apoptosis (Alali *et al.*, 1999).

2.4.3 Venadillo.

Es un árbol, originario de las regiones tropicales de América y de amplia distribución en las zonas secas y húmedas de las costas del pacífico, desde el estado de Sinaloa, México hasta la provincia de Guanacaste, en Costa Rica (Standley, 1920). El venadillo contiene en su corteza y semillas limonoides que actúan en diversas especies de insectos de importancia agrícola, forestal y médico veterinaria, al inhibir el crecimiento, alimentación y oviposición en diversos grados y niveles en los insectos en general (Jiménez *et al.*, 1997; Zorofchian *et al.*, 2013).

Segura-Correa *et al.* (1993), reportan que los extractos de hojas de venadillo inhibieron el crecimiento (concentración efectiva al 50 %, $EC_{50} = 100 \mu L^{-1}$) y alimentación ($EC_{50} = 23 \mu L^{-1}$) de larvas de gusano trozador *Peridroma saucia* (Noctuidae). El análisis fitoquímico del extracto de semillas reveló la presencia de siete limonoides, incluidos los humilínolidos A-D (Zorofchian *et al.*, 2013).

Jiménez *et al.* (1997), al estudiar el efecto insecticida de los humilínolidos A-D a $50 \mu L^{-1}$, incorporados en la dieta, la toxicidad de extractos de venadillo contra *Ostrinia nubilalis* (Crambidae), demostraron que éstos compuestos activos causaron mortalidad larval, así como reducción en el crecimiento e incremento en el tiempo de desarrollo, en una manera dependiente de la concentración.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento.

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, específicamente en el Laboratorio de Parasitología Agrícola, ubicado en el municipio de Xalisco, Nayarit.

3.2 Material biológico.

Se utilizó el vector *A. aegypti*, recolectado en los municipios de Xalisco, Bahía de Banderas y Tepic, Nayarit. El periodo de recolecta fue de enero a julio del año 2016. Para la recolección de los huevos del vector se utilizaron ovitrampas que consistieron en pequeñas cubetas de 15 cm de diámetro y una altura de 20 cm, con papel pellón (Figura 2).



Figura 2. Ovitrapa.

3.3 Relación de tratamientos.

Se utilizaron cinco concentraciones de extractos de tres especies: neem, venadillo y guanábana con propiedades insecticidas, y un control negativo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el en el control del vector *Aedes aegypti*.

Extracto	Tratamientos (μL^{-1})				
Neem	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
Venadillo	500	1000	1250	1500	2000
Guanábana	500	1182	1500	2000	2500
Control negativo	0	0	0	0	0

3.4 Diseño experimental y tamaño de la unidad experimental.

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. El tamaño de cada unidad experimental fue de 25 larvas, requiriéndose un total de 3000 para todo el experimento.

3.5 Extracción de los activos de las plantas.

3.5.1 Guanábana.

Los aceites esenciales fueron extraídos de semillas de la temporada, recolectadas en la zona de Las Varas, municipio de Compostela, Nayarit en abril de 2016, se recolectó la semilla de *A. muricata* en empaques de guanábana establecidos en la zona productora del fruto, donde se despulpa la fruta. La obtención de la suspensión acuosa del material vegetal fue extraída por medio del método de Lock (1994), con ligeras modificaciones, según se describe a continuación:

3.5.1.1 Proceso de secado.

Para este proceso la semilla se colocó en papel estraza, sobre una mesa a la sombra por 10 días, a si la semilla pierde la humedad contenida en ella. Posteriormente la semilla se almaceno en vuelta en este papel dentro de una bolsa de plástico.

3.5.1.2 Molienda.

Las semillas deshidratadas fueron separadas del material vegetal contaminante, se molieron con un molino de nixtamal, el cual sólo fraccionó las semillas. Posteriormente, de forma manual se separó la cascara de los cotiledones.

