

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**



Determinación de la actividad larvicida de seis extractos y aceites de plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, contra *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* vectores transmisores del dengue y el paludismo respectivamente

BLANCA ALICIA ALVARADO RODRÍGUEZ

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, marzo del 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Determinación de la actividad larvica de seis extractos y aceites de plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, contra *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* vectores transmisores del dengue y el paludismo respectivamente

**INFORME DE TESIS
PRESENTADO POR**

BLANCA ALICIA ALVARADO RODRIGUEZ

**PARA OPTAR AL TITULO DE
QUÌMICA BIÒLOGA**

Guatemala, marzo del 2011

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por darme la oportunidad de vivir y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más y porque se que de su mano no me faltara nada.

A MI MAMA

Blanca Rodríguez de Alvarado. Por estar conmigo en los momento alegres y difíciles, por ser mi guía, mi compañía, mi mejor y única amiga, por su sacrificio de mujer, por su amor incondicional y comprensión. Te amo mami

A MI PAPA

Manuel Alvarado Orellana. Por ser el hombre mas maravilloso que he conocido, por ser mi ejemplo de ser humano, por su sacrificio, amor, paciencia, comprensión y por el apoyo que me brindo para culminar mi carrera profesional. Te amo papi

A MI HIJA

Fátima Daniela Michell. Por que es el ser mas especial y amor mas grande de mi vida y por llenar mis días de alegría. Mi amor incondicional para ti Fátima y ejemplo para tu vida.

A MI HERMANO Y SOBRINO

Douglas Alvarado Rodríguez y Kenny Alvarado Soto. Gracias por estar conmigo siempre por su apoyo y compañía .Los quiero mucho

A MIS ABUELOS

Rafael Rodríguez y Alicia de Rodríguez†. Trinidad Alvarado† y Rumalda Orellana Por su ejemplo de vida por estar conmigo en todo momento y por su cariño. Los quiero mucho y siempre los llevare en mi corazón.

A MI FAMILIA

Por ser parte de mi vida y por sus muestras de cariño. En especial a mis tías Sandra de Álvarez y Sonia Rodríguez por su cariño paciencia y comprensión.

A MIS CATEDRATICOS

Gracias por su tiempo, apoyo y por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional en especial a Lic. Armando Cáceres, por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.

A MIS AMIGOS

Roxana Hernández por su apoyo amistad y cariño, Adriana González, Vivian Retana, por los momentos compartidos, amistad y cariño, Danicela Mercado, Mildred Guancin, Jacqueline Morales, Carlos Vargas, Lucia Posada, Sara Galindo, Enrique Villatoro, Luisa Lemus, Claudia Castillo, Manola Pérez, Anaite Sánchez por compartir momentos alegres y difíciles, y porque siempre van estar a mi lado.

A la **UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**, en especial a la **FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA** que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la fuerza que me da día a día para poder salir adelante, y por la sabiduría que recibo de su infinita bondad.

A mis padres Manuel Alvarado y Blanca de Alvarado, por su amor incondicional, apoyo comprensión, sacrificio, mi amor y lealtad para ambos.

A mi hija Fátima, por su sonrisa que es el motor que impulsa mi vida, te amo mi vida.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por permitirme formar parte de ella.

A mis revisores de investigación, Licda. María Eugenia Paredes y Lic. Martin Gil, por brindarme sus conocimientos para poder culminar la elaboración y presentación de esta investigación

A Max Mérida, por toda su ayuda y apoyo al momento de realizar esta investigación.

Al Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, por permitir la realización de esta investigación.

A LIPRONAT, Laboratorio de Productos Naturales, por permitir la realización de esta investigación.

A mis amigos y compañero, por su amistad y cariño

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	4
3.1	Dengue	4
3.2	Paludismo	6
3.3	Vectores de dengue y paludismo	12
3.4	Epidemiología y medidas de prevención de dengue y paludismo	15
3.5	Control de vectores de dengue y paludismo	18
3.6	Plantas de la familia <i>Verbenaceae</i> . Género <i>Lippia</i>	21
4.	Justificación	28
5.	Objetivos	29
6.	Hipótesis	30
7.	Materiales y métodos	31
8.	Resultados	36
9.	Discusión de resultados	41
10.	Conclusiones	43
11.	Recomendaciones	44
12.	Referencias	45
13.	Anexos	46

1. RESUMEN

El propósito de esta investigación fue medir la actividad larvicida y la concentración letal media de los extractos diclorometánicos, metanólicos y en aceites esenciales de seis plantas nativas de Guatemala pertenecientes al género *Lippia*, y obtener de esta manera una posible alternativa natural para la erradicación de larvas de vectores como *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, vectores de enfermedades tan importantes como son el dengue y el paludismo respectivamente.

Los resultados de mortalidad de larvas, posterior a la aplicación de los diferentes extractos y aceites esenciales, a concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml y 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 mg/ml respectivamente, se analizaron por medio de la prueba de Kruskal Wallis y comparaciones de los grupos frente al control negativo, para determinar si hubo efecto significativo en el número de larvas muertas.

En el caso de larvas de *A. aegypti*, de las seis plantas en estudio, solamente el extracto diclorometánico de *L. graveolens* mostró efecto larvicida significativo con tres de las cuatro concentraciones empleadas en primero, segundo y tercer estadio; así mismo los tratamientos con efecto larvicida significativo hasta la concentración 0.5 mg/ml fue el extracto metanólico de *L. graveolens* en larvas en primero, segundo y tercer estadio, y el extracto diclorometánico de *L. dulcis* en larvas de primer estadio; el extracto metanólico de *L. dulcis* y aceite esencial de *L. graveolens* tuvieron actividad con la dilución 1.0 mg/ml y 0.1 mg/ml respectivamente en larvas de primero y segundo estadio.

En el caso de larvas de *A. albimanus*, se evidenció el efecto larvicida significativo hasta la dilución 0.25 mg/ml con el extracto diclorometánico de *L. graveolens*, y aceite esencial hasta la concentración 0.05 mg/ml de la misma planta sobre larvas de primero y segundo estadio. Así también se obtuvo un efecto larvicida significativo hasta la concentración 1.0 mg/ml, con extractos metanólico de *L. graveolens* en los cuatro estadios, y aceite esencial de la misma planta sobre el tercer estadio.

Los extractos de *L. alba*, *L. controversa*, *L. substrigosa* y *L. myriocephala* no evidenciaron actividad en ninguna de las cuatro concentraciones.

El extracto que presentó una menor CL_{50} fue el diclorometánico de *L. graveolens* ya que mostró actividad positiva al matar el 50 % de las larvas de ambos vectores a una concentración mínima, este fue el único extracto en estudio que presentó mejor actividad, y de los tres aceites evaluados solamente el de *L. graveolens* mostro actividad larvicida significativa; en esta investigación se evidenció la actividad del extracto diclorometánico de dicha planta. Se concluye que la especie *L. graveolens* es candidata ideal y promisoría como agente biocida natural para el control larvario de *A. aegypti* y *A. albimanus*.

2. INTRODUCCION

El impacto ambiental de la mayoría de los insecticidas que se distribuyen en el mundo ha orientado la investigación hacia el desarrollo de insecticidas de origen botánico como una alternativa menos contaminante.

La resistencia de mosquitos vectores de enfermedades metaxénicas como el dengue y el paludismo a los insecticidas químicos se ha incrementado en los últimos años, frente a esta gravedad se está realizando la búsqueda de métodos alternativos, utilizando extractos de plantas con actividad larvicida.

Guatemala cuenta con una amplia gama de recursos naturales, los cuales deben ser aprovechados al máximo para obtener de ellos los más altos beneficios para la población en general, entre ellos la flora nacional cuenta con 13 especies del género *Lippia* pertenecientes a la familia *Verbenaceae*, cuyos extractos y aceites esenciales, han proporcionando resultados positivos en contra de larvas de diversos vectores.

El propósito de esta investigación fue medir la actividad larvicida y la concentración letal media de los extractos diclorometánicos, metanólicos y en aceites esenciales de seis plantas nativas de Guatemala pertenecientes al género *Lippia*, y poder obtener de esta manera una posible alternativa natural para la erradicación de larvas de vectores como *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, vectores de enfermedades tan importantes como son el dengue y el paludismo respectivamente.

3. ANTECEDENTES

Las enfermedades metaxénicas constituyen uno de los principales problemas de salud, que afectan a grandes sectores de la población, generalmente las más pobres y de menos accesos a los servicios de salud (1).

Dentro de estas enfermedades destacan el dengue y el paludismo, las cuales generan un gran impacto sobre la salud pública nacional así como una gran pérdida económica.

3.1 Dengue

3.1.1 Agente etiológico

El virus del dengue, es un virus de la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, existen 4 serotipos los cuales causan enfermedad en el hombre (1).

La multiplicación en los vertebrados es demostrable a expensas de la viremia y la subsiguiente formación de anticuerpos, pudiendo cursar la infección en forma inaparente o con síntomas clínicamente manifiestos (1,2).

Tanto el dengue clásico (DC) y el dengue hemorrágico (DH) son causados por el virus del dengue (VD), un virus ARN positivo unicatenario que posee cuatro serotipos, los cuales le confieren sus características y su agresividad. Los serotipos I y II son los más agresivos y el IV es el menos agresivo (3).

El virus se transmite por medio de un vector, éste adquiere la infección al ingerir sangre de un paciente infectado por el virus. Se infectan los tejidos del insecto y el virus se multiplica en sus glándulas salivales, donde se almacena e inyecta al picar. Entre 8 y 12 días después de haberse infectado el vector, está listo para transmitir el virus y es infectante durante toda su vida (4).

3.1.2 Manifestaciones clínicas

El paciente presenta su sintomatología después del período de incubación que es de 5 a 8 días y el dengue clásico, que es el más común, cursa con síntomas seudogripales, que

pueden ir desde una forma muy leve hasta periodo febril intenso, con dolores articulares, mialgias, congestión ocular, dolor retro-ocular, insomnio y rigidez de la nuca, a veces exantema, que puede simular un brote de Rubéola o exantema súbito, con localización preferencial en tórax y cara interna de los brazos (4-6).

La enfermedad dura de 72 horas a 5 o 6 días, desapareciendo en forma brusca, no existiendo más tratamiento que el sintomático. En algunos casos y generalmente después de la primera infección, se puede presentar la forma hemorrágica, de mayor gravedad en los niños y es ocasionado predilectamente por los tipos II y IV, pero los otros dos en menor proporción, también lo pueden ocasionar (4-6).

Tanto el dengue clásico como el hemorrágico, originan una deshidratación general, por el paso del líquido intravascular al espacio intersticial, que se manifiesta en el tipo hemorrágico. En este hay fragilidad capilar, descenso de las plaquetas y presencia de petequias (4-6).

En sus comienzos, la cifra leucocitaria puede ser normal. Generalmente al tercer día se inicia leucopenia con neutropenia y es frecuente la albuminuria. La hipoproteinemia es propia del dengue hemorrágico, lo mismo que la trombocitopenia, la disminución del fibrinógeno, el aumento de los productos de degradación de la fibrina y elevación de las transaminasas (4-6).

3.1.3 Diagnóstico

El conocimiento de la cinética de los diferentes marcadores del curso de la infección por dengue es de mayor importancia para su diagnóstico. El virus puede detectarse en la sangre desde 2 ó 3 días antes del comienzo de la fiebre hasta 4 ó 5 días después de su desaparición (4).

