



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
HERBARIO MERF**



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA EN PLANTAS DE
LA TRIBU DALBERGIAE Bronn ex DC. (Papilionoideae-Leguminosae)
EN VENEZUELA**

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en
Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Br. Luces Pereira Manuel de Jesús
V-20.471.478

Br. Chacón Urdaneta José Daniel
V- 20.470.097

Tutor:

Prof. Pablo Meléndez González

Co-Tutor:

Prof. José Manuel Jiménez

Asesor Metodológico:

Prof. José Gregorio Hernández

Mérida, Junio de 2017

C.C.Reconocimiento

DEDICATORIA

La presente tesis la dedicamos a toda nuestra familia y amigos, principalmente a nuestros padres que han sido un pilar fundamental en mi formación como profesional, por brindarnos la confianza, consejos, oportunidades y recursos para lograrlo.

Por ultimo a nuestros verdaderos amigos con los que compartimos todos estos años juntos.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por permitirnos llegar a hacer realidad esta meta.

A nuestras familias, por inculcarnos todos los valores que conocemos y el amor por esta carrera, por acompañarnos y apoyarnos.

A nuestros tutores, por su paciencia y amor por su trabajo. Muchas gracias por brindarnos su conocimiento.

A nuestro asesor metodológico Dr. José Gregorio Hernández por su paciencia, dedicación, estética y perfeccionismo en este trabajo de grado.

A nuestros amigos, por todos los momentos divertidos e inolvidables que vivimos durante todos estos años.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

	pág.
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
<i>Objetivo General</i>	6
<i>Objetivos Específicos</i>	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
CAPITULO II. MARCO TEORICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	11
Bases Teóricas	13
<i>Las fabáceas (Fabaceae) o leguminosas (Leguminosae)</i>	13
Taxonomía Planta <i>Tipuana tipu (Benth.) Kuntze</i>	15
Taxonomía Planta <i>Machaerium seemannii Benth.ex Seem</i>	15
Taxonomía Planta <i>Machaerium biovulatum Micheli</i>	16
Los mosquitos	17
<i>Aedes aegypti L.</i>	20
Larva de <i>Aedes aegypti L.</i>	21
Definición Operacional de Términos	23
Actividad Larvicida	23
Probóscide	23
Percolación	24
Maceración	24
Inflorescencias	24
Operacionalización de Variables	24

Hipótesis	27
<i>Hipótesis Alternativa (H_a)</i>	27
<i>Hipótesis Nula (H₀)</i>	27
CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO	28
Tipo de Investigación	28
Diseño de la Investigación	28
Población y Muestra	29
<i>Unidad de Investigación</i>	29
<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	29
Sistema de Variables	30
Procedimientos de la investigación	30
Obtención del extracto de las especies <i>Machaerium seemanni</i> Benth. Ex Seem., <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli y <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	30
Cultivo Larvario de <i>Aedes aegypti</i> L.	33
Ensayo de la actividad larvicida contra las larvas de <i>Aedes aegypti</i> L. de los extractos de las especies <i>Machaerium seemanni</i> Benth. Ex Seem., <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli y <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	34
Ensayo de la sobrevivencia de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> L. en los extractos de las especies <i>Machaerium seemanni</i> Benth. Ex Seem., <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli y <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	35
Diseño de Análisis	37
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Resultados	38
Discusión	49
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
Conclusiones	53
Recomendaciones	54
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	56

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente: 25 Actividad larvicida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> de las especies de <i>Tipuana tipu</i> (Benth), <i>Machaerium seemannii</i> Benth. ex Seem y <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli.	
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: 26 Concentración del extracto de las especies de <i>Tipuana tipu</i> (Benth), <i>Machaerium seemannii</i> Benth. ex Seem y <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli.	
Tabla 3. Miligramos de extractos obtenidos de las especies 33 <i>Machaerium seemanni</i> Benth. Ex Seem, <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli y <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze, con diferentes solventes. Laboratorio “A” de productos naturales del Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro Período 2015-2017.	
Tabla 4. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas 42 de <i>Aedes aegypti</i> a las 12 y 24 horas del ensayo con 200 mg de los extractos de <i>Tipuana tipu</i> ; <i>Machaerium seemanni</i> Benth. Ex Seem., <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	
Tabla 5. Supervivencia de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> en el 46 extracto de <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	
Tabla 6. Supervivencia de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> en el 47 extracto de <i>Macherium seemanni</i> Benth. ExSeem. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	
Tabla 7. Supervivencia de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> en el 48 extracto de <i>Macherium biovulatum</i> Micheli. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química de la tirosina, leucina y fenilalanina.	14
Figura 2. Árbol <i>Tipuanatipu</i> (Benth.) Kuntze.	15
Figura 3. <i>Machaerium seemannii</i> Benth. ex Seem.	16
Figura 4. <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli.	17
Figura 5. Ciclo de la vida de <i>Aedes aegypti</i> .	18
Figura 6. Huevos de <i>Aedes aegypti</i> L.	21
Figura 7. Pupa de <i>Aedes aegypti</i> L.	22
Figura 8. Adulto de <i>Aedes aegypti</i> L.	22
Figura 9. Tallos y hojas recolectadas de <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	31
Figura 10. Tallos y hojas recolectadas de <i>Macherium semaanni</i> Benth. exSeem.	31
Figura 11. Tallos y hojas recolectadas de <i>Macherium biovulatum</i> Micheli.	31
Figura 12. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> a las 12 y 24 horas del ensayo con el extracto de <i>Tipuana tipu</i> . Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	43
Figura 13. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> a las 12 y 24 horas del ensayo con el extracto de <i>Machaerium seemanni</i> Benth. exSeem. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	44
Figura 14. Porcentaje de Mortalidad de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> incubadas con el extracto de la especie <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.	45



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Actividad Larvicida



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA EN PLANTAS DE
LA TRIBU DALBERGIAE Bronn ex DC. (Papilionoideae-Leguminosae)

EN VENEZUELA.

Autor:

José Chacón

Manuel Luces

Tutor:

Prof. Pablo Melendez

Co-Tutor:

Prof. José Jimenez

RESUMEN

El uso de productos vegetales como plaguicida ha sido una práctica frecuente en el transcurso del tiempo. Estos productos pueden tener actividad larvicida. El objetivo de esta investigación fue Confirmar la actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* de las plantas de la tribu Dalbergiae Bronn ex DC. (Papilionoideae-Leguminosae), en las especies *Machaerium seemanni* Benth. ex Seem., *Machaerium biovulatum* Micheli y *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze. La investigación se desarrolló en el Herbario MERF y en el Laboratorio A del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde se obtuvieron los extractos (hexánicos, acetónicos, etanólicos y diclorometánicos) de las plantas y se realizaron los bioensayos. Las concentraciones analizadas fueron entre 180 y 369 mg/mL, y el criterio de análisis fue la ausencia de motilidad de las larvas a las 12 y 24 horas después de la incubación con los extractos. Los resultados fueron: no se observó actividad larvicida con las concentraciones de 200 mg de los diferentes extractos. Con concentraciones mayores de 300mg se observó hasta un 80% de mortalidad larvaria con el extracto acetónico/diclorometánico. La mortalidad larvaria fue verificada con una DL50 inversamente proporcional a la concentración de los extractos.

Palabras claves: *Machaerium seemanni* B., *Machaerium biovulatum* M., *Tipuana tipu* B., extracto de plantas, actividad larvicida, *Aedes aegypti*.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas contienen 727 géneros y cerca de 19.325 especies en el mundo. El género *Machaerium* está subordinado a la subfamilia *Papilionoideae* dentro de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. Dicha tribu consiste en 19 géneros y aproximadamente 300 especies. Los recientes estudios filogenéticos moleculares incluyen 49 géneros y alrededor de 1300 especies en esta tribu.

Además del interés que presenta la familia desde el punto de vista sistemático y nomenclatural, existen otros criterios biológicos y de otra índole que le dan aún mayor importancia al estudio de las *Leguminosae* venezolanas. Es una familia muy importante desde el punto de vista de la economía de la naturaleza, razón por la que su conocimiento es fundamental para poder emprender investigaciones científicas sobre agricultura y conservación de la riqueza del suelo. Gran parte de sus especies brindan productos diversos para la vida humana; de ellas se obtienen semillas que han sido base insustituible de la alimentación desde tiempos remotos, como son las habas entre otras.

El uso de extractos vegetales para el control de plagas agrícolas era una práctica ancestral, ampliamente utilizada en diversas culturas y regiones del planeta hasta la aparición de los plaguicidas sintéticos. En los últimos años en la búsqueda de un equilibrio entre el ambiente, la producción y el hombre, se ha desarrollado un nuevo concepto de protección de cultivos. Esto se logra mediante productos que tengan una acción específica sobre el objetivo y un bajo impacto en los organismos circundantes y el ambiente.

Esta investigación fue de tipo confirmatoria, con diseño de campo y de laboratorio. Los procedimientos realizados fueron: preparación del extracto alcohólico de las hojas de las especies familia *Dalbergiae* subfamilia *Leguminosae*. Posteriormente, se analizó la actividad larvicida. Los datos fueron analizados a través de estadísticos descriptivos.

Este informe final de Trabajo de Grado está estructurado por cinco capítulos. Capítulo I, El Problema: que abarca, Planteamiento del Problema, Formulación del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, así como también Alcances y Limitaciones de la Investigación. Capítulo II, Marco Teórico: que presenta, Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos. Capítulo III, Marco Metodológico: que explica Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la investigación y el Diseño de Análisis. Capítulo IV, Resultados y discusión, donde se presentan los resultados del estudio en tablas y gráficos y la discusión de los mismos; y el Capítulo V donde se presentan las conclusiones y recomendaciones.

El objetivo específico de esta investigación fue determinar la actividad larvívora contra larvas de *Aedes aegypti* en plantas de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), en las especies *Machaerium seemanni* Benth. ex Seem., *Machaerium biovulatum* Micheli y *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze., ubicados en la zona geográfica de Venezuela

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El estudio de compuestos biológicos derivados de recursos naturales renovables como las plantas, siempre ha sido de gran interés científico. Existe la posibilidad de descubrir principios activos presentes en las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum.*, los cuales podrían tener algunas propiedades larvicidas. Estos géneros ofrecen amplias posibilidades las cuales demandan la investigación de éste recurso, para mejorar el conocimiento de la biodiversidad. También, para el aprovechamiento de los recursos naturales y el estudio de la bioactividad de los fitoquímicos presentes en estas plantas, en las que destaca el efecto larvicida (Sanabria, Segovia, González, Alcaraz., Vera, 2009; Chaverri y Castillo, 2010).

El dengue es una enfermedad infecciosa que puede ser producida por cuatro serotipos diferentes del virus dengue y es transmitido por mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762). Presenta una amplia distribución en las regiones de clima tropical y subtropical del mundo, manifestándose principalmente en zonas semiurbanas y urbanas, en donde el mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector (Amariles-Barrera, García, Parra-Henao, 2013).

Se estima que cerca de 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas con transmisión endémica de dengue están en riesgo de adquirir esta enfermedad. El dengue es una de las enfermedades infecciosas que mayor carga social y económica impone a la población en Riesgo, representando un evento de especial interés en salud pública (Amariles-Barrera, García, Parra-Henao, 2013).