Los cotiledones fueron macerados en trozos medianos con una licuadora industrial (marca Blender Modelo 51BL31). El material obtenido, se colocó en un contenedor con 1000 mL de alcohol etílico 70 % por cinco días para extraer los aceites esenciales. Al quinto día la mezcla de semilla y alcohol etílico se maceró por segunda vez y se pulverizó y se dejó un día más en alcohol etílico para obtener una extracción completa de los aceites. Una vez completa la extracción etílica de los aceites, se puso a evaporar el alcohol etílico dentro de una estufa (marca Novatech Modelo E135-EA) a 50 °C por 4 días. Una vez evaporado el alcohol, sólo quedó la parte del extracto vegetal mismo que se disolvió en 1000 mL de agua destilada a 50 °C para ser considerado como extracto acuoso.

3.5.2 Venadillo.

La semilla fue obtenida del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados. Para la molienda de la semilla, se utilizó una licuadora industrial (marca Blender Modelo 51BL31), posteriormente se pesaron 50 g y se colocaron en 500 mL de agua destilada (P/V) por 48 horas. La mezcla de semillas y hojas se filtraron con tela tricot, para obtener el extracto acuoso.

3.5.3 Neem.

El extracto utilizado fue marca TRILOGY®, fabricado por laboratorios OMR Y LISTED. La composición porcentual es equivalente a 639.8 g IA/L.

3.6 Bioensayos.

Los huevos de *A. aegypti* se colocaron en contenedores de plástico de 25 cm de largo, 15 cm de ancho y 15 cm de alto y en pellón de 20 cm de largo por 10 cm de ancho, que fungieron como ovitrampas. El pellón se sumergió en 1,500 mL de agua potable a 26 ± 2 °C para mantener los huevos hidratados,

para que al eclosionar la larva pueda tener movimiento. Las condiciones de laboratorio con las cuales se llevaron los bioensayos de muestran en el cuadro 2.

Una vez que los huevos eclosionaron y las larvas se encontraron en el primer estadio, se contabilizaron 25 larvas y se transfirieron a una caja Petri. Posteriormente, se colocaron en vasos de precipitados de 1,000 mL con la cantidad de agua potable correspondiente para cada dilución. La mezcla se mantuvo a 26 ° C. El traspaso de las larvas se hizo con una pipeta de boca ancha y bordes romos por manejo del bioensayo y evitar dañar las larvas.

Posteriormente se procedió a agregar el extracto para tener las concentraciones deseadas en cada vaso de precipitados, para lo cual se preparó una solución madre de los extractos. De esta solución se tomó la cantidad necesaria para hacer cada dilución y se depositaron en los vasos de precipitado con la cantidad de agua correspondiente para cada dilución.

Las larvas y la concentración en los vasos de precipitado, se colocaron dentro de una jaula entomológica en donde se dio seguimiento a la mortalidad de las larvas a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición. En cada revisión se registró la temperatura y humedad relativa.

3.7 Variables evaluadas.

3.7.1 Mortalidad.

Se consideró el porcentaje de mortalidad. Para contabilizar esta variable, se registró como larva muerta aquella que no presentó movimiento a estímulos sensoriales al ser tocada por la punta del pincel o reacción a la luz), se confirmó su mortalidad con un microscopio estereoscópico.

3.7.2 CL₅₀.

Con base en los resultados de mortalidad, se estableció la concentración letal media (CL₅₀ - 96 horas) y sus respectivos intervalos de confianza a un 95 % de acuerdo al método DL-PROBIT Versión 1 (Finney, 1971; Randhawa, 2009).

Cuadro 2. Condiciones de laboratorio para bioensayos de *A. aegypti*.

Laboratorio	Condiciones
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la solución de prueba
Duración	96 horas
Fotoperiodo	N
Volumen de los recipientes de prueba	500 mL
Etapa de los organismos	Primer estadio
No. de organismos	25
No. de replicas	5
Aireación de los recipientes de prueba	N
Alimentación	N
Respuesta evaluada	Mortalidad
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia ≥ 90 % en testigos
Humedad relativa	70-80 % ((Consoli-Oliveira, 1994)
Temperatura ambiental	14-30 °C (Forattini, 2002)
Temperatura del agua de recipientes	14-30 °C (Forattini, 2002)
Exposición a la luz	14 horas (Consoli De Oliveira, 1994)

3.8 Análisis estadístico.

Los resultados estadísticos se obtuvieron mediante el programa IBM SPS statistics 20.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados.