Los anticuerpos de la clase IgM contra el virus del dengue se pueden detectar en más de 95% de los casos a partir del quinto día de la enfermedad. En la infección primaria, los anticuerpos de la clase IgG se comienzan a detectar entre el séptimo y el decimo día de fiebre, mientras que en la infección secundaria se observa un incremento muy temprano de

los anticuerpos IgG con títulos muy elevados a partir del segundo día de fiebre. En algunos casos de infección secundaria no se detectan anticuerpos IgM (4,7).

Otra forma de diagnóstico fácil y rápido es la detección del antígeno NS1 del dengue, utilizando el método ELISA por captura, es un procedimiento valioso, ya que permite la detección de la infección antes de la seroconversión. El antígeno NS1 puede ser detectado en suero a partir del día primero después del comienzo de la fiebre y hasta el noveno día. Esto se compara con los anticuerpos IgM que no son detectables hasta los 3 ó 5 días de aparición de los síntomas en algunos pacientes y en otros al octavo día. Este antígeno desaparece desde que se producen los anticuerpos IgG anti NS1. Esta metodología tiene como ventajas, además de ser más fácil y rápida que las demás metodologías de diagnóstico, como son el PCR, el aislamiento y/o cultivo del virus, no requiere de equipos especiales ni sofisticados y es menos costosa (8, 9).

3.1.4 Tratamiento

No hay tratamiento para el dengue solamente tratamiento sintomático, la única forma de prevención es a través de la erradicación del vector (4).

3.2 Paludismo

3.2.1 Agente etiológico

El paludismo es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo. El organismo que produce el paludismo es un protozoo del género *Plasmodium* perteneciente al subfilo Apicomplexa. La característica que lo define en este subfilo es la compleja disposición de estructuras apicales conocidas como roptrias y micronemas, las cuales participan en la entrada del parásito a su célula blanco y desaparecen en las etapas que no son invasivas (10).

Cuatro son las especies de *Plasmodium* que parasitan al hombre: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium falciparum*. Las tres primeras especies se han descrito en América Latina. El hombre es el único hospedero de las especies de *Plasmodium* mencionadas (10).

El parásito presenta en su ciclo de vida dos formas de reproducción: sexual y asexual. La reproducción sexual ocurre en la hembra del mosquito del género *Anopheles* (hospedero definitivo), y la reproducción asexual en el hombre (hospedero intermediario) (10, 11).

La reproducción sexual o ciclo esporogónico se realiza en el mosquito y dura aproximadamente de 7 a 14 días. Comprende los estadios de gametocitos, gametos, cigoto, ooquineto, ooquiste, esporozoíto. Esta reproducción es esporogónica, porque en el mosquito da lugar a la formación de esporozoítos. Se inicia con la ingesta de sangre de una persona infectada que contenga las formas sexuales del parásito, los gametocitos (10, 11).

La reproducción asexual o ciclo esquizogónico presenta dos ciclos o fases: Exoeritrocitaria (hepática) y eritrocitaria (sanguínea). La fase hepática o exoeritrocitaria comprende al esquizonte tisular y al criptozooíto. La fase eritrocitaria comprende el trofozoíto, el esquizonte, los merozoítos, y los gametocitos (10, 11).

La reproducción asexual se suele denominar esquizogónica porque lleva a la producción de esquizontes. Se inicia con la penetración del esporozoíto al hombre, en el momento de la picadura y termina con la producción de esquizontes maduros y gametocitos. Los esporozoítos inoculados se distribuyen por el torrente sanguíneo a todo el organismo; sin embargo, ellos van a penetrar a las células hepáticas donde dan lugar a la formación de los esquizontes tisulares, en una fase o etapa que se llama pre-eritrocítica (10, 11).

3.2.2 Manifestaciones clínicas

El esporozoíto inoculado por el vector llega por la sangre hasta el hígado, donde se introduce en los hepatocitos, desarrollándose los esquizontes y reproduciéndose por fisión binaria, bajo la forma de merozoítos. Este desarrollo en el hígado produce una hepatomegalia discreta que generalmente no provoca sintomatología local; sin embargo, en raras ocasiones, hay manifestaciones de insuficiencia hepática y sintomatología de un proceso infeccioso generalizado con fiebre y malestar general (10).

Los glóbulos rojos se rompen al final del desarrollo de los esquizontes maduros, cuando son liberados los merozoítos; esta circunstancia adicionada a la producción de sustancias extrañas al organismo, derivadas de los restos de los hematíes, pigmento malárico y

productos del metabolismo del parásito, actúan como pirógenos y producen un shock anafiláctico que se manifiesta por escalofrío, fiebre y sudoración, lo cual dura algunas horas. En la sangre de estas personas aparecen, en forma transitoria, mediadores activos entre los que se reconoce al factor de necrosis tumoral por su incremento en el paroxismo de la fiebre (10).

Los glóbulos rojos alterados por el parásito, las sustancias liberadas, principalmente el pigmento malárico, la hemozoína, son captados por el sistema reticuloendotelial, determinando que órganos ricos en dichas células, como son el hígado y el bazo aumentan de tamaño. La destrucción sistemática de los glóbulos rojos determina su disminución, con la consiguiente anemia (10).

La destrucción intravascular de los eritrocitos puede causar hemoglobinuria e insuficiencia renal en el caso de la infección por *P. falciparum*; sin embargo, la necrosis tubular aguda es probablemente la causa más frecuente de esta insuficiencia renal. Los glóbulos rojos parasitados presentan en su superficie prolongaciones que favorecen la adherencia de dichas células al endotelio de las vénulas postcapilares, con el concomitante secuestro de los parásitos en órganos como el corazón, cerebro, musculoesquelético e intestino, dando altas parasitemias que se asocian a las complicaciones del paludismo por *P. falciparum*, principalmente anemia severa, compromiso cerebral e insuficiencia renal (10).

La malaria cerebral es una complicación grave del paludismo por *P. falciparum* con tasa de mortalidad del 20 al 50%, aparentemente provocado por la disminución de flujo sanguíneo cerebral, y a encefalopatía cerebral (10).

Se ha señalado repetidamente una coincidencia geográfica entre la presencia de malaria y de defectos eritrocíticos como las hemoglobinopatías (hemoglobinas anormales, talasemias) y la deficiencia de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD), que es el trastorno metabólico asociado con mayor frecuencia con la anemia hemolítica. La coincidencia geográfica mencionada apoya la teoría de que la malaria es un factor selectivo respecto a la presencia de defectos eritrocíticos. En el caso específico de la deficiencia de G6PD, las mujeres heterocigotas portadoras de esta deficiencia podrían estar protegidas contra la malaria causada por *P. falciparum* y las hemoglobinopatías confieren algún grado de

protección contra la malaria grave por *P. falciparum*. Algunos estudios realizados en poblaciones africanas han mostrado una menor densidad de la parasitemia, que pareciera indicadora de esa protección o resistencia, mientras que otros parecen indicar que los defectos eritrocíticos innatos no confieren protección contra la malaria. Aunque el mecanismo de protección de las células portadoras de alguno de los defectos eritrocíticos ha sido bien documentado en estudios in vitro, tal protección no se ha encontrado en estudios de tipo poblacional. En general, la información obtenida indica que la presencia de defectos eritrocíticos pudiera redundar en una menor incidencia de malaria por *P. falciparum*, con la posibilidad de que las personas con estos defectos tengan una parasitemia menos densa (12).

3.2.3 Diagnóstico

La sospecha diagnóstica se plantea en casos febriles. En ocasiones, cuando ocurren accesos de escalofríos, fiebre y sudor de personas que vivan o hayan visitado, por lo menos dos semanas antes, áreas endémicas, han recibido transfusión sanguínea, o en recién nacidos febriles con bajo peso al nacer y hepatoesplenomegalia provenientes de gestantes en quienes se diagnóstico paludismo. La confirmación diagnóstica se hace por el hallazgo del parásito en la sangre, ya sea demostrando directamente o a través de pruebas indirectas (10).

El método más sencillo de diagnóstico es el frotis y la gota gruesa, tomados preferentemente durante el acceso febril y coloreados con derivados de Romanowsky, siendo la coloración de Giemsa la utilizada. Este método permite analizar mayor concentración de sangre, diferenciar las formas del parásito y hacer recuento de los mismos, tiene una sensibilidad de 85% y una especificidad de 100%, además es un método económico y fácil de realizar (10, 11).

Todas estas características han permitido que la gota gruesa sea el método de referencia para el diagnóstico del paludismo porque permite clasificar el grado de la parasitemia y evaluar la respuesta del tratamiento durante el seguimiento. Sin embargo, por ser una prueba que depende del operador, en ocasiones, la gota gruesa no detecta parasitemias bajas (entre 50-500 parásitos/ μ l), estos casos de paludismo que se reportan como negativos,

retrasan el tratamiento, y contribuyen a la presentación de complicaciones y al aumento de la mortalidad. En zonas rurales que carecen de recursos como microscopios, personal experto e infraestructura eléctrica, se limita su uso. Por lo anterior, se ha propuesto investigaciones para el desarrollo de pruebas rápidas de diagnóstico que detecten antígenos de *Plasmodium* spp (10- 13).

A mediados de los años 90 se desarrollaron las pruebas rápidas de diagnóstico, que consisten en la detección de antígenos específicos expresados por los parásitos del paludismo presentes en individuos infectados, mediante la captura con anticuerpos. Algunas pruebas rápidas pueden detectar solamente una especie, otras detectan la presencia sólo del género *Plasmodium*. Una de las técnicas más recientes de diagnóstico rápido es la prueba inmunocromatográfica de sangre total (ICT *P. falciparum*/*P. vivax*) Binax® NOW malaria ICT Pf/Pv, la cual se basa en la detección de los antígenos HRP-II y panmalarico. Estos dos antígenos son capturados por anticuerpos monoclonales de tipo IgM; la HRP-II es una proteína que se expresa en la membrana del eritrocito infectado con *P. falciparum* y se libera a partir de las formas asexuales y de los gametocitos jóvenes, y el antígeno panmalarico o aldolasa específica de parásito, es producido por las cuatro especies del *Plasmodium* que infectan al hombre, dicha prueba posee una sensibilidad de 54.2% y especificidad de 93.6 % para *P. falciparum* y para *P. vivax* 80% de sensibilidad y 100% de especificidad. Esta prueba no posee una gran sensibilidad y especificidad global para el diagnóstico de malaria de forma rutinaria. Sin embargo, podría ser de utilidad cuando no se pueda acceder al diagnóstico microscópico. Una de las aplicaciones que se le ha atribuido a la prueba ICT Pf/pv, es la detección de antígenos del parásito cuando hay un secuestro del mismo, que dificulta su diagnóstico en sangre periférica; por ejemplo, en el caso de secuestro de parásitos en la placenta de mujeres embarazadas. Entre las desventajas está la incapacidad para identificar infecciones mixtas y diagnosticar paludismo por especies diferentes a *P. falciparum* y *P. vivax*, y no poder ser utilizada para seguimiento de la respuesta al tratamiento, porque sigue siendo positiva por la persistencia de los antígenos aun después de la desaparición de los parásitos (13).

El uso de pruebas serológicas para detectar anticuerpos, IgG o IgM, han demostrado ser útiles en estudios de carácter epidemiológico, pero tienen escaso rendimiento en el discernimiento clínico de los casos (10, 11).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa no es una técnica rápida de diagnóstico, ya que consume más de una hora. Sin embargo, su ventaja radica en su sensibilidad porque con ella se pueden detectar 5 o menos parásitos/ μ l de sangre (10).