Debido que no hay un tratamiento específico para esta enfermedad y a la ausencia de vacunas para realizar tratamientos a gran escala, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente el único método de controlar o prevenir la transmisión de los virus del dengue consiste en la lucha contra los vectores por medio de insecticidas químicos, como los organofosforados. El uso extendido e indiscriminado de estos insecticidas sintéticos para el control de vectores ha favorecido la aparición, propagación e incremento constante de resistencia a la mayoría de insecticidas disponibles actualmente en el mercado para *Aedes aegypti*. De otro lado, se ha encontrado un grave riesgo de contaminación ambiental, destrucción de la fauna benéfica y el subsecuente desequilibrio en los diferentes ecosistemas (Arana, 2002; Amariles-Barrera, García, Parra-Henao, 2013).

Es evidente entonces la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control. Como métodos alternativos para el control de los vectores se han evaluado en laboratorio y en campo el uso de controladores biológicos tales como depredadores, hongos entomopatógenos y extractos naturales de plantas, los cuales han demostrado ser efectivos controlando las poblaciones de mosquitos y evitando el desarrollo de resistencia. Los insecticidas de origen botánico han sido usados tradicionalmente en las comunidades humanas en muchos lugares del mundo para el manejo de los insectos plaga. Hoy en día se ha encontrado que estos pueden ser utilizados como alternativas eficaces en los programas integrados de control de mosquitos vectores, con la ventaja de ser altamente específicos, sin afectar la fauna benéfica, fácilmente biodegradables, de bajo costo, no requieren de metodologías complejas para la extracción de sus compuestos activos, son de disponibilidad inmediata y pueden ser preparados artesanalmente por medio de tratamientos caseros y ser aplicados inmediatamente sin la necesidad de instrumentos especializados (Amariles-Barrera, García, Parra-Henao, 2013).

En la actualidad la población venezolana padece de varias enfermedades infecciosas y virales causadas por mosquitos. Por eso,

debido a las diversas características específicas que poseen las plantas de la Tribu *Dalbergiae-Leguminosae*, y de la utilización etnobotánica-medicinal se planteó el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la actividad larvívica contra larvas de *Aedes aegypti* de las especies de plantas de la tribu *Dalbergiae-Leguminosae*, procedentes de Venezuela, durante el periodo 2015-2017?

Justificación de la Investigación

La justificación de una investigación está relacionada con las razones que motivan la realización del proceso operativo. En tal sentido, las razones pueden estar relacionadas con necesidades observadas en la realidad, inquietudes, oportunidades y amenazas (Hurtado, 2010). Al respecto, el autor de esta investigación consideró varias razones que le motivaron a realizarla. Primera, la actividad larvívica permite el control de vectores que pueden transmitir enfermedades virales, fundamentalmente (Arana, 2002; Chaverri. y Castillo, 2010). Segunda, en la actualidad el control de vectores se hace con insecticidas organofosforados, los cuales crean resistencia, contaminación ambiental y no son biodegradables (Amariles-Barrera y cols, 2013). Tercera, en la realidad existen evidencias relacionadas con el uso de insecticidas botánicos, los cuales provienen de plantas; además, son biodegradables, de bajos costos, y crean menor resistencia en los vectores. (Sanabria, Segovia, González, Alcaraz., Vera, 2009; Amariles-Barrera y cols, 2013). Por tanto, las razones referidas contribuyeron con la cosmovisión que el investigador concretó para cumplir cabalmente las fases operativas del proceso de la investigación realizada.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Confirmar la actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* de las plantas de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), en las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* en el Herbario MERF, procedentes de Venezuela.

Objetivos Específicos

- Obtener extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* con solventes de polaridad creciente.
- Describir el estadio II y IV de las larvas de *Aedes aegypti*.
- Analizar la correspondencia entre el extracto y la concentración bioactiva de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.
- Analizar la motilidad de las larvas en los extractos obtenidos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* a las 12 y 24 horas de interacción.
- Interpretar la sobrevivencia de las larvas en los extractos obtenidos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* a las 12 y 24 horas de interacción.
- Verificar la mortalidad de las larvas en los extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* a las 24 horas de interacción.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances

Los alcances de una investigación están relacionados con la profundidad del conocimiento que se quiere obtener. Al respecto, Hernández-Sampieri, Fernández y Baptista (2010), refirieron que la profundidad de una investigación representa un continuum de conocimientos. En tal sentido, esta investigación tuvo un alcance confirmatorio ya que se intentó verificar la actividad larvívora de la mortalidad de las larvas en los extractos de las especies *M. seemanni*., *M. biovulatum* y *T. tipu* a las 24 horas de interacción.

Limitaciones

Hernández-Sampieri y cols (2010), señalaron que las limitaciones de una investigación pueden ser técnicas, teóricas y de recursos económicos. Al respecto, en esta investigación se encontraron limitaciones que no limitaron la viabilidad de las fases operativas del proceso. Las limitaciones teóricas estuvieron representadas por los escasos trabajos previos sobre el evento de estudio. Las limitaciones de disponibilidad de reactivos estuvieron relacionadas con la cantidad de acetona, la cual fue sustituida por el diclorometano ya que tienen una polaridad similar.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Gómez en 2015 realizó un estudio titulado evaluación larvicida del extracto etanólico de la semilla de *Carica papaya* sobre larvas del iv estadio de *Aedes aegypti* (*diptera: culicidae*) en condiciones de laboratorio, cuyo objetivo fue confirmar el efecto larvicida del extracto etanólico de semillas de *Carica papaya* L. sobre larvas de IV estadio de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio, para generar alternativas naturales en el control del vector del Dengue. En la metodología se llevaron a cabo seis bioensayos con diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de *Carica papaya* de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm con cuatro repeticiones cada una, con 100 especímenes por bioensayo y un grupo testigo al que solo se le agregó agua declorinada para comparar la mortalidad en las larvas sometidas a los tratamientos experimentales y la mortalidad natural sin exposición. Las mortalidades de los bioensayos de los extractos etanólicos de semillas de *Carica papaya* a 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 ppm al cabo de 48 horas fueron de 46 %, 87 %, 95 %, 99 %, 100 % y 100 % respectivamente. En cuanto al efecto residual las mortalidades fueron menores a las iniciales, siendo 0 %, 8 %, 11 %, 14 %, 19 % y 23 % respectivamente a las concentraciones ya mencionadas, por lo que se evidencia la degradación del extracto con el paso del tiempo, asegurando el uso de este en medios acuáticos para el control de *Aedes aegypti*. Este antecedente es importante porque demuestra que el efecto larvicida usando extractos etanólicos, también utilizado en esta investigación, puede tener éxito.

Albrech y Alonso en 2014 realizaron un estudio titulado efectos larvicidas de extractos vegetales acuosos sobre el *Aedes Aegypti*. El objetivo de este trabajo fue confirmar la actividad de los extractos vegetales de: *Chenopodium ambrosioides* L. (Ka'are), *Ruta graveolens* L. (Ruda) y *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo), *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton (cidrón), *Petiveria paraguayensis* D. Parodi (Pipi), *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Tarope), Lavanda angustifolia (lavanda), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), contra las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. Los huevos fueron colectados en diferentes barrios de la ciudad de Encarnación (Paraguay), durante los meses de febrero y marzo del año 2014, utilizándose para la captura ovitrampas conteniendo agua y extracto de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (pasto bermuda). Se encontró la mejor actividad larvicida en *Ruta graveolens*, llegando a eliminar al 60 % de las larvas en 12 horas, y a su totalidad a las 24 horas de exposición. La *Dorstenia brasiliensis*, a las 48 horas eliminó el 100 %. Por su parte *Petiveria paraguayensis* (Pipi) con 5000 mg/L, y el *Artemisia absinthium* (ajenjo) necesitaron 72 horas para llegar al mismo resultado. *Chenopodium ambrosioides*, *Aloysia triphylla*, *Lavandula angustifolia* Mill., *Rosmarinus officinalis* mostraron menor actividad larvicida a esas dosis ya que eliminaron solo hasta el 40 %. Este trabajo permite comparar los valores de mortalidad larvaria en diferentes plantas encontradas en el país, y se relacionó con el evento de estudio de esta investigación.

Amariles-Barrera, García, Parra-Henao en 2013, realizaron una investigación titulada Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, *Diptera: Culicidae*. El objetivo fue confirmar la actividad insecticida de los extractos metanólicos de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp., *Sapindus saponaria* L. y *Annona muricata* L. sobre larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*. El procedimiento se llevó a cabo mediante percolación metanólica de macerados de las especies vegetales, se obtuvieron extractos totales y mediante diluciones de cada extracto se realizaron bioensayos sobre larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*, cepas Rockefeller y Silvestre. Se realizó análisis PROBIT

ANALISIS para determinar la concentración letal media (LC50) de los extractos evaluados. Los valores de LC50 hallados para cada uno de los extractos vegetales fueron: *Annona muricata*, 6,48 ppm (IC 95 %: 5,88 -7,27); *Sapindus saponaria*, 601,81 ppm (IC 95 %: 498,41 - 690,74); *Gliricidia sepium*, 1328,91 ppm (IC 95 %: 1201,45 - 1448,70), para la cepa Rockefeller. *Annona muricata*, 7,26 ppm (IC 95 %: 6,65 - 8,05); *S. saponaria*, 658,64 ppm (IC 95 %: 591,48 - 730,05); *G. sepium*, 1532,89 ppm (IC 95 %: 1408,15 -1660,70), para la cepa silvestre. Los resultados obtenidos son promisorios para el control de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* y fue importante para esta investigación por el procedimiento que se llevó a cabo.

González, Flores, Guerrero, Mendoza, Cárden, Aguirre y Cerna en 2013, realizaron un estudio titulado efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. El objetivo de este trabajo fue confirmar el efecto insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Culex tarsalis* en el laboratorio. El trabajo se desarrolló en el laboratorio de la Universidad (UAAAN), donde se obtuvieron los extractos (metanólicos y hexánolicos) de plantas y se realizaron los bioensayos. Las concentraciones evaluadas fueron: 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm y la lectura de muertos fue realizada a las 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados fueron analizados en el PC-Probit para la CL₅₀. Los extractos de semillas (*Annona muricata*, *Carica papaya* y *Azadirachta indica* A. Juss.) mostraron los mejores resultados al matar con 1000 ppm más de 80 % de la población desde las 24 h. Los extractos vegetales de *Annona muricata*, *Carica papaya* y *Azadirachta indica* mostraron ser una buena alternativa para el control de *Cx. tarsalis*. Esta investigación es importante porque se demostró que el efecto larvicida de los extractos en distintos solvente orgánico, también funciona en otras especies de larvas distintas a las utilizadas en esta investigación.

Antecedentes Históricos

Chaverri y Castillo (2010) realizaron un bioensayo para la detección de la actividad larvica en matrices complejas utilizando como modelo larvica de *Aedes aegypti* L. Esta línea de investigación se basó en el estudio de matrices complejas, como extractos de origen natural y sus constituyentes, que tengan un uso potencial. Es por ello, que se inició un programa para la búsqueda de insecticidas de origen natural que puedan exhibir tanto un menor impacto ambiental como un costo de producción razonable. Cabe destacar que los resultados demostraron que hay un potencial en los extractos naturales y sus constituyentes para ser empleados como sustitutos de insecticidas.