4.1.1 Análisis Probit.

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos para neem, venadillo y guanábana. La CL_{50} se refiere a la dosis necesaria de extracto (μL^{-1}) para causar el 50 % de muerte en la población de larvas en estudio (*A. aegypti*). La CL_{95} se refiere a la dosis necesaria de extracto para causar el 95 % de mortalidad en la población de larvas. Los límites de confianza indican el intervalo de concentraciones dentro de las cuales se encuentra la CL_{50} con un 95 % de confianza. Todos los extractos presentaron actividad larvicida contra *A. aegypti*.

La CL_{50} para los extractos evaluados, fueron de 0.00814, 867.837 y 958. 477 (μL^{-1}) de neem, guanábana y venadillo, respectivamente. El extracto que menor concentración se necesitó para matar el 50 % de la población fue el neem. Con base al criterio el cual considera de mayor toxicidad al extracto que necesite una menor concentración y menor tiempo para matar al 50 o 90 % en la población expuesta (Silva y Casals, 2001), en este caso el extracto de las semillas de guanábana fue el más eficiente (a pesar de no ser el extracto que se haya utilizado en menor concentración), debido a que en las primeras 24 horas de exposición registró mayor mortalidad. Seguido del extracto de neem, solo que este tiene un comportamiento muy diferente en las siguientes lecturas y por último el extracto de venadillo; como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 3. Concentraciones letales de extractos aplicados a larvas de *A. aegypti*.

Extracto	N	b±ES	CL50	CL95	LC (95 %)	GL	R ²
Neem	125	Y=65.037 X + 39.468	0.00814	0.853	0.0094-0.0068	4	1
Guanábana	125	Y=0.0361 X + 13.708	867.837	2251.855	874.434-861.24	4	0.969
Venadillo	125	Y=0.0491 X - 2.68	958.477	1988.798	525.022-828.178	4	0.954

N. Número de organismos expuestos. CL. Concentración letal. GL. Grados de libertad. LC. Límites de confianza.

Cuadro 4. Relación tiempo-mortalidad.

Tiempo (horas)	Neem	Guanábana	Venadillo
	Larvas muertas		
24	337	339	315
48	337	379	319
72	337	410	358
96	337	432	367

4.1.2 Análisis de varianza.

En el cuadro 5, se presentan los resultados del análisis de varianza aplicado a la variable mortalidad, utilizada para medir el efecto de las diferentes concentraciones de extractos vegetales aplicadas a las 24, 48, 72 y 96 horas para ocasionar la muerte de larvas del mosquito. Se observa que en todos los casos se presentaron diferencias estadísticas significativas, ya que los valores arrojados por la prueba estadística son menores de 0.05

En lo referente al coeficiente de variación (C. V.), el cual mide el grado de error que se comete al medir la variable de interés, se presentaron valores entre 6.39 y 11.89 %, los cuales son aceptables en las condiciones en que se desarrolló la investigación.

En el coeficiente de determinación (R^2), el cual mide la bondad de ajuste del modelo estadístico empleado, se obtuvieron valores aceptables, lo que significa que el modelo explicó entre el 97 y 99 % de la variabilidad generada en la investigación.

Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable mortalidad utilizando extractos vegetales.

Extractos	Pr>F	C. V. (%)	R^2
Guanábana	0.0001*	10.89	0.9744
Neem	0.0001*	6.39	0.9958
Venadillo	0.0001*	11.89	0.9767

Cuando la Pr>F es menor de 0.05, existen diferencias significativas. * Presencia de diferencias.

4.1.3 Prueba de medias (Tukey_{0.05}) para la variable mortalidad.

4.1.3.1 Extracto de guanábana.

La prueba de medias en esta variable manifestó la presencia de 11 grupos estadísticos (Cuadro 6). Los resultados muestran que los tratamientos con la mayor concentración de extracto de guanábana (2500 μL^{-1}), independientemente del tiempo de lectura parecen los más sobresalientes ya que pertenecen al primer grupo estadístico (A).

4.1.3.2 Extracto de neem.

Para esta característica, la prueba de Tukey arrojó cinco grupos estadísticos, sobresalen estadísticamente en el primero, las concentraciones más altas que se determinaron en los cuatro tiempos (1 μL^{-1} a los 24, 48, 72 y 96 horas), aunque numéricamente son iguales entre ellos. El testigo en las cuatro lecturas no manifestó mortalidad (Cuadro 7).