3.2.4 Tratamiento

Los medicamentos antipalúdicos se suelen clasificar en aquellos de primera línea: cloroquina y primaquina. De segunda línea: combinación de primetamina y sulfa, quinina, antibióticos como la tetraciclina y clindamicina; y en zonas donde la resistencia a los mencionados es evidente, artemisinina, mefloquina y halofantrina (10, 11).

El mecanismo de resistencia radica en las mutaciones espontáneas que ocurren en la composición genética de la población parasitaria. La frecuencia de estas mutaciones varía según la cepa y según el grado de presión medicamentosa sobre la población que, a menudo, se traduce por una administración indiscriminada del fármaco durante años y en todos los grupos de edad. Finalmente, la movilidad de las poblaciones de un área a otra es también un factor contribuyente importante a la existencia de dichas resistencias (14).

El tratamiento del paludismo está dirigido a eliminar la fase eritrocítica, causante de la mayor parte de la sintomatología. La droga recomendada es la cloroquina, y para eliminar la fase exoeritrocitaria, la primaquina, la cual también posee una acción gametocítica (10, 11).

Los pacientes no tratados o insuficientemente tratados pueden ser fuente de infección para los mosquitos, por más de tres años con la forma *P. malariae*, de uno a dos años en el caso de *P. vivax* y por lo regular no más de un año, con *P. falciparum* (15).

Se ha comprobado que pacientes con malaria recurrente, y que tienen un tratamiento profiláctico con bajas dosis de cloroquina, han desarrollado fallo cardíaco, ya que se ha demostrado a través de biopsias, toxicidad a la cloroquina. Lo que pone de manifiesto la importancia de reconocer los signos de toxicidad antes de que ocurra un fallo cardíaco (16).

3.3 Vectores de dengue y paludismo

3.3.1 Mosquitos (familia *Culicidae*)

Los mosquitos son los insectos más importantes como vectores de enfermedades del hombre, además de ser los artrópodos hematófagos más comunes. Se caracterizan por su abdomen largo y angosto, patas muy largas en relación con el cuerpo, antenas plumosas en los machos y las hembras presentan un aparato bucal adaptado para picar, perforar la piel y succionar sangre, mientras los machos carecen de estas adaptaciones y se alimentan de néctares vegetales. Las especies de mosquitos de importancia médica pertenecen a la subfamilia *Anophelinae* con el género *Anopheles* transmisores del paludismo, y la subfamilia *Culicinae*, con los géneros *Aedes* vector del dengue y *Culex* vectores de diversas virosis y parasitosis (17).

3.3.1.1 Género *Aedes*

Este género está constituido por más de 500 especies, la de mayor trascendencia en el hemisferio occidental es *Aedes aegypti*, (17).

El *A. aegypti* es el principal vector de dengue. El mosquito al picar monos y otros animales que sirven como reservorios adquiere la infección y luego de un periodo de incubación de alrededor de 12 días la transmite al hombre susceptible por medio de su saliva y puede hacerlo durante toda su vida de 3 a 4 meses, puesto que es inmune a la virosis (18, 19).

Su ciclo evolutivo se caracteriza por su capacidad de desarrollo en pequeñas colecciones de agua, como son estanques de agua, barriles, floreros, parte interna de neumáticos en desuso, etc. Según la temperatura ambiente, en alrededor de 10 días completa su desarrollo, la mayoría de las especies de *Aedes* tiene actividad diurna o crepuscular. El desarrollo larvario de diversas especies ocurre en condiciones ambientales extraordinariamente variadas, siendo la más importante la humedad. El huevo mide 0.7 mm. de longitud y está encerrado en una cubierta de tres capas, con un pasaje como aspecto de embudo, poseen estructura poligonal y no maduran hasta que el suelo este inundado de agua (18, 19).

La larva elongada, sin patas, con pelos enrollados y ramificaciones transversales o simples, distribuidos en todo su cuerpo, pasa a través de cuatro etapas hasta alcanzar la longitud de

10 mm. La cabeza tiene ojos compuestos, antenas hirsutas y partes bucales masticadoras. Los ocho segmentos abdominales llevan dos espiráculos. La abertura anal está rodeada por cuatro procesos papilares flexibles, las branquias anales, su función probablemente sea absorción de agua más que respiración (19).

El ciclo larvario en condiciones óptimas dura un poco más de 3 semanas. La larva en su cuarta etapa se transforma en una pupa megalocéfala, curva, que semeja un signo de puntuación. Tiene trompas respiratorias en el tórax, una vesícula aérea situada entre las futuras alas del adulto, y un par de aletas superpuestas con pelos terminales en el último segmento abdominal. La etapa de pupa que no se alimenta, dura de dos a cinco días. Al madurar, la piel de la pupa es rota por la vesícula aérea y la actividad del insecto al escapar (19).

3.3.1.2 Género *Anopheles*

Los vectores del *Plasmodium* son mosquitos hembras del género *Anopheles*, que son hematófagos, pues necesitan sangre para obtener los elementos nutritivos necesarios para la maduración de sus huevos. El mosquito es un díptero que presenta una metamorfosis completa: huevo, larva, pupa y adulto. El tiempo de vida de los Anophelinos adultos no suele ser mayor de 45 días. El nicho ecológico es un ambiente que tenga depósitos de agua, de preferencia tranquila, temperatura de 25 a 27 °C y altitud sobre el nivel del mar hasta los 2.800 m. (18).

La hembra coloca alrededor de 100 huevos por vez y los deja flotando en forma individual, para lo cual poseen flotadores que les permiten permanecer en la superficie del agua semejan como balsas. Los huevos de Anophelinos suelen perecer a más de 40 °C y a menos de 0 °C y no se desarrollan por debajo de 12 °C (18).

Las larvas, son elementos alargados, semejan gusanos, cuyo tamaño es de aproximadamente 4 a 5 mm. de longitud, en los cuales se pueden distinguir una cabeza y un cuerpo segmentado. Los más llamativos y característico es la ausencia de sifón respiratorio, que es reemplazado por un aparato espiracular, por consiguiente las larvas deben aproximarse a la superficie y adosar todo su cuerpo a la superficie del agua para

respirar, lo cual permite diferenciarlas de las larvas de *Culex* y *Aedes* que tienen sifón respiratorio (18).

Las larvas al transformarse en pupas adquieren la forma de una vírgula o coma de 3 a 4 mm. de longitud, en que la parte ancha y superior corresponde al cefalotórax, donde se puede distinguir 2 sifones respiratorios o trompetas cortas que el insecto adosa a la superficie del agua para respirar (18).

De las pupas salen los adultos o imagos que miden aproximadamente 1.5 cm. de largo y presentan los tres segmentos del cuerpo bien diferenciados: cabeza, tórax y abdomen. El tórax presenta la inserción de tres pares de patas, un par de alas y un par de balancines. Las alas tienen escamas en grupos que le dan el aspecto de manchas aladas. El abdomen es delgado en reposo y aumenta de volumen a medida que el insecto succiona la sangre, su alimento (18, 19).

Las especies que muestran afinidad por alimentarse sobre el hombre se llaman antropófilas. Algunas especies se acercan a la vivienda en busca de personas o viviendas para alimentarse y se les llama endófilas, por contraste las exófilas pican a campo abierto. Las endófilas son las más peligrosas y su conducta suele acompañarse del hábito de succionar la sangre y reposar intradomiciliariamente (en las paredes de las viviendas) (18, 19).

La aptitud de una especie para transmitir el paludismo, depende de:

- Su presencia en las habitaciones o cerca de ellas
- Su preferencia por sangre humana, aunque cuando los animales escasean, las especies zoófilas se alimentan del hombre.
- Un medio que favorezca su propagación y permita una vida lo suficientemente larga para que *Plasmodium* complete su ciclo vital.
- La susceptibilidad fisiológica a la infección (18).

3.4 Epidemiología y medidas de prevención de dengue y paludismo

En la actualidad la extensión geográfica, incidencia y gravedad de varias enfermedades de transmisión vectorial están experimentando un preocupante e inusitado aumento en las Américas, Asia Suroriental, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental. La fiebre del dengue y su forma más grave la fiebre hemorrágica del dengue, por ejemplo, solo 9 países la conocían antes de 1970, sin embargo, a partir de ese momento la cifra se ha cuadruplicado y tiene en la actualidad una marcada tendencia a seguir aumentando (19).

A este deteriorado cuadro epidemiológico hay que agregar la malaria, pues hay millones de personas que en el planeta viven en áreas de endemicidad de la enfermedad. Todo lo antes señalado, crea la urgente necesidad de ejecutar notables esfuerzos por tratar de revertir el cuadro entomológico-epidemiológico existente, en el menor tiempo posible en algunas regiones, entre las que se encuentra Centroamérica y el Caribe donde se han desarrollado algunos estudios destinados a la caracterización bioecológica de mosquitos de relevancia médico-veterinaria (19).

La infección se distribuye en todos los continentes, siendo en África donde cobra más víctimas, especialmente en los niños afectados por *P. falciparum*, estimándose que alrededor de un millón de niños fallece por este mal. En las Américas, hay pocos países que no tienen el parasitismo pues se extiende desde América del Norte hasta el sur; siendo tres países que aportan el mayor número de casos: Brasil, Perú, Colombia, con cifras cercanas al millón de casos al año. La ecología de esta infección parasitaria está en relación con diversos factores prevalentes en las zonas tropicales (20).

En Guatemala, cuya extensión territorial es de aproximadamente 108,880 km², el 74 % del total constituye área malarica, viviendo en ésta aproximadamente 8,500,000 guatemaltecos. El número de enfermos confirmados en el período 1959 a 1976 tuvo un promedio anual de registros cercanos a los 10,000 casos/año, mientras que entre 1977 y 1991 ya era de 57,274 casos anuales. Solo en la región norte, reconocida como la principal área endémica del país, en 1991 fueron reportados más de 32,000 casos. Tal situación es favorecida entre otros factores, por los constantes movimientos migratorios de nacionales en busca de fuentes de trabajo, así como de indocumentados que provenientes de diferentes países, en su gran

mayoría centroamericanos, atraviesan el Petén para dirigirse hacia los EE.UU. Lamentablemente muchas de estas personas llegan a la región enfermas, y no pueden recibir el tratamiento médico que se requiere (20).

En al menos 22 de 64 países de otras regiones del mundo, los casos de malaria disminuyeron un 50% durante el periodo 2000–2006. No obstante, investigaciones más profundas acerca del impacto se necesitarán para confirmar que estos 29 países están bien encaminados para alcanzar las metas de reducción de la carga de malaria fijadas para 2010.

En el 2006 se registraron según las estimaciones unos 247 millones de casos de malaria entre 3300 millones de personas en riesgo, produciéndose como resultado casi un millón de muertes, principalmente de menores de cinco años. En el año 2008 habían 109 países con malaria endémica, 45 de ellos en la región de África. El reporte mundial de la malaria de 2009, indica que más de un tercio de los 108 países endémicos de malaria (9 países africanos y 29 fuera de África), mostraron una reducción en los casos de malaria mayor al 50% en 2008 comparado al año 2000. El número de casos se redujo menos en los países con altos índices de incidencia (21).