Meléndez (2009) realizó una investigación titulada Sinopsis del género *Machaerium* pers. (*Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae*) en Venezuela. En la cual realizó una revisión taxonómica de las especies circunscritas al género *Machaerium* presentes en Venezuela, con el objetivo de interpretar el conocimiento en cuanto a los problemas nomenclaturales y de identificación que han existido a través de la historia de este taxón. Siguiendo el estudio clásico de observación de caracteres morfológicos en dicho estudio. Se determinaron 39 especies y 11 variedades distribuidas en todo el territorio venezolano en un rango altitudinal de 0-1800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m).

Sanabria, Segovia, González, Alcaraz., Vera (2009) realizaron una serie de bioensayos con extractos acuosos de *Annona muricata* L. (Chirimoya), *Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb. (Palo santo) y *Melia azedarach* L. (Paraíso). Probaron en cada planta su actividad y eficacia como larvica contra larvas del mosquito *Aedes aegypti* L. y observaron que las semillas de la *Annona muricata* L. presentaron mayor actividad larvica con respecto a los demás extractos ensayados.

Leyva, Tacoronte, Marquetti., Scull., Montada, Rodríguez, y Yirian (2008), determinaron la acción insecticida de aceites esenciales contra larvas de *Aedes aegypti* L. Observaron que los aceites probados

presentaron alta actividad insecticida contra *Aedes aegypti* L., siendo *Piperauratum* kunth. el que presentó mayor actividad con la menor concentración letal siendo 50 %.

Bobadilla, Zavala, Sisniegas, Zavaleta, Mostacero y Taramona (2005), evaluaron la actividad larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* L. sobre *Aedes aegypti* L. Registraron valores de mortalidad mayores en la suspensión de semillas en comparación con las otras partes vegetales evaluadas (flores y hojas). Todas las suspensiones mostraron toxicidad larvicida.

Arana (2002), realizó un estudio en la Universidad de San Carlos de Guatemala denominado: determinación de actividad larvicida de dieciocho (18) especies de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala, el cual se realizó por medio de Bioensayos contra cuatro estadíos de larvas de dos Especies de mosquitos (*Aedes aegypti* L. y *Anopheles albimanus* C.). Siendo estas dos especies vectores de dos de las más importantes enfermedades en el mundo, Dengue y Paludismo respectivamente. Por un método micrométrico el extracto etanólico de la hoja de *Tilandsia yunckeri* L. mostró actividad preliminar contra larvas de primer estadío de *Aedes aegypti* L. y posteriormente se determinó la concentración letal 100 %, la cual fue de 0,20 mg/mL.

Sharma, Qadry, Subramanium, Verghese, Rahman (1998), evaluaron la actividad larvicida de algunos extractos obtenidos de plantas de la familia *Euphorbiaceae* L. contra el *Aedes aegypti* L. y *Culex* L. Estudiaron la mortalidad de las larvas después de 24 horas de exposición. Observaron que todos los extractos mostraron poco efecto larvicida, sin embargo, la mayor mortalidad de las larvas se encontró en el extracto de éter de petróleo.

Estos antecedentes históricos revelan la importancia que tienen los fitoquímicos presentes en los extractos de plantas en relación a la actividad larvicida. En consecuencia, contribuyeron con la cosmovisión del investigador durante el proceso de esta investigación.

Bases Teóricas

Las fabáceas (Fabaceae) o leguminosas (Leguminosae)

Son una familia del orden de las fabales. Reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. La riqueza de estas especies se halla particularmente concentrada en las ramas de las *Mimosoideae* y las *Papilionoideae*, ya que contienen cerca del 9,4 % de la totalidad de las especies de las *eudicotiledóneas*. Se ha estimado que alrededor del 16 % de todas las especies arbóreas en los bosques lluviosos neotropicales son miembros de esta familia. Así mismo, Fabaceae es la familia más representada en los bosques tropicales lluviosos y en los bosques secos de América y África (Romero, Blunden, Melendez, 2007).

Las plantas de la subfamilia *Papilionoideae* se reconocen de las demás subfamilias de leguminosas debido a que sus flores poseen cuatro pétalos envueltos entre sí. A su vez, forman un tubo por cuyo extremo sobresalen sus largos estambres. El quinto pétalo está extendido como una vela y se denomina estandarte, velamen o vexilo (Romero, Blunden, Meléndez, P., 2007)

Las leguminosas raramente son cianogenéticas, en algunos casos, Los compuestos cianogenéticos derivan de la tirosina, la fenilalanina o de la leucina. Comúnmente presentan alcaloides. Las protoantocianidinas pueden estar presentes y, en ese caso, son la cianidina, la delfinidina o ambas a la vez. Frecuentemente presentan flavonoides tales como kaempferol, quercitina y miricetina. El ácido elágico se halla consistentemente ausente en todos los géneros y especies analizadas de las tres subfamilias. Los azúcares se transportan dentro de la planta en forma de sacarosa (Heinrich, Rimpler y Barrera, 1992) (Figura1).

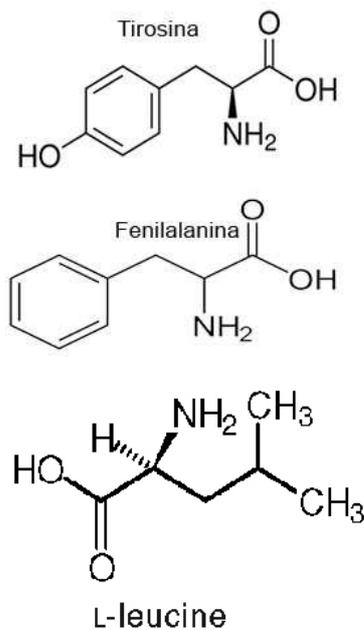


Figura 1. Estructura química de la tirosina, leucina y fenilalanina.

Además del interés que presenta la familia desde el punto de vista sistemático y nomenclatural, existen otros criterios biológicos y de otra índole que le dan aún mayor importancia al estudio de las *Leguminosae* venezolanas. Es una familia muy importante desde el punto de vista de la economía de la naturaleza. Por esta razón, su conocimiento es fundamental para poder emprender investigaciones científicas sobre agricultura y conservación de la riqueza del suelo (Bird, y Maramorosch, 1975).

Gran parte de sus especies brindan productos diversos para la vida humana. De ellas se obtienen semillas que han sido base insustituible de la alimentación desde tiempos remotos, como son las habas (*Vicia* L.), lentejas (*Lens* Mill.), frijol (*Phaseolus* L.), soya (*Glycine* Willd.), arvejas (*Pisum* L.), maní (*Arachis* L.), entre otras (García y Forero, 1968). Así mismo, numerosas especies son usadas en medicina convencional y popular o se cultivan con fines decorativos. Otras especies proporcionan maderas finas o de construcción, algunas son forrajeras o tienen usos industriales ya que de ellas se extraen ceras, alcoholes, insecticidas,

sustancias citotóxicas, mucílagos, ácidos orgánicos, taninos, tintes y perfumes. Muchas sirven para proteger el suelo, producir abono orgánico y fijar nitrógeno por medio de las bacterias presentes en los nódulos que se forman en sus raíces (García y Forero, 1968).

Tipuana tipu

Pertenece a la familia Leguminosas (Fabaceae), la forma de la copa es extendida y es de crecimiento lento. Se describe como un árbol cultivado introducido de 8 a 10 metros, tronco de corteza escarchada con presencia de látex rojizo. Su foliolo es sub coreáceo y los frutos samaroides con ala conspicua y uniseminada en su base (Melendez, 2016). (Figura 2).



Figura 2. Árbol *T. tipu*.

Machaerium seemanii

Planta trepadora mediante ramas con garfios, posee Foliolos coreáceos y tallitos pubescentes. Inflorescencia en cortos racimos con flores en botones o prefloraciones. (Meléndez, 2016).

Son plantas trepadoras o lianas con tallos cilíndrico, ramitas con lenticelas marrones, hojas imparipinnadas y alternas, con 3 a 11 folíolos, alternos en el raquis. Los folíolos son asimétricos y miden de 3 a 15 cm de largo y de 1.5 a 8 cm de ancho, lanceolados a ovados, con ápice acuminado, bordes enteros y base redondeada. Los folíolos presentan pelos a lo largo de la nervadura central del envés. También, estípulas persistentes o deciduas, a veces algo espinescentes en los brotes.

Pecíolos de 3 a 5 cm de largo y pulvinados en la base. Presentan inflorescencias en racimos axilares o subterminales. Sus flores son lilas y sus frutos con la semilla basal y un ala en el extremo apical, de 6 a 9 cm de largo y de 1.5 a 2 cm de ancho, a veces cubiertos de pelos seríceos (López y Sánchez, 2001) (Figura 3).



Figura 3. *M. seemannii*.

Machaerium biovulatum.

Arbolito de 4 metros de alto con frutos secos muy madurados, y posee foliolos sub coráceos (Meléndez, 2016).

Entre sus características se encuentran: arboles hermafroditas, perennifolios con la copa irregular, los troncos cilíndricos en sección transversal, sin contrafuertes prominentes, armados con espinas geminadas. La corteza externa es pardo-grisácea, lisa; ocasionalmente con látex rojo. Las hojas alternas, imparipinnadas, con los folíolos alternos, emarginados apicalmente y con los nervios secundarios numerosos, finos y paralelos. Las estipulas espiniformes (que luego quedan remanentes en las ramas y los troncos).

Las inflorescencias son paniculadas, las flores púrpuras, los cálices campanulados, 5-lobulados, las corolas con 5 pétalos, el vexilo ampliamente ovado u orbicular, con 10 estambres. Las legumbres samaroides, indehiscentes, con las valvas reticuladas y ferrugíneo-pubescentes. Se distribuye desde México a Bolivia, Colombia y Venezuela. En bosques húmedos y secos; de 0-1300 m.s.n.m (López y Sánchez, 2001) (Figura 4).



Figura 4. *M. biouvulatum*..

Los mosquitos

Los mosquitos y zancudos son pequeños insectos pertenecientes al Orden Diptera, Familia *Culicidae*, provistos de dos alas funcionales. Son de metamorfosis completa (huevo, larva, pupa, adulto), depositan sus huevos en racimo o aislados en agua de curso lento o estancado, o en lugares donde puedan humedecerse al ocurrir una inundación. La forma y posición de las larvas respecto de la superficie del agua permite diferenciar las especies. Las larvas y las pupas viven en el agua, pero deben emerger a la superficie para respirar. Luego de 4 estadíos larvarios, al cabo de 4 a 10 días, las larvas se transforman en pupas bastante activas. Luego de un día o algunas semanas eclosiona el adulto.

Los mosquitos tienen proboscis penetrante, y son las hembras las que precisan alimentarse de sangre para producir huevos fértiles (obtención de proteína). Después del apareamiento, la hembra pica a su hospedero (humano o animal) y con cada succión de sangre produce entre 100 a 200 huevos. El macho, en cambio, se alimenta de jugo y néctar de plantas, ya que su aparato bucal no está adaptado para succionar sangre. El tiempo de desarrollo de huevo a adulto es de 10 a 14 días. Una de las características importantes de esta especie es la capacidad de esperar condiciones climáticas adecuadas de los huevos, los cuales pueden eclosionar de inmediato o hasta varios años después (García, Gutsevich, 1969).