4.1.3.3 Extracto de venadillo.

En el cuadro 8 se presentan los resultados de la prueba de medias para la variable mortalidad, y se pueden apreciar nueve grupos estadísticos, donde sobresalen con los valores más altos los tratamientos formados por las concentraciones más altas del primer grupo (2000 μL^{-1} de extracto de la planta venadillo a las 24, 48, 72 y 96 horas). En último lugar se manifestaron los testigos ubicados en el último grupo estadístico.

Cuadro 6. Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de guanábana.

Tratamientos	Medias ^z	Grupos estadísticos
2500 ppm - 96 horas	25.00	A
2500 ppm - 72 horas	24.60	A
2000 ppm - 96 horas	22.40	A B
2500 ppm - 48 horas	22.20	A B
2000 ppm - 72 horas	21.00	B C
2500 ppm - 24 horas	20.00	B C D
2000 ppm - 48 horas	18.80	C D E
1500 ppm - 96 horas	17.40	D E F
1500 ppm - 72 horas	16.40	E F G
2000 ppm - 24 horas	16.00	E F G H
1500 ppm - 48 horas	16.00	E F G H
1500 ppm - 24 horas	14.60	F G H I
1182 ppm - 96 horas	14.20	F G H I
1182 ppm - 72 horas	13.40	G H I
1182 ppm - 48 horas	12.80	H I
1182 ppm - 24 horas	11.60	I
500 ppm - 96 horas	7.40	J
500 ppm - 72 horas	6.60	J
500 ppm - 48 horas	6.00	J
500 ppm - 24 horas	4.80	J
Testigo - 24 horas	0.40	K
Testigo - 48 horas	0.40	K
Testigo - 72 horas	0.40	K
Testigo - 96 horas	0.40	K

^zMedias con la misma letra, son estadísticamente iguales (Tukey_{0.05}).

Cuadro 7. Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de neem.

Tratamientos	Medias ^z	Grupos estadísticos
1 ppm - 24 horas	25.00	A
1 ppm - 48 horas	25.00	A
1 ppm - 72 horas	25.00	A
1 ppm - 96 horas	25.00	A
0.1 ppm - 24 horas	22.40	B
0.1 ppm - 48 horas	22.40	B
0.1 ppm - 72 horas	22.40	B
0.1 ppm - 96 horas	22.40	B
0.01 ppm - 24 horas	14.20	C
0.01 ppm - 48 horas	14.20	C
0.01 ppm - 72 horas	14.20	C
0.01 ppm - 96 horas	14.20	C
0.001 ppm - 24 horas	4.40	D
0.001 ppm - 48 horas	4.40	D
0.001 ppm - 72 horas	4.40	D
0.001 ppm - 96 horas	4.40	D
0.0001 ppm - 24 horas	1.40	E
0.0001 ppm - 48 horas	1.40	E
0.0001 ppm - 72 horas	1.40	E
0.0001 ppm - 96 horas	1.40	E
Testigo - 24 horas	0.00	E
Testigo - 48 horas	0.00	E
Testigo - 72 horas	0.00	E
Testigo - 96 horas	0.00	E

^z Medias con la misma letra, son estadísticamente iguales (Tukey_{0.05}).

Cuadro 8. Prueba de medias para la variable mortalidad en extracto de venadillo.

Tratamientos	Medias ^z	Grupos estadísticos
2000 ppm - 24 horas	25.00	A
2000 ppm - 48 horas	25.00	A
2000 ppm - 72 horas	25.00	A
2000 ppm - 96 horas	25.00	A
1500 ppm - 96 horas	22.40	A B
1500 ppm - 72 horas	21.00	B C
1500 ppm - 48 horas	18.80	C D
1500 ppm - 24 horas	16.00	D
1250 ppm - 96 horas	12.00	E
1250 ppm - 72 horas	11.20	E
1000 ppm - 72 horas	11.00	E
1000 ppm - 96 horas	11.00	E
1250 ppm - 24 horas	9.40	E F
1250 ppm - 48 horas	9.40	E F
1000 ppm - 48 horas	9.20	E F
1000 ppm - 24 horas	9.00	E F G
500 ppm - 72 horas	7.00	F G H
500 ppm - 96 horas	7.00	F G H
500 ppm - 48 horas	5.80	G H
500 ppm - 24 horas	5.20	H
Testigo - 24 horas	0.40	I
Testigo - 48 horas	0.40	I
Testigo - 72 horas	0.40	I
Testigo - 96 horas	0.40	I

^z Medias con la misma letra, son estadísticamente iguales (Tukey_{0.05}).