No se pueden obviar también, las actuales tendencias demográficas y las consecuencias de las políticas socioeconómicas derivadas del siglo pasado, de las cuales procede el incremento de comunidades con viviendas totalmente desprotegidas y una situación higiénica que favorece la proliferación de vectores y sus mecanismos de transmisión (20).

Frente a esta situación se hace necesario por tanto diseñar estrategias, dirigidas a detectar la presencia de las especies de gran seguimiento médico, para ubicar sus criaderos e implementar métodos de control con énfasis en el biológico, acerca del cual ya se cuenta con información que avala su eficacia e inocuidad al ambiente. Como resultado de la presencia de especialistas cubanos en la vigilancia y lucha antivectorial en territorio guatemalteco, se han derivado varias líneas de investigación destinadas a la caracterización de vectores transmisores de enfermedades al hombre (19, 20).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han llamado a todos los países a adoptar las medidas necesarias que contribuyan a disminuir la carga de la enfermedad y su impacto médico y socioeconómico. Se espera que

una respuesta internacional coordinada y eficaz y el desarrollo de investigaciones epidemiológicas, clínicas y virológicas en las que se conjuguen los más avanzados métodos y técnicas permitan revertir la tendencia epidemiológica ascendente del dengue y coadyuven a su control (20).

La estrategia mundial de la lucha contra el paludismo discutida por la OMS, inició el compromiso de los Gobiernos en dar prioridad a las actividades para la reducción de la morbilidad y la prevención de la mortalidad en las poblaciones bajo riesgo. Para cumplir las metas fijadas para 2010 y 2015 es preciso que los países faciliten a todas las personas expuestas a la enfermedad mosquiteros tratados con insecticida o material para rociar los interiores con insecticidas de acción residual, puedan efectuar un diagnóstico de laboratorio en todos los presuntos casos de paludismo y dispensen un tratamiento eficaz si se confirma la enfermedad. El rociamiento de interiores con insecticidas de acción residual aprobados por la OMS (comprendido el DDT) sigue siendo una de las intervenciones básicas para reducir o incluso interrumpir la transmisión del paludismo atacando al vector en todo tipo de contextos epidemiológicos. En 2008 declararon haber recurrido a esta técnica 44 países, 19 de ellos de la región de África (22)

Se debe de tomar en cuenta las diversas medidas de prevención que existen para erradicar estas enfermedades, se conoce una prevención individual la cual consiste en la protección de la picadura de los vectores, que suele ser de hábito intradomiciliario, mediante el uso de mallas en puertas y ventanas, así como dormir bajo mosquiteros, impregnados con insecticidas. Para personas que permanecerán en área endémica en el caso del paludismo se deben usar quimioproliféricos, aconsejándose cloroquina y proguanil. La prevención colectiva la cual se inserta en la mayoría de los casos en programas de control desarrollados por los países con paludismo o dengue, como problemas de salud y con repercusión en la economía de diversos países. Las recomendaciones señalan hacer el diagnóstico y el tratamiento precoz de los casos de paludismo o dengue, así como las intervenciones antivectoriales que incluyen el uso racional de insecticidas, labores de ingeniería sanitaria y la participación activa de las comunidades en las acciones de control (18).

Aunque las opciones para el control de estas infecciones están disponibles, los problemas de resistencia a drogas como en el paludismo, la falta de disponibilidad o el costo de una

vacuna, en el caso del dengue, hacen del control vectorial una opción importante. Sin embargo, la habilidad de los vectores en desarrollar resistencia a los insecticidas ha sido hoy día el mayor obstáculo para su control (18).

3.5 Control de los vectores de dengue y paludismo

El control de los mosquitos requiere conocimiento de los hábitos de cada especie, la topografía y clima del lugar, así como la raza y estado socioeconómico de la población.

Los mosquitos pueden controlarse:

- Eliminando o reduciendo su hábitat
- Destruyendo sus larvas
- Destruyendo los mosquitos adultos

Puede necesitarse más de un método. La eficacia de las medidas de control puede determinarse por la reducción local de los mosquitos y disminución de la frecuencia de las enfermedades transmitidas (18).

Diversas medidas, incluso el empleo de agentes químicos y biológicos, se aplican para el control de mosquitos importantes médicamente. Se pueden destruir larvas acuáticas que habitan en la superficie mediante la aplicación de aceites u otras películas superficiales orgánicas que interfieren con el intercambio gaseoso de las larvas o impiden que emerjan los adultos (18).

Se han empleado muchos insecticidas de 4 clases químicas distintas contra las larvas o adultos de los mosquitos. Estos son:

- Los hidrocarburos clorinados, como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), hidrocloruros de benceno Dieldrin
- Fosfatos orgánicos como malation y paration
- Carbamados como landrin y bendiocar
- Piretroides como permatrin y decametrin.

Tales insecticidas se utilizan de diferentes maneras, en aerosoles para destrucción rápida de los adultos o incorporados en sustancias líquidas o sólidas para obtener una acción residual de liberación lenta una vez que han sido colocados o espolvoreados en las superficies (18).

Otro factor que ha complicado la situación ha sido que los amantes de la naturaleza y los defensores del medio ambiente se han ido percatando, cada vez más, del daño real y potencial que produce el uso indiscriminado y extendido de los insecticidas a otros elementos de la cadena biológica de la vida. Ante estos hechos, se ha prohibido la manufactura y empleo de muchos insecticidas en EEUU. Como ironía, la contaminación del ambiente la aparición de resistencia de los insecticidas ha surgido principalmente, del uso de pesticidas en la agricultura y no de su empleo para controlar los vectores en los programas de salud pública. Los problemas relacionados con los insecticidas también han estimulado el estudio de las formas nuevas para controlar a los vectores, estas comprenden métodos biológicos (18).

En las últimas décadas la lucha contra las plagas se ha basado principalmente en el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos. La mayor parte de ellos son productos químicos que se emplean principalmente en el combate a vectores, como es el caso del paludismo y dengue (24,25).

El empleo de los insecticidas conlleva a diversos riesgos, tanto para el ambiente como para la salud de la población. Los efectos a la salud de tipo agudo eran anteriormente los más considerados; sin embargo, en las dos últimas décadas han tomado importancia los efectos crónicos, tales como daños en el sistema nervioso central, teratogénesis, mutaciones, cáncer, entre otros (24).

La resistencia que han adquirido los mosquitos vectores de enfermedades metaxénicas a los insecticidas químicos debido a su uso indiscriminado, se ha incrementado en los últimos años. Frente a esta realidad se está incrementando la búsqueda de métodos alternativos utilizando extractos de plantas con actividad larvicida (23).

En muchos países el empleo de controladores biológicos ha cobrado gran relevancia y se considera una alternativa a los insecticidas. El empleo de productos derivados de plantas, para el control de larvas de mosquitos es una alternativa natural y es considerada segura

para el medio ambiente. Tal es así que se continúan investigando como repelentes en mosquitos adultos y como intoxicantes e inhibidores de crecimiento frente a larvas (24).

Las evaluaciones realizadas con plantas, como extractos y aceites vegetales para eliminar larvas de mosquitos, han incrementado la lista a 140 especies de plantas con propiedades larvicidas. Entre las plantas que han destacado contra larvas de mosquitos se encuentra el género *Annona*, tóxicas a larvas de mosquito *A. aegypti* y activa contra adultos de *A. aegypti* y *Anopheles* spp (15).

También otros estudios han demostrado la potencia de la naranja como fumigante de mosquitos, se han evaluado la actividad de 4 replicaciones mostrando que extractos volátiles de dos especies de naranja *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus aurantifolia* (lima) tuvieron actividad contra mosquitos. Extractos volátiles de *C. sinensis* mostraron gran potencial insecticida en tres insectos estudiados (26).

La mayoría de estudios han realizado ensayos con extractos de muchas fuentes botánicas, se estudia el modo de acción de estos diversos compuestos para la posible prevención y tratamiento de cáncer, enfermedades cardiovasculares, así como bioactividad antibacterial, antiviral, pero más importante se han convertido en el punto principal de interés en el desarrollo de pesticidas, recientemente. Varios aceites esenciales han sido documentados como causantes de efectos tóxicos sobre insectos, así mismo ha sido examinada la actividad de aceites esenciales contra adultos de moscas (27).

Los bioensayos de un número alto de aceites esenciales muestran repelencia contra mosquitos, usualmente atribuidos a sus componentes principales. El fenómeno sinérgico entre los diversos componentes de los aceites esenciales puede resultar en una alta bioactividad (un incremento en la respuesta repelente), de los aceites comparados con los componentes aislados. La composición puede variar considerablemente entre especies de plantas aromáticas y variedades, entre las mismas variedades de diferentes áreas geográficas. Las propiedades repelentes de muchos aceites esenciales pueden estar asociadas con la presencia de monoterpenoides y sesquiterpenoides (28).

Los monoterpenoides así como α -pineno, limoneno, terpinoleno, citronelol, alcanfor y timol son constituyentes comunes de un número de aceites esenciales descritos en la

literatura con actividad repelente. Entre los sesquiterpenoides β -cariofileno es el más citado como un fuerte repelente contra larvas de *A. aegypti* (28).

La evaluación de aceites esenciales de *Acantholippia seriphioides*, *Aloysia citriodora*, *Anemia tomentosa*, *Baccharis spartioides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus saligna*, *Hyptis mutabilis*, *Minthostachys mollis*, *Rosmarinus officinalis*, *Tagetes minuta* y *Tagetes pusilla*, las cuales son plantas aromáticas, presentaron actividad efectiva contra larvas de *A. aegypti* (28).

El empleo de productos derivados de plantas para el control de larvas de mosquitos, es una alternativa natural y es considerada segura para el medio ambiente; tal es así que se continúan investigando como repelentes en mosquitos adultos, y como intoxicantes e inhibidores del crecimiento frente a larvas. Mediante estudios etnobotánicos en *Paullinia clavigera* Simpson y *Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse han sido seleccionadas con potencial biocidad para ser investigadas en el control de los vectores de la malaria (29).

3.6 Plantas de la familia *Verbenaceae*. Género *Lippia*

De la familia *Verbenaceae*, se conocen varias especies aromáticas tropicales, oriundas de América del Sur, con gran variedad de quimiotipos, las cuales poseen aceites esenciales exóticos que hacen importante su estudio con el fin de encontrarle aplicación a sus principios activos ya sea como antioxidantes o aromatizantes, en la formulación de fármacos, de cosméticos, de perfumes o como aditivos en alimentos, y por su actividad larvicida, entre otros. Uno de los géneros de la familia *Verbenaceae* que más abunda en América del Sur y América Central, es el género *Lippia* del cual se han realizado diferentes estudios (30).

La familia *Verbenaceae* presenta extensa distribución en zonas tropicales y subtropicales, amplia diversidad de usos y variedad en la composición de sus aceites esenciales. La composición de cada una de las esencias, determina sus propiedades físicas, organolépticas, químicas y biológicas, y por ende, las aplicaciones comerciales de las mismas (30).

La acción larvicida de *L. sidoides* contra la larva del *A. aegypti*, ha quedado establecida, el aceite esencial y sus hidrolatos tienen acción larvicida contra el mosquito, causando el

100% de la mortalidad larval a la concentración probada más baja de 0.017% (w/v). Esto sugiere que el aceite esencial de *L. sidoides* tiene un promisorio uso larvicida contra el *A. aegypti* y podría ser útil en la búsqueda de un nuevo, selectivo y biodegradable larvicida natural que podrá usarse contra la erradicación del dengue hemorrágico. Así mismo se han reportado algunos resultados sobre los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por diferentes técnicas de extracción a partir de las hojas frescas y tallos de *L. alba* y *L. origanoides* (30).