Hábitos

Los mosquitos y zancudos se encuentran desde los trópicos hasta el ártico. Son la única forma de transmisión de enfermedades tropicales como la malaria, fiebre amarilla, el dengue, fiebre del nilo y otras. Sin embargo, su sola presencia puede ser insoportable por el permanente acoso que provocan las hembras para picar y alimentarse de sangre.

Los principales mosquitos vectores son: zancudos, mosquito del dengue y mosquito de la malaria. Zancudo (*Culex spp.*), vector de la Fiebre del Nilo y Filariasis. Presente en países tropicales y subtropicales, cálidos y templados. Mosquito del Dengue (*Aedes aegypti*), vector de la Fiebre del Dengue y Fiebre Amarilla, presente en países tropicales, subtropicales y cálidos, en todo América, excepto Canadá y Chile Continental, ya que se encuentra en Isla de Pascua. Mosquito de La Malaria (*Anopheles spp.*), vector de la Malaria o Paludismo, enfermedad que anualmente mata en el mundo, alrededor de dos millones de personas, de los cuales un millón son niños. Está presente en África, Medio Oriente y Sur de Asia, En América, desde el Sur de Estados Unidos y toda América Latina (García, Gutsevich, 1969) (Figura 5).



Figura 5. Ciclo de la vida de *Aedes aegypti*.

Manejo de los mosquitos

Un control efectivo de los mosquitos se consigue aplicando medidas de control integrado. Entre las medidas de control se pueden mencionar el manejo del ambiente a través del drenaje de áreas anegadas, métodos físicos como mosquiteros. También los métodos biológicos para el control de *Bacillus turingiensis var. israelensis*, *Bacillus sphaericus*; entre otros está el uso de insecticidas. (Corrales, 2004).

Sitios de cría de mosquitos

La presencia de determinadas condiciones en depósitos de agua favorece el desarrollo de algunas especies de mosquitos. Hay algunas que viven en aguas salobres, otras son de agua dulce y otras crían en aguas totalmente polidas. El estudio de los sitios de cría es importante para poder realizar un efectivo control de los insectos (García, 1977). Se han clasificado en cuatro grupos los criaderos de mosquitos, dividiéndolos principalmente por su naturaleza y la permanencia del agua de los mismos, mencionando las especies que crían en cada una de ellas, los grupos son:

- Naturales Permanentes: que incluye lagunas, ciénagas, cuevas de cangrejos, remansos de ríos, etc.
- Naturales Temporarios: que incluye huecos de árboles, piedras y charcos de agua de lluvia, etc.
- Artificiales Permanentes: donde se encuentran las presas, zanjas, cisternas, canales, etc.
- Artificiales Temporarios: como arrozales, latas, gomas, etc.

(Corrales, 2004).

***Aedes aegypti* L.**

Es una especie diseminada por el hombre por medio del transporte de sus adultos, huevos, larvas o ninfas en barcos, aviones y transportes terrestres. Sus hábitos son netamente antropofílicos y domésticos, con ubicación de sus criaderos en la vivienda o sus alrededores (Consoli y De Olivera, 1994). También, en depósitos de agua, ubicados en objetos o construcciones, como neumáticos, baterías viejas, recipientes de todo tipo, botellas, floreros. Estos le sirven al *Aedes aegypti* para establecer sus criaderos en agua limpia, con bajo contenido orgánico y de sales disueltas, mediante la puesta de huevos en la superficie del recipiente a la altura de la interface agua-aire (Consoli y De Olivera, 1994).

Por otra parte, se ha demostrado que los mosquitos sólo utilizan un espacio estrecho entre la superficie del agua y las zonas más profundas. Esto permite entender su presencia en gran diversidad de recipientes (Corrales, 2004). Además, existe una tendencia de resaltar la importancia de incluir los criaderos llamados subterráneos de esta especie en los programas de vigilancia y control de la misma (Corrales, 2004).

Los huevos, de alrededor de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros (Figura 6), con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de dos a tres días. Con posterioridad a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas de hasta siete meses a un año. La mayor parte de cada postura es de eclosión rápida, mientras un porcentaje reducido constituye los llamados huevos resistentes, inactivos o residuales (Consoli y De Olivera, 1994).

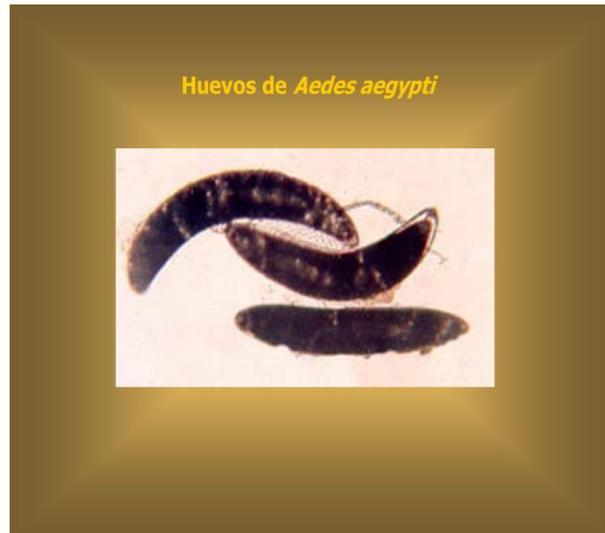


Figura 6. Huevos de *Aedes aegypti*.

Generalmente, después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, este mosquito con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez entre cada postura. Especialmente, si es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre. Las alimentaciones escasas producen menos huevos por lote y una alimentación muy reducida no las produce. Por otra parte, se ha demostrado que *Aedes aegypti* presenta la habilidad de incrementar o disminuir la duración de la alimentación requerida, lo cual viene aparejado con interferencias fisiológicas durante el proceso de la alimentación y consecuentemente aumenta su eficiencia vectorial (Chadee, 1990).

Larva de *Aedes aegypti*.

Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29 °C, en cinco a siete días, estando dotadas de movimientos característicos verticales, entre fondo y superficie. Se disponen en forma de ese (S) durante los mismos. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10 °C, superiores a 42 °C (Chadee, 1990).

La pupa no requiere alimentación y entre 28° y 32 °C completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en uno a tres días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar o acelerar este período (Chadee, 1990) (Figura 7).



Figura 7. Pupa de *Aedes aegypti*.

El ciclo completo del *Aedes aegypti* de huevo a adulto, se completa en óptima temperatura y alimentación en 10 días. El adulto emergente es de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que simulan la forma de una "lira", en el 17 dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas (Hoeck, Ramberg, Merrill, Moll, Agedorn, 2003) (Figura 8).



Figura 8. Adulto de *Aedes aegypti*.

Las hembras hematófagas poseen hábitos de alimentación diurnos, en cercanía a los domicilios humanos, con gran afinidad a la alimentación sobre el hombre. Estudios realizados en Tucson Arizona mostraron en el análisis de la sangre del estómago de hembras que un 80 % de las mismas se alimentaron sobre humanos (Hoeck, Ramberg, Merrill, Moll, Agedorn, 2003). El mosquito *Aedes aegypti* no se aleja mucho de sus criaderos, algunas observaciones hacen suponer que pueden alejarse unos 200 o 300 metros y algunos creen que hasta un kilómetro o más. La distancia de dispersión aceptada para este mosquito es de menos de 150 metros (Chadee, 1990).

Definición Operacional de Términos

Actividad larvicida

Los compuestos utilizados como larvicidas son aquellos que tienen una buena capacidad de matar las formas inmaduras de los mosquitos (Estadío II y IV). El mecanismo de acción de estos compuestos es la inhibición de la formación de quitina. La consecuencia de esta inhibición es que bloquea el ciclo evolutivo del insecto produciendo un efecto letal (Organización Panamericana de la Salud, 2011).

Probóscide

La probóscide del mosquito consiste en un pequeño paquete de estilos largos, ahusados y de alimentación que se denomina colectivamente fascículo. Tiene un labio inferior externo escamoso llamado labio. Durante la alimentación de sangre, sólo el fascículo penetra en la piel mientras que el labio se abrocha para permanecer en la superficie. En su lugar, utiliza los dos maxilares como microcosis de frecuencia variable con dientes de nanoarp para avanzar en el tejido de la piel. Este elegante BMEMS permite al mosquito insertar su fascículo de alimentación en la piel humana utilizando una fuerza extremadamente pequeña (promedio de 16,5 μ N) (Kong, Wu, 2010).

Percolación

Es el proceso por el cual el solvente pasa a través de la planta deshidratada y pulverizada, hasta extracción exhaustiva de las sustancias solubles en él. El paso del solvente se realiza por efecto de la gravedad. El equipo que se usa para el proceso se denomina percolador (Ávila, 2013).

Maceración

Es el proceso en el que el material vegetal se pone en contacto con el solvente, durante varios días con o sin agitación, normalmente a temperatura ambiente. El equipo que se usa para el proceso es un simple tanque de maceración. (Ávila, 2013).

Inflorescencias

Se denomina inflorescencia a aquellos sistemas de ramas de los espermatofitos que están destinados a la formación de flores y se suelen encontrar más o menos claramente delimitados respecto al área vegetativa. Constan de un eje principal llamado raquis que lleva generalmente brácteas en cuyas axilas nacen flores o inflorescencias parciales. El raquis está unido al tallo por el pedúnculo y cada flor está sostenida por el pedicelo. Las inflorescencias pueden ser simples o complejas. Son simples cuando sobre el eje principal nace una flor en la axila de cada bráctea. Son complejas cuando en la axila de la bráctea nace una inflorescencia parcial que lleva a su vez bractéolas o profilos (Marzocca, 1985).

Operacionalización de las variables

El proceso de operacionalización, es importante, durante las fases operativas del proceso de investigación. En tal sentido, Pérez (2009) sugirió que los conceptos abstractos debe transformarse en empíricos para que se puedan identificar los indicadores. Estos permitirán reconocer la presencia de la característica estudiada. Por tal razón se

operacionalizaron el evento de estudio y el criterio de análisis (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad larvica contra larvas de *Aedes aegypti* de las especies de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

1. Variable	2.Tipo de Variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad larvica contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> de las especies de <i>T. tipu</i> , <i>M. seemannii</i> y <i>M. biovulatum</i> .	Dependiente Discreta.	La actividad larvica de un compuesto se refiere a la muerte de la larva durante las primeras 24 horas de interacción.
4.Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Inndicadores
La actividad larvica se mide a través de la ausencia de movilidad de las larvas.	Ausencia de morbilidad larvaria. Sobrevivencia larvaria.	Larva de <i>Aedes aegypti</i> en estadio II y IV sin movilidad a las 12 o 24 horas de incubación con el extracto.

Chacón, Luces, Meléndez y Hernández, 2017.