4.2 Discusión.

Los resultados muestran que los tres extractos presentaron una notable actividad larvicida en la especie *A. aegypti*, y evidencian que hay sensibilidad a los metabolitos presentes en dichos extractos.

Los extractos naturales de plantas tienen un gran potencial como productos de bajo impacto en la entomofauna (Isman, 2000). Muchos de estos extractos, como el extraído de *Melia azedarach* L., son conocidos por poseer, entre sus cualidades, actividad inhibidora de la oviposición, reguladora del crecimiento e insecticida contra *A. aegypti* (Coria *et al.*, 2008). La potencialidad de los extractos varía según la especie vegetal, su origen, su composición y los mecanismos de acción contra plagas, sus componentes son los responsables de su actividad insecticida (Araujo *et al.*, 2003).

Los compuestos reportados que presentan actividad biológica en las plantas del género *Annona* son acetogeninas, bistetrahidrofuránicas y monotetrahidrofuránicas. Específicamente, en las semillas de *A. muricata*, la acetogeninas, muricatacina y anonnacina son algunas de las moléculas biológicamente más activas. El efecto larvicida del extracto acuoso de *A. muricata*, es altamente prometedor, debido a que, a partir de la concentración más baja del 5 %, se demostró su efecto letal sobre larvas de *A. aegypti* al tener una efectividad similar al larvicida comercial (Temefos al 1 %) (Sanabria *et al.*, 2009).

Los resultados son muy similares a los obtenidos por Parra-Henao *et al.* (2007), quienes evaluaron los efectos tóxicos del extracto etanólico de semillas de guanábana sobre larvas de cuarto estadios de la cepa susceptible Rockefeller del mosquito *A. aegypti*. Se registra una concentración letal media de 900 ppm sobre las larvas en un tiempo de exposición de 24 horas.

Robledo *et al.* (2008), encontraron actividad insecticida eficaz de extractos etanólicos de semillas de guanábana sobre ninfas de los últimos estadios de *Periplaneta americana* de seis poblaciones del suroccidente colombiano, las pruebas olfatómetricas mostraron un marcado efecto repelente 80 % por las ninfas a las acetogeninas impregnadas en papel ($X^2= 10.2$ $p=0.001$), por lo tanto, se podría considerar efectivo en la prevención de infestaciones o colonizaciones por parte de *P. americana*.

Romero (2005), encontró que los limonoides son compuestos que se encuentran en mayor cantidad en el neem, son una subclase de terpenos más conocidos como triterpenoides. Aproximadamente, un

tercio de estos compuestos aislados son limonoides, el más conocido es la azadirachtina, que se encuentra principalmente en la semilla y registran un efecto inhibitor en el crecimiento de insectos, de ahí el principal interés de utilizar el extracto del neem en la formulación de plaguicidas e insecticidas.

Malusin *et al.* (2015) llevaron a cabo investigaciones con extractos etanólicos de las hojas del neem a 50, 100, 150 y 200 mg/mL, obtuvieron porcentajes de mortalidad del 35, 60, 70 y 85 % respectivamente, resultados fueron menores a los del presente trabajo. Estos resultados podrían explicarse al uso de concentraciones diferentes; sin embargo, se coincide en que el extracto de neem posee una actividad larvicida probada.

Durmusoglu *et al.* (2003) realizaron investigaciones con extracto de neem donde obtuvieron los siguientes resultados: un valor promedio de 94 % de repelencia a los 35 minutos y dos horas, mientras que a las 24 horas el promedio de repelencia fue del 86 %. Al 10 %, el extracto de neem arrojó valores del 70 % a los tres tiempos registrados, mientras que la repelencia en promedio al 10 % fue de 74 y 72 % a los 35 minutos y dos horas respectivamente, así mismo, a las 24 horas obtuvo un 66 %. Los resultados anteriores, coinciden con los del presente trabajo, ya que la mayor actividad de extracto de neem se dió en las primeras 24 horas después de haber agregado el extracto.