El aceite esencial de *L. gracilis* ha mostrado ser un potente insecticida sobre las larvas de *A. aegypti*, al igual que *L. sidoides*, sin embargo, es de importancia evaluar la actividad larvicida de extractos y otros aceites esenciales de plantas de este mismo género, con el fin de encontrar nuevas alternativas de larvicidas, tomando en cuenta que en Guatemala existen 13 especies del género *Lippia* (30,31).

3.6.1 *Lippia graveolens* HBK.

3.6.1.1 Descripción y distribución

Crece en forma de arbustos finos de hasta 3 m de altura. Posee hojas de 2 a 4 cm. de longitud. Las hojas aromáticas, secas o frescas, son usadas en Centro América para dar sabor a comidas, y secas, son vendidas en el mercado. Se encuentra en los departamentos de Petén y Zacapa en Guatemala, y en México y Nicaragua (31).

3.6.1.2 Componentes químicos

Se han identificado tres diferentes quimiotipos, siendo tipo timol, tipo carvacrol y tipo mixto. Se han encontrado concentraciones diferentes para dos aceites de *L. graveolens*, siendo así: Carvacrol (44.8%); timol: (7.4%), p-cimeno (21.8%) (32).

3.6.1.3 Actividad biocida

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas de *L. graveolens* es activa contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*, pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos

microorganismo. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* y *Trichophytum rubrum*, pero inactivos contra *Cryptococcus neoformans*. La CIM del extracto diclorometánico contra bacterias es 10 mg/mL y del etanol es 1.75 mg/mL; la CIM de la actividad contra *Microsporum gypseum* es 2.5 mg/mL. (33, 34).

3.6.2 *Lippia dulcis* Trev.

3.6.2.1 Descripción y distribución

Crece en suelos de bosques, márgenes de pantanos, o en pastos, desde el nivel del mar hasta 1,800 m. Se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa, Sololá, en la República de Guatemala y en México, así como de Belice hasta Panamá. Son plantas perennes, raras veces mayores de 40 cm. presenta hojas de 1 a 6 cm. de longitud, que son muy aromáticas. Esta planta es utilizada en la medicina doméstica. La raíz cuando es masticada presenta sabor de licor, por lo cual es conocida como “orozús” en América Central (31).

3.6.2.2 Composición química

En estudios efectuados en Guatemala se han obtenido rendimientos de extracción por hidrodestilación de muestras de San Juan Sacatepéquez y de Chimaltenango (0.5 y 0.9%).

En plantas colectadas de *L. dulcis* colectadas en Puerto Rico, se encontró una alta proporción de sesquiterpenoides (79%). Entre los principales compuestos se encontraron: el sesquiterpenoide intensamente dulce (+)-hernandulcina (36%) y (-)-epi-hernandulcina (22%). Alcanfor no fue determinado (<<0.01%) (35).

3.6.2.3 Actividad biocida

Estudios antibacterianos in vitro demuestran que la maceración hidroalcohólica de las hojas inhibe bacterias Gram negativo (*S. typhi* y *S. flexneri*) y Gram positivo (*S. aureus* y *S. pneumoniae*). En un segundo estudio se confirmó la actividad del extracto etanólico y

acetónico de las hojas contra bacterias Gram positivo (*S. aureus*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*), pero no contra enterobacterias (*E. coli*, *S. flexneri* y *S. typhi*) (34).

3.6.3 *Lippia alba* (Mill) N. E. Brow

3.6.3.1 Descripción y distribución

Conocida como Juanilama, Mastranto, Salvia Santa, Santa María, es un arbusto aromático, 1 a 2 m de alto, ramas largas, cayentes, densamente puberulentas o estrigosas. Presenta hojas opuestas, oblongas, 2 a 8 cm. de largo, pecíolos 2 a 14 mm. de largo, arrugadas, festonadas, cubiertas con pelillos cortos; venas prominentes en la cara externa; pedúnculos solitarios. Produce flores tubulares, 4 a 5 mm. de largo, brácteas puberulentas, ovadas, acuminadas, las inferiores mucronadas; cabeza florales redondas u oblongas, 8 a 12 mm. de largo, en pares, en pequeños tallitos en las hojas axilares, cáliz viloso, corola, púrpura o blanca (31).

Es nativa de América, crece desde México a Sur América y el Caribe en laderas, a la orilla de caminos y riveras de los ríos en alturas hasta de 1800 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Sacatepéquez, Sololá y Suchitepéquez (31).

3.6.3.2 Composición química

La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones del cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, junto con otros factores geobotánicos. Esto se evidencia en los trabajos sobre la composición química de *L. alba* realizados en Guatemala. El tamizaje fitoquímico demuestra la presencia de alcaloides, derivados diterpénicos, taninos, aceite esencial y resinas (33).

Posee componentes con actividad terapéutica y marcadores: Aceite esencial (1.2%) está compuesto de geraniol (34%), neral (23%), β -cariofileno (6%), metilheptona (5.8%), citronelal (5.2%), geraniol (4.1%), borneol (2.6%), óxido de coriofileno (2.5%), alloaromadendreno (2.4%), cis- α -bisaboleno (2.1%), germacreno D (2%), nerol (1.6%),

linalool (1.1%), citronelal (0.7%), limoneno (0.4%), isobutirato de geranilo (0.4%), cubenol (0.3%), trans-ocimeno (0.2%), butirato de geranilo (0.2%), eugenol (0.2%) (33).

Se reporta un nuevo quimiotipo de *L. alba*, un quimiotipo híbrido, caracterizado por un alto contenido de carvona, limoneno y citral, en plantas recolectadas en Colombia (36).

3.6.3.3 Actividad biocida

Estudios antibacterianos muestran que la tintura de hojas es activa contra *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. typhi*. El aceite esencial es activo contra y el extracto etanólico contra *Neurospora crassa*. Las hojas han demostrado actividad contra hongos fitopatógenos y contra insectos de granos almacenados (33).

3.6.4. *Lippia substrigosa* Turcz.

3.6.4.1 Descripción y distribución

Es un arbusto o árboles de hasta 7 m. de altura, con hojas de 5 a 24 cm. de longitud y 2.5 a 12 cm. de ancho. Se encuentra en bosques secos, algunas veces en pendientes abiertas y rocosas, entre 1,200 y 2,800 msnm. En Guatemala crece en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, El Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Sololá y Zacapa, se encuentra también en el sur de México (32).

3.6.4.2 Composición química

En la revisión de literatura no se encontró reportes sobre la composición química de *L. substrigosa*.

3.6.4.3 Actividad biocida

En la revisión de literatura no se encontraron reportes sobre usos medicinales reportados para esta planta, ni actividad biocida de la misma.

3.6.5. *Lippia myriocephala* Schlecht & Cham.

3.6.5.1 Descripción y distribución

Son arbustos o árboles de hasta 12 m. de altura, con hojas de 5 a 15 cm. de longitud por 1 a 5 de ancho. Crece en bosques rocosos, húmedos o secos, frecuentemente en laderas, pendientes de bosques nubosos, entre 300 a 2,700 msnm. Se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Guatemala, Izabal, Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, y en México, Honduras Británica, y de Honduras a Costa Rica (32).

3.6.5.2 Componente químico

En un estudio reciente efectuado en Costa Rica se reportaron 59 compuestos en el aceite esencial de *L. myriocephala*, correspondientes al 92% de la composición del aceite esencial, analizado por cromatografía de gases. Los componentes mayoritarios encontrados fueron: β -cariofileno (16.1%), germacreno D (11.2%) β -cubebeno (8.1%), geranilacetona (7.3%) y α -copaeno (6.26) (31).

3.6.5.3 Actividad biocida

En la revisión de literatura no se encontraron reportes sobre usos medicinales reportados para esta planta, ni actividad biocida de la misma.

3.6.6. *Lippia controversa* Moldenke.

3.6.6.1 Descripción y distribución

Es un arbusto de 3 m. de altura, con hojas de 2 a 7 cm. de longitud y 1 a 3 cm. de ancho. Esta especie es extremadamente variable, especialmente en el tamaño de hojas y longitud de pedúnculos. Crece en planicies y laderas húmedas o secas, frecuentemente rocosas o con arbustos. Algunas veces en bosques mixtos abiertos entre 150 y 1,500 msnm. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, el Quiché, Sacatepéquez, Santa Rosa. También en el sur de México, El Salvador, Honduras, Nicaragua y en Costa Rica (31).

3.6.6.2 Composición química

En la revisión de literatura no se encontraron reportes sobre la composición química de *L. controversa*

3.6.6.3 Actividad biocida

No se encontró información sobre estudios de aceites esenciales en esta planta ni se reportan usos medicinales conocidos

4. JUSTIFICACION

El dengue es una enfermedad causada por cualquiera de cuatro virus estrechamente relacionados. Los virus son transmitidos a los humanos por la picadura del mosquito *A. aegypti*. El paludismo o malaria es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, está causada por los parásitos del género *Plasmodium* que son transmitidos al hombre a través de la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, ambas enfermedades se encuentran en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que aproximadamente 114 millones de personas viven en áreas de riesgo de transmisión de estas enfermedades por los vectores mencionados.

Para el control de esos vectores se emplean plaguicidas químicos, que por su uso inadecuado pueden desarrollar resistencia y conlleva a diversos riesgos, tanto para el ambiente como para la salud de las personas expuestas. Los compuestos organoclorados fueron los primeros insecticidas comercializados de amplio uso, su utilización ha sido restringida y en muchos casos prohibida por el riesgo de toxicidad que su uso implica.

Por lo anterior el uso de alternativas como el control biológico ha adquirido relevancia. El empleo de productos derivados de plantas para el control de larvas de mosquitos es una alternativa natural promisoriosa y es considerada menos dañina para el medio ambiente.

Las evaluaciones realizadas en diversas especies vegetales (extractos y aceites esenciales) para eliminar larvas de mosquitos, han incrementado la lista a 140 especies de plantas con propiedades larvicida. Entre las plantas que se han destacado por su actividad contra larvas de mosquitos se encuentran las semillas del género *Annona*, que son tóxicas a larvas de mosquito *A. aegypti* y activa contra *A. aegypti* y *Anopheles* sp.

Los aceites esenciales de *L. gracilis* y *L. sidoides* han mostrado ser un potente insecticida sobre las larvas de *A. aegypti*, sin embargo, tomando en cuenta que en Guatemala existen 13 especies del género *Lippia*, es de importancia evaluar la actividad larvicida de extractos y otros aceites esenciales de plantas de este mismo género, con el fin de encontrar nuevas alternativas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad larvicida de extractos y aceites esenciales, de seis plantas del género *Lippia*, en larvas del vector transmisor del dengue y del paludismo.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Determinar la actividad larvicida de los extractos diclorometánicos y metanólicos de seis plantas del género *Lippia* contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*.
- 5.2.2 Determinar la actividad larvicida de aceites esenciales de seis plantas del género *Lippia* contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*.
- 5.2.3 Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de los aceites y extractos de seis especies de *Lippia* contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* en sus cuatro estadios.