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Concentración del extracto de las especies de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

1. Variable	2.Tipo de Variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Concentración del extracto de las especies de <i>T. tipu</i> , <i>M. seemannii</i> y <i>M. biovulatum</i> .	Independiente Discreta	Es el producto purificado después de la interacción del material molido de una planta con un solvente alcohólico u acuoso.
4.Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicadores
El extracto se mide en cuanto a la concentración del presente y se puede diluir para analizar varias concentraciones.	.Concentración del extracto: .Concentración menor 200 mg. .Concentración de 200-300 mg. .Concentración mayor de 300 mg.	Miligramos del extracto de cada especie.

Chacón, Luces, Meléndez y Hernández, 2017.

Sistema de Hipótesis

Afirmativa

- Existe actividad larvicida contra las larvas de *Aedes aegypti* en las plantas de la tribu *Dalbergiae-Leguminosae*, especies *T. tipu*, *M. seemanni* y *M. biovulatum*, durante el periodo 2015-2016.

Nula

- No Existe actividad larvicida contra las larvas de *Aedes aegypti* en las plantas de la tribu *Dalbergiae-Leguminosae*, especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, durante el periodo 2015-2016.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación se refiere al grado de profundidad con la que se aborda un objeto o fenómeno de estudio (Hernández, Fernández, y Baptista, 2010). Además, Hurtado (2010) ha referido que existen diez tipos de investigación: descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Específicamente, la investigación confirmatoria considera la relación de causa-efecto entre dos variables. Por lo tanto, esta investigación fue de tipo confirmatoria ya que se intentó confirmar la actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* de las plantas de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), en las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

Diseño de la investigación

El diseño de la investigación se refiere a dónde y cuándo se recopila la información, así como, la amplitud de la información a recolectar, de modo que se pueda dar respuesta a la pregunta de investigación de la forma más idónea posible (Hurtado, 2010). En la presente investigación el diseño fue de laboratorio y de tipo experimental, ya que los datos fueron recolectados en el Laboratorio "A" de productos naturales del Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, y se manipuló la concentración del extracto. Respecto al cuándo el diseño fue

Evolutivo y contemporáneo, ya que el dato fue recolectado en el presente y a las 12 y 24 horas de interacción de las larvas de *Aedes aegypti* con la concentración del extracto. En relación a la amplitud de la información a recolectar el diseño fue bivariable, bicategorico y multicategorico, pues el evento de estudio estuvo conformado por una variable dependiente y una variable independiente, las cuales presentaron dos categorías y más categorías respectivamente.

Población y muestra

Unidad de investigación

La unidad de investigación estuvo representada por las larvas de *Aedes aegypti* en las que se verificó la actividad larvicida de los extractos de las plantas de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), en las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. Estas larvas fueron cultivadas en los alrededores del Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra estuvo representado por 400 larvas de *Aedes aegypti* en estadio II y IV. Las larvas fueron distribuidas en grupos de 10 para cada uno de los ensayos que se realizaron. Específicamente, se distribuyeron 10 larvas de *Aedes aegypti* para el ensayo de cada una de las especies: *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.. Finalmente, el tamaño de la muestra no fue probabilístico.

Sistema de Variables

Las variables fueron sistematizadas en dependiente e independiente. La variable dependiente fue: actividad larvívica de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, la cual presentó dos categorías (ausencia de motilidad larvária, sobrevivencia larvária) .Variable independiente fue: concentraciones del extracto de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, la cual presentó tres categorías (menor 200 mg, 200-300 mg, mayor de 300 mg).

Procedimientos de la investigación

Obtención del extracto de las especies T. tipu, M. seemannii y M. biovulatum.

Se recolectaron muestras vegetales de las especies de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), tales especies fueron: *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, en el estado Mérida, las cuales fueron procesadas y preservadas en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo los números de colección o vouchers 643, 646 y 645 respectivamente, cuya colector principal es P. Meléndez, y la identificación taxonómica fue realizada por el Dr. Pablo Meléndez. Posteriormente, se limpiaron y se separaron las partes aéreas (hojas y flores) y los tallos (Figura 9,10 y 11). Se procedió al secado en la estufa durante 72 horas y luego se molieron las hojas empleando un molino de alta velocidad GRINDOMIX GM 200 de cuchillas y se pasaron por una malla con un diámetro de orificio de 0,5 mm; para que las pequeñas partículas tuviesen mayor superficie de contacto con el solvente. Finalmente, se utilizaron 6,5 g, 7,8 g y 8 g de las hojas molidas de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* respectivamente.



Figura 9. Tallos y hojas recolectadas de *T. tipu*.



Figura 10. Tallos y hojas recolectadas de *M. semanni*.



Figura 11. Tallos y hojas recolectadas de *M. biovulatum*.

Extracto Hexanólico

Las hojas se maceraron en hexano durante 48 horas, transcurrido este tiempo se filtraron para extraer la fracción líquida. Este procedimiento se repitió tres veces para obtener el filtrado total. La mezcla de estos tres filtrados (filtrado total), se procedió a colocarla en el rotaevaporador, donde se concentró por presión reducida a una temperatura no mayor de 50°C hasta extraer completamente el solvente y así obtener el concentrado de cada especie (Tabla 3).

Extracto Acetónico

Para este extracto se utilizó el sólido sobrante de la filtración con hexano, al cual se le agregó una solución de acetona. Después de 48 horas se procedió a realizar la filtración por tres veces hasta obtener el filtrado total. Posteriormente, el filtrado fue colocado en el rotaevaporador, donde se concentró por presión reducida a una temperatura no mayor de 50 °C hasta extraer completamente el solvente y así obtener el concentrado de *T. tipu*. Para las especies *M. seemanni* y *M. biovulatum* el solvente empleado fue de Diclorometano debido a que no se disponía de suficiente cantidad de Acetona en el Laboratorio, y estos presentan la misma polaridad (Tabla 3).

Extracto Etanólico

Para dicho procedimiento se utilizó el sólido sobrante de la filtración con acetona y diclorometano, al cual se le agregó una solución de etanol. Después de 48 horas se procedió a realizar la filtración por tres veces hasta obtener el filtrado total. Posteriormente, el filtrado fue colocado en el rotaevaporador hasta extraer completamente el solvente y así obtener el concentrado de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. (Tabla 3).

Los tres concentrados obtenidos de los extractos de las especies, *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, fueron trasvasados a frascos estériles y llevados a la estufa durante 48 horas para obtener un completo secado. Posteriormente, a estos extractos concentrados se les agregó una dilución de Dimetilsulfóxido (DMSO) para proceder con la actividad larvicida.

Tabla 3. Miligramos de los extractos obtenidos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* con diferentes solventes.

Planta	Solvente	Extracto obtenido
• <i>Tipuana tipu</i> (6.5g)	Hexano	1,07 g
	Etanol	1,21g
	Acetona	1,11g
• <i>Machaerium seemanni</i> (7.8g)	Hexano	1,05g
	Diclorometano	1,19g
	Etanol	1,02g
• <i>Machaerium biovulatum</i> (8g)	Hexano	0,98g
	Diclorometano	0,78g
	Etanol	1,02g

Cultivo Larvario de *Aedes aegypti*

Las larvas fueron cultivadas en recipientes con agua potable, los cuales fueron colocados en ambientes adecuados para el desarrollo larvario, ubicados en los alrededores del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de Los Andes. Las larvas fueron transportadas al laboratorio de microbiología “Dra. Celina Araujo” en el edificio de microbiología de dicha Facultad. Luego las larvas se colocaron en agua destilada por al menos 20 horas a temperatura ambiente. Para los ensayos se seleccionaron aquellas larvas que estaban entre el

Estadío II y Estadío IV de desarrollo, ya que en estas etapas muestran menor resistencia a los larvicidas. Además, es la última etapa larvaria en la que toman alimento antes de surgir la pupa y el insecto adulto.

Ensayo de la actividad larvicida contra las larvas de *Aedes aegypti* de los extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

Análisis preliminar de la actividad larvicida

200 mg del extracto de cada una de las especies se resuspendieron en Dimetilsulfóxido. Luego 1 mL se diluyó en 19 mL de agua destilada en tubos de vidrio 19 X 200 mm, obteniendo un volumen final de 20 mL. Previamente, las larvas viables de *Aedes aegypti* se colocaron en agua destilada “over night” y a temperatura ambiente para eliminar el factor manipulación. Seguidamente en la mañana se colocaron 10 larvas en cada tubo a temperatura ambiente. El procedimiento se realizó por triplicado (extracto etanólico, acetónico, hexánico, diclorometánico). El control positivo estuvo representado por la colocación de las larvas viables en un tubo con Dimetilsulfóxido a una concentración mayor de la que podrían tener los extractos residuales (3 mL de DMS con 17 mL de agua destilada). El control negativo estuvo representado por las larvas viables colocadas en un tubo con 20mL agua destilada. La observación del criterio de análisis representado por la motilidad de las larvas se realizó a las 12 y 24 horas. La ausencia de motilidad de las larvas se interpretó como actividad larvicida positiva.

Análisis de la potencia larvicida de los extractos

Entre 306 y 369 mg/mL del extracto de cada una de las especies se resuspendieron en Dimetilsulfóxido. Previamente, las larvas viables de *Aedes aegypti* se colocaron en agua destilada “over night” y a

temperatura ambiente para eliminar el factor manipulación. Luego, se dispensaron 1650 μL de la solución de cada extracto (etanólicos, acetónicos, diclorometánicos, hexanoicos) en los tubos de ensayo respectivos, y se agregaron 10 larvas viables de *Aedes aegypti* que reposaron toda la noche en agua destilada (tiempo inicial del ensayo). Además, se prepararon el control positivo y negativo para la actividad larvicida. La observación del criterio de análisis representado por la motilidad de las larvas se realizó a las 12 y 24 horas. La ausencia de motilidad de las larvas se interpretó como actividad larvicida positiva. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo de la sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en los extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

Análisis de la sobrevivencia de las larvas de Aedes aegypti en el extracto de la especie Tipuana tipu (Benth.) Kuntze

190 mg/mL, 198 mg/mL y 226 mg/mL de los extractos etanólico, acetónico y hexanólico, respectivamente se resuspendieron en Dimetilsulfóxido. Luego, se dispensaron 1650 μL de la solución de cada extracto (etanólicos, acetónicos, hexanoicos) en los tubos de ensayo respectivos, y se realizaron 2 diluciones (1/100 y 1/1000). Posteriormente, se colocaron 10 larvas viables de *Aedes aegypti* en los tubos de las dos diluciones realizadas. La observación del criterio de análisis representado por la presencia de motilidad de las larvas se realizó a las 12 y 24 horas. La presencia de motilidad de las larvas se interpretó como sobrevivencia larvicida positiva. También se determinó la dosis letal 50 utilizando el programa estadístico PROBIT ANALISIS. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis de la sobrevivencia de las larvas de Aedes aegypti en el extracto de la especie M. seemanni.

181 mg/mL, 185 mg/mL y 194 mg/mL de los extractos etanólico, diclorometánico y hexanóico, respectivamente se resuspendieron en Dimetilsulfóxido. Luego, se dispensaron 1650 µL de la solución de cada extracto (etanólicos, diclorometánico, hexanóicos) en los tubos de ensayo respectivos, y se realizaron 2 diluciones con agua destilada (1/100 y 1/1000). Posteriormente, se colocaron 10 larvas viables de *Aedes aegypti* en los tubos de las dos diluciones realizadas. La observación del criterio de análisis representado por la presencia de motilidad de las larvas se realizó a las 12 y 24 horas. La presencia de motilidad de las larvas se interpretó como sobrevivencia larvicida positiva. También se determinó la dosis letal 50 utilizando el programa estadístico PROBIT ANALISIS Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis de la sobrevivencia de las larvas de Aedes aegypti en el extracto de la especie M. biovulatum.