El neem es una especie ampliamente evaluada en diferentes insectos, destaca su efecto insecticida o bien regulador de crecimiento en especies de importancia agrícola, particularmente en hemípteros como *Nezara viridula* (Pentatomidae) en la cual se valoró su efecto y registró un 60 % de mortalidad en ninfas (Durmusoglu *et al.*, 2003).

Diferentes productos y partes de neem, demostraron un amplio uso como insecticida de mosquitos (Atawodi y Atawodi, 2009), tal es el caso del efecto repelente del aceite derivado de la semilla con el 80 % en *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) (Mandal, 2011), o bien el efecto insecticida generado en los inmaduros de *A. aegypti* (Culicidae) por el extracto etanólico (Wandscheer *et al.*, 2004). En el presente trabajo se comprobó el efecto insecticida del extracto de neem.

De los extractos evaluados, el de semillas de venadillo fue efectivo como larvicida, ya que el extracto de hoja no funcionó para este fin; igual que algunas investigaciones realizadas con estos mismos

extractos, pero con diferentes organismos de prueba. Estos resultados, coinciden con los reportados por Segura-Correa *et al.* (1993) y Jiménez *et al.* (1997) quienes encontraron que los extractos de semillas de *S. humilis* a 100 y 50 μL^{-1} , inhibieron el crecimiento y alimentación de larvas de *P. saucia* y *O. nubilalis*, respectivamente. La baja toxicidad del extracto de hojas contra el psílido, aparentemente se puede explicar por una diferencia en la composición y concentración de principios activos presentes en las diferentes estructuras vegetales (Zorofchian *et al.*, 2013).

Los resultados de los extractos de neem, venadillo y guanábana con base en las recomendaciones de la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ), se pueden considerar promisorios para el control de larvas de *A. aegypti* debido a que los valores de CL_{50} obtenidos en estas evaluaciones se encuentran por abajo de la concentración máxima (5,000 μL^{-1}) recomendada para condiciones de trabajo en laboratorio (Hellpap, 1993).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis planteada, los extractos de neem, guanábana y venadillo mostraron toxicidad larvicida contra *A. aegypti*, sin embargo, unos se comportan mejor que otros con el paso del tiempo, ya que todos inducen mortalidad sobre las larvas.
2. La guanábana provocó mayor mortalidad en un periodo de 24 horas (54.2 %), el extracto de neem 53.9 % y el extracto de venadillo 50.4 %. La diferencia de los extractos radica en el comportamiento de 24 hasta 96 horas. Mientras que la guanábana provocó una mortalidad considerable hasta las 96 horas, el extracto de neem no provocó ninguna mortalidad después de 24 horas. El extracto de venadillo después de las 24 horas ocasionó una mortalidad considerablemente menor a la del extracto de guanábana.
3. Los extractos de neem y venadillo manifestaron una marcada actividad larvicida solamente en las primeras 24 horas.
4. Los extractos vegetales, son una herramienta para el control de plagas muy importante, que tienen que empezar a desarrollarse de una manera más amplia y profesional, en todos los sectores, ya que el efecto que causan a terceros, son mínimos, comparados con los compuestos químicos actuales.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Alali, F.; Liu X. and Mclaughlin, J. 1999. *Annonaceous Acetogenins*: Recent Progress. Journal of Natural Products 62 (3): 504-540.
- Araujo, E. C.; Silveira, E. R.; Lima, M. A.; Neto M. A.; De Andrade, I. L. and Lima, M. A. 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martisii* Benth. J Agric. Food Chem. 51: 3260-2.
- Atawodi, E. S. and Atawodi, C. J. 2009. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochemistry Reviews, 8 (3): 601–620.
- Consoli, R.A.G.B.; and Oliveira, R.L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p
- Coria, C.; Almiron, W.; Valladares, G.; Carpinella, C.; Ludueña, F. and Defago, M. 2008. Larvicida and oviposit Larvicidae and oviposition deterrent effects of fruit and leaf ext from *Melia azedarach* (L.) on *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) Bioresour Technol. 99: 3066-70.
- Durmusoglu, E.; Karsavuran, Y.; Ozgen, I. and Guncan, A. 2003. Effects of two different neem products on different stages of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). Journal of Pest Science, 76: 151–154.
- Finney, D. J. 1971. Probit analisis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, New York, 668 p.
- Forattini, O.P. 2002. Culicidologia médica: Identificacao, biologia e epidemiologia. Vol. 2, EDUSP, Sao Paulo, 864 p.
- Gallardo-Díaz, E.; Borja-Aburto, V.; Mendez-Galván, J.; Sánchez-Tejeda, G.; Olguin-Bernal, H. y Ramírez-Hernández, J. 2000. Secretaria de Salud: Situación actual de la malaria y el uso de