6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los seis extractos o seis aceites esenciales de plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, poseen actividad larvicida en contra de larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo y muestra

7.1.1 Universo

Plantas del género *Lippia*, nativas de Centro América

7.1.2 Muestra

Seis extractos diclorometanólicos, seis metanólicos y seis aceites esenciales de plantas nativas del género *Lippia*: *L. alba*, *L. dulcis*, *L. controversa*, *L. substrigosa*, *L. myriocephala* y *L. graveolens*.

7.2 Recursos humanos

7.2.1 Br. Blanca Alicia Alvarado Rodríguez, estudiante de la carrera de Química Biológica.

7.2.2 Asesor: Lic. Armando Cáceres

7.2.3 Revisores: Licda. María Eugenia Paredes y Lic. Martín Gil

7.3 Recursos institucionales

7.3.1 Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química Biológica, departamento de Citohistología, fuente de financiamiento de materiales y equipo para obtención de los extractos y realización del ensayo.

7.3.2 Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), apoyo para la obtención de los aceites esenciales por Neoclevenger.

7.3.3 Ministerio de Salud y Asistencia Social, sección de Entomología Médica, el cual proporciono las larvas en los cuatro estadios de *A. aegypti* y *A. albimanus* para el ensayo

7.4 Materiales

7.4.1 Equipo

Balanza analítica, horno, percoladores, rotavapor, equipo de Neoclevenger, pipetas analíticas

7.4.2 Reactivos

Agua, etanol al 95%, diclorometano, temefos (insecticida a base de DDT).

7.4.3 Cristalería

Erlenmeyer de 250 mL y 1000 mL, vasos de precipitar de 100 y 250 mL, cápsulas de porcelana, micropipetas, frascos ambar para envasar extractos de 5 mL, viales para envasar aceites esenciales de las plantas del género *Lippia* en estudio.

7.4.4 Materiales de laboratorio

Papel filtro, papel parafin, papel aluminio, micropalacas.

7.4.5 Materiales de oficina

Hojas de papel bond, lapiceros, cuaderno, cinta adhesiva

7.5 Metodología

7.5.1 Selección de las plantas

Se seleccionaron seis plantas del género *Lippia*, nativas de Guatemala, tomando en cuenta que en Guatemala existen trece especies de dicho género.

Se colectaron las muestras en regiones de crecimiento silvestre. Se seleccionaron hojas de plantas sanas, vivas y representativas de la población, se cortó la base de las hojas utilizando una tijera de podar.

La planta se secó en condiciones libres de humedad, sol directo y polvo, ya que estos factores pueden deteriorar el material y destruir sus propiedades larvicidas. Después de la identificación botánica, la parte a utilizar (hoja) como es muy frágil solamente se pasó a

través de un tamiz para obtener un material semi-fino, se colectó en una bolsa plástica, se selló y se identificó con una etiqueta. Para los posteriores análisis se depositó muestras en el herbario BIGU de la escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.5.2 Preparación de extracto diclorometánico y metanólico

Se colocaron de 100 a 150 g de material vegetal en un percolador y se le adicionaron 5 L de diclorometano y se dejaron en reposo por 48 horas. Transcurrido el tiempo establecido se abrió la llave del percolador y se obtuvo la mezcla del diclorometano y la planta. Para obtener el extracto se extrajo el diclorometano por medio de un rotavapor, hasta dejar en el balón un volumen determinado del extracto y secar hasta obtener el polvo del mismo.

Posteriormente se reutilizó la planta del percolador, adicionándole 5 L de etanol, para obtener el extracto en polvo realizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

7.5.3 Extracción del aceite esencial por Neoclevenger

Se pesaron 50 g del material vegetal y se introdujeron en un balón de destilación de 1,000 ml. Se agregó agua destilada hasta cubrir el material. Se instaló el destilador de aceites esenciales.

En el recipiente recolector, se llenó de agua y se conectó el refrigerante, se agregó 3 ml de pentano. Se destiló a temperatura constante, aproximadamente durante 3 horas, al final de las cuales el agua y el aceite esencial se condensaron. Se midió la capa superior de aceite esencial recogido en el recipiente graduado. Se abrió la llave, se dejó caer el agua y se descantó. Se recibió la parte pentánica en un balón de 125 mL, se lavó el tubo con pentano y se agregó al destilado. Se colocó el balón al rotavapor, para separar el pentano del aceite, se colocó el aceite en un vial previamente tarado, se pesó el aceite esencial y se calculó el porcentaje de rendimiento. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces con cada una de las especies de *Lippia*.

7.5.4 Evaluación de la actividad larvicida

Se pesaron 25 mg del extracto a ensayar y se disolvió con 1 ml de DMSO (solución madre).

Posteriormente se realizarán las 4 concentraciones a evaluar para extracto metanólico y diclorometánico 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml y para aceite esencial 0.1, 0.05, 0.0025 y 0.012 mg/ml, empleando la solución madre y agua destilada.

En la microplaca se agregó por cuadruplicado 100 µl del extracto o aceite esencial con 10-15 larvas de los diferentes vectores y diferentes estadios.

Control negativo: 100 µl de agua del chorro reposada con 10-15 larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*

Control positivo: 100 µl de temefos al 1% con 10-15 larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*

Incubar a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 horas.

Contar en el estereoscopio el número de larvas muertas y determinar la CL₅₀.

7.6 Diseño experimental

7.6.1 Tipo de diseño: totalmente al azar

Se realizaron 3 tratamientos distintos los cuales consisten en la utilización de los extractos y aceites esenciales de las 6 plantas mencionadas de la siguiente forma:

Tratamiento No.1: Extracto de diclorometano contra los 4 estadios de las larvas mencionadas.

Tratamiento No. 2: Extracto de metanólico contra los 4 estadios de las larvas mencionadas.

Tratamiento No.3: Aceite esencial contra los 4 estadios de las larvas mencionadas.

Se tomaron dos controles:

Control positivo: Se utilizó temefos (insecticida a base de DDT), contra los cuatro estadios de las larvas mencionadas.

Control negativo: Se utilizó agua del chorro reposada, contra los cuatro estadios de las larvas mencionadas.

7.6.2 Número de replicas por tratamiento: 4 réplicas por conveniencia de cada tratamiento. Cada uno de los 3 tratamientos de las 6 plantas en mención se evaluaron, contra los 4 estadios de las larvas mencionadas anteriormente, empleando 4 dosis distintas.

7.6.3 Respuesta a medir: Número de larvas muertas

7.6.4 Análisis estadístico:

Prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Hubo diferencia significativa y por lo tanto se hicieron comparaciones pareadas de cada tratamiento frente al control negativo.

Análisis para CL_{50} : se determinó la concentración a la cual el 50% de larvas sometidas a los tratamientos mueren.

8. RESULTADOS

Se recolectaron seis plantas nativas de Guatemala, provenientes del Centro de experimentación y docente de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala (CEDA), Barberena Santa Rosa y faldas de volcán de Acatenango de Guatemala, se registraron en el herbario BIGU escuela de biología, para la realización de este estudio (Tabla 1).

TABLA 1. Fuente de recolección, y peso en gramos de las seis especies de *Lippia* empleadas en el estudio.

Especie	Fuente de recolección	Registro botanico (*BIGU)	Peso (g)
<i>Lippia alba</i> Mill	**CEDA	48,685	168.84
<i>Lippia dulcis</i> Trev	CEDA	48,697	85.78
<i>Lippia graveolens</i> HBK	CEDA	42,015	225.37
<i>Lippia controversa</i> Moldenke	Barbarena Santa Rosa	43,403	75
<i>Lippia substrigosa</i> Turcz	Falda de volcán Acatenango	27,624	241.96
<i>Lippia myriocephala</i> Schelecht & Cham	Falda de Volcán Acatenango	27,625	139.04

*Herbario BIGU, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

**Centro de Experimentación y Docente de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

De cada planta mencionada, se obtuvieron extractos diclorometánico y metanólicos así como aceites esenciales. De los extractos diclorometánicos se obtuvo un mayor rendimiento de *L. myriocephala* (5.45 %), seguido por *L. substrigosa* (4.74 %), *L. graveolens* (2.46 %), *L. dulcis* (2.79 %), *L. controversa* (2.09 %), *L. alba* (1.15 %); de los extractos metanólicos el que mayor rendimiento tuvo fue el de *L. dulcis* (10.64 %), seguido por *L. controversa* (9.37 %), *L. graveolens* (7.64 %), *L. alba* (3.67%), *L. myriocephala* (3.18%), *L. substrigosa* (2.88 %); de aceites esenciales se obtuvo solamente de *L. graveolens* (4.02 %), *L. dulcis* (1.61 %) y *L. alba* (1.02%). No se obtuvo un buen rendimiento de *L. myriocephala* (0.02 %), *L. substrigosa* (0.12%), *L. controversa* (0.03%), por lo que dichos aceites no fueron evaluados en el estudio (Tabla No. 2) (Anexo 3).

Especie	Aceite (g)	Rendimiento (%)	Extracto diclorometano (g)	Rendimiento (%)	Extracto metanol (g)	Rendimiento (%)
<i>L. alba</i>	0,24	1,02	1,36	1,15	4,34	3,67
<i>L. dulcis</i>	0,3	1,61	2,4	2,79	9,13	10,64
<i>L. graveolens</i>	0,6	4,02	5,56	2,46	17,22	7,64
<i>L. controversa</i>	0,01	0,03	1,57	2,09	4,03	9,37
<i>L. substrigosa</i>	0,03	0,12	11,47	4,74	6,99	2,88
<i>L. myriocephala</i>	0,01	0,02	7,59	5,45	4,43	3,18

TABLA 2. Rendimiento de extractos y aceites de las especies de *Lippia* estudiadas

Fuente: datos experimentales

Los resultados de mortalidad de larvas, posterior a la aplicación de los diferentes extractos y aceites esenciales, a las concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml y 0.1, 0.05, 0.025, 0.012 mg/ml respectivamente, se analizaron por la prueba de Kruskal Wallis y comparaciones de los grupos frente al control negativo, para determinar si hubo efecto significativo en el número de larvas muertas.

De las seis plantas en estudio la que presentó mayor actividad larvicida fue el extracto diclorometánico de *L. graveolens* en primero, segundo y tercer estadio de larvas de *A. aegypti*, cuya actividad se evidenció hasta la tercera dilución, seguida por el extracto metanólico de la misma planta, el cual tuvo actividad hasta la segunda dilución hasta el tercer estadio, y en cuarto estadio solamente fue positiva la actividad con la primera dilución. En el caso del extracto diclorometánico de *L. dulcis* se evidenció actividad hasta la segunda dilución, en larvas de primer estadio, seguida por el extracto metanólico de dicha planta hasta la primera dilución en larvas de primero y segundo estadio. Los resultados de aceites esenciales fueron positivos solamente para el aceite de *L. graveolens* sobre larvas de primero y segundo estadio hasta la primera dilución, en el caso de extractos y aceite esencial de *L. alba* no se evidenció actividad positiva (tabla no. 3).

TABLA 3. Efecto larvicida significativo de los diferentes tratamientos a los cuales se expusieron los 4 estadios de *A. aegypti*.