180 mg/mL, 203 mg/mL y 211 mg/mL de los extractos etanólico, diclorometánico y hexanóico respectivamente, se resuspendieron en Dimetilsulfóxido. Luego, se dispensaron 1650µL de la solución de cada extracto (etanólicos, diclorometánico, hexanóicos) en los tubos de ensayo respectivos, y se realizaron 2 diluciones con agua destilada (1/100 y 1/1000). Posteriormente, se colocaron 10 larvas viables de *Aedes aegypti* en los tubos de las dos diluciones realizadas. La observación del criterio de análisis representado por la presencia de motilidad de las larvas se realizó a las 12 y 24 horas. La presencia de motilidad de las larvas se interpretó como sobrevivencia larvicida positiva. También se determinó la dosis letal 50 utilizando el programa estadístico PROBIT ANALISIS Los ensayos se realizaron por triplicado.

Diseño de análisis

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación fueron expresados numéricamente. Por eso, el enfoque de análisis fue cuantitativo, tal como lo refirieron Palella y Martins (2010). Para tal efecto, el diseño fue bivariado, bicategorico y multicategorico. El análisis se realizó a través de estadísticos descriptivos como frecuencias absolutas y relativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Los datos recolectados sobre la actividad larvica de los extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, fueron sistematizados en tablas y gráficos. Posteriormente, se interpretaron utilizando el criterio de análisis representado por la presencia de motilidad de las larvas a las 12 y 24 horas, en el laboratorio “Dra. Celina Araujo” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti a las 12 y 24 horas del ensayo con 200 mg de los extractos de T. tipu, M. seemannii y M. biovulatum.

En el ensayo con 200 mg de cada uno de los extractos por separado, las larvas mantuvieron su motilidad. Por lo tanto, no hubo mortalidad larvaria en ninguno de los tubos con los extractos (Tabla 4).

Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti a las 12 y 24 horas del ensayo con 330, 320 y 369 mg de los extractos de T. tipu.

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. La mortalidad de las larvas incubadas en 330mg del extracto etanólico fue: 40 % a las 12 horas y 50 % a las 24 horas de incubación. La mortalidad de las larvas incubadas en 320mg del extracto acetónico fue: 60 % a las 12 horas y 80 % a las 24 horas de incubación.

La mortalidad de las larvas incubadas en 369 mg del extracto hexanóico fue: 40 % a las 12 horas y 40 % a las 24 horas de incubación. La mayor mortalidad se observó a las 24 horas con el extracto acetónico (Figura 12).

Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti a las 12 y 24 horas del ensayo con 306, 313 y 325 mg de los extractos de M. seemanni.

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. La mortalidad de las larvas incubadas en 306 mg del extracto etanólico fue: 70 % a las 12 horas y 80 % a las 24 horas de incubación. La mortalidad de las larvas incubadas en 313 mg del extracto diclorometánico fue: 80 % a las 12 horas y 80 % a las 24 horas de incubación. La mortalidad de las larvas incubadas en 325 mg del extracto hexanóico fue: 60 % a las 12 horas y 60 % a las 24 horas de incubación. La mayor mortalidad se observó a las 24 horas con el extracto diclorometánico (Figura 13).

Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti a las 12 y 24 horas del ensayo con 306, 338 y 349 mg de los extractos de de M. biovulatum.

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. La mortalidad de las larvas incubadas en 306 mg del extracto etanólico fue: 60 % a las 12 horas y 70 % a las 24 horas de incubación. La mortalidad de las larvas incubadas en 338 mg del extracto diclorometánico fue: 80 % a las 12 horas y 80 % a las 24 horas de incubación. La mortalidad de las larvas incubadas en 349 mg del extracto hexanóico fue: 40 % a las 12 horas y 50 % a las 24 horas de incubación. La mayor mortalidad se observó a las 24 horas con el extracto diclorometánico (Figura 14).

Sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *T. tipu*.

La sobrevivencia de las larvas fue categorizada en tiempo (T0 y T1), y en diluciones (1/100 y 1/1000). La sobrevivencia observada de las larvas en el extracto *T. tipu* en T0 fue de 10 larvas al inicio del ensayo. Mientras que la sobrevivencia en T1 (24 horas del ensayo) fue: dilución 1/100 del extracto etanólico (198 mg/mL) 2 larvas conservaron la motilidad, extracto acetónico (190 mg/mL) 4 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico (226 mg/mL) 1 larva conservó la motilidad; Dilución 1/1000 del extracto etanólico 6 larvas conservaron la motilidad, extracto acetónico 8 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico 7 larvas conservaron la motilidad. La dosis letal 50 obtenida fue 0,065, 0,15, 0,95 mg/mL para los extractos etanólicos, acetónicos y hexanólicos, respectivamente. La mayor sobrevivencia se observó a las 24 horas con el extracto acetónico utilizado en la dilución 1/1000 (Tabla 5).

Sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *M. seemanni*.

La sobrevivencia de las larvas fue categorizada en tiempo (T0 y T1), y en diluciones (1/100 y 1/1000). La sobrevivencia observada de las larvas en el extracto *M. seemanni* en T0 fue de 10 larvas al inicio del ensayo. Mientras que la sobrevivencia en T1 (24 horas del ensayo) fue: dilución 1/100 del extracto etanólico (181 mg/mL) 3 larvas conservaron la motilidad, extracto diclorometánico (185 mg/mL) 5 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico (194 mg/mL) 4 larvas conservaron la motilidad; Dilución 1/1000 del extracto etanólico 10 larvas conservaron la motilidad, extracto diclorometánico 8 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico 7 larvas conservaron la motilidad. La dosis letal 50 obtenida fue 0,14, 0,185, 0,139 mg/mL para los extractos etanólicos, diclorometánicos y hexanólicos, respectivamente. La mayor sobrevivencia

se observó a las 24 horas con el extracto etanólico utilizado en la dilución 1/1000 (Tabla 6).

Sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *M. biovulatum*.

La sobrevivencia de las larvas fue categorizada en tiempo (T0 y T1), y en diluciones (1/100 y 1/1000). La sobrevivencia observada de las larvas en el extracto *M. biovulatum* en T0 fue de 10 larvas al inicio del ensayo. Mientras que la sobrevivencia en T1 (24 horas del ensayo) fue: dilución 1/100 del extracto etanólico (180 mg/mL) 3 larvas conservaron la motilidad, extracto diclorometánico (203 mg/mL) 0 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico (211 mg/mL) 3 larvas conservaron la motilidad; Dilución 1/1000 del extracto etanólico 9 larvas conservaron la motilidad, extracto diclorometánico 8 larvas conservaron la motilidad, extracto hexanólico 6 larvas conservaron la motilidad. La dosis letal 50 obtenida fue 0,10, 0,09, 0,085 mg/mL para los extractos etanólicos, diclorometánicos y hexanólicos, respectivamente. La mayor sobrevivencia se observó a las 24 horas con el extracto etanólico utilizado en la dilución 1/1000 (Tabla 7).

Tabla 4. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* a las 12 y 24 horas del ensayo con 200 mg de los extractos de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

Extractos de <i>Tipuana tipu</i>	%Mortalidad 12h	%Mortalidad 24h
Hexano	0%	0%
Acetona	0%	0%
Etanol	0%	0%
Extractos de <i>Macherium seemanni</i>	%Mortalidad 12h	%Mortalidad 24h
Hexano	0%	0%
Diclorometano	0%	0%
Etanol	0%	0%
Extractos de <i>Macherium biovulatum</i>	%Mortalidad 12h	%Mortalidad 24h
Hexano	0%	0%
Diclorometano	0%	0%
Etanol	0%	0%

Cada extracto fue resuspendido en 1000 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. La cantidad de cada extracto utilizado para este ensayo fue 200 mg. No se observó mortalidad de las larvas incubadas con los diferentes extractos a las 12 y 24 horas de incubación.

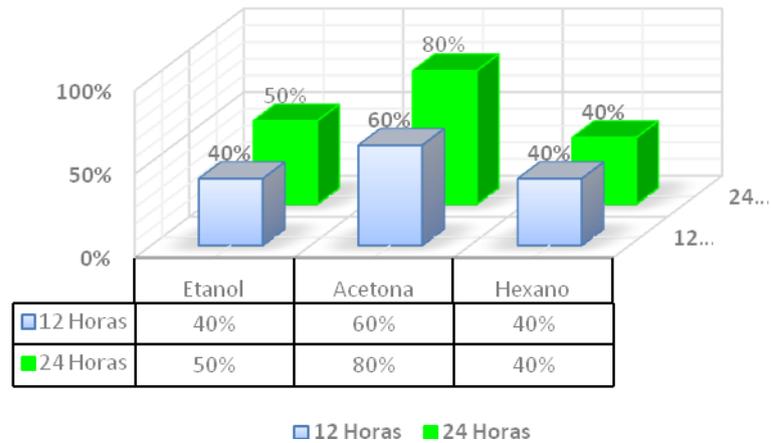


Figura 12. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* a las 12 y 24 horas del ensayo con el extracto de *T. tipu*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. Las cantidades del extracto utilizado para este ensayo fueron: 330 mg (extracto etanólico), 320 mg (extracto acetónico), 369 mg (extracto hexanólico). La mortalidad de las larvas fue mayor con el extracto acetónico a las 24 horas de incubación.



Figura 13. Distribución porcentual de la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* a las 12 y 24 horas del ensayo con el extracto de *M. seemanni*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

www.bdigital.ula.ve

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. Las cantidades del extracto utilizado para este ensayo fueron: 306 mg (extracto etanólico), 313 mg (extracto diclorometánico), 325 mg (extracto hexanólico). La mortalidad de las larvas fue mayor con el extracto diclorometánico a las 24 horas de incubación.

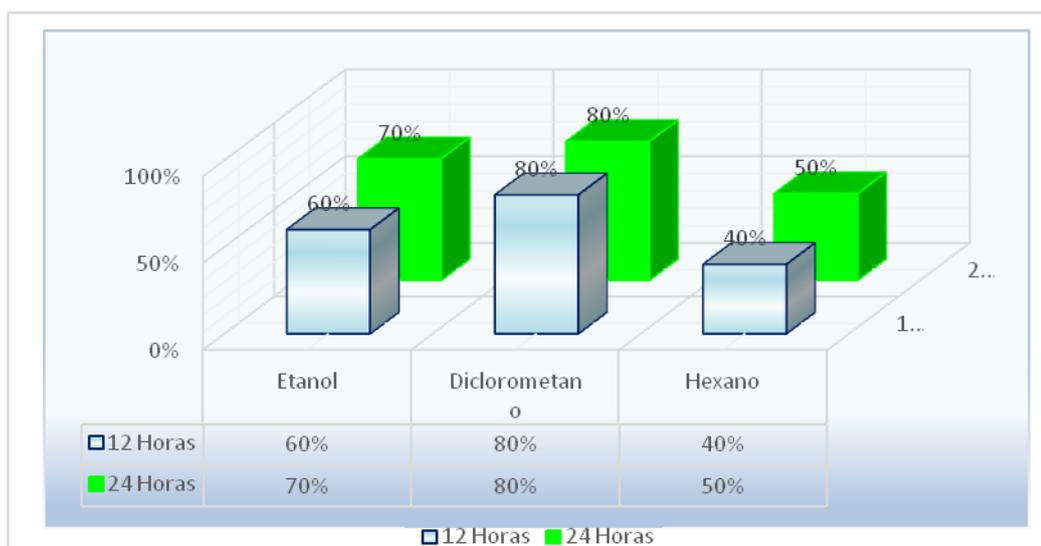


Figura 14. Porcentaje de Mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* incubadas con el extracto de la especie *M. biovulatum*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

El extracto fue resuspendido en 1650 μ L del disolvente orgánico Dimetilsulfóxido. Las cantidades del extracto utilizado para este ensayo fueron: 306 mg (extracto etanólico), 338 mg (extracto diclorometánico), 349 mg (extracto hexanólico). La mortalidad de las larvas fue mayor con el extracto diclorometánico a las 24 horas de incubación.

Tabla 5. Supervivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *T. tipu*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

Extracto de <i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze					
	Supervivencia				
Solvente	T0 Dilución 1/100	T1 Dilución 1/100	T0 Dilución 1/1000	T1 Dilución 1/1000	DL 50 (mg/mL)
Etanol: 198 mg/mL	10	2	10	6	0,065
Acetona: 190 mg/mL	10	4	10	8	0,15
Hexano: 226 mg/mL	10	1	10	7	0,095

Nota. T0 : tiempo inicial; T1: tiempo final (24 horas).

El ensayo se realizó con 10 larvas viables en el tiempo inicial y dos diluciones (1/100, 1/1000). Luego se observó en T1 la presencia de motilidad de las larvas, la cual fue mayor en la dilución 1/1000. Las concentraciones del extracto utilizadas fueron menores a 300 mg/mL (P/V), ya que los ensayos revelaron que en cantidades mayores la letalidad aumenta.

Tabla 6. Supervivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *M. seemanni*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

Extracto de <i>Machaerium seemanni</i> Benth. ex Seem.					
Solvente	Supervivencia				DL 50 (mg/mL)
	T0 Dilución 1/100	T1 Dilución 1/100	T0 Dilución 1/1000	T1 Dilución 1/1000	
Etanol: 181 mg/mL	10	3	10	10	0,14
DCM: 185 mg/mL	10	5	10	8	0,185
Hexano: 194 mg/mL	10	4	10	7	0,139
DCM: Diclorometano					

Nota. T0 : tiempo inicial; T1: tiempo final (24 horas).

www.bdigital.ula.ve

El ensayo se realizó con 10 larvas viables en el tiempo inicial y dos diluciones (1/100, 1/1000). Luego se observó en T1 la presencia de motilidad de las larvas, la cual fue mayor en la dilución 1/1000. Las concentraciones del extracto utilizadas fueron menores a 300 mg/mL (P/V), ya que los ensayos revelaron que en cantidades mayores la letalidad aumenta.

Tabla 7. Supervivencia de las larvas de *Aedes aegypti* en el extracto de *M. biovulatum*. Laboratorio “Dra Celina Araujo”. Período 2015-2017.

Extracto de <i>Machaerium biovulatum</i> Micheli.					
	Supervivencia				
Solvente	T0 Dilución 1/100	T1 Dilución 1/100	T0 Dilución 1/1000	T1 Dilución 1/1000	DL 50 (mg/mL)
Etanol: 180 mg/mL	10	3	10	9	0,1
DCM: 203 mg/mL	10	0	10	8	0,09
Hexano: 211 mg/mL	10	3	10	6	0,085
DCM: Diclorometano					

Nota. T0 : tiempo inicial; T1: tiempo final (24 horas).

El ensayo se realizó con 10 larvas viables en el tiempo inicial y dos diluciones (1/100, 1/1000). Luego se observó en T1 la presencia de motilidad de las larvas, la cual fue mayor en la dilución 1/1000. Las concentraciones del extracto utilizadas fueron menores a 300 mg/mL (P/V), ya que los ensayos revelaron que en cantidades mayores la letalidad aumenta.

Discusión

En esta investigación bivariable, bicategorica y multicategorica se pretendió confirmar la actividad larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* de las plantas de la tribu *Dalbergiae* Bronn ex DC. (*Papilionoideae-Leguminosae*), en las *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.. Para tal efecto se realizaron ensayos experimentales y posteriormente se analizaron los datos a través de estadísticos descriptivos.

El porcentaje de larvas muertas de *Aedes aegypti* incubadas, a temperatura ambiente, con 200 mg del extracto de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. fue de 0 % a las 12 y 24 horas de incubación. No se encontró ninguna referencia de otros autores que sustentara este hallazgo. Sin embargo, Gómez (2015), aunque con 50 ppm de otro tipo de extracto (*Carica papaya*) observó 0 % de mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti*. Este resultado con la concentración de 200 mg del extracto (etanólico, acetónico/diclorometánico, hexanólico) de las especies estudiadas vehiculizado con dimetilsulfóxido mostró ausencia de actividad larvicida, probablemente porque no tiene suficiente cantidad de componentes orgánicos para matar las larvas. Aunque también es posible que las larvas presentaran actividad de la esterasa y de glutatión-S-transferasa, las cuales inactivarían los componentes larvicidas del extracto, tal como lo divulgaron Rodríguez, Bisset y Fernández (2007). Por lo tanto, los autores de esta investigación realizaron otros ensayos biodirigidos con otras concentraciones.

Con el aumento de la concentración del extracto de *T. tipu*, a partir de 320 mg hasta 369 mg, en el medio de reacción para la actividad larvicida, los investigadores observaron 40 y 60% de mortalidad de la larvas a las 12 horas de exposición. Específicamente, los 320mg del extracto acetónico lograron 60 % de mortalidad a las 12 horas; este hallazgo permitió considerar que existe una relación sinérgica entre la concentración del extracto y el tipo de solvente. De manera similar, Gómez (2015) encontró que el incremento de la cantidad del extracto

etanólico aumentó la mortalidad en 20 % a las 24 horas de incubación, adicionalmente, el tiempo de exposición (48 horas) aumentó la actividad larvicida. El extracto hexanólico fue el que obtuvo el rendimiento menor en cuanto a la actividad larvicida, con una concentración mayor (369 mg), tanto a las 12 horas como a las 24 horas de exposición, lo cual estimula a considerar la polaridad de este solvente con respecto a la de los componentes del extracto. Ante estos hallazgos confrontados, los investigadores consideraron que las concentraciones mayores de 200 mg del extracto y la polaridad del tipo de solvente, como en el caso de la acetona, son importantes para la actividad larvicida.

Con la especie *M. seemanni*, las concentraciones mayores a 200 mg mostraron que el extracto hexanólico fue de menor rendimiento (60 y 60%) de la actividad larvicida a las 12 y 24 horas, respectivamente. Esto coincidió con el bioensayo realizado con el extracto hexanólico de *T. tipu*. Sin embargo, la actividad larvicida fue mayor (80 %) con el extracto diclorometánico, parecido al acetónico de *T. tipu*, aunque a las 24 horas no causó el deceso de todas las larvas, ya que 20 % de las cepas larvianas conservaron la motilidad. En cuanto al extracto etanólico, en esta especie, fue el segundo en rendimiento de la actividad larvicida, sin embargo, Parra-Henao (2007) encontró buen efecto insecticida aunque en cepas de laboratorio (Rockefeller) y en otra especie; lo interesante es que aparentemente el etanol presenta una buena polaridad para extraer fracciones polares bioactivas.

Resultados parecidos se obtuvieron con la especie *M. biovulatum*, con concentraciones del extracto mayores a 200 mg, siendo el extracto hexanólico el de menor rendimiento (40 y 50 %) de la actividad larvicida a las 12 y 24 horas, respectivamente. Esto coincidió con el bioensayo realizado con el extracto hexanólico de *T. tipu*. En este ensayo la actividad larvicida fue mayor (80 %) con el extracto diclorometánico, parecido al acetónico de *T. tipu*, sin embargo, a las 24 horas no causó el deceso de todas las larvas.

El extracto etanólico es el segundo en rendimiento de la actividad larvicida de la especie *M. biovulatum*, sin causar el 100 % de mortalidad a las 24 horas, lo cual no coincide con el hallazgo de Arana (2002) quién sí encontró mortalidad de 100 % de las larvas de *Aedes aegypti* con un extracto etanólico aunque de otra especie (*Tilandsia yunckeri*). El tiempo de exposición al extracto aumentó la actividad larvicida en el caso del etanol y el hexano, sin que mejorara el rendimiento respecto al extracto diclorometánico; este hallazgo coincide con lo reportado por Albrech y Alonso (2015), quienes encontraron que el tiempo de incubación con el extracto aumentó la tasa de mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti*. Por lo tanto, la concentración mayor de 200 mg del extracto etanólico y hexanólico produce mortalidad de las larvas pero no incrementa el porcentaje cuando se aumenta de 306 mg a 349 mg. Sin embargo, el tiempo de exposición sí incrementa la tasa de mortalidad cercana al 80 % en el caso del extracto etanólico.

En los bioensayos realizados con los extractos de las especies de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*, los autores de esta investigación observaron que existió una relación directamente proporcional de la sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* con el aumento de la dilución del extracto (etanólico, acetónico/diclorometánico, hexanólico). En tal sentido, el número de larvas que sobrevivieron aumentó en la dilución 1/1000 con respecto a la de 1/100. No se encontró ningún trabajo previo relacionado con la variable dilución del extracto y su relación con la sobrevivencia de las larvas. Sin embargo, se podría especular que en el caso de la mayor dilución, la fracción polar extraída del extracto podría tener grupos funcionales saturados con el solvente de dilución, lo cual disminuiría la acción insecticida.

Respecto a la DL50 de los extractos de las diferentes especies analizadas en los bioensayos, los autores de esta investigación encontraron que a mayor concentración de los extractos de *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. se requirió menor concentración para el deceso del 50 % de las cepas larvarias. Amariles, Garcia y Parra (2013)

encontraron que las cepas larvianas de *Aedes aegypti* requirieron una DL50 mayor del extracto en cepas salvajes que en las de referencia. Mientras que en las cepas salvajes de esta investigación probablemente sería igual, sí se comparara con cepas de referencia. Además, es importante considerar que en esta investigación se analizaron las hojas de las especies mencionadas y no las semillas, ya que algunos autores han referido que estas últimas por ser órganos de reserva tienen mayor concentración de los metabolitos secundarios y fitoconstituyentes tóxicos para las larvas (Agrela, Hidalgo y Herrera, 2014).

Es importante señalar que la DL50 es muy relevante sobretodo en las cepas salvajes ya que éstas están bajo la presión selectiva de los insecticidas sintéticos. Por lo tanto, pueden desarrollar mecanismos de resistencia relacionados con la actividad de esterasa y de glutathion-S-transferasa (Rodríguez y cols, 2007). También, esta DL50 debe ser la menor posible para evitar los efectos secundarios en la población tales como reacciones alérgicas en niños y adultos que tienen contacto con el insecticida. Entre otros aspectos se evitaría eliminar el depredador natural de *Aedes aegypti*, representado por el mosquito no hematófago *Toxorhynchites* (Sanabria y cols, 2009). Indudablemente, estas consideraciones son relevantes para elaborar los planes de control de las enfermedades transmitidas por vectores, tales como *Aedes aegypti*.

En resumen, esta investigación reveló que los extractos de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum* tienen actividad larvicida contra las cepas larvianas de *Aedes aegypti*. También que es importante considerar el tipo de solvente utilizado para la extracción. En tal sentido, sería interesante realizar nuevas investigaciones en las cuales se incluyan cepas larvianas de referencia y salvajes, en la que además se determine la DL50 y DL90.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Las características morfológicas de las larvas fueron sugestivas de del estadio II y IV de *Aedes aegypti*, las cuales revelaron motilidad en el control negativo y mortalidad en el control positivo.
- La correspondencia entre el extracto de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*. y la concentración larvicida fue evidente a partir de concentraciones mayores a 200 mg/mL en los bioensayos realizados.
- La mortalidad de las larvas fue mayor en los extractos acetónicos y diclorometánicos que en los etanólicos y hexanólicos; revelando hasta un 80% de efecto larvicida a las 24 horas.
- La sobrevivencia de las larvas de *Aedes aegypti* fue directamente proporcional a la dilución del extracto.
- La mortalidad de las cepas de *Aedes aegypti* fue verificada con una DL50 inversamente proporcional a la concentración de los extractos (etanólico, acetónico/diclorometánico, hexanólico) de las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum*.

Recomendaciones

Las recomendaciones se realizan después de finalizadas las fases operativas del proceso de investigación. Al respecto Hurtado (2010), aclaró que las recomendaciones derivan de las limitaciones encontradas durante la investigación. A continuación se mencionan:

- Durante la fase analítica-comparativa-explicativa no se encontraron suficientes trabajos previos para sustentar esta investigación. Por lo tanto, los autores de esta indagatoria recomiendan dinamizar la divulgación de las fuentes primarias con el fin de que estén disponibles para otros investigadores.
- Ante la limitación económica para comprar un reactivo si no hay suficiente cantidad, es conveniente considerar las propiedades fisicoquímicas afines de otros compuestos con el fin de sustituirlo y mantener la viabilidad de la investigación.
- Los ensayos preliminares de laboratorio, cuando se analiza la actividad de un compuesto, son una buena opción para definir las otras estrategias que se pueden implementar con el fin de asegurar el máximo rendimiento de los reactivos utilizados, así como, del tiempo de investigación.
- Es conveniente realizar otras investigaciones que permitan identificar fitoquímicos específicos con actividad contra las larvas de *Aedes aegypti* en las especies *T. tipu*, *M. seemannii* y *M. biovulatum.*, con el fin de estandarizar su uso y promocionarlo con fines epidemiológicos. Pues, *Aedes aegypti* es un vector para la transmisión del virus del dengue, cuya transmisión a los humanos fomenta un problema de salud pública.
- Los autores de esta investigación recomiendan realizar un análisis de correspondencia múltiple a los datos obtenidos, asignando como variable de referencia a la actividad larvicida en relación con las otras características: concentración del extracto, polaridad del solvente,

dilución de la muestra, DL50 y sobrevivencia. El fin es medir descriptivamente la tendencia de la actividad larvicida en correspondencia con las características seleccionadas. La realización de este análisis permitiría continuar esta línea de indagación con una nueva investigación.

- Indagar a posterior posibles datos que infieran o aporten sobre relaciones sistemáticas o filogenéticas de especies de esta tribu respecto a esta actividad larvicida.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albrech, A. y Alonso, J. (2015). *Efectos larvicidas de extractos vegetales acuosos sobre el Aedes Aegypti*. Revista sobre estudios e investigaciones del saber académico. 9 (9), 18-22. Recuperado en 12 de abril de 2016, de <http://publicaciones.uni.edu.py/index.php/eisa/article/view/84/67>.
- Agrela, I., Hidalgo, Y., Herrera, F. (2014). Efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de Persea americana (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bol. Mal. Salud Amb*, LIV (2): 199-207.
- Amariles-Barrera S., García C., Parra-Henao G. (2013) *Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de Aedes aegypti, Diptera: Culicidae*. *Rev CES Med*. 27(2):193-203.
- Arana, S. (2002). *Determinación de la actividad larvicida de 18 especies de plantas detectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala*. (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Arias, F. (1999). *El proyecto de Investigación, guía para su elaboración*. 3era edición. Editorial Episteme. Caracas 19-25.
- Ávila, M. (2013) *Extractos y tinturas*. Labfarve Extractos Vegetales. Recuperado de: http://www.biocomerciocolombia.com/docs/biocomercio_andino/Componente%20/Proyecto%20Etnobotanica/CAPACITACIONES%20OVILLA%20DE%20LEYVA/CAPACITACION%20EXTRACTOS%20Y%20TINTURAS.pdf

- Bird, J. y Maramorosch, K. (1975). *Tropical diseases of legumes*. American Press, New York. 160-162.
- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J. y Taramona, L. (2005). *Evaluación larvica de suspensiones acuosas de Annona muricata Linnaeus «guanábana» sobre Aedes aegypti Linnaeus (Diptera, Culicidae)*. Revista Peruana de Biología, 12(1).
- Chadee, D. (1990). *Aedes aegypti surveillance in Tobago, West Indies(1983-1988)*. J. Am. Mosq. Control Assoc; 6(1):148-150.
- Chaverri, L. y Castillo, G. (2010). *Establecimiento de un bioensayo para la detección de actividad larvica en matrices complejas utilizando como modelo larvas de Aedes aegypti*. Boletín de ciencia y tecnología, 28.
- Consoli, R. y De Olivera, R. (1994). *Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Corrales, L. (2004). *Biocontrolador de Vectores que Producen Malaria, Fiebre Amarilla y Dengue*. Ediciones Kluwer Academic Publisher P. 96.
- Díaz, F., Morelos, S., Carrascal, M., Pájaro, Y., y Gómez, H. (2012). *Actividad larvica de extractos etanólicos de Tabernaemontana cymosa y Trichilia hirta sobre larvas de estadio III y IV de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 17(3), 256-267. Recuperado en 15 de mayo de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000300006&lng=es&tlng=es.

- García, A. (1999). *Los Árboles de Alineación en las Avenidas y Calles de la Ciudad de Buenos Aires*. Revista del Instituto Municipal de Botánica. Buenos Aires, L.O.L.A. (1999).
- García, H. y Forero, E. (1968). *Las Leguminosas: Mimosaceae, Caesalpiniaceae, Papilionaceae*. Pl. Cundinamarca. Colombia.
- García, I. (1977). *Fauna cubana de mosquitos y sus criaderos típicos*. Academia de Ciencias de Cuba. 136.
- García, I., Gutsevich, A. (1969). *Los mosquitos de Cuba como hematófagos del hombre*. Dirección Nacional de Zoológicos y Acuarios; 15: 83.
- Ginzburg, S. (1977). *Plantas Medicinales de los Indios Bribris y Cabezas*. América. Indígena, 37(2): 367-398.
- Gómez, N. (2015). *Evaluación larvívica del extracto etanólico de la semilla de *Carica papaya* sobre larvas del IV estadio de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) en condiciones de laboratorio*. (Tesis de grado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- González, R., Flores, M., Guerrero, E., Mendoza, R., Cárdena, A., Aguirre, L. y Cerna, E. (2013). *Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio*. Rev. Mex. Cienc. Agríc. Texcoco, 4 (2), 273. Recuperado en 10 de abril de 2016, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000200007.
- Heinrich, M., Rimpler, H. y Barrera, N. (1992). *Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca,*

Mexico): *ethnopharmacologic evaluation*. J. Ethnopharm, 36(1):63-80.

Hernández, S., Fernández, C., y Baptista L. (2010). Metodología de la investigación. (Quinta edición). México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Hoeck, P., Ramberg, F., Merrill, S., Moll, C., Agedorn, H. (2003) *Population and parity levels of Aedes aegypti collected in Tucson*. Journal of Vector Ecology; 28(1).

Hurtado, J. (2010). *El proyecto de Investigación*. (Quinta edición). Caracas. Ediciones Quirón-Sypal.

Kong, XQ., Wu, CW. (2010). *Mosquito proboscis: an elegant biomicroelectromechanical system*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 82(1). DOI:10.1103/PhysRevE.82.011910.

Klitgaard, B., Lavin, M., Lewis, GP., Schire, B., Mackinder, B., Lock, M. (2005). *Dalbergiaae. Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK. 307-335.

Leython, S. y Ruiz Zapata, T. (2006). *Leguminosae de un bosque estacional, la trilla, Parque Nacional "Henri Pittier", Estado Aragua, Venezuela*. ERNSTIA 16(2), 81-94.

Leyva, M., Tacoronte, J., Marquetti, M., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y., y Yirian, R. (2008). *Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 60(1) Recuperado en 22 de mayo de 2016, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000100012&lng=es&tlng=es.

López, A. y Sánchez, J. (2001). *Árboles en España. Manual de identificación*. Ediciones Mundi Prensa, 2da edición.

Marzocca, A. (1985). *Nociones Básicas de Taxonomía Vegetal*. Costa Rica: IICA.

Meléndez, P. (2009). *Sinopsis del género machaerium pers. (leguminosae-papilionoideae-dalbergieae) en Venezuela*. Acta Botánica Venezuelica, 32(2), 363-416. Recuperado en 10 de abril de 2016, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0084-59062009000200005&lng=es&tlng=es.

Meléndez, P. (2016). Cuaderno de anotaciones de campo.

Molina, N. (2001). *Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades*. Manejo integrado de plagas, Costa Rica. 59: 76-77.

Pérez, A. (2009). *Guía Metodológica para anteproyectos de investigación*. Caracas: FEDUPEL.

Rodríguez, M., Bisset, J., Fernández D. (2007). Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in aedes aegypti from some latin american countries. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4), 420-429.

Romero, M., Blunden, G., Melendez, P. (2007). *Betaines and N-Methylprolines from Venezuelan Plants*. Natural Product Communications 2(8): 863-868.

Sanabria, L., Segovia, E., González, N., Alcaraz, P., Vera, N. (2009). *Actividad larvívica de extractos vegetales acuosos en larvas de Aedes aegypti (primeros ensayos)*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 7(2), 26-31. Recuperado en 08 de abril de 2016, de <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v7n2/v7n2a05.pdf>.

Sharma, N., Qadry, J., Subramaniam, B., Verghese, T., Rahman, S., Sharma, S. (1998) *Larvicidal activity of gliricidia sepium against mosquito larvae of anopheles stephansi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus*. Pharmaceutical Biology. 36 (1):3–7. Recuperado en 04 de abril de 2016, de https://www.researchgate.net/publication/232089138_Larvicidal_Activity_of_Gliricidia_sepium_Against_Mosquito_Larvae_of_Anopheles_stephansi_Aedes_aegypti_and_Culex_quinquefasciatus.

www.bdigital.ula.ve