DDT en México. Centro Nacional de Salud Ambiental, Centro de Vigilancia Epidemiológica. 53 p.

Grainge, M. and Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & Sons. New York, USA. 470 p.

Guzmán, M. G. and Kourí G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2 (1): 33-42.

Hellpap, C. 1993. Steps for developing botanical pesticides. *Manuscrito G. T. Z.*

Hoss, R. 1992. Cuaderno de trabajo 1. Guía metodológica: Uso de extractos vegetales en la regulación de plagas. Red de acción de alternativas al uso de agroquímicos. Lima. Peru.

Isman, M. 2000. Plant essential oil for pest and disease management. *Crop. Prot.* 19: 603-08.

Jiménez, A.; Mata, R.; Pereda-Miranda, J.; Calderón, M. B.; Isman, R. and Arnason, J. T. 1997. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *J. Chem. Ecol.* 23: 1225-1234.

Jiménez, A.; Villarreal, C.; Toscano, R. A.; Cook, M.; Arnason, J.; Bye, R. and Mata, R. 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry.* 49: 1981-1988.

Joshi, H; Baxi, G. and Baxi, A. 1992. Free amino acids and sugars of *Annona squamosa* Linn. *Asian J. Chem.* 4 (1): 49-52.

Karr, L. L. and Cotas, J. R. 1998. Insecticidal properties of limonene. *J. Pest. Sci.* 13: 287-90.

Leatemia, J. and Isman, B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. *International J. Trop. Insect Science.* 24 (1): 150-158.

- Lock, O. 1994. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2. ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima. Peru. 300 p.
- Malusin-Castro, J. A. y Villamar-Jiménez, J. N. 2015. Estudio de la acción larvicida del extracto etanólico de la *Azadirachta indica* A. Juss. Contra el *Aedes eegypti*. Universidad de Guayaquil. Facultad Ciencias Químicas.
- Mandal, S. 2011. Repellent activity of *Eucalyptus* and *Azadirachta indica* seed oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1 (1): 109-112.
- McLaughlin, J.; Lingling, R.; and Jon, A. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Information Journal. 32. 513-524.
- Méndez, G. J. F.; Rivas, M. L.; Nájera, M. R.; Inette, G.; Canto, S. B. y Sabido, F. 1996. Proyecto de prevención y control del dengue 1995-1996. En: Secretaría de Salud. Taller sobre avances recientes en el control de *Aedes aegypti* basado en la comunidad: México y Honduras. Mérida, Yucatán, México. 32 -81 p.
- Morales, C.; Gonzales, A. y Aragón, R. 2004. Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología. Vol 30. 187-192 p.
- Mordue, A. J. and Blackwell, A. 1993. Azadirachtin: an update. J. of Insect Physiol. Vol 39. 903-924 p.
- Morrison, A.; Zielinski-Gutierrez, E.; Scott, T. W. and Rosenberg, R. 2008. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. PLoS Med 5 (3): e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050068>

National Research Council (NRC, 1992). *Neem: A tree for solving global problems*. Report of an ad hoc panel of the board on Sci. and Technol. for International Development. National Academy Press. Washington. D. C. 141 p.

Nelson, M. J. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington D. C. 36 p.

Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2001). Situación de los programas de malaria en las Américas. Bol. Epid. Org. Pan. Salud. 22: 10-14.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015). Number of reported cases of dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by country: deaths (SD/D) x100 CFR North America Central America and Mexico.

Padin, S.; Ricci E.; Kahan, A.; Re, M. y Henning, C. 2002. Comportamiento repelente del aceite esencial de *Laurus nobilis* L., sobre *Brevicoryne brassicae* L., y *Myzus persicae* Sulz. (Homoptera: Aphididae) en trigo. Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba. 26, 27 y 28 de junio de 2002. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrarias, Córdoba, Argentina. 54 p.

Parra-Henao, G.; García-Pajón, C. M. y Cotes-Torres, J. M. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. CES Med. 21 (1): 47-54.

Randhawa, M. A. 2009. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1994. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad, 21 (3): 184-185.

Reiter, P. y Nathan, M. B. 2003. Guías para la evaluación de la eficacia del rociado espacial de insecticidas para el control del vector del dengue *Aedes aegypti*. Organización Mundial de la Salud. WHO/CDS/CPE/PVC/2001.1.1-30 p.

- Robledo, P. C.; González, R.; Jaramillo, G. I. y Restrepo, J. 2008. Evaluación de la toxicidad de acetogeninas anonáceas sobre ninfas de *Periplaneta americana* L. (Dictyoptera: Blattidae). Boletín del Museo de Entomología Universidad del Valle. 9 (1): 54-61.
- Rodríguez, H. C. y Nieto, A. D. 1997. Anonáceas con propiedades insecticidas. En: Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). A. Reboucas São Jose, I. Vilas Boas S., O. Magalhaes M. e T.N. Hojo R. (Eds). Bahía, Brasil.
- Romero, Y. V. 2005. Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-20762005000400007&lng=es&nrm=i Consultado el 27 de mayo de 2015.
- Rose, R. 2001. Pesticide and Public health: Integrated methods of mosquito management. Emergent Infect Dis. 7(1):17-23 p.
- Royal Gardens Botanic. 2006. Neem. Plant Cultures, exploring plant and people. Kew. Disponible en: http://www.plantcultures.org.uk/plants/neem_landing.html.
- Rupprecht, J. K.; Hui, Y. H. and Mclaughlin, J. L. 1990. *Annonaceous acetogenins* a review. Journal. Natural Products.
- Sanabria, L.; Segovia, E. A.; González, N.; Alcaraz, P. y Vera, N. de B. 2009. Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *A. aegypti* (primeros ensayos). Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.
- Santos, D. and Salatino, M. 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. Phytochemistry. 55: 567-573.
- Saxena, R. C.; Liquido, N. J. and Justo, H. D. 1987. Neem seed oil, a potential antifeedant for the control of the rice planthopper, *Niiparvata lugens*. Proc. 1st. Int. Neem Conf., Rottach-Egern. 139-144 p.

- Segura-Correa, R. R.; Mata, A. L.; Anaya, B.; Hernández-Bautista, R.; Villena, M.; Soriano-García, B. and Linares. E. 1993. New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. J. Nat. Prod. 56: 1567-1574.
- Seetharaman, T. 1986. Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* and *Polyalthia longifolia*. Fitoterapia; 57(3):198-199.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Dengue (SINAVE/DGE, 2016). Información al 05 de diciembre de 2016 y semana 48.
- Silva, G. y Casals, P. 2002. Bioensayo. Disponible en: [http:// www.multired.com./ciencia/gosilagu/](http://www.multired.com./ciencia/gosilagu/).
- Standley, P. C. 1920. Trees and Shrubs of Mexico. United States National Herbarium, Washington D. C. p. 560.
- Wandscheer, C.; Duque, J. E.; Da Silva, M. A. N.; Fukuyama, Y.; Wohlke, J. L.; Adelman, J. and Fontana, J. D. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon, 44: 829-835.
- Watts, D. M.; Burke, D. S.; Harrison, B. A.; Whitmire, R. E. and Nisalak, A. 1987. Effect of Temperature on the Vector Efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue 2 Virus. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 36. 143-152 p.
- Weinzierl, R. and Henn, T. 1992. Alternatives in insect management: Biological and biorational approaches. North Central Regional Extension Publication 401. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Zorofchian S. M.; Hing, B. G.; Kei, Ch.; Shabab, T. and Abdul, K. H. 2013. Biological activities and phytochemicals of *Swietenia macrophylla* King. Molecules 18: 10465-10483.