



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
IPN – CIIDIR – OAXACA**

**BIOPROSPECCION Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS  
NATURALES PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* Y *Culex  
quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE)**

**PRESENTA:  
JOSÉ ABIMAEEL CAMPOS RUIZ**

**T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**DIRECTORES DE TESIS:  
DR. RAFAEL PEREZ PACHECO  
DR. CARLOS ALEJANDRO GRANADOS ECHEGOYEN**

**SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA  
DICIEMBRE 2019**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 12:00 horas del día 04 del mes de septiembre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:  
Bioprospeccion y caracterización de productos naturales para el control de Aedes aegypti y Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)

Presentada por el alumno:

Campos Ruiz  
Apellido paterno Apellido materno  
Nombre(s) José Abimael

Con registro: 

B	1	7	0	5	9	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

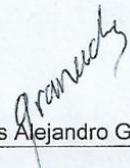
Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

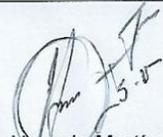
Directores de tesis

  
Dr. Rafael Pérez Pacheco

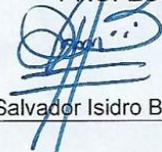
  
Dr. Carlos Alejandro Granados Echegoyen

  
Dr. José Antonio Sánchez García

  
Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

  
Dr. Sabino Honorio Martínez Tomas

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE  
PROFESORES

  
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca el día 04 del mes septiembre del año 2019, el (la) que suscribe José Abimael Campos Ruiz alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro B170590, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Rafael Pérez Pacheco y Dr. Carlos Alejandro Granados Echegoyen y cede los derechos del trabajo titulado **“Bioprospección y caracterización de productos naturales para el control de Aedes aegypti y Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [josecampos92@gmail.com](mailto:josecampos92@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente al autor y/o director del mismo.



  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

Nombre y firma

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR – IPN – Unidad Oaxaca) por darme la oportunidad de continuar mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco por creer en mi y brindarme su apoyo incondicional para el desarrollo de la investigación, por todos los conocimientos compartidos, por su amistad y consejos a lo largo de todo el proceso.

Al Dr. Carlos A. Granados Echegoyen por inculcar en mi el amor por la investigación, por los conocimientos transmitidos y por su invaluable apoyo y amistad en todo mi desarrollo profesional y académicos.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. José Antonio Sánchez García, Dr. Teodulfo Aquino Bolaños y Dr. Sabino Martínez Tomas por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones para el mejoramiento de este documento.

A los miembros del cuerpo académico del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche por la facilidades prestadas para el desarrollo de mi estancia de investigación.

A mis compañeros y amigos de la maestría Marisol y Eliel por compartir y hacer más ameno el proceso.

A todas las personas que directa e indirectamente fueron parte de mi formación durante mi estancia en el CIIDIR – Oaxaca.

## DEDICATORIA

A Dios por la fortaleza para solventar cada día diferentes obstáculos.

A mis Abuelitos, que donde quiera que esten, son parte de este logro.

A mi mamá, por que sembró en mí, que la unica forma para salir adelante es luchando día a día, con dedicación, esfuerzo y perseverancia, además de su apoyo infinito e incondicional a pesar de las adversidades.

A mis tias Irma, Ceci y Leti, que siempre me apoyan y me alientan a seguir adelante y ser cada día mejor.

## RESUMEN

Los mosquitos son un grupo de artrópodos que comprenden aproximadamente 3,500 especies que se encuentran distribuidas en áreas tropicales y subtropicales. *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* son vectores de diferentes patógenos y parásitos que perjudican a humanos y otros vertebrados, por lo que el control de las poblaciones de estos insectos se realiza con la aplicación de insecticidas sintéticos. En este sentido, en el presente trabajo se realizó una revisión de literatura de los modos de acción de diferentes metabolitos secundarios sobre los insectos y se determinó la actividad biológica de extractos fúngicos y vegetales sobre fases acuáticas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas sintetizadas durante las fases del ciclo de vida de diferentes organismos y poseen un efecto insectistático o tóxico en los insectos, perturbando procesos celulares y fisiológicos. Se muestra la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios en las fracciones polares y no polares de los extractos metanólicos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp., extractos etanólicos de *Myrothecium dimerum*, *M. nivale* y *M. roridum*, extractos etanólicos, hexánicos y metanólicos de *Agave angustifolia* y *A. karwinskii*. Se determinó la actividad tóxica en huevos de *A. aegypti* superior al 50% con la aplicación de la concentración de 800 ppm de extracto polar y no polar de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp., mientras que

los valores más altos de mortalidad de larvas se obtuvieron con la concentración de 800 ppm de la fracción no polar de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. Con la aplicación de extractos etanólicos de *M. dimerum* y *M. nivale*, se obtuvieron valores de 100% de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* después de 48 h de la aplicación de la concentración de 800 ppm. La aplicación de los extractos de las tres especies de *Myrothecium* inhibieron el crecimiento de las larvas de *Ae. aegypti* en comparación con el control. Con la aplicación de los extractos etanólicos, hexánicos y metanólicos de *A. angustifolia*, se obtuvieron valores de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* superiores al 60% después de 24 h de la aplicación de la concentración más alta (1000 ppm), mientras que con larvas de *Cx. quinquefasciatus* se obtuvieron valores menores de 73.75%. En la inhibición de crecimiento, con la aplicación de concentraciones de 62.5 y 125 ppm de extracto etanólico, no se presentaron diferencias significativas. Las larvas de *Ae. aegypti* tratadas con extracto etanólico y metanólico de *A. karwinskii* presentaron valores superiores al 60% con las concentraciones más altas después de 24 h de la aplicación, mientras que con la concentración de 1250 ppm extracto etanólico se presentó 100% de mortalidad de larvas de *Cx. quinquefasciatus* después de 48 h de la aplicación del tratamiento. Con la aplicación del extracto de hexano, no se presentó mortalidad de larvas de *Ae. aegypti*.

**Palabras clave:** metabolitos secundarios, control de mosquitos, inhibición de crecimiento, larvicida, extractos.

## ABSTRACT

The mosquitoes are a group of arthropods that comprise approximately 3,500 species that are distributed in tropical and subtropical areas. *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* are vectors of different pathogenic and parasites that harm human beings and other vertebrates, for what the control of the populations of these insects realizes with the insecticides application synthetics. In this sense, in the present work is realized a review of literature of the manners of action of different secondary metabolites on the insects and decide the activity biological of fungical and vegatble extracts on aquatic phases of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. The secondary metabolites are organic molecules synthesized during the phases of the life cycle of different organisms and they possess an insctistatic or poisonous effect in the insects, disturbing cellular and physiological processes. There appears the presence of different groups of secondary metabolites in the polar and not polar fractions of the metanolics extracts of *Paecilomyces* sp. and *Verticillium* sp., ethanolics extracts of *Myrothecium dimerum*, *M. nivale* and *M. roridum*, ethanolics, hexanics and methanolics extracts of *Agave angustifolia* and *A. karwinskii*. The poisonous activity decided in eggs of *Ae. aegypti* higher to 50% with the application of the concentration of 800 ppm of polar and not polar extract of *Paecilomyces* sp. and *Verticillium* sp., while the highest values of mortality of larvae were obtained by the concentration

of 800 ppm of not polar fraction of *Paecilomyces* sp. and *Verticillium* sp. With the ethanolics extracts application of *M. dimerum* and *M. nivale*, we got values of 100% of mortality of larvae of *Ae. aegypti* after 48 h of the application of the concentration of 800 ppm. The application of the extracts of three species of *Myrothecium* they inhibited the growth of the larvae of *Ae. aegypti* compared to the control. With the application of the ethanolics, hexanics and methanolics extracts of *A. angustifolia*, there were obtained values of mortality of larvae of *Ae. aegypti* higher to 60% after 24 h of the application of the highest concentration (1000 ppm), while with *Cx. quinquefasciatus* larvae less values of 73.75% were obtained. In the growth inhibition, with the application of concentrations of 62.5 and 125 ppm of ethanolic extract, significant differences did not appear. The larvae of *Ae. aegypti* treated with ethanolic and methanolic extract of *A. karwinskii* they presented values higher to 60% with the highest concentrations after 24 h of the application, while with the concentration of 1250 ppm ethanolic extract there presented before himself 100% of mortality of larvae of *Cx. quinquefasciatus* after 48 h of the application of the treatment. With the application of the hexane extract there did not appear mortality of larvae of *Ae. aegypti*.

**Key words:** Secondary metabolites, mosquitoes control, growth inhibition, larvicide, extracts.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCION GENERAL .....	16
OBJETIVO GENERAL .....	18
HIPOTESIS .....	18
Hipótesis alternativa (Ha) .....	18
Hipótesis nula (Ho) .....	18
<b>CAPÍTULO 1. MODO DE ACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS</b>	
<b>CONTRA INSECTOS: UNA REVISIÓN .....</b>	<b>19</b>
RESUMEN .....	19
ABSTRACT .....	19
INTRODUCCION .....	20
<i>Alcaloides</i> .....	22
<i>Flavonoides</i> .....	23
<i>Taninos</i> .....	24
<i>Terpenoides</i> .....	24
<i>Cumarinas</i> .....	25

LITERATURA CITADA .....	26
<b>CAPÍTULO 2. EXTRACTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS .....</b>	<b>32</b>
<b>Actividad larvicida y ovicida de fracción polar y no polar de extractos de <i>Paecilomyces</i> sp. y <i>Verticillium</i> sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae).....</b>	<b>32</b>
RESUMEN.....	32
ABSTRACT.....	33
INTRODUCCIÓN .....	34
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
<i>Obtención de material biológico .....</i>	<i>38</i>
<i>Cría de Aedes aegypti.....</i>	<i>38</i>
<i>Obtención de huevos de mosquito .....</i>	<i>38</i>
<i>Aislamiento de hongos .....</i>	<i>39</i>
<i>Conservación e identificación.....</i>	<i>40</i>
<i>Obtención de extractos fúngicos .....</i>	<i>41</i>
<i>Fraccionamiento de extractos fúngicos .....</i>	<i>42</i>
<i>Preparación de concentraciones .....</i>	<i>42</i>

<i>Actividad ovicida en condiciones de laboratorio</i> .....	43
<i>Actividad larvica en condiciones de laboratorio</i> .....	43
<i>Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)</i> .....	44
<i>Análisis estadístico</i> .....	45
RESULTADOS .....	46
<i>Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC</i> .....	46
<i>Actividad ovicida</i> .....	47
<i>Actividad larvica</i> .....	48
DISCUSIÓN .....	50
CONCLUSION .....	53
LITERATURA CITADA .....	54
<b>Toxicidad de extractos etanolicos de <i>Myrothecium</i> spp. contra larvas del mosquito vector del Dengue <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)</b> .....	<b>64</b>
RESUMEN.....	64
ABSTRACT.....	65
INTRODUCCIÓN .....	66
MATERIALES Y MÉTODOS .....	68
<i>Obtención de material biológico</i> .....	68

<i>Cría de Aedes aegypti</i> .....	68
<i>Obtención de extractos fúngicos</i> .....	69
<i>Preparación de concentraciones</i> .....	70
<i>Actividad larvícida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio</i> .....	70
<i>Duración larval y pupal en condiciones de laboratorio</i> .....	71
<i>Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)</i> .....	72
<i>Análisis estadístico</i> .....	73
<b>RESULTADOS</b> .....	74
<i>Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC</i> .....	74
<i>Actividad larvícida</i> .....	74
<i>Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito</i> .....	76
<b>DISCUSIÓN</b> .....	77
<b>CONCLUSION</b> .....	80
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	82
<b>CAPITULO 3. EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS DE OAXACA</b> .....	89
<b>Actividad larvícida e inhibición de crecimiento de extractos de <i>Agave angustifolia</i> (Asparagaceae: Agavoideae) contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> (Díptera: Culicidae)</b> .....	89

RESUMEN .....	89
ABSTRACT .....	90
INTRODUCCIÓN .....	91
MATERIALES Y MÉTODOS .....	94
<i>Obtención de material biológico .....</i>	<i>94</i>
<i>Cría de mosquitos .....</i>	<i>94</i>
<i>Colecta de plantas y preparación de extractos .....</i>	<i>95</i>
<i>Preparación de concentraciones para bioensayos .....</i>	<i>95</i>
<i>Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC) .....</i>	<i>96</i>
<i>Bioensayos de actividad larvícida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio .....</i>	<i>97</i>
<i>Análisis estadístico .....</i>	<i>99</i>
RESULTADOS .....	100
<i>Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC .....</i>	<i>100</i>
<i>Actividad larvícida .....</i>	<i>101</i>
<i>Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito .....</i>	<i>103</i>
DISCUSIÓN .....	106
CONCLUSIONES.....	110

LITERATURA CITADA .....	111
<b>Primer reporte de actividad larvicida e inhibición de crecimiento de larvas de mosquitos vectores de enfermedades con extractos de <i>Agave karwinskii</i> (Asparagaceae: Agavoideae).</b> .....	<b>121</b>
RESUMEN .....	121
ABSTRACT .....	122
INTRODUCCIÓN .....	124
MATERIALES Y MÉTODOS .....	126
<i>Obtención de material biológico</i> .....	126
<i>Cría de mosquitos</i> .....	126
<i>Colecta de plantas y preparación de extractos</i> .....	127
<i>Preparación de concentraciones para bioensayos</i> .....	128
<i>Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)</i> .....	129
<i>Bioensayos de actividad larvicida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio</i> .....	130
<i>Duración larval y pupal en condiciones de laboratorio</i> .....	131
<i>Análisis estadístico</i> .....	132
RESULTADOS .....	133

<i>Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC</i> .....	133
<i>Actividad larvícida</i> .....	134
<i>Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito</i> .....	136
DISCUSIÓN .....	139
CONCLUSIONES.....	144
LITERATURA CITADA .....	145

## INTRODUCCION GENERAL

Este trabajo de tesis se está desarrollando a partir de la pregunta de investigación de la posibilidad de realizar una búsqueda sistemática de nuevos compuestos químicos naturales de origen vegetal y fúngico que son parte de la biodiversidad, con la finalidad de formular productos que puedan integrarse en la estrategia de prevención, manejo y control de dos especies de mosquitos de importancia epidemiológica. En este sentido, a continuación, se presenta la estructura de los capítulos científicos y descripción de los avances metodológicos.