Tratamiento	Larvas de <i>A. aegypti</i>			
	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo
	I estadio	II estadio	III estadio	IV estadio
<i>L. graveolens</i> Metanol	1 mg/ml, 0.5 mg/ml	1 mg/ml, 0.5 mg/ml	1 mg/ml, 0.5 mg/ml	1 mg/ml.
<i>L. graveolens</i> Diclorometano	1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml	1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/mL	1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml	*extracto no tiene efecto significativo
<i>L. graveolens</i> Aceite esencial	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml	*Aceite no tuvo efecto significativo	*Aceite no tuvo efecto significativo
<i>L. dulcis</i> Diclorometano	1 mg/ml, 0.5 mg/ml	No evidencio actividad	No evidencio actividad	No evidencio actividad
<i>L. dulcis</i> Metanol	1 mg/ml	1 mg/ml	No evidencio actividad	No evidencio actividad

Fuente: datos experimentales P-value < 0.05; * P-value >0.05

En el caso de larvas de *A. albimanus* se evidenció mayor actividad larvicida con el extracto diclorometánico de *L. graveolens* hasta la dilución más baja sobre primero y segundo estadio. Con el extracto metanólico hasta el cuarto estadio. Con aceite esencial hasta segunda dilución de dicha planta en primero y segundo estadio (Tabla no. 4). Los extractos de *L. alba*, *L. controversa*, *L. substrigosa* y *L. myriocephala* no evidenciaron actividad en ninguna de las cuatro concentraciones sobre las larvas de ambos vectores en estudio.

TABLA 4. Efecto larvicida significativo de los diferentes tratamientos a los cuales se expusieron los 4 estadios de *A. albimanus*

Larvas de <i>A. albimanus</i>				
Tratamiento	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo	Efecto larvicida significativo
	I estadio	II estadio	III estadio	IV estadio
<i>L. graveolens</i> Metanol	1 mg/ml.	1 mg/ml.	1 mg/ml.	1 mg/ml.
<i>L. graveolens</i> Diclorometano	1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml	1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml	1 mg/ml, 0.5 mg/ml.	*extracto no tiene efecto significativo
<i>L. graveolens</i> Aceite esencial	0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml	0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml	0.1 mg/ml	0.1 mg/ml
<i>L. alba</i> Diclorometano	* Extracto no tiene efecto significativo.			
<i>L. dulcis</i> Aceite esencial	*Aceite no tiene efecto significativo.			

Fuente: datos experimentales P-value < 0.05; * P-value >0.05

Se determinó la concentración a la cual murieron el 50 % de las larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* expuestas a los diferentes tratamientos de extractos y aceites esenciales. La concentración letal media (CL₅₀) se calculó mediante el programa Probit con un intervalo a un nivel de confianza del 95% (tabla 5 y 6).

TABLA 5. Concentración letal media (CL₅₀) a la cual los diferentes tratamientos elimina al 50% de las larvas de *A. aegypti* en sus diferentes estadios.

<i>A. aegypti</i>			
Tratamiento	Estadio	CL50 mg/ml	LCL-LCS al 95%
<i>L. graveolens</i> /Metanol	I	0.8702	0.3220-0.7282
<i>L. graveolens</i> /Metanol	II	0.8737	0.587-1.1534
<i>L. graveolens</i> /Metanol	III	0.8407	0.2413-1.3222
<i>L. graveolens</i> /Metanol	IV	1.4987	1.0829-1.9145
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	I	0.8253	0.2838-1.3668
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	II	0.7955	0.1211-1.4698
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	III	0.8055	0.1408-1.4501
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	IV	0.8626	0.5865-1.1387
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	I	1.4906	0.953-2.0283
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	II	2.7265	1.5298-3.9231
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	III	1.8244	1.2814-2.3673
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	IV	1.0201	0.6419-1.3982
<i>L. dulcis</i> /Metanol	II	1.009	0.7972-1.2209
<i>L. dulcis</i> /Diclorometano	I	0.818	0.2453-1.3907
<i>L. alba</i> /Aceite esencial	III	1.8858	1.2545-2.5171

Fuente: datos experimentales

TABLA 6. Concentración letal media (CL₅₀) a la cual los diferentes tratamientos elimina al 50% de las larvas de *A. albimanus* en sus diferentes estadios.

<i>A. anopheles</i>			
Tratamiento	Estadio	CL50 mg/ml	LCL-LCS al 95%
<i>L. graveolens</i> /Metanol	I	0.842	0.2946-1.3894
<i>L. graveolens</i> /Metanol	II	0.9938	0.7045-1.2831
<i>L. graveolens</i> /metanol	III	1.3077	0.7251-1.8903
<i>L. graveolens</i> /Metanol	IV	1.0201	0.6419-1.3982
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	I	0.7955	0.2585-1.3324
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	II	0.8041	0.3457-1.2626
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	III	1.2698	0.7511-1.7885
<i>L. graveolens</i> /Diclorometano	IV	2.283	1.5616-3.0044
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	I	1.6834	1.190-2.1768
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	II	1.1217	0.7021-1.5414
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	III	1.5824	1.0311-2.1336
<i>L. graveolens</i> /Aceite esencial	IV	1.4278	1.0328-1.8227
<i>L. dulcis</i> /Diclorometano	IV	1.785	1.0848-2.4801
<i>L. dulcis</i> /Aceite esencial	I	1.8244	1.2814-2.3673
<i>L. alba</i> /metanol	IV	2.2624	1.6076-2.9171
<i>L. alba</i> /diclorometano	I	2.2624	1.6076-2.2624

Fuente: datos experimentales

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Esta investigación se llevo a cabo con el fin de determinar la capacidad larvicida de extractos y aceites esenciales de plantas del género *Lippia* nativas de Guatemala, empleando para ello las hojas de dichas plantas. Se debe de tomar en cuenta que existen estudios, los cuales señalan que las diferencias en la toxicidad de diferentes extractos pudieran deberse a la solubilidad de sus compuestos activos en los solventes o a la presencia de inhibidores activos en los solventes o bien a la presencia de inhibidores de principios insecticidas (40). En este caso para evaluar la actividad larvicida de plantas del género *Lippia* se emplearon como solventes polares el diclorometano y el metanol, mostrándose actividad en extractos con ambos solventes de *L. graveolens*, lo que indica que los componentes de *L. graveolens* son solubles en dichos extractos y por lo tanto permitió evaluar la actividad larvicida.

En la literatura se menciona que extractos preparados a partir de etanol y metanol, disolventes menos polares son más activos contra larvas de *A. aegypti* que los extractos preparados por la extracción con agua como disolvente mas polar, ésto es probablemente una indicación de que la toxicidad de estas larvas se asocie en general con sustancias de polaridad media o baja. En este estudio se utilizó diclorometano como solvente menos polar, seguido por el metanol en este caso. Dando como resultado mayor actividad larvicida en el extracto diclorometanico (40).

Más de 2000 especies de plantas poseen compuestos químicos con propiedades biocidas útiles en el control de plagas, y entre éstas, 344 especies han demostrado que tienen algún grado de actividad contra las larvas de mosquitos (29,31).

Se han realizado diversos estudios de diferentes especies del género *Lippia*, uno de ellos indica que poseen actividades desde tóxicas a diversos microorganismos, así como prevención de lesiones gástricas como es el caso de *L. alba* (39). Es por ello que en este estudio se tomaron en cuenta plantas de este género para demostrar de alguna manera la actividad larvicida que podrían presentar, debido a sus componentes naturales. Desde la edad media y especialmente hoy en día, los aceites esenciales han sido ampliamente usados en aplicaciones bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasíticos, insecticidas, medicinales

y cosméticas, por ello que se decidió a investigar la actividad larvicida no solamente de extractos sino también de aceites esenciales (41).

Las referencias consultadas indican que el aceite esencial de *L. graveolens* presenta actividad larvicida, lo cual concuerda con los resultados de este estudio, ya que de los tres aceites evaluados solamente el de *L. graveolens* mostró actividad larvicida significativa, debido a que en sus componentes se encuentra en mayor cantidad el timol, compuesto que ha sido evaluado por otros investigadores y ha mostrado una alta actividad como insecticida contra *Sitophilus zeamais* (42).

Posiblemente de los aceites evaluados de *L. alba* y *L. dulcis* no se obtuvieron resultados positivos porque no poseen los componentes necesarios para efectuar dicha actividad, o bien porque los compuestos que poseen no son solubles en los solventes utilizados. En el caso de los aceites de *L. myriocephala*, *L. substrigosa* y *L. controversa* no fueron evaluados debido a que no se obtuvo un alto rendimiento de aceite esencial, esto posiblemente por propiedades extrínsecas de las plantas (tabla 2).

En esta investigación, se evidenció la actividad del extracto diclorometánico de *L. graveolens* lo cual es muy importante ya que la mayoría de los estudios de *L. graveolens* se han centrado en la composición química y actividad biológica del aceite esencial y son pocos los informes científicos sobre química y caracterización de los extractos polares, así como sus actividades biológicas (38).

El resto de extractos y aceites esenciales evaluados no presentaron actividad larvicida lo cual pudo haber sido por factores extrínsecos de la planta, tales como la especie y variedad de la planta, época de recolección, parte cosechada y forma de preparación, extracción y aplicación así como la presencia de compuestos químicos que favorezcan la actividad deseada en este caso.

El extracto que presentó una menor CL_{50} fue el diclorometánico de *L. graveolens* ya que mostró actividad positiva al matar al 50 % de las larvas de ambos vectores a una concentración mínima (0.7955 mg/ml). Fue el único extracto en estudio que presentó mayor actividad por las características mencionadas anteriormente (Tablas 5 y 6) (Anexos 1 y 2).

Se concluye que la especie *L. graveolens* es candidato ideal y promisorio como agente biocida natural para el control larvario de *A. aegypti* y *A. albimanus*.

10. CONCLUSIONES

- 9.1 De los 6 extractos metanólicos y diclorometánicos evaluados contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* solamente el extracto de *L. graveolens* posee un efecto larvicida significativo
- 9.2 De los aceites esenciales evaluados solo el aceite esencial de *L. graveolens* presentó actividad larvicida contra larvas de *A. aegypti* y *A. anopheles*.
- 9.3 La menor CL₅₀ en este estudio la obtuvo el extracto diclorometánico de *L. graveolens* contra larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus* en segundo y primer estadio respectivamente.
- 9.4 Para este estudio no fue posible determinar actividad larvicida de los extractos metanólico y diclorometanólico y aceites esenciales de *L. controversa*, *L. substrigosa* y *L. myriocephala*.

11. RECOMENDACIONES

- 10.1 Evaluar la actividad larvicida de otras especies de plantas del genero *Lippia* para proporcionar nuevas alternativas naturales, para la erradicación de larvas de vectores importantes como *A. aegypti* y *A. albimanus*.
- 10.2 Caracterizar las variables técnicas de la producción de extractos y aceites de *L. graveolens* para considerar su potencial de explotación como un larvicida natural.
- 10.3 Evaluar las características toxicológicas del aceite y extracto de *L. graveolens* para recomendar su uso en la agricultura ecológica.
- 10.4 Evaluar otros diferentes extractos de las plantas utilizadas o de diferentes localidades.

12. REFERENCIAS

1. Suárez L *et al.* Dengue clásico y hemorrágico: una enfermedad reemergente y emergente en Perú. *Rev Cub Infec.* 2007;24:725-727
2. Rivers T. Diagnóstico y tratamiento de virus y rickettsias. 3ra. Ed. México: Interamericana S.A, 1965. 761p.
3. Vaughan G. *et al.* Dengue virus replicative intermediate RNA detection by reverse transcription-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:198-200.
4. Ángel M *et al.* Interpretación Clínica del Laboratorio. 7ma. Ed. Colombia: Panamericana. 2006. 702 p.
5. Diaz A, Kourí G, Guzman M. Cuadro clínico de la fiebre hemorrágica del Dengue, Síndrome de choque del Dengue en el adulto. *Bol of Sanit Panam* 1988; 104:560-571
6. Halstead S. Observations related to the patogénesis of dengue hemorrhagic fever. *Yale J Biol Med.* 1970;42:350-362.
7. Halstead S. Patogénesis of dengue: Challenge to molecular biology. *Science* 1988; 239: 476-481.
8. Lei H, Yeh T, Liu H. Immunopathogenesis of dengue Virus infection. *J Biomed Sci.* 2001;8:377-388.

9. Petit L *et al.* Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum Philippe Dussar. *Rev Cub Med Trop.* 2008;2:110-115
10. Becerril F, Romero C. *Parasitología Médica. De las moléculas a la enfermedad.* México. McGraw-Hill Interamericana.2004. 301 p.
11. Atias A. *Parasitología Médica.* 3ra. Edición. México. Impresos Universitaria S.A. 1991. 311p
12. Moyano M, Mendez, F. Defectos eritrocíticos y densidad de la parasitemia en pacientes con malaria por *Plasmodium falciparum* en Buenaventura, Colombia. *Rev Panam.* 2005; 18:25-32.
13. Pabón A *et al.* Evaluación de la prueba rápida inmunocromatográfica Binax® NOW ICT Pf/Pv para el diagnóstico de paludismo en un área endémica de Colombia. *Biomedica* 2007;27:225-35
14. Acevedo A *et al.* Diagnóstico rápido de paludismo (Malaria) basado en una técnica inmunocromatográfica. *Servicios de Análisis Clínicos y Microbiología.* Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. Madrid 2005
15. Geosalud. "Malaria". Sabanilla de Montes de Oca: Ministerio de Salud Pública de Costa Rica, Doc. Tec. Febrero 2008. Marzo 2010.
<<http://www.netsalud.sa.cr/ms/estadist/enferme/palu01.htm>>
16. Fragasso G *et al.* Cardiotoxicity after low-dose chloroquine antimalarial therapy. *Epub* 2009; 24(5):385-7.

17. Beck J. Parasitología Médica. 3ra. Edición. Mexico: Interamericana S.A.1984. 340 p.
18. Brown H, Neva F. Parasitología Clínica. 5ta edición. México: Interamericana S.A. 1985. 360 p.
19. Rigau-Pérez J, Clark G. Cómo responder a una epidemia de dengue: visión global y experiencia en Puerto Rico. Rev Panam Salud Públ. 2005;17:282-293
20. Diéguez Fernández L *et al.* Contribución al estudio de la familia *Culicidae* de Guatemala: relación y distribución geográfica de las principales especies en la región norte. Rev Cub Med Trop 2006;58(1):30-35
21. World Health Organization. Guidelines for the treatment of Malaria. 2nd edition. 2010. 194p. Marzo 2010. <<http://apps.who.int/malaria/wmr2008/MAL2008-SumKey-SP.pdf>>
22. World Health Organization. Global Programme Malaria. World Malaria Report 2009. 2009. Marzo 2010
<http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/mal2009_summary_and_key_points_es.pdf>
23. Vargas F *et al.* Determinación de la resistencia a insecticidas en *A. aegypti*, *A. albimanus* y *L. peruensis*, procedentes del Norte peruano. Rev Peru Med Exp Salud Públ. 2006; 23:110-115
24. Karma M *et al.* Plaguicidas y salud de la población. México: Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, Doc. Tec. No 003, 2004. (p. 246-254).

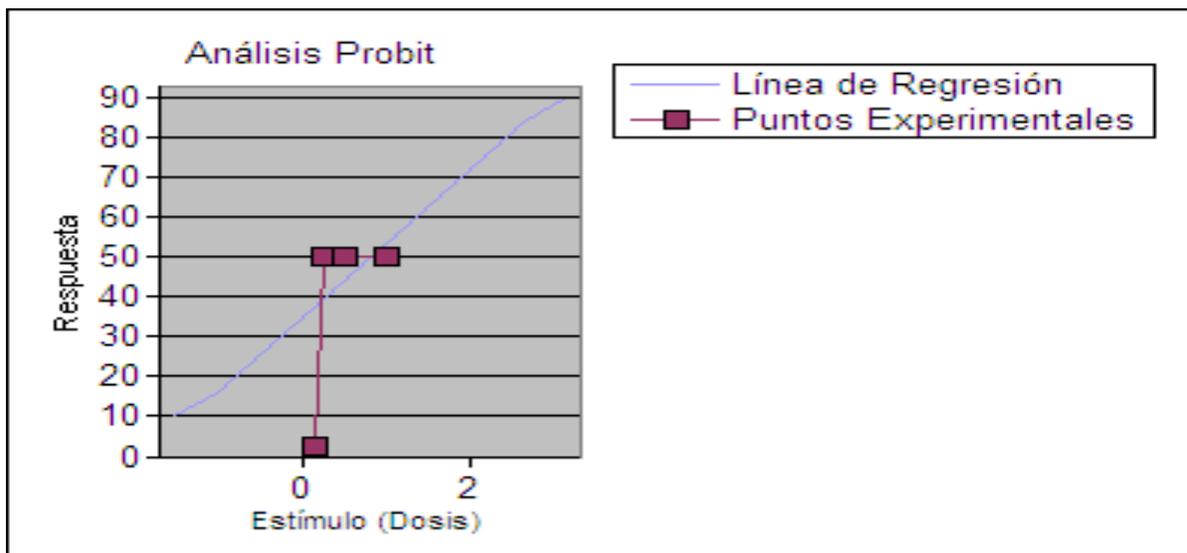
25. Rahumuman A. Larvicidal activity of some *Euphorbiaceae* plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*). *Rev Mex Zool.* 2008; 102(5):867-73.
26. Ezeoun F, Chidume G, Udedi, S. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bio Tec.* 2001;76: 273-274
27. Pavel R. Insecticidal Properties of Several Essential Oils on the House Fly (*Musca domestica* L.) *Phytothe Res.* 2008; 22: 274–278
28. Gillij Y, Gleiser M, Zygadlo J. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bio Tec.* 2008;99: 2507–2515
29. Pérez D, Inaconn J. Efecto insecticida de *Sacha Yoco* (*Paullina clavigera* var. *Bullata* Simpson (*Sapandiceae*) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex. Bosse (*Commelinaceae*) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova, Garcia y Lopez, 1941 principal vector de Malaria en Ucayali, Perú. *Ecol Apl.* 2004;3: 64-72.
30. Yaéz X, Sanchez L, Pinzón M. Composición química del aceite esencial de *Lippia schlimii* Turcz (Salvio blanco). Universidad de Pamplona. *Doc. Tec.* No 32, 2006 (p 32-37)
31. Standley P, Williams L. *Flora of Guatemala.* *Fieldiana Botany.* 1970; 24(9):206-214
32. Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves M. Proença da Cunha A. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala.

- Planta Med.2003;69(1):80-83.
33. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala.1996. 403 p.
 34. Mendoza C. Confirmación de la actividad antimicrobiana de tres especies del género *Lippia*: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 48 p.
 35. Souto-Bachiller F *et al.* Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. Science. 1997;44:1077-1086
 36. Duran D *et al.* Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia. Scientia et Tech. 2007;33:435-438
 37. Jayes Reyes P *et al.* Aceites esenciales de nueve plantas Nativas de Guatemala, familia *Verbenaceae* y *Laurenceae*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Proyecto de investigación, Faculta de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 34p
 38. Martínez Rocha A *et al.* Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). Plant Foods Hum Nutr .2008; 63:1–5
 - 39 Pascual ME. *et al.* Antiulcerogenicactivity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Il Farmaco. 2001;56: 501–504
 40. Pohlit, A.M. *et al.* . Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. Acta Amaz. Manaus. 2004; 34:97-105

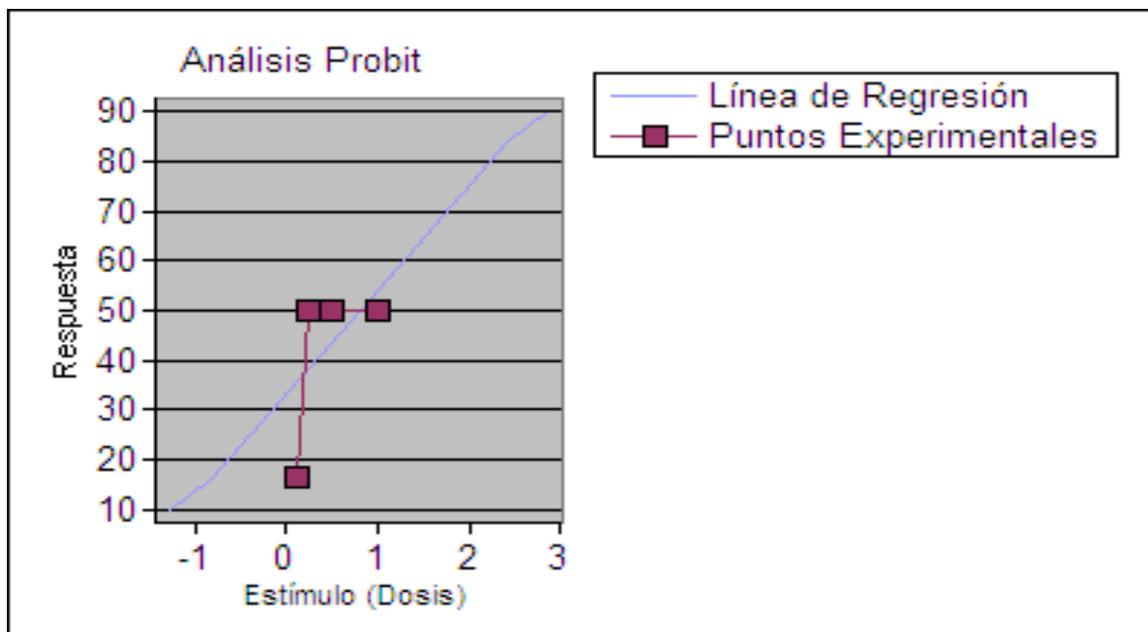
- 41 Bakkali F *et al.* Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46: 446–475
- 42 Nerio L. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*. 2009; 45: 212–214

13. ANEXOS

Anexo No. 1 *Lippia graveolens*/diclorometano/II estadio *A. aegypti*. Análisis Probits para determinación de la CL₅₀



Anexo No. 2 *Lippia graveolens*/diclorometano/I estadio *A. albimanus*



Anexo No. 3. Extractos diclorometánicos y metanólicos de *Lippias* en estudio



Anexo No. 4 En esta imagen se observa cómo se tomaron las larvas de los diferentes estadios de los vectores en estudio, para poder colocarlos en las placas y realizar el análisis.



Anexo No. 5. La imagen muestra una parte del procedimiento en la cual se agregan los diferentes extractos a pozos que ya contienen larvas de *A. aegypti* o *A. albimanus* que se lleva a cabo para la evaluación de la actividad larvicida de las *Lippias* en estudio.



Anexo No. 6. La imagen muestra una placa la cual contiene las larvas de *A. aegypti* en III y IV estadio posterior al análisis



Anexo No. 7. La imagen muestra una placa la cual contiene la larvas de *A. albimanus* en IV estadio posterior al análisis