En el *Capítulo 1* se integra una revisión de literatura de los diferentes modos de acción de los metabolitos secundarios en los insectos, con la finalidad de comprender la importancia de los productos naturales para el control y manejo de las poblaciones.

El *Capítulo 2* esta conformado por la metodología y resultados de la evaluación del efecto tóxico de extractos obtenidos de hongos entomopatogenos y fitopatógenos contra larvas de *Ae. aegypti*.

En el *Capítulo 3* se presenta la metodología de obtención de extractos etanólicos, hexánicos y metanólicos a partir de hojas secas de plantas nativas de Oaxaca, específicamente de las especies de *Agave angustifolia* y *Agave karwinskii*, además del procedimiento para el establecimiento de los bioensayos, las variables evaluadas y el análisis estadístico de los datos colectados. Se muestran los resultados del análisis

fitoquímico cualitativo, actividad larvicida, inhibición de crecimiento y efecto en la durabilidad de larvas y pupas en mosquitos *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) y *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*).

Con el trabajo realizado, se lograron fortalecer y adquirir habilidades de investigación para aplicar las técnicas y métodos que permiten formular productos naturales y proponer alternativas no químicas para el control de insecto de importancia económica.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad biológica de extractos vegetales y fúngicos sobre fases acuáticas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

## HIPOTESIS

### Hipótesis alternativa (Ha)

Al menos uno de los extractos vegetales y/o fúngicos mostrará actividad biológica sobre fases acuáticas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

### Hipótesis nula (Ho)

- Ninguno de los extractos vegetales y/o fúngicos mostrará actividad biológica sobre fases acuáticas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*

# CAPÍTULO 1. MODO DE ACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CONTRA INSECTOS: UNA REVISIÓN

Mode of action of secondary metabolites against insects: A review

## RESUMEN

Los metabolitos secundarios son productos naturales sintetizados por diferentes hongos y plantas. Estos compuestos funcionan como defensa y poseen diferentes niveles de actividad sobre procesos celulares y fisiológicos de los insectos. En el presente capítulo se presentan diferentes grupos de metabolitos secundarios que se han reportado con al menos un efecto tóxico sobre diferentes especies de insectos. Los alcaloides son compuestos que se han reportado ampliamente con una amplia gama de actividad biológica, como la mortalidad y efectos de desequilibrio de diferentes sustancias o compuestos. Los flavonoides y las cumarinas también interfieren en diferentes procesos como interrupción de la actividad de enzimas que forman parte el sistema de desintoxicación de los insectos. Los taninos actúan generando lesiones en los intestinos de los insectos, mientras que los terpenoides tienen un efecto antialimentario y de inhibición de crecimiento.

*Palabras clave:* Alteraciones, insectistático, mortalidad, productos naturales.

## ABSTRACT

The secondary metabolites are natural products synthesized by different fungi and plants. These compounds work like defense and possess different activity levels

on cellular and physiological processes of the insects. In the present chapter there present before themselves different groups of secondary metabolites that have been brought by at least a poisonous effect on different species of insects. The alkaloids are composed that have been brought extensively with a wide range of biological activity, as the mortality and imbalance effects of different substances or compounds. The flavonoids and the cumarins also interfere in different processes like interruption of the activity of enzymes that are part the system of detoxification of the insects. The tannins act generating injuries in the intestines of the insects, while the terpenoids have an antifeed effect and of growth inhibition.

*Key words:* Alterations, insectistatic, mortality, natural products.

## INTRODUCCION

Los productos naturales son compuestos de moléculas orgánicas que poseen estructuras químicas complejas producidas por cualquier organismo, incluidos los metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos secundarios (MS) son pequeñas moléculas orgánicas que no son esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo que los produce, pero sólo se sintetizan durante distintas fases del ciclo de vida y/o bajo ciertas condiciones ambientales. (Monfil & Casas-Flores, 2014; Teichert, et al., 2014). Los MS se clasifican de acuerdo a su composición, estructura química, su ruta de síntesis o su solubilidad en diferentes

disolventes. Una clasificación sencilla está basada en su estructura química, que contempla tres grupos: compuestos fenólicos (que poseen en su estructura uno o más anillos de fenol; incluye cumarinas, flavonoides y taninos), compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides, principalmente) y compuestos de carbono e hidrógeno (terpenoides). (Chowański et al., 2016; Hanson, 2003; Kuete, 2013).

Los MS producidos por hongos y plantas, principalmente, sirven como mecanismo de defensa y poseen amplio espectro de actividad, afectando a los insectos a nivel de células, tejidos o de su organismo (Chowański et al., 2016). De manera general, actúan perturbando los procesos celulares y fisiológicos responsables de la homeostasis, que como consecuencia tiene un efecto insectistático o conducen a la muerte. Se ha demostrado que los principales efectos de los MS son la inhibición de la alimentación, alteración en el desarrollo, reducción de la fecundidad, deformaciones o malformaciones en las generaciones consecutivas, interferencia en la actividad de enzimas vitales, señalizaciones en el sistema nervioso, bloqueo de rutas metabólicas, afectación del comportamiento, reducción del número de individuos de las poblaciones (Wink, 2000; Adeyemi, 2010; López & Pascual- Villalobos, 2010; Rattan, 2010; Wink, 2013; Nenaah, 2014; Teichert et al., 2014; Maazoun et al., 2017; Rosado-Aguilar et al., 2017).

## *Alcaloides*

Los alcaloides son los compuestos más comunes y biológicamente activos, por lo que se han descrito aproximadamente más de 12000 alcaloides. (Chowański et al., 2016). Diversos estudios, han demostrado que los alcaloides tienen una amplia gama de actividad biológica, generando interferencia en diferentes mecanismos fisiológicos del insecto. Al penetrar en el insecto, los alcaloides conducen a la generación de especies de reactivas de oxígeno (ERO) (iones de oxígeno, radicales libres y peróxido) que promueven estrés oxidativo que tiene como consecuencia la alteración del potencial de la membrana mitocondrial y se induce la muerte celular, además se abren los canales de la membrana celular y en consecuencia se aumenta la concentración de iones de calcio en la célula, lo que conduce a la apoptosis (Adamski et al., 2014; Chowański et al., 2016; Macedo-Márquez, 2012). Estos compuestos interrumpen el equilibrio y debilitamiento de las hormonas que participan la metamorfosis del insecto. El proceso se ve afectado por la interrupción de la hormona protoracicotrópica (HPTT) que activa las glándulas protorácicas para promover la biosíntesis de ecdisoma o hormona de la muda y la hormona juvenil, que son esenciales para la maduración de los huevos, y sin el correcto funcionamiento de ellas las larvas de diferentes especies pueden durar un mayor tiempo sin cambiar de fase y morir, aunque en algunos casos los estados larvales logran empuparse pero los adultos emergen con las alas deformadas o se muestran

una reducción en la fecundidad (Ge et al., 2015; Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2007).

Otro de los efectos a nivel del sistema nervioso de los alcaloides en los insectos consiste en mimetizar la acetilcolina (neurotransmisor) al combinarse con una proteína integral de la membrana que se denomina receptor acetilcolínico. El receptor al reaccionar con el alcaloide altera la permeabilidad de la membrana lo que ocasiona la generación de nuevos impulsos que provocan contracciones espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte (Celis et al., 2010). También, poseen efectos neurotóxicos que se manifiestan por la disminución de la locomoción, temblores de los apéndices y segmentos abdominales como resultado de la interrupción del balance de agua, además se producen cambios en la ingesta de alimentos y, en consecuencia, se producen perturbaciones en la reproducción, tales como la reducción de la fecundidad en hembras, inhibición de la madurez sexual y apareamiento de machos y reducción de la tasa de eclosión (Abbassi, et al., 2003).

### *Flavonoides*

Los flavonoides son compuestos derivados de la ruta del shikimato y acetil coenzima-A y constituyen uno de los grupos químicos más importantes con más de 5000 compuestos (Vasquez-Luna et al., 2007). Estos compuestos afectan el sistema de desintoxicación de los insectos reduciendo la actividad de las enzimas Glutation

– S – transferasa y esterasas (Baskar & Muthu, 2014). También, los flavonoides disminuyen la actividad de las mitocondrias, y en consecuencia se afecta a la enzima ubiquinona oxidoreductasa que está ligada a la obtención de energía, por lo que en consecuencia se ve afectada la capacidad de alimentación y otros procesos de movimiento (Pavela et al., 2019).

### *Taninos*

Los taninos son compuestos fenólicos complejos que se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados. El principal efecto que causan estos compuestos en los insectos son lesiones fatales en los intestinos medios por el estrés oxidativo que se genera por la absorción de peróxidos producidos durante el proceso de oxidación de los taninos (Galati et al., 2002; Barbehenn & Constabel, 2011).

### *Terpenoides*

Los terpenoides son compuestos formados por una estructura a base de isopropeno, al que se le une un oxígeno (Vázquez-Luna et al., 2007). Estos compuestos al entrar en contacto con los insectos, desaceleran el paso de alimentos a través del intestino, reduciendo la digestibilidad al inhibir la secreción de enzimas digestivas (proteasas) y por la formación de conglomerados de terpenoides y proteínas de baja digestibilidad. En consecuencia, el insecto presenta debilitamiento

físico (inanición) y baja tasa de crecimiento y desarrollo. También, las saponinas, poseen una estructura química similar a la de hormona de la muda de los insectos, por lo que tienen un efecto inhibitor, antagonista o competitivo que puede interrumpir el momento de la muda y la metamorfosis de los insectos (Geyter, 2012).

### *Cumarinas*

Las cumarinas son compuestos aromáticos bicíclicos, que se biosintetizan de la vía del shikimato (de Souza et al., 2016). Se clasifican en clasifican en cuatro grupos: hidroxycumarinas, furanocumarinas, piranocumarinas y cumarinas glicosiladas (Pavela, 2015). Estos compuestos se conjugan con las con la enzima transaminasa y el citocromo P450, por lo que se inhibe el sistema de desintoxicación de los insectos (Wen et al., 2009).

## LITERATURA CITADA

Abbassi, K., Atay-Kadiri, Z., & Ghaout, S. (2003). Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. *Physiological Entomology*, 28, 232–236.

Adamski, Z., Marciniak, P., Ziemnicki, K., Büyükgüzel, E., Erdem, M., Büyükgüzel, K., Ventrella, E., Falabella, P., Cristallo, M., Salvia, R., Bufo, S. A., & Scrano, L. (2014). Potato leaf extract and its component, and alpha;-solanine, exert similar impacts on development and oxidative stress in galleria mellonella L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87(1), 26–39.  
<https://doi.org/10.1002/arch.21177>

Adeyemi, M. M. H. (2010). The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(11), 243–246. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/AJPAC/article-abstract/B76CE2E2388>

Barbehenn, R. V., & Constabel, P. C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551–1565.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>

Baskar, K., & Muthu, C. (2014). Effect of pectolinarigenin , a flavonoid from Clerodendrum phlomidis , on total protein , glutathione S-transferase and esterase

activities of *Earias vittella* and *Helicoverpa armigera*, 323–331.

<https://doi.org/10.1007/s12600-013-0363-4>

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2010). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97–106. <https://doi.org/2357-3732>

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Falabella, P., Scrano, L., Ventrella, E., Lelario, F. & Bufo, S. A. (2016). A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. *Toxins*, 8(3), 60. <https://doi.org/10.3390/toxins8030060>

de Souza, L. G., Rennó, M. N., & Figueroa-Villar, J. D. (2016). Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 11–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.001>

Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., & Brien, P. J. O. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, 177, 91–104.

Ge, Y., Liu, P., Yang, R., Zhang, L., Chen, H., Camara, I., Liu, Y. & Shi, W. (2015). Insecticidal Constituents and Activity of Alkaloids from *Cynanchum mongolicum*, 17483–17492. <https://doi.org/10.3390/molecules200917483>

Geyter, L. E. D. E. (2012). Toxicity and mode of action of steroid and terpenoid secondary plant metabolites against economically important pest insects in agriculture. Faculty of BioscienceEngineering. Ghent University. Ghent.

Hanson, J. R. (2003). *Natural Products*. (E. W. Abel, Ed.). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551535>

Kuete, V. (2013). Chapter 3 - Bioactivity of Plant Constituents against Vancomycin-Resistant Enterococci. In M. K. Rai & K. V. Kon (Eds.), *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components* (pp. 23–30). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00003-3>

López, M. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>

Maazoun, A. M., Hlel, T. Ben, Hamdi, S. H., Belhadj, F., Jemâa, J. M. Ben, & Marzouki, M. N. (2017). Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(3), 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.004>

Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103.

Monfil, V. O., & Casas-Flores, S. (2014). *Molecular Mechanisms of Biocontrol in Trichoderma spp. and Their Applications in Agriculture. Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1>

Nenaah, G. E. (2014). Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*, 53, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.042>

Orozco-Sánchez, F., & Rodríguez-Monroy, M. (2007). Cell suspension culture of *Azadirachta indica* for production of bioinsecticide. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 251–258.

Pavela, A. R., Maggi, F., Iannarelli, R., & Benelli, G. (2019). Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Tropica*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.019>

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>

Rosado-Aguilar, J. A., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J. F. J., Rodríguez-Vivas, R. I., Bolio-González, M. E., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Gutiérrez-Blanco, E. & Aguilar-Caballero, A. J. (2017). Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Veterinary Parasitology*, 238, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.023>

Teichert, I., Nowrousian, M., Pöggeler, S., & Kück, U. (2014). The filamentous fungus *Sordaria macrospora* as a genetic model to study fruiting body development. *Advances in Genetics* (Vol. 87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800149-3.00004-4>

Vázquez-Luna, A., Pérez-Flores, L., & Díaz-Sobac, R. (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: Una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 306–313. <https://doi.org/10.1080/11358120709487705>

Wen, Z., Zeng, R. Sen, & Niu, G. (2009). Ecological Significance of Induction of Broad-Substrate Cytochrome P450s by Natural and Synthetic Inducers in *Helicoverpa zea*, 183–189. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9598-4>

Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.006>

Wink, Michael. (2000). Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21(PART B), 3–122. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80004-6)

## CAPÍTULO 2. EXTRACTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS

### **Actividad larvica y ovica de fracción polar y no polar de extractos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Larvicidal and ovicidal activity of the polar and non-polar fraction of extracts of *Paecilomyces* sp. and *Verticillium* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

#### **RESUMEN**

El presente trabajo se planteó como objetivo determinar el efecto ovica y larvica de las fracciones polares y no polares de extractos metanólicos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. sobre larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, cada unidad experimental consistió en un vaso de plástico de 150 mL capacidad que contenía 100 mL de agua destilada y 1 mL de cada tratamiento. Cada vaso contenía 20 larvas de segundo instar. Se realizó el registro de los estadios vivos y muertos todos los días hasta que el control presentó más del 98% de emergencia de adultos. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ). El análisis fitoquímico muestra la presencia de cumarinas, flavonoides y terpenoides en la fracción no polar de *Paecilomyces* sp. y la presencia de terpenoides en la la fracción no polar de *Verticillium* sp. Las fracciones polares de

ambos extractos presentaron más de 70% de efecto tóxico sobre huevos de *Ae. aegypti*. Los valores máximos de actividad larvicida se presentaron con las fracciones no polares de los extractos después de 24 h de la aplicación de los tratamientos. El efecto ejercido sobre las larvas demuestra que contienen elementos secundarios de diferentes grupos químicos que pueden utilizarse como medida de control y combate de huevos y larvas de mosquito.

**Palabras clave:** extractos fúngicos, ovicida, larvicida, mosquitos.

## ABSTRACT

The present worked considered like target to determine the effect ovicidal and larvicidal of the polar and not polar methanolics extracts fractions of *Paecilomyces* sp. and *Verticillium* sp. on larvae of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. An experimental design was used completely at random with three repetitions, every experimental unit consisted of a glass of 150 mL plastic capacity that was containing 100 mL of distilled water and 1 mL of every treatment. Every glass was containing 20 second larvae to urge. There was realized the record of the living and dead stadiums every day until the control presented more than 98% of adults' emergency. The experimental information surrendered to an analysis of variance and comparison of averages Tukey ( $p < 0.05$ ). The analysis phytochemical shows the presence of coumarins, flavonoids and terpenoids in not polar fraction of *Paecilomyces* sp. and the

presence of terpenoides in not polar *Verticillium* sp fraction. The polar fractions of both extracts presentaron more than 70% of poisonous effect on eggs of *Ae. aegypti*. The maximum values of activity larvicida appeared with not polar fractions of the extracts after 24 h of the application of the treatments. The effect exercised on the larvae show that contain secondary elements of different chemical groups that can be used as a measurement of control and combat of eggs and larvae of mosquito.

**Key words:** fungi extracts, ovicidal, larvicide, mosquitoes.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Díptera: Culicidae), son una de las plagas más peligrosas que afectan a los seres humanos, porque son los principales transmisores de patógenos y parásitos que causan enfermedades epidémicas y mortales (Murugan et al., 2012; Mathalaimuthu et al., 2017; Ali et al., 2018). Las enfermedades transmitidas no sólo causan altos niveles de mortalidad, también tiene un impacto económico, incluida la perdida de producción agrícola, comercial y laboral, principalmente en países tropicales y subtropicales donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación de las poblaciones de los culícidos (Sivakumar et al, 2011; Ali et al., 2018).

*Aedes aegypti* Linnaeus (*Ae. aegypti*) es el principal vector del dengue, la fiebre amarilla, chinkungunya y recientemente del zika (Reegan et al., 2014; Benelli et al.,

2017a). El dengue se ha convertido en un importante problema de salud pública por el número de casos reportados en todo el mundo cada año, especialmente con formas más graves de la enfermedad como hemorragias, fiebre ó síndrome de shock del dengue y en algunos casos con manifestaciones inusuales como la afectación del sistema nervioso central; esta enfermedad prevalece en más de 100 países y amenaza la salud de aproximadamente 2,500 millones de personas (Govindarajan & Sivakumar, 2014; Reegan et al., 2014).

Los programas de manejo de las poblaciones de mosquitos se han centrado en el uso de productos químicos sintéticos que plantean efectos indeseables relacionados con la salud humana y organismos no objetivo, además del desarrollo de resistencia y en consecuencia la pérdida de efectividad (Benelli et al., 2017b; Mathalaimuthu et al., 2017). Esta problemática, ha generado la búsqueda de nuevas estrategias y herramientas ecológicas para el control selectivo de larvas de *Ae. aegypti* (Govindarajan et al., 2011). Los productos naturales derivados de especies vegetales y microorganismos han demostrado ser efectivos, biodegradables y respetuosos con el ambiente (Chellappandian et al., 2018).

Los hongos son un grupo de organismos más diversos presentes en la tierra, se ha estimado que el número de especies es de entre 1.5 y 5 millones. Estos organismos producen una amplia gama de productos naturales, específicamente denominados

metabolitos fúngicos, que se agrupan en varias categorías, entre las que destacan alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, glucósidos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenil propanoides, lignanos, metabolitos alifáticos, lactonas, entre otros., que exhiben efectos biológicos, entre los que se incluyen antimicrobianos, antioxidantes y anticancerígenos (Zhang et al., 2006; Kaul et al., 2012; Synytsya et al., 2017).

*Paecilomyces* Samson (Deuteromycotina: Hyphomycetes) es un género que agrupa más de 100 especies, que se caracterizan por ser hongos filamentosos que se encuentran en el suelo, insectos, plantas en descomposición y alimentos (Luangsa-Ard et al., 2011; Dong et al., 2012). *Verticillium* Nees (Deuteromycotina: Hyphomycetes) es un género de hongos cosmopolita que comprende alrededor de 51 especies que incluye parásitos de plantas, insectos y nematodos (Al-Mekhlafi, 2017).

Los hongos tienen la capacidad de producir metabolitos tóxicos que pueden actuar como agentes de control de mosquitos y son una alternativa potencial, innovadora y selectiva (Ragavendran et al., 2017). Se ha evaluado la actividad larvicida del filtrado de metabolitos de *Verticillium lecani* contra *Cx. quinquefasciatus*, demostrando que las larvas de cuarto instar son más susceptibles que las de otros instar después de 72 h de exposición a los tratamientos (Soni & Prakash, 2012). Al-

Mekhlafi (2017) evaluó el extracto metanólico de *Paecilomyces lilacinus*, que mostró una mortalidad de 100% contra larvas de cuarto instar de *Ae. caspio* (CL<sub>50</sub> de 190.66 ppm) y *Cx. pipiens* (CL<sub>50</sub> de 254.25 ppm) después de 24 h de la exposición a los tratamientos. Por otra parte, existe evidencia de la experimentación con otras especies fúngicas, como el estudio realizado por Govindarajan et al. (2005), en el que evaluaron filtrados de cultivo de *Aspergillus flavus*, mostrando actividad larvicida contra larvas de tercer instar de *Cx. quinquefasciatus* 24 h después de la exposición. También, se ha reportado que el extracto obtenido con acetato de etilo a partir de micelio de *Beauveria bassiana* presentó actividad biológica después de 24 h de la aplicación contra *Anopheles stephensi*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. En otros estudios se reporta el efecto aleloquímico de extractos orgánicos de *Muscodora yucatanensis* sobre *Guignardia mangifera*, *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica* (Macías-Rubalcava et al., 2010). En este sentido, el presente estudio se diseñó para determinar la actividad biológica de fracciones metanólicas polar y no polar de *Paecilomyces* sp y *Verticillium* sp sobre huevos y larvas de *Ae. aegypti*, además de caracterizar preliminarmente las fracciones de extracto fúngicos mediante cromatografía de capa fina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención de material biológico*

#### *Cría de Aedes aegypti*

Se colectaron huevos, larvas y pupas de *Ae. aegypti* en agua sucia acumulada en la Ciudad de Campeche, México (19°49'36.7"N 90°33'15.6"W). Los huevos se trasladaron al laboratorio del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) y se colocaron en bandejas de plástico (47 cm × 35 cm × 12 cm) con 300 mL de agua para su eclosión. Las larvas se alimentaron con alimento molido para peces tilapia (Apitilapia nivel 1®) hasta que alcanzaron la fase pupal. Las pupas se transfirieron a recipientes (30 x 20 x 6 cm) con 300 mL de agua y se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos machos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y semanalmente se introdujo un conejo (*Oryctolagus cuniculatus*) inmovilizado por una noche como material hematofágico para las hembras. La cría se mantuvo en laboratorio a 27±2 °C, 60-70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad (Pérez-Pacheco et al., 2004; Rahuman & Venkatesan, 2008; Granados-Echegoyen et al., 2015).

#### *Obtención de huevos de mosquito*

Para la obtención de huevos del mosquito se ubicaron recipientes de plástico color negro recubiertos en el interior con cuadrículas de papel filtro Whatman No. 1

de 2 x 2 cm de dimensión, para que las hembras del insecto lo utilizarán como medio de postura para realizar la oviposición. Las cuadrículas fueron retiradas cada 24 h y se trasladaron a una cámara húmeda de 10 x 20 X 5 cm por 12 h para promover la hidratación y desarrollo el embrión; pasado este tiempo las cuadrículas se retiraron de la cámara y se observaron en un estereoscopio Nikon SMZ800 para determinar si existía daño físico y contabilizar el número total de huevos ovipositados. Las cuadrículas con huevos se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron hasta ser utilizadas (Rocha et al., 2015; Veni et al., 2017).

### *Aislamiento de hongos*

Los hongos fueron aislados a partir de muestras de suelo colectadas en el municipio de Calakmul, Campeche, México. Se siguió la técnica de insecto trampa, que consistió en colocar adultos de *Ae. aegypti* en cajas de Petri con medio de cultivo agar agua (AA), suplementado con 200 mg/L de cloranfenicol, después se esparcieron 300 mg de suelo previamente tamizado y se incubaron a 28 °C por diez días. El micelio y esporas que se desarrollaron sobre el insecto se transfirieron de forma directa a cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 28 °C por siete días (Hernández-Velázquez *et al.*, 2011).

### *Conservación e identificación*

Se realizaron cultivos monospóricos de los hongos aislados mediante diluciones seriadas en cajas de Petri con PDA y se incubaron a 28 °C con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad hasta que el micelio cubrió la superficie. Se tomaron discos con crecimiento micelial y se conservaron en viales mediante dos métodos, con agua estéril a temperatura ambiente y en caldo de papa dextrosa (CPD) con glicerol al 50% en ultracongelación a -80 °C (Mier *et al.*, 2002). El material conservado se utilizó como cepas de trabajo.

La identificación morfológica y taxonómica fue realizada por la Dra. Maria Manuela Reyes Estebanez en el DEMAB. Se realizaron microcultivos en cajas de Petri y se colocó una varilla de vidrio y se depositó un portaobjetos sobre el que se colocaron dos cuadros de los medios PDA y AA de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Sobre los medios PDA y AA se inocularon los hongos y se colocó un cubre objetos. Finalmente, se vertieron en la caja de Petri 10 mL de agua destilada estéril para mantener la humedad y se incubaron a 28 °C. Cuando se observó crecimiento fúngico se removieron los cubreobjetos y se colocaron sobre un portaobjetos para la observación de las estructuras en microscopio (Mier *et al.*, 2002).

### *Obtención de extractos fúngicos*

Para la producción de biomasa se utilizó arroz Soriana como medio de cultivo. El arroz se lavó con agua destilada, se trituró con un mortero y se secó en horno Felisa a 50 °C. Se tomaron 20 g de arroz seco y triturado y se depositó en frascos de vidrio de 250 mL, además se adicionó 30 mL de agua destilada y se dejó fermentar por 24 h. El material se esterilizó en autoclave Yamato SM500 a 121 °C durante 30 min (Soman et al., 2001).

Para obtener el inóculo, se realizaron cultivos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. en cajas de Petri de PDA. Después de diez días de incubación a 28 °C se adicionó 10 mL de solución salina de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.85% con tween 80 al 0.1% (SST) y se realizó un raspado suave sobre la superficie de la caja de Petri para remover micelio y esporas. Se tomaron 6 mL de la mezcla y se decantó en tubos Falcon de 10 mL para eliminar el excedente de micelio. Del inóculo filtrado, se tomaron alícuota de 6 mL y se inocularon los frascos con arroz y agua destilada. De manera paralela se prepararon blancos inoculados con 6 mL de SST. Después de 40 días de incubación a 28 °C, se transfirieron 100 g de arroz con crecimiento fúngico a matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad y se macero con 250 mL de metanol. Los frascos se colocaron en agitación a 120 rpm en un orbitador Lab Line durante 24 h. Después se decantó a través de papel filtro Whatman del No. 1 y el remanente se introdujo nuevamente al frasco y se agregó disolvente. El procedimiento se repitió

dos veces. El filtrado se concentró y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio Buchi B-490 a 40 °C y presión reducida para obtener los extractos metanólicos crudos. (Soman et al., 2001; Macias-Rubalcava et al., 2010).

### ***Fraccionamiento de extractos fúngicos***

Los extractos metanólicos crudos se partitionaron en fracción polar y no polar. El extracto crudo se diluyó en 10 mL metanol, agua desionizada y diclorometano (1:1:1) (volumen:volumen:volumen) (v:v:v). La mezcla se colocó en un embudo de separación y se agitó para integrar los disolventes. La solución se dejó reposar por cinco minutos para obtener la separación de la fase polar (superior) y no polar (inferior). A la fase polar se le realizaron lavados con 20 mL de diclorometano hasta que la muestra se observó semi-transparente y se eliminó el disolvente en una liofilizadora Laboconco por 48 h para obtener la fracción de extracto polar. La fase no polar se concentró y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio. Las fracciones se conservaron a 4 °C hasta su uso (Synytsya et al., 2017).

### ***Preparación de concentraciones***

Se tomaron 880 mg de cada una de las fracciones del extracto de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. y se disolvieron en 11 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.7% como agente emulsificante para obtener la solución inicial del tratamiento (80,000 ppm), posteriormente por dilución volumétrica en serie se prepararon las concentraciones

de aplicación para los bioensayos de acción ovicida (60000, 30000, 15000, 75000) y larvicida (60000, 40000, 20000, 10000, 5000 y 2500 ppm) (WHO, 2005)

#### ***Actividad ovicida en condiciones de laboratorio***

Las concentraciones a las que fueron expuestos los huevos fueron 800, 600, 300, 150 y 75 ppm. Se aplicó 75 µL de cada una de las concentraciones a las cuadrículas de 2 X 2 cm y se incubaron en cámara húmeda de 15 X 30 X 10 cm por 24 h, se observaron en un estereoscopio para verificar si existía algún daño físico al ser comparadas con el control sin aplicación de tratamientos. Luego, las cuadrículas se ubicaron en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada para promover la eclosión de los huevos. La tasa de eclosión se registró 48 h después de la aplicación de los tratamientos (Su & Mulla, 1998; Arivoli & Tennyson, 2013).

$$\% \text{ de actividad ovicida} = \frac{\text{No. huevos eclosionados en el control} - \text{No. de huevos eclosionados por el tratamiento}}{\text{No. de huevos eclosionados en el control}} \times 100$$

#### ***Actividad larvicida en condiciones de laboratorio***

Las concentraciones finales a las que fueron sometidas las larvas del mosquito fueron 800, 600, 400, 200, 100, 50 y 25 ppm, obtenidas al aplicar una alícuota de 1 mL de la solución inicial en 100 mL de agua destilada en cada unidad experimental con 20 larvas de segundo instar tardío (WHO, 2005; Granados-Echegoyen et al., 2014). La mortalidad de las fracciones polar y no polar de los extractos evaluados se determinó durante tres días (24, 48 y 72 h) después de la aplicación de los

tratamientos. Se consideraron larvas muertas cuando no presentaran movimientos similares a los exhibidos por las larvas del grupo control y cuando la larva no mostró ninguna reacción al momento de ser alterada en el sifón y su región cervical (Granados-Echegoyen et al., 2015; Martínez-Tomás et al., 2018).

### *Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)*

Las fracciones evaluadas se analizaron para detectar la presencia de alcaloides, cumarinas, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides como lo describe Pascual et al. (2002).

Los alcaloides se detectaron pulverizando el reactivo de Dragendorff sobre la placa seca de TLC. La aparición de manchas color anaranjado indicaron la presencia de alcaloides.

La presencia de cumarinas y antroquinonas se realizó usando solución de Bornträger (hidróxido de potasio (KOH) en EtOH al 5%); al cromatograma se le pulverizó la solución y se detectaron cumarinas por la formación de una fluorescencia azul a 365 nm; las antroquinonas se detectaron por la aparición de color rojo.

Los flavonoides se detectaron pulverizando sobre el cromatograma difenilboriloxietilamina (NP) con CH<sub>3</sub>OH al 1%, seguido de polietilenglicol (PEG)

con EtOH al 5%; un color amarillo intenso, rojo, azul o verde fluorescente a 365 nm de UV indicó la presencia de flavonoides.

La presencia de taninos se demostró por la presencia de zonas oscuras (azul-negro) en las placas de TLC al aplicar cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 3%.

Para demostrar la presencia de terpenoides, se usó el reactivo de Godin; se pulverizó sobre el cromatograma una solución de vainillina en EtOH al 1% mezclada (1:1) (v:v) con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 3% en agua, luego se pulverizó una solución al 10% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en EtOH. La placa se calentó a 105 °C por tres minutos, la aparición de color rojo o azul mostró la presencia de terpenoides.

El volumen de las manchas aplicadas en las placas cromatográficas fue de 10  $\mu\text{L}$ . Se desarrollaron placas de TLC de la fracción polar y no polar de extracto metanólico de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. en sistema de disolventes tolueno-cloroformo-acetona (40:25:35) (v:v:v). Los cromatogramas se observaron primero sin tratamiento químico bajo luz ultravioleta de 365 nm y luego usando los reactivos de pulverización.

### *Análisis estadístico*

Los bioensayos con huevos y larvas de *Ae. aegypti* sometidas a concentraciones de fracciones polares y no polares de extracto de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado. Se realizó un análisis

de varianza de la actividad ovicida y larvicida para identificar diferencias significativas y prueba de Tukey para separar las medias con  $p < 0.05$ . El efecto larvicida (%) durante los primeros tres días fue sometido a un análisis de Probit para calcular las concentraciones letales 50 y 90 ( $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ ) y otros valores estadísticos con límite de confianza de 95%. El análisis se realizó utilizando el software Minitab v18.1 (Minitab, Inc. 2017).

## RESULTADOS

### *Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC*

El tamizaje fitoquímico (Tabla 1) en el sistema de disolventes tolueno-cloroformo-acetona mostró que en las fracciones polares de los extractos no se detectó la presencia de metabolitos secundarios. En la fracción polar de *Paecilomyces* sp. se presentaron cumarinas, flavonoides y terpenoides, mientras que en la fracción no polar de *Verticillium* sp. sólo se determinó la presencia de terpenoides.

**Tabla 1.** Componentes fitoquímicos de las fracciones polar y no polar de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp.

Metabolitos	<i>Paecilomyces</i> sp.		<i>Verticillium</i> sp.	
	FP	FNP	FP	FNP
Alcaloides	-	-	-	-
Cumarinas	-	+	-	-
Antroquinonas	-	-	-	-
Flavonoides	-	+	-	-
Taninos	-	-	-	-
Terpenoides	-	+	-	+

NP: Productos naturales; PEG: Polietilenglicol; FP: Fracción polar; FNP: Fracción No Polar

### *Actividad ovicida*

Los huevos de *Ae. aegypti* que se sometieron a diferentes concentraciones de la fracción no polar de extractos metanólicos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. presentaron un menor porcentaje actividad ovicida de 48 h de exposición. Los valores más altos en el experimento, se registraron con la concentración de 800 ppm de las fracciones polares de los extractos de el extracto de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. Con la aplicación de concentraciones menores a 300 ppm de la fracción polar de *Paecilomyces* sp. no se resgistro actividad ovicida. De acuerdo al análisis estadístico, ambas fracciones del extracto de *Paecilomyces* sp. presentan diferencias significativas, sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos en los que se utilizó la concentración de 800 ppm, mientras que, con la utilización de las fracciones polar y no polar de *Verticillium* sp. no se presentaron diferencias significativas con la utilización de concentraciones entre 150 y 75 ppm.

**Tabla 2.** Actividad ovicida de huevos de *Aedes aegypti* después de 48 h de exposición a las fracciones polar y no polar de extractos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp.

Extracto	Fracción	Concentración (ppm) / Media (%)					Control
		800	600	300	150	75	
<i>Paecilomyces</i> sp	Polar	74.24 a	42.14 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	No polar	63.33 a	33.57 b	32.70 b	16.76 c	0.00 d	0.00 d
<i>Verticillium</i> sp.	Polar	76.96 a	63.95 b	19.80 c	8.89 cd	7.28 cd	0.00 d
	No Polar	62.01 a	57.91 a	24.20 b	20.31 bc	8.00 cd	0.00 d

Medias seguidas por letras diferentes dentro de la misma fila y tratamiento son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

### *Actividad larvica*

Las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a la fracción polar del extracto de *Paecilomyces* sp. registraron valores de 28.33% de mortalidad después de 72 h de la aplicación del tratamiento con concentración de 800 ppm (Tabla 2). Con las concentraciones menores a 200 ppm no se presentó actividad larvica, mientras que, con la fracción no polar del mismo extracto, después de 24 h se presentó el 100% de mortalidad de larvas a concentraciones de 800 y 600 ppm ( $LC_{50}$  de 54.93 ppm y  $LC_{90}$  de 200.40 ppm). En las larvas que fueron expuestas a la fracción polar de *Verticillium* sp. con la concentración de 800 ppm, se obtuvo 13.33% de mortalidad después de 72 h de la aplicación del tratamiento mientras que en los tratamientos con concentraciones menores no se registraron datos de mortalidad. La fracción no polar de *Verticillium* sp. eliminó el 93.33% y 88.33% de la población de larvas después de 24 h de la aplicación de los tratamientos con concentraciones de 800 y 600 ppm, respectivamente, mientras que, las larvas que se sometieron a concentraciones entre 400 y 100 ppm mostraron valores superiores al 40% de mortalidad después de 72 h de la aplicación de los tratamientos. Estadísticamente, los resultados indican que los mejores resultados se presentaron en los que se sometieron las larvas a concentraciones de 800 ppm de las fracciones no polares de ambos extractos.

**Tabla 3.** Mortalidad a las 24, 48 y 72 h de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con las fracciones polar y no polar de extractos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp.

Extracto	Fracción	Días (h)	Concentración (ppm) / Medias (%)								
			800	600	400	200	100	50	25	Control	
<i>Paecilomyces</i> sp.	Polar	24	8.33 a	6.67 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 c
		48	23.33 a	15.00 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		72	28.33 a	20.00 b	3.33 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	No polar	24	100.00 a	100.00 a	96.67 a	96.67 a	78.33 b	51.67 c	21.67 d	0.00 e	0.00 e
		48	-	-	96.67 a	98.33 a	78.33 b	53.33 c	28.33 d	0.00 e	0.00 e
		72	-	-	96.67 a	98.33 a	80.00 b	53.33 c	28.33 d	0.00 e	0.00 e
<i>Verticillium</i> sp.	Polar	24	8.33 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		48	13.33 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		72	13.33 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
	No polar	24	93.33 a	88.33 a	81.67 ab	55.00 bc	40.00 cd	8.33 e	11.67 de	0.00 e	0.00 e
		48	93.33 a	88.33 a	81.67 ab	55.00 bc	41.67 c	11.67 d	11.67 d	0.00 d	0.00 d
		72	93.33 a	88.33 a	88.33 ab	61.67 bc	41.67 c	11.67 d	11.67 d	0.00 d	0.00 d

Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y tratamiento son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

**Tabla 4.** Concentraciones letales de las fracciones polar y no polar de extractos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. contra larvas de mosquitos *Aedes aegypti*.

Extracto	Fracción	Días (h)	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
<i>Paecilomyces</i> sp.	Polar	24	1235.06 (997.91 - 2254.77)	1681.23 (1277.41 - 3486.72)
	No polar	24	54.93 (30.59 - 74.64)	200.40 (170.19 - 248.75)
<i>Verticillium</i> sp.	Polar	24	862.31 (*)	920.05 (*)
	No polar	24	249.38 (210.81 - 288.44)	596.79 (533.76 - 681.34)

LC<sub>50</sub>: concentración letal que controla el 50% de la población de mosquitos; LC<sub>90</sub>: concentración letal que controla el 90% de la población de mosquitos; \* Los valores entre paréntesis indican los límites de confianza del 95% inferior y superior; (\*): Sin determinación de LC. No alcanza la convergencia para el criterio de cálculo. Bajo número de iteraciones.

## DISCUSIÓN

Los extractos fúngicos son una fuente de diferentes grupos químicos. Se ha reportado que *P. lilacinum*, *P. militaris* (Teles & Takahashi, 2013), *P. fumosoroseus*, *V. lecanii*, *B. bassiana* (Vey et al., 2001; Asaff et al., 2005) y otras especies de hongos endófitos como *Acremonium zeae*, *Phomopsis* sp. (Yu et al., 2010) producen diferentes tipos de alcaloides, sin embargo, en nuestro estudio, en las fracciones de extracto metanólico no se detectó la presencia de este grupo de metabolitos secundarios. Así mismo, se ha demostrado la producción de diferentes grupos de metabolitos como flavonoides, glucósidos, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenil propanoides, lignanos, metabolitos alifáticos, lactonas y esteroides en diferentes especies fungicas (Zhang et al., 2006), sin embargo, la información es limitada en relación a las especies evaluadas en este estudio.

En la actualidad, por seguridad ambiental, para que un producto sea aceptable, no debe causar una alta mortalidad en los organismos objetivo (Govindarajan et al., 2011). Nuestros resultados muestran que la fracción no polar de extracto metanólico de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. poseen actividad ovicida contra *Ae. aegypti*. Este resultado es comparable con lo que informan Luz et al. (2007) que evaluaron la actividad ovicida de 21 especies de hongos contra *Ae. aegypti*, entre los que destaco *P. lilacinum* por la inhibición de eclosión de los huevos. Rocha et al. (2015) que observaron eclosión de huevos <30% con la aplicación de suspensión de  $5 \times 10^6$  conidia  $\text{cm}^{-2}$  de *Tolyocladium cylindrosporum*, mientras que con la aplicación de suspensión de conidias de  $3.3 \times 10^5$  y  $3.3 \times 10^3$  de *Tolyocladium cylindrosporum* IP 419 y *Tolyocladium*

*cylindrosporium* IP 425, respectivamente, se obtuvo inhibición de la eclosión de huevos de *Ae. aegypti* menores del 30%, después de 48 h de exposición a los tratamientos (Montalva et al., 2019). También se han evaluado la actividad ovicida de diferentes extractos botánicos. Con la aplicación de concentraciones de 250 y 300 ppm de extracto de cloroformo y metanol obtenido de hojas de *Terminalia chebula* no se reporta eclosión de huevos de *Ae. aegypti* y *Anopheles stephensi* después de 48 h de exposición a los tratamientos (Veni et al., 2017); Govindarajan y Sivakumar (2014) reportan valores menores de 20% de eclosión de huevos de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *An. stephensi* con la aplicación de extracto metanólico de hojas de *Erythrina indica* con concentraciones entre 200 y 300 ppm. Con la aplicación de extracto de hexano de *Limonia acidissima* se registraron valores de 79.2% y 60% de actividad ovicida con una concentración de 500 ppm sobre huevos de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*, respectivamente (Reegan et al., 2015). Los resultados obtenidos en nuestro estudio de porcentaje de eclosión de huevos son similares a los que se obtuvieron con la aplicación de extractos botánicos obtenidos con solventes de diferente polaridad, sin embargo, las concentraciones más altas a las que se sometieron los organismos son menores a las que se utilizaron en nuestro estudio.

La actividad larvicida se ha evaluado con extractos de diferentes especies fúngicas. En nuestro estudio la fracción no polar de los extractos metanólicos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp. registraron los valores más altos de mortalidad de larvas de segundo

instar después de 24 h de exposición a los tratamientos. Estos resultados son similares a los que reporta Al-Mekhlafi (2017) con la aplicación de extracto metanólico de *P. lilacinum*, en los que obtuvo valores de mortalidad de 100% (LC<sub>50</sub> de 190.66 ppm) y 93.33% (LC<sub>50</sub> de 378.63 ppm) sobre larvas de cuarto instar de *Ae. caspius* y *Cx. pipiens*, respectivamente. La aplicación del filtrado de metabolitos de *V. lecani* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus* demostró mayor susceptibilidad de larvas de cuarto instar con LC<sub>50</sub> de 40 ppm, LC<sub>90</sub> de 128.82 ppm y LC<sub>99</sub> de 293.81 ppm después de 72 h de exposición a los tratamientos (Soni & Prakash, 2012). La fracción soluble en metanol del extracto del hongo fitopatógeno *Cochliobolus spicifer* sobre larvas de tercer instar de *Ae. caspius* (LC<sub>50</sub> de 170.33 ppm y LC<sub>90</sub> de 264.47 ppm) y *Cx. pipiens* (LC<sub>50</sub> de 133.39 ppm y LC<sub>90</sub> de 249.84 ppm) registró valores de 100% de mortalidad de larvas después de 24 h de exposición a una concentración de 300 ppm (Al-shami et al., 2015). En el estudio realizado por Govindarajan et al. (2005) evaluaron filtrados de cultivo de *Aspergillus flavus*, mostrando actividad larvicida y mayor efecto tóxico contra larvas de tercer instar de *Cx. quinquefasciatus* con una LC<sub>50</sub> de 38.34 ppm después de 24 h a la exposición de los tratamientos, resultado que es menor a los registros que se obtuvieron en nuestro estudio. Ragavendran y Natarajan (2015), evaluaron el extracto de acetato de etilo de *Aspergillus terreus* y con la concentración de 500 ppm registraron valores superiores al 90% de mortalidad de larvas de segundo instar de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* después de 24 h de exposición, resultado similar al que se obtuvo en nuestro estudio con las tratadas con las fracciones no polares.

Las variaciones de la actividad larvicida de los extractos utilizados están relacionadas directamente con la polaridad de los compuestos bioactivos (Ghosh et al., 2012). Es importante mencionar que los estudios previos con uso de extractos obtenidos de *Paecilomyces* sp. o *Verticillium* sp. para determinar el efecto tóxico sobre huevos de diferentes especies de mosquitos son limitados.

## CONCLUSION

Con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico se puede atribuir el efecto tóxico a los terpenoides, debido a que son los compuestos que se detectaron en las fracciones no polares de los extractos metanólicos de *Paecilomyces* sp. y *Verticillium* sp., sin embargo, pueden existir otros grupos químicos que también estén ejerciendo acción sobre las larvas de *Ae. aegypti*, por lo que es necesario realizar nuevas pruebas de detección de metabolitos secundarios y posteriormente purificar, identificar y caracterizar los componentes activos. Se concluye que la fracción no polar del extracto metanólico de *Paecilomyces* sp y *Verticillium* sp. tiene un efecto tóxico más severo sobre larvas de *Ae. aegypti*, sin embargo, la actividad ovicida es mayor con la aplicación de diferentes concentraciones de la fracción polar. Los resultados obtenidos con el uso de la fracción no polar, demuestran que existen compuestos biactivos que pueden ser incluidos dentro de una estrategia de manejo integrado de larvas de mosquitos.

## LITERATURA CITADA

Al-Mekhlafi, F. A. (2017). Larvicidal activity of some fungal extracts on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Entomological Research*, 47(6), 388–393. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12235>

Al-shami, M., Al-Mekhlafi, F. A., Wadaan, M. A., Farooq, M., Abutaha, N., & Mashaly, A. M. A. (2015). Larvicidal activity of endophytic fungal extract of *Cochliobolus spicifer* (Pleosporales: Pleosporaceae) on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 50(3), 405–414. <https://doi.org/10.1007/s13355-015-0347-6>

Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2018). Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. *South African Journal of Botany*, 114, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.018>

Arivoli, S. & Tennyson, S. (2013). Ovicidal activity of plants extracts against *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 2(10), 140–145.

Aslaff, A., Cerda-García-Rojas, C., & De La Torre, M. (2005). Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 542–547. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1909-2>

Benelli, G., Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., & Khaled, J. M. (2017a). Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitology Research*, *116*(4), 1175–1188. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5395-0>

Benelli, G., Pavela, R., Iannarelli, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Cianfaglione, K., Afshar, F. H., Nicoletti, M., Canale, A., & Maggi, F. (2017b). Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. *Industrial Crops and Products*, *96*, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.059>

Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Kalaivani, K., & Hunter, W. B. (2018). Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International*, *113*(October 2017), 214–230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038>

Dong, Q., Wang, H., Xing, X., & Ji, S. (2012). Identification and characterization of a special species of *Paecilomyces*. *Annals of Microbiology*, *62*(4), 1587–1592. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0414-3>

Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 581–598.

Govindarajan, M., Jebanesan, M. & Reetha, D. (2005). Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine*, 22(1), 1–3.

Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., & Anandan, A. (2011). Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 109(2), 353–367. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2263-1>

Govindarajan, Marimuthu, & Sivakumar, R. (2014). Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.) (Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicida. *Parasitology Research*, 113(4), 1435–1449. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3784-1>

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., & Rojas-Olivos, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill

(Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(6), 463–467. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60816-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60816-7)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernandez, N., & Gato-Armas, R. (2014). Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594–601. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)

Hernandez-Velázquez, V. M., Cervantes, Z., Villalobos, F. J., Lina, L., & Peña, G. (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27(3), 591–599.

Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 487–505. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9260-6>

Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 141–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>

Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, a H., Rocha, L. F. N., Albernaz, D. a S., & Silva, H. H. G. (2007). Ovicidal activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), 799–804. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[799:OAOEHO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[799:OAOEHO]2.0.CO;2)

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., & Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122–1131. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9848-5>

Martinez-Tomás, S. H. , Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. de J. R., & López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 221–238. <https://doi.org/10.3958/059.043.0114>

Mathalaimuthu, B., Shanmugam, D., Kovendan, K., Kadarkarai, M., Jayapal, G., & Benelli, G. (2017). *Coleus aromaticus* leaf extract fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? *Process Safety and Environmental Protection*, 106, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.12.003>

Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. 2002. *Métodos para el aislamiento, purificación y obtención de microcultivos de hongos microscópicos*. En: Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. Linares-Vieyra, C., Izquierdo-Sánchez, T., Zavaleta-Blackler, P., Leal-Fernández, G. y Bojórquez-Castro, L. (eds). Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F, pp. 12-15.

Montalva, C., Silva, J. J., Rocha, L. F. N., Luz, C., & Humber, R. A. (2019). Characterization of *Tolypocladium cylindrosporum* (Hypocreales, Ophiocordycipitaceae) isolates from Brazil and their efficacy against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 266–276. <https://doi.org/10.1111/jam.14093>

Murugan, K., Kumar, P. M., Kovendan, K., Amerasan, D., Subrmaniam, J., & Hwang, J. S. (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 111(4), 1757–1769. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3021-8>

Pascual, M. E., Carretero, M. E., Slowing, K. V., & Villar, A. (2008). Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. *Pharmaceutical Biology*, 40 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.2.139.5849>

Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. & G. Ramírez V. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 141-152.

Ragavendran, C., Dubey, N. K. & Natarajan, D. (2017). *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *RSC Adv.*, 7(7), 3838–3851. <https://doi.org/10.1039/C6RA25859J>

Ragavendran, C. & Natarajan, D. (2015). Insecticidal potency of *Aspergillus terreus* against larvae and pupae of three mosquito species *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17224–17237. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4961-1>

Rahuman, A. A. & Venkatesan, P. (2008). Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research*, 103(1), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0940-5>

Reegan, A. D., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2014). Effect of niloticin, a protolimonoid isolated from *Limonia acidissima* L. (Rutaceae) on the immature stages of dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 139, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.002>

Reegan, A. D., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2015). Ovicidal and Oviposition Deterrent Activities of Medicinal Plant Extracts Against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6(1), 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.08.009>

Rocha, L. F. N., Sousa, N. A., Rodrigues, J., Catão, A. M. L., Marques, C. S., Fernandes, K. K., & Luz, C. (2015). Efficacy of *Tolypocladium cylindrosporum* against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1412–1419. <https://doi.org/10.1111/jam.12945>

Sivakumar, R., Jebanesan, A., Govindarajan, M., & Rajasekar, P. (2011). Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera:Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9), 706–710. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60178-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60178-8)

Soman, A. G., Gloer, J. B., Angawi, R. F., Wicklow, D. T., & Dowd, P. F. (2001). Vertilecanins: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64(2), 189–192. <https://doi.org/10.1021/np000094q>

Soni, N., & Prakash, S. (2012). Larvicidal effect of *Verticillium lecanii* metabolites on *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 220–224. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60050-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60050-4)

Su, T. & Mulla M. S. (1998). Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14:204 – 9

Synytsya, A., Monkai, J., Bleha, R., Macurkova, A., Ruml, T., Ahn, J., & Chukeatirote, E. (2017). Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.011>

Teles, A. P. C., & Takahashi, J. A. (2013). Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiological Research*, 168(4), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.007>

Veni, T., Pushpanathan, T., & Mohanraj, J. (2017). Larvicidal and ovicidal activity of *Terminalia chebula* Retz. (Family: Combretaceae) medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(3), 693–702. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0869-z>

Veys-Behbahani, R., Sharififard, M., Dinparast-Djadid, N., Shamsi, J., & Fakoorziba, M. R. (2014). Laboratory evolution of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against *Anopheles stephensi* larvae (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(S2), S799–S802. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60730-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60730-1)

WHO. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Health Organization*, 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., & Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, 165, 437-449. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>

Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753. <https://doi.org/10.1039/b609472b>

## **Toxicidad de extractos etanolicos de *Myrothecium* spp. contra larvas del mosquito vector del Dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Toxicity of ethanol extracts of *Myrothecium* spp. against mosquito larvae vector of Dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

### **RESUMEN**

El mosquito *Ae. aegypti* es el vector principal del dengue y otras enfermedades de importancia epidemiológica que provocan la mayor morbilidad y mortalidad en humanos e invertebrados. Los hongos del genero *Myrothecium* son patógenos que causa manchas foliares y pudriciones de tallo en diferentes especies vegetales. Se obtuvieron extractos etanólicos cultivando *M. dimerum*, *M. nivale* y *M. roridum* en arroz. Se realizó un análisis fitoquímico a los extractos obtenidos. Se estableció un bioensayo bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ). Se seleccionaron 20 larvas colocadas en un vaso de plástico que contenia 100 mL de agua destilada y 1 mL de los tratamientos (800, 600, 400, 200, 100, 50 y 25 ppm). Los resultados demuestran el potencial de los extractos de *M. dimerum* y *M. nivale* después de 48 h y 72 h con el extracto de *M. roridum* con la concentración más alta. Al finalizar el experimento, se presentó el 100% de mortalidad de con las concentraciones de 800, 600 y 400 ppm con la aplicación de los extratos de *M. nivale* y *M. roridum*. Los extractos evaluados ejercen un efecto de letargo en el crecimiento y desarrollo de las larvas en comparación con el control. Con datos obtenidos se demuestra el potencial larvicida y de inhibición de

crecimiento de los extractos de las tres especies del genero *Myrothecium*, por lo que pueden ser incluidos dentro de una estrategia de manejo integrado de las poblaciones de mosquitos.

Palabras clave: fitopatógeno, larvicida, hongos mitospóricos.

## **ABSTRACT**

The mosquito *Ae. aegypti* is the main vector of the fastidiousness and other illnesses of epidemiologic importance that provoke the biggest morbidity and mortality in human and invertebrate. The fungi of the genre *Myrothecium* is pathogenic that causes spots you will foliate and stem putrefactions in different vegetable species. Ethanolic extracts were obtained cultivating *M. dimerum*, *M. nivale* and *M. roridum* in rice. An analysis phytochemical to the obtained extracts was realized. A bioessay was established under an experimental design completely at random with three repetitions. There was realized an analysis of variance and comparison of averages Tukey ( $p < 0.05$ ). There were selected 20 larvae placed in a glass of plastic that was containing 100 mL of distilled water and 1 mL of the treatments (800, 600, 400, 200, 100, 50 and 25 ppm). The results demonstrate the potential of the extracts of *M. dimerum* and *M. nivale* after 48 h and 72 h with the extract of *M. roridum* with the highest concentration. On having finished the experiment, 100% of mortality presented before himself of with the concentrations of 800, 600 and 400 ppm with the application of the extracts of *M. nivale* and *M. roridum*. The evaluated extracts exercise a lethargy effect in the growth and

development of the larvae compared to the control. With obtained information the potential is demonstrated larvicida and of inhibition of growth of the extracts of three species of the genre *Myrothecium*, by what they can be included inside an strategy of integrated handling of the populations of mosquitoes.

**Key words:** Phyopathogenic, larvicide, fungi mitosporic.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son insectos vectores de virus y parásitos que causan la muerte de millones de seres humanos en diferentes regiones tropicales y subtropicales (Mathalaimuthu et al., 2017). Se han descrito 41 géneros y 3500 especies de las cuales, 100 se han reportan como vectores de enfermedades en humanos y otros vertebrados. Estos culícidos, constituyen un problema importante de salud pública por ser vectores de enfermedades humanas como la malaria, filariasis, encefalitis japonesa, fiebre del dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla (Subarani et al., 2013), además las picaduras causan respuestas alérgicas como la urticaria o angioedema (Govindarajan & Sivakumar, 2014a).

*Aedes aegypti* Linnaeus (*Ae. aegypti*) es el vector primario en la transmisión de arbovirus responsables de diversas enfermedades entre las que destaca el dengue, fiebre amarilla y chikungunya, principalmente (Mathalaimuthu et al., 2017). La fiebre del dengue se ha convertido en un importante problema de salud. El número de casos

notificados sigue aumentando, especialmente con formas más graves de la enfermedad como hemorragias, fiebre ó síndrome de shock del dengue y en algunos casos con manifestaciones inusuales como la afectación del sistema nervioso central; esta enfermedad prevalece en más de 100 países y amenaza la salud de aproximadamente 2,500 millones de personas, mientras que alrededor de 80 millones de personas se infectan anualmente con una tasa de ataque del 4% en todo el mundo (Govindarajan & Sivakumar, 2014b; Ali et al., 2018).

El género *Myrothecium* Alb. & Schwein. (Hypocreales: Stachybotryaceae) incluye ocho especies, y varias de ellas viven como saprófitos en el suelo y se consideran patógenos de más de 200 especies de plantas (Mehmood et al., 2018). Los síntomas que provocan, son generalmente manchas foliares de color marrón a marrón oscuro y grietas superficiales o profundas, generalmente en forma de cráter en la fruta en diferentes especies de agrícolas y ornamentales, tales como soya, tomate, cafeto, anturio, entre otras (Nunes et al., 2015). En estudios recientes, se ha determinado que los hongos del genero *Myrothecium* producen compuestos bioactivos tales como los tricotecenos (terpenoides), diterpenos, amidas, policétidos (actúan como bloques de construcción de amplio rango de productos naturales), esteroles (esteroides), lactonas y myrothecosidos que poseen actividad biológica contra diferentes organismos (Quezado-Duval et al., 2010; Fu et al., 2014; Ruma et al., 2014; Zhang et al., 2016. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto tóxico de extractos

etanólicos de *Myrothecium roridum*, *M. dimerum* y *M. nivale* sobre larvas de segundo instar de *Ae. aegypti* y caracterizar cualitativamente los principales grupos químicos presentes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Obtención de material biológico***

#### ***Cría de Aedes aegypti***

Se colectaron huevos, larvas y pupas de *Ae. aegypti* en agua sucia acumulada en la Ciudad de Campeche, México (19°49'36.7"N 90°33'15.6"W). Los huevos se trasladaron al laboratorio del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) de la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) y se colocaron en bandejas de plástico (47 cm × 35 cm × 12 cm) con 300 mL de agua para su eclosión. Las larvas se alimentaron con alimento molido para peces tilapia (Api-tilapia nivel 1®) hasta que alcanzaron la fase pupal. Las pupas se transfirieron a recipientes (30 x 20 x 6 cm) con 300 mL de agua y se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos machos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y semanalmente se introdujo un conejo (*Oryctolagus cuniculatus*) inmovilizado por una noche como material hematofágico para las hembras. La cría se mantuvo en laboratorio a 27±2 °C, 60-70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad (Pérez-Pacheco et al., 2004; Rahuman & Venkatesan, 2008; Granados-Echegoyen et al., 2015b).

### *Obtención de extractos fúngicos*

Para la producción de biomasa se utilizó arroz Soriana como medio de cultivo. El arroz se lavó con agua destilada, se trituró con un mortero y se secó en horno Felisa a 50 °C. Se tomaron 20 g de arroz seco y triturado y se depositó en frascos de vidrio de 250 mL, además se adicionó 30 mL de agua destilada y se dejó fermentar por 24 h. El material se esterilizó en autoclave Yamato SM500 a 121 °C durante 30 min (Soman et al., 2001).

Para obtener el inóculo, se utilizaron hongos *M. roridum*, *M. dimerum* y *M. nivale* depositados en el cepario del DEMAB – UAC y se cultivaron en cajas de Petri de PDA. Después de diez días de incubación a 28 °C se adicionó 10 mL de solución salina de NaCl al 0.85% con tween 80 al 0.1% (SST) y se realizó un raspado suave sobre la superficie de la caja de Petri para remover micelio y esporas. Se tomaron 6 mL de la mezcla y se decantó en tubos Falcon de 10 mL para eliminar el excedente de micelio. Del inóculo filtrado, se tomaron alícuota de 6 mL y se inocularon los frascos con arroz y agua destilada. De manera paralela se prepararon blancos inoculados con 6 mL de SST. Después de 40 días de incubación a 28 °C, se transfirieron 100 g de arroz con crecimiento fúngico a matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad y se maceró con 250 mL de metanol. Los frascos se colocaron en agitación a 120 rpm en un orbitador Lab Line durante 24 h. Después se decantó a través de papel filtro Whatman del No. 1 y el remanente se introdujo nuevamente al frasco y se agregó disolvente. El

procedimiento se repitió dos veces. El filtrado se concentró y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio Buchi B-490 a 40 °C y presión reducida para obtener los extractos metanólicos crudos. (Soman et al., 2001; Macias-Rubalcava et al., 2010).

### ***Preparación de concentraciones***

Se tomaron 880 mg de cada extracto etanólico de *M. roridum*, *M. dimerum* y *M. nivale* y se disolvieron en 11 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.7% como agente emulsificante para obtener la solución inicial de 80000 ppm, posteriormente por dilución volumétrica en serie se prepararon las concentraciones de aplicación (60000, 40000, 20000, 10000, 5000 y 2500 ppm) (WHO, 2005). Para cada tratamiento se seleccionaron grupos de 20 larvas y se colocaron en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada y 1 mL de las concentraciones de aplicación; las concentraciones finales fueron de 800, 600, 400, 200, 100, 50 y 25 ppm.

### ***Actividad larvícida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio***

Los bioensayos de actividad larvícida se realizaron de acuerdo con los Procedimientos Estándar de la Organización Mundial de la Salud (2015). La mortalidad de los extractos evaluados se determinó durante tres días (24, 48 y 72 h) después de la aplicación de los tratamientos. Se siguió realizando un seguimiento de los insectos durante 20 días para observar las diferentes etapas de desarrollo (segundo, tercero, cuarto instar, pupas y adultos). La mortalidad de los extractos evaluados se determinó durante tres días (24, 48 y 72 h) después de la aplicación de los tratamientos. Las larvas

y pupas muertas se contaron y eliminaron diariamente en cada etapa de desarrollo. Se consideraron larvas muertas cuando no presentaran movimientos similares a los exhibidos por las larvas del grupo control y cuando la larva no mostró ninguna reacción al momento de ser alterada en el sifón y su región cervical. Cuando el grupo control presentó del 90 – 93% de pupas formadas se contabilizaron las larvas y pupas vivas y muertas de cada estadio. Cada tratamiento fue replicado tres veces (Granados-Echegoyen et al., 2015b; Martínez-Tomás et al., 2018). Con la información recopilada se calculó el Índice de Inhibición de Crecimiento (IIC) usando la siguiente fórmula (Zhang et al., 1993):

$$IIC = \frac{\sum_1^4(\text{No. de insectos vivos} * \text{fase insecto}) + \sum_1^4[\text{No. de insectos muertos} * (\text{fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} * \text{total de fases del insecto})}$$

Donde 1, 2, 3 y 4 representan la fase de insecto de 2°, 3°, 4° instar y pupas formadas respectivamente. Se usaron aproximadamente 80 insectos para cada tratamiento y el número total de etapas del insecto fueron cuatro (tres larvas y pupa). El Índice de Crecimiento Relativo (ICR) se determinó mediante la fórmula: ICR = IIC tratamiento / IIC control sin aplicación.

### *Duración larval y pupal en condiciones de laboratorio*

Para calcular la duración de las fases de larva y pupa siguió la metodología de Granados-Echegoyen et al. (2018), en la que menciona que se multiplica el porcentaje de pupas y adultos desarrollados por el número de días en que se desarrollaron en cada repetición. Estos valores se agregaron y el total se dividió por el porcentaje total

de pupas y adultos desarrollados, mientras que la viabilidad larvaria y pupal se estimó contando el número de individuos que se convirtieron en pupas y adultos, expresado como un porcentaje con respecto al número inicial de individuos tratados.

### *Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)*

Los extractos evaluados se analizaron para detectar la presencia de alcaloides, cumarinas, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides tal como lo describen Pascual et al. (2008).

Los alcaloides se detectaron pulverizando el reactivo de Dragendorff sobre la placa seca de TLC. La aparición de manchas color anaranjado indicaron la presencia de alcaloides.

La presencia de cumarinas y antroquinonas se realizó usando solución de Bornträger (hidróxido de potasio (KOH) en EtOH al 5%); al cromatograma se le pulverizó la solución y se detectaron cumarinas por la formación de una fluorescencia azul a 365 nm; las antroquinonas se detectaron por la aparición de color rojo.

Los flavonoides se detectaron pulverizando sobre el cromatograma difenilboriloxietilamina (NP) con CH<sub>3</sub>OH al 1%, seguido de polietilenglicol (PEG) con EtOH al 5%; un color amarillo intenso, rojo, azul o verde fluorescente a 365 nm de UV indicó la presencia de flavonoides.

La presencia de taninos se demostró por la presencia de zonas oscuras (azul-negro) en las placas de TLC al aplicar cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 3%.

Para demostrar la presencia de terpenoides, se usó el reactivo de Godin; se pulverizó sobre el cromatograma una solución de vainillina en EtOH al 1% mezclada (1:1) (volumen:volumen) (v:v) con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 3% en agua, luego se pulverizó una solución al 10% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en EtOH. La placa se calentó a 105 °C por 3 min, la aparición de color rojo o azul mostró la presencia de terpenoides.

El volumen de las manchas aplicadas en las placas cromatografías fue de 10  $\mu\text{L}$ . Se desarrollaron placas de TLC de los extractos etanólicos de *M. roridum*, *M. dimerum* y *M. nivale* en sistema de disolventes tolueno--acetona (80:20) (v:v). Los cromatogramas se observaron primero sin tratamiento químico bajo luz ultravioleta de 365 nm y luego usando los reactivos de pulverización.

### *Análisis estadístico*

Los bioensayos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza para identificar diferencias significativas y prueba de Tukey para separar las medias con  $p < 0.05$  y comparar el efecto de las diferentes concentraciones en cada etapa de desarrollo. El efecto mortal (%) durante los primeros tres días fue sometido a un análisis de Probit para calcular las concentraciones letales ( $\text{LC}_{50}$  y  $\text{LC}_{90}$ ) y otros valores estadísticos con límite de confianza de 95%. El análisis se realizó utilizando el software Minitab v18.1 (Minitab, Inc. 2017).

## RESULTADOS

### *Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC*

El tamizaje fitoquímico (Tabla 1) mostró que en los extractos etanólico de las tres especies de hongos estaban presentes los alcaloides, flavonoides y terpenoides, mientras que los taninos solo se encontraron en el extracto de *M. dimerum* y *M. roridum*.

**Tabla 1.** Componentes fitoquímicos de extractos de etanol de *Myrothecium* spp.

Metabolitos	<i>M. dimerum</i>	<i>M. nivale</i>	<i>M. roridum</i>
Alcaloides	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Antroquinonas	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Taninos	+	-	+
Terpenoides	+	+	+

NP: Productos naturales; PEG: Polietilenglicol.

### *Actividad larvícida*

Las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a extracto etanólico de *M. nivale* registraron valores de 83.33% después de 24 h de la aplicación del tratamiento con concentración de 800 ppm. Con las concentraciones menores a 200 ppm del extracto de *M. dimerum* no se registraron datos de mortalidad durante las primeras 72 h (Tabla 2), mientras que el extracto de *M. roridum* registró 98.33% de actividad larvícida después de 48 h de la aplicación de las concentraciones de 800 y 600 ppm, respectivamente. Las concentraciones letales que se obtuvieron después de 24 h fueron menores a las concentraciones utilizadas sólo para *M. nivale* (LC<sub>50</sub> de 446.85 ppm y LC<sub>90</sub> de 733.90 ppm), mientras que para *M. dimerum* y *M. roridum* las concentraciones media (LC<sub>50</sub>) fueron de 1080.52 ppm y 1007.41 ppm, respectivamente. De acuerdo al análisis

estadístico, con la utilización del extracto de *M. dimerum* se presentaron diferencias significativas con las concentraciones entre 800 y 400 ppm después de 48 de la aplicación de los tratamientos, sin embargo, el mejor tratamiento resultó ser el de 800 ppm debido a que se eliminaron el 100% de las larvas, mientras que a las 72 h el mejor tratamiento fue el de 600 ppm. Con la utilización de extracto de *M. nivale* no se presentaron diferencias significativas con las concentraciones de 800 y 600 ppm durante las primeras 24 y 48 h, sin embargo, los valores indican que después de 48 h, el mejor tratamiento fue on la concentración más alta, debido a que se eliminó el 100% de la población de larvas. El mejor resultado con la utilización de extracto etanólico de *M. roridum* se obtuvo con las concentraciones de 800, 600 y 400 ppm después de 72 h de la aplicación del tratamiento, mientras que a las 24 h el mejor tratamiento fue el de 800 ppm y con las concentraciones entre 600 y 25 ppm no se presentaron diferencias significativas.

**Tabla 2.** Mortalidad a las 24, 48 y 72 h de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con extractos de etanol de hongos *Myrothecium* spp.

Extracto	Días (h)	Concentración (ppm) / Medias (%)							
		800	600	400	200	100	50	25	Control
<i>M. dimerum</i>	24	13.33 a	5.00 b	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	48	100.00 a	85.00 b	6.67 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	72	-	100.00 a	11.67 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c
<i>M. nivale</i>	24	83.33 a	80.00 a	63.33 b	18.33 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	48	100.00 a	96.67 a	75.00 b	23.33 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	72	-	100.00 a	88.33 b	28.33 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
<i>M. roridum</i>	24	13.33 a	1.67 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
	48	98.33 a	98.33 a	66.67 b	21.67 c	13.33 cd	5.00 de	0.00 e	0.00 e
	72	100.00 a	100.00 a	90.00 a	43.33 b	33.33 b	11.67 c	5.00 c	0.00 c

Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control

**Tabla 3.** Concentraciones letales de extractos de etanol de *Myrothecium* spp. contra larvas de segundo instar de mosquito *Aedes aegypti*

Extracto	Días (h)	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
<i>M. dimerum</i>	24	1080.52 (924.45 -1695.18)	1418.66 (1140.32 – 2575.46)
<i>M. nivale</i>	24	446.85 (410.30 – 485.99)	733.90 (677.74 – 805.55)
<i>M. roridum</i>	24	1007.41 (888.49 – 1741.03)	1247.90 (1032.26 – 2665.45)

LC<sub>50</sub>: concentración letal que controla el 50% de la población de mosquitos; LC<sub>90</sub>: concentración letal que controla el 90% de la población de mosquitos; \* Los valores entre paréntesis indican los límites de confianza del 95% inferior y superior; (\*): Sin determinación de LC. No alcanza la convergencia para el criterio de cálculo. Bajo número de iteraciones.

### ***Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito***

El índice de inhibición del crecimiento (IIC) permite observar una reducción en el tiempo del desarrollo de las fases del insecto. Las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a una concentración de 200 ppm de extracto etanólico de *M. roridum* presentó un ICR de 0.52, por lo que se el crecimiento de las fases de larva y pupa del insecto fue 48% menor en comparación con el control (1.00) (Tabla 4), mientras que en la duración de larvas y pupas no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si existen diferencias con comparación con el control. Por otra parte, efecto de inhibición de crecimiento fue mayor con las larvas que se expusieron a concentraciones de 400 200 y 100 ppm de extracto de *M. dimerum*, por lo que se registraron valores de ICR de 0.71, 0.77 y 0.80 respectivamente. Los insectos que lograron sobrevivir, pasaron un menor tiempo en fase de pupa en comparación con el control. Los valores máximos de mortalidad total se presentaron con la exposición de las larvas a las concentraciones más altas de cada extracto evaluado, mientras que los valores menores se registraron con las concentraciones menores de 200 ppm de los extractos de *M. dimerum* y *M. nivale*.

**Tabla 4.** Mortalidad total, duración larval y pupal e Índice de Inhibición de Crecimiento de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con extractos de etanol de *Myrothecium* spp.

Extracto	Concentración (ppm)	Mortalidad total (%)	Duración		ICR
			Larva*	Pupa**	
<i>M. dimerum</i>	800	100.00 a	0.00 f	0.00 c	0.00 f
	600	100.00 a	0.00 f	0.00 c	0.00 f
	400	11.67 b	5.77 a	1.05 b	0.71 e
	200	5.00 c	5.52 ab	1.05 b	0.77 d
	100	0.00 d	5.26 bc	1.01 b	0.80 cd
	50	0.00 d	4.95 cd	1.08 b	0.84 bc
	25	0.00 d	4.76 d	1.05 b	0.86 b
	Control	0.00 d	3.60 e	2.26 a	1.00 a
<i>M. nivale</i>	800	100.00 a	0.00 e	0.00 c	0.00 d
	600	100.00 a	0.00 e	0.00 c	0.00 d
	400	100.00 a	0.00 e	0.00 c	0.00 d
	200	45.00 b	5.60 a	1.28 b	0.68 c
	100	0.00 c	5.52 ab	1.26 b	0.79 b
	50	0.00 c	5.23 b	1.15 b	0.79 b
	25	0.00 c	4.71 c	1.13 b	0.80 b
	Control	0.00 c	3.60 d	2.26 a	1.00 a
<i>M. roridum</i>	800	100.00 a	0.00 c	0.00 c	0.00 e
	600	100.00 a	0.00 c	0.00 c	0.00 e
	400	100.00 a	0.00 c	0.00 c	0.00 e
	200	58.33 b	4.59 a	1.25 b	0.52 d
	100	36.67 c	4.68 a	1.24 b	0.63 c
	50	13.33 d	4.65 a	1.14 b	0.82 b
	25	5.00 de	4.49 a	1.26 b	0.90 ab
	Control	0.00 e	3.60 b	2.26 a	1.00 a

Núm.; Número de individuos; II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; \* Periodo de larva a pupa; \*\* Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; (\*): Sin registro o cálculo de datos; Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

## DISCUSIÓN

Se ha determinado que los hongos del genero *Myrothecium* tienen la capacidad de producir compuestos biactivos de diferentes grupos químicos. Diferentes estudios reportan la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios como los fenoles en el extracto crudo de etil acetato obtenido de *Myrothecium* sp. M1-CA-102 (Ruma et

al. 2014). También se ha demostrado la presencia de tricotecenos obtenidos a partir de extracto *M. verrucaria* (Isaka et al., 1999) y *M. roridum* (Liu et al., 2015) y sesquiterpenos obtenidos de *Myrothecium* sp. SC0265 (Fu et al., 2014) que pertenecen al grupo de los terpenoides que en nuestro estudio se observó la presencia de este grupo de metabolitos secundarios.

Se ha evaluado la actividad larvicida del filtrado de metabolitos de otras especies de hongos, tales como de *Verticillium lecani* contra *Cx. quinquefasciatus*, demostrando que las larvas de cuarto instar son más susceptibles que las de otros instar después de 72 h de exposición a los tratamientos (Soni & Prakash, 2012), resultados que son similares a los obtenidos en nuestro estudio con concentraciones de 800 y 600 ppm. Al-Mekhlafi (2017) evaluó el extracto metanólico de *Paecilomyces lilacinus*, que mostró una mortalidad de 100% contra larvas de cuarto instar de *Ae. caspius* (LC<sub>50</sub> de 190.66 ppm) y *Cx. pipiens* (LC<sub>50</sub> de 254.25 ppm) después de 24 h de la exposición a los tratamientos, resultados que son menores a los que obtuvimos en nuestro estudio, puesto que después de 24 h de exposición a los tratamientos con los extractos de las tres especies de hongos del género *Myrothecium*. Por otra parte, Ragavendran & Natarajan (2015), evaluaron el extracto de acetato de etilo de *Aspergillus terreus* y con la concentración de 500 ppm la mortalidad de larvas de segundo instar y pupas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* comienza durante las primeras seis horas de exposición y es superior al 90% después de 24 h, resultados que difieren a los datos que se obtuvieron con la

aplicación de extractos etanólicos de *Myrothecium*, puesto que los valores máximos de actividad larvicida se obtuvieron con *M. nivale*, mientras que el registro máximo de mortalidad de pupas se obtuvo con una concentración de 200 ppm del mismo extracto.

No hay evidencia del efecto de los extractos fúngicos en la duración de larvas y pupas, sin embargo, existen reportes en larvas de mosquito *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extracto de metanol de semillas de *Ricinus communis* con una concentración de 162.5 ppm disminuyen el periodo larval (Martinez-Tomás et al., 2018), resultado inverso al que obtuvimos en nuestro estudio con larvas de *Ae. aegypti*, mientras que Daniel et al. (1995) informaron que los extractos de *Acalypha indica* aumentan en el periodo de larvas, lo cual coincide con los datos obtenidos en esta investigación. El índice de crecimiento relativo (ICR) no se ha evaluado con el uso de concentraciones de extractos fúngicos, sin embargo, se ha determinado este índice con la utilización de extractos botánicos, tal como lo reportan Granados-Echegoyen et al. (2014) que evaluaron la aplicación de extractos de etanol y metanol de hojas de *Pseudocalymma alliaceum* al 10% sobre larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* y reportan valores de ICR de 0.70 y 0.76, respectivamente, que son valores similares a los que se reportan en este estudio con la aplicación de concentraciones entre 200 y 50 ppm de extracto de *M. nivale*.

Se ha determinado la actividad biológica contra diferentes organismos con extractos obtenidos de diferentes especies de hongos del genero *Myrothecium*. El extracto de

acetona de *M. verrucaria* posee actividad nematocida contra el nematodo nódulador de raíces *Meloidogyne incognita* (Nguyen et al., 2018). Fu et al. (2014), reportaron que el extracto de metanol obtenido a partir de un cultivo de micelio sólido *Myrothecium* sp. SC0265 mostró actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, mientras que Ruma et al. (2014) determinó que el extracto crudo de etil acetato obtenido a partir de micelio de *Myrothecium* sp. M1-CA-102 tienen actividad antibacterial contra *Shigella flexneri* y *Klebsiella pneumoniae* y actividad antifúngica contra *Candida albicans* y hongos patógenos de plantas *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Wu et al., 2016). En otros estudios se reporta el efecto aleloquímico de extractos orgánicos de *Muscodor yucatanensis* sobre *Guignardia mangifera*, *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica* (Macias-Rubalcava et al., 2010).

## CONCLUSION

Los resultados de nuestro estudio muestran que los extractos etanólicos de *M. dimerum*, *M. roridum* y *M. nivale* poseen efecto tóxico contra larvas del mosquito *Ae. aegypti*. El resultado general de la aplicación de los tres extractos a concentraciones de 800 ppm observó que la actividad efectiva contra larvas se da entre las 48 y 72 h, mientras que a concentraciones menores, existe una prolongación en el ciclo de vida del insecto, lo que asegura que la reducción de la población de mosquitos resultante sea

sustancial incluso cuando el potencial larvicida sea mínimo. Así mismo se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los principales grupos químicos presentes en los extractos y que ejercen la acción biológica, sin embargo, es necesario realizar evaluaciones con extractos a base de solventes de polaridad variable y purificar, identificar y caracterizar los componentes activos responsables de la muerte e inhibición de crecimiento y desarrollo de los mosquitos.

## LITERATURA CITADA

Al-Mekhlafi, F. A. (2017). Larvicidal activity of some fungal extracts on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Entomological Research*, 47(6), 388–393. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12235>

Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2018). Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. *South African Journal of Botany*, 114, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.018>

Daniel T., Umarani S., & Sakthivadivel M. (1995) Insecticidal action of *Ervatamia divaricata* L. and *Acalypha indica* L. against *Culex quinquefasciatus* Say. *Geobios News Report*, 14(2):95–98

Fu, Y., Wu, P., Xue, J., & Wei, X. (2014). Cytotoxic and antibacterial quinone sesquiterpenes from a *Myrothecium* Fungus. *Journal of Natural Products*, 77(8), 1791–1799. <https://doi.org/10.1021/np500142g>

Govindarajan, M., & Sivakumar, R. (2014a). Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(2), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3709-4>

Govindarajan, M., & Sivakumar, R. (2014b). Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.) (Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicida. *Parasitology Research*, 113(4), 1435–1449. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3784-1>

Granados-Echegoyen, C. A., Chan-Bacab, M. J., Ortega-Morales, B. O., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., Diego-Nava, F., & Gaylarde, C. (2018). Argemone mexicana (Papaverales: Papavaraceae) as an Alternative for Mosquito Control: First Report of Larvicidal Activity of Flower Extract. *Journal of Medical Entomology*, tjy159–tjy159. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjy159>

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alexander-Aguilera, A., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., & de Jesús Chairez-Martinez, E. (2015a). Effects of aqueous and ethanol extract of dried leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae) on haematological and biochemical parameters of wistar rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2), 129–134. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30009-9](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30009-9)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., & Rojas-Olivos, A. (2015b). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(6), 463–467. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60816-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60816-7)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernandez, N., & Gato-Armas, R. (2014). Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594–601. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)

Isaka, M., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (1999). Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products*, 62(2), 329–331. <https://doi.org/10.1021/np980323x>

Liu, X.-X., Jiao, R.-H., Chen, C.-J., Ge, H.-M., Ren, R., & Tan, R.-X. (2015). Bioactive Trichothecenes Produced by the *Myrothecium* sp. QB-1 . *Helvetica Chimica Acta*, 98(10), 1435–1441. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500088>

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., & Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122–1131. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9848-5>

Martinez-Tomás, S. H. , Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. de J. R., & López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 221–238. <https://doi.org/10.3958/059.043.0114>

Mathalaimuthu, B., Shanmugam, D., Kovendan, K., Kadarkarai, M., Jayapal, G., & Benelli, G. (2017). *Coleus aromaticus* leaf extract fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? *Process Safety and Environmental Protection*, 106, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.12.003>

Mehmood, M. A., Chohan, S., Abid, M., Naqvi, S. A. H., & Naz, S. (2018). Antifungal Potential of Indigenous Medicinal Plants against *Myrothecium* Leaf Spot of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(0), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160395>

Nguyen, L. T. T., Yeo, J. H., Bae, C.-H., Park, H. W., Lee, S., Jang, J. Y., Kim, T. Y., Nan, H. Y., Hur, J. S., & Kim, J.-C. (2018). Nematicidal activity of verrucarins A and roridin A isolated from *Myrothecium verrucaria* against *Meloidogyne incognita*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.012>

Nunes, F. C., Leite, J. A., Oliveira, L. H. G., Sousa, P. A. P. S., Menezes, M. C., Moraes, J. P. S., Mascarenhas, S. R., & Braga, V. A. (2015). The larvicidal activity of

*Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitology Research*, 114(2), 543–549. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4216-y>

Pascual, M. E., Carretero, M. E., Slowing, K. V., & Villar, A. (2008). Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. *Pharmaceutical Biology*, 40 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.2.139.5849>

Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. & G. Ramírez V. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 141-152.

Quezado Duval, A. M., Henz, G. P., Paz-Lima, M. L., Medeiros, A. R., Miranda, B. E. C., Pfenning, L. H., & Reis, A. (2010). New hosts of *Myrothecium* SPP. In Brazil and a preliminary In Vitro assay of fungicides. *Brazilian Journal of Microbiology* : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 41(1), 246–252. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100001000034>

Ragavendran, C., & Natarajan, D. (2015). Insecticidal potency of *Aspergillus terreus* against larvae and pupae of three mosquito species *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17224–17237. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4961-1>

Rahuman, A. A., & Venkatesan, P. (2008). Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research*, 103(1), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0940-5>

Ruma, K., Sunil, K., & Prakash, H. S. (2014). Bioactive potential of endophytic *Myrothecium* sp. isolate M1-CA-102, associated with *Calophyllum* apetalum. *Pharmaceutical Biology*, 52(6), 665–676. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.863950>

Soman, A. G., Gloer, J. B., Angawi, R. F., Wicklow, D. T., & Dowd, P. F. (2001). Vertilecanins: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64(2), 189–192. <https://doi.org/10.1021/np000094q>

Soni, N., & Prakash, S. (2012). Larvicidal effect of *Verticillium lecanii* metabolites on *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 220–224. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60050-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60050-4)

Subarani, S., Sabhanayakam, S., Kamaraj, C., Elango, G., & Kadir, M. A. (2013). Efficacy of larvicidal and pupicidal activity of *Catharanthus roseus* aqueous and solvent extracts against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 625–630. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60107-8)

WHO. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Health Organization*, 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>

Wu, H. Bo., Wu, H. B., Wang, W. H., Liu, T. T., Qi, M. G., Feng, J. C., Li, X. Y., & Liu, Y. (2016). Insecticidal activity of sesquiterpene lactones and monoterpenoid from the fruits of *Carpesium abrotanoides*. *Industrial Crops and Products*, 92, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.046>

Zhang, M., Chaudhuri, S. K., & Kubo, I. (1993). Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *Journal of Chemical Ecology*, 19(6), 1109–1118. <https://doi.org/10.1007/BF00987372>

Zhang, S., Zhu, J., Liu, T., Samra, S., Pan, H., Bai, J., Hua, H., & Bechthold, A. (2016). Myrothecoside, a Novel Glycosylated Polyketide from the Terrestrial Fungus *Myrothecium* sp. GS-17. *Helvetica Chimica Acta*, 99(3), 215–219. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500218>

## CAPITULO 3. EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS DE OAXACA

### **Actividad larvicida e inhibición de crecimiento de extractos de *Agave angustifolia* (Asparagaceae: Agavoideae) contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae)**

Larvicidal activity and growth inhibition of extracts of *Agave angustifolia* (Asparagaceae: Agavoideae) against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

#### **RESUMEN**

*Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* son mosquito con distribución global, con mayor presencia en zonas tropicales y subtropicales, vectores de diversas enfermedades como dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla y filariasis linfática. *Agave angustifolia* se utiliza para la elaboración de mezcal y durante su cosecha las hojas son abandonadas en campo para su degradación, sin embargo, este órgano vegetativo posee metabolitos secundarios con potencial como agente de control de insectos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto larvicida e inhibición de crecimiento de larvas de mosquitos con extractos de hojas de *A. angustifolia*. El extracto de hojas se obtuvo mediante un proceso de maceración y se realizó un análisis fitoquímico. Se evaluaron grupos de 20 larvas colocadas en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada y 1 mL de cada una de las concentraciones, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. El análisis fitoquímico muestra la presencia de diferentes grupos químicos entre lo que destacan los alcaloides, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides. El extracto metanólico mostró 100%

de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* después de 24 h de la aplicación de la concentración de 1000 ppm. Los valores más altos de mortalidad de larvas de *Cx. quinquefasciatus* se registraron después de 72 h de la aplicación de las concentraciones más altas de extracto etanólico y metanólico, sin embargo, al finalizar el experimento se eliminó más del 90% de la población de con las concentraciones utilizadas. Con las concentraciones de 125 y 62.5 ppm y el control no se presentaron diferencias significativas en la inhibición de crecimiento de larvas de *Ae. aegypti*. Los resultados sugieren que los extractos de etanol y metanol son una alternativa viable para el control de las poblaciones de las dos especies de mosquitos.

**Palabras clave:** extractos botánicos, mortalidad, mosquitos.

## **ABSTRACT**

*Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* are mosquitoes with global distribution, with major presence in tropical and subtropical zones, vectors of diverse illnesses like fastidiousness, zika, chikungunya, yellow fever and filariasis lymphatic. *Agave angustifolia* is used for the tequila making and during its harvest the sheets are left in field for its degradation, nevertheless, this vegetative organ it possesses secondary metabolites with potential like agent of control of insects. The target of this study was to evaluate the larvicida effect and inhibition of growth of larvae of mosquitoes with extracts of sheets of *A. angustifolia*. The sheets extract was obtained by means of a maceration process and an analysis was realized phytochemical. There were evaluated

groups of 20 larvae placed in glasses of plastic with 100 mL of distilled water and 1 mL of each of the concentrations, an experimental design was used completely at random with three repetitions. The analysis phytochemical shows the presence of different chemical groups between what they emphasize the alkaloids, anthroquinones, flavonoids, tannins and terpenoids. The methanolic extract showed 100% of mortality of larvae of *Ae. aegypti* after 24 h of the application of the concentration of 1000 ppm. The highest values of mortality of larvae of *Cx. quinquefasciatus* registered after 72 h of the application of the highest concentrations of ethanolic and methanolic extracts, nevertheless, on having finished the experiment, there were eliminated more than 90% of the population of with the used concentrations. With the concentrations of 125 and 62.5 ppm and the control significant differences did not appear in the inhibition of growth of larvae of *Ae. aegypti*. The results suggest that the extracts of ethanol and methanol are viable alternatives for the control of the populations of two species of mosquitoes.

**Key words:** botanical extracts, mortality, mosquitoes.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) un grupo que comprende aproximadamente 3,500 especies agrupados en 41 géneros que se encuentran distribuidas en áreas tropicales y subtropicales (Govindarajan & Karuppanan, 2011; Rojas-Olivos et al., 2018). Más de 100 especies perjudican a los humanos y otros vertebrados debido a las

picaduras que provocan urticaria o angioedemas y también son vectores importantes de diferentes patógenos y parásitos (Govindarajan & Sivakumar, 2014; Benelli et al., 2017a).

*Aedes aegypti* Linnaeus (*Ae. aegypti*) es uno de los principales vectores de arbovirus que causan el dengue, fiebre amarilla, chikungunya y zika (Macedo et al., 2017). El dengue se ha convertido en la principal amenaza para la salud de aproximadamente 2,500 millones de personas en más de 100 países (Rahuman & Venkatesan, 2008). *Culex quinquefasciatus* Say (*Cx. quinquefasciatus*) es vector del nematodo *Wuchereria bancrofti* responsable de la filariasis linfática que mantiene 120 millones de personas infectadas y 44 millones con manifestaciones crónicas en todo el mundo. También es vector de *Plasmodium relictum* causante de la malaria aviar y otras enfermedades arbovirales importantes y peligrosas, incluido el virus del Nilo Occidental y la encefalitis japonesa (Subarani et al., 2013; Benelli et al., 2017b; Martínez-Tomás et al., 2018).

El control de estos insectos se ha realizado con la aplicación de insecticidas sintéticos, sin embargo, el uso excesivo de estos productos ha generado resistencia fisiológica, efectos tóxicos en la salud humana y organismos no objetivo y contaminación del ambiente (Das & Chandra, 2012; Rajesh et al., 2015). Estos problemas han puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar agentes de control alternativo y selectivo que sean más eficientes y respetuosos con el ambiente (Rawani et al., 2009; Govindarajan et al., 2011).

Los productos naturales obtenidos de plantas son una fuente de compuestos bioactivos que tienen diferentes efectos sobre las fases juveniles y adultas de insectos (Rattan, 2010). En los últimos años, se ha reportado que los extractos de plantas poseen actividad larvicida, ovicida e inhibición de crecimiento y desarrollo contra diferentes especies de mosquitos de importancia epidemiológica (Govindarajan et al., 2011; Granados-Echegoyen et al., 2014; Baskar et al., 2017; Ali et al., 2018; Hong et al., 2018; Martinez-Tomás et al., 2018).

La familia Asparagaceae es endémica del continente americano y se encuentra integrada por nueve géneros y aproximadamente 330 especies distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Venezuela. El género *Agave* tiene más de 275 especies y el 75% de estas se encuentra presente en México con un alto grado de endemismo. En el estado de Oaxaca, se encuentran distribuidos el 25% del total de las especies reportadas para el género, entre las que se encuentra *Agave angustifolia* Haw (*A. angustifolia*) (García-Mendoza, 2007; Kajla et al. 2016). Esta especie, también denominada localmente como espadín se ha convertido en el principal agave cultivado debido a que el tallo que representan el 45% del total de la planta es utilizado como materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica mezcal y durante la cosecha, las hojas son abandonadas en campo para su degradación (Pérez del Rio et al., 2013; Chimal-Sánchez et al., 2018; López-Romero et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado que las hojas de los agaves poseen actividad sobre larvas de diferentes especies de mosquitos debido a

la presencia de diferentes grupos químicos (Dharmshaktu et al., 1987; Hammuel et al., 2011; Ahumada-Santos et al., 2013; Nunes et al., 2015; Guimarães de Oliveira et al., 2016; Kajla et al., 2016). Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto tóxico de extractos obtenidos de hojas de *A. angustifolia* como fuentes potenciales para el contra larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Obtención de material biológico***

#### ***Cría de mosquitos***

Se colectaron huevos, larvas y pupas de *Ae. aegypti* en agua sucia acumulada en la Ciudad de Campeche, México (19°49'36.7"N 90°33'15.6"W) y de *Cx. quinquefasciatus* en agua sucia acumulada de floreros del cementerio municipal de Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México (16°47'32.4"N 96°40'50.2"W). Los huevos de ambas especies se trasladaron al laboratorio y se colocaron en bandejas de plástico (47 x 35 x 12 cm) con 300 mL de agua para su eclosión. Las larvas se alimentaron con alimento molido para peces tilapia (Api-tilapia nivel 1®) hasta que alcanzaron la fase pupal. Las pupas se transfirieron a recipientes (30 x 20 x 6 cm) con 300 mL de agua y se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos machos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y semanalmente se introdujo un conejo (*Oryctolagus cuniculatus*) inmovilizado por una noche como material hematofágico para las hembras. La cría se mantuvo en laboratorio a 27±2 °C,

60-70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad (Pérez-Pacheco et al., 2004; Rahuman & Venkatesan, 2008; Granados-Echegoyen et al., 2015).

### ***Colecta de plantas y preparación de extractos***

Las hojas de *A. angustifolia* de siete años de edad se recolectaron de campos agrícolas en la comunidad de Monte del Toro. Ejutla de Crespo, Oaxaca, México (16°40'28.6"N 96°44'39.9"W). Las hojas se lavaron con agua de corriente para eliminar las partículas de polvo y se secaron completamente a la sombra con temperatura ambiente (26±2 °C) durante 70 días. Las hojas secas de la planta se cortaron en partes de 10 x 2 cm y se pulverizaron con un molino eléctrico de cuchillos universal (Fritsh, Pulverisette 19) con una malla de 1 mm. (Granados-Echegoyen et al., 2014).

Se prepararon extractos de etanol (EtOH), metanol (CH<sub>3</sub>OH) y hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) se colocó 100 g polvo de hojas en un matraz con 250 mL de cada disolvente, agitando y dejando reposar durante 72 h (maceración). La solución se filtró con papel Whatman N° 1 y el disolvente se evaporó completamente a presión reducida en un evaporador rotatorio (Buchi B-490) para obtener los extractos crudos. Los extractos se almacenaron a 4 °C (Mabe RMF0260XMXX2) hasta su uso (Granados-Echegoyen et al., 2018).

### ***Preparación de concentraciones para bioensayos***

Se tomó 1 g de cada uno de los extractos y se solubilizaron en 11 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.7% como agente emulsificante para obtener la concentración inicial de 100000 ppm, posteriormente por dilución volumétrica en serie

se prepararon las concentraciones de aplicación (50000, 25000, 12500 y 6250 ppm) (WHO, 2005). Para cada tratamiento se seleccionaron grupos de 20 larvas y se colocaron en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada y 1 mL de las concentraciones de aplicación; las concentraciones finales fueron de 1000, 500, 250, 125 y 62.5 ppm (WHO, 2005).

### *Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)*

Los extractos evaluados se analizaron para detectar la presencia de alcaloides, cumarinas, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides tal como lo describen Pascual et al. (2008).

Los alcaloides se detectaron pulverizando el reactivo de Dragendorff sobre la placa seca de TLC. La aparición de manchas color anaranjado indicaron la presencia de alcaloides.

La presencia de cumarinas y antroquinonas se realizó usando solución de Bornträger (hidróxido de potasio (KOH) en EtOH al 5%); al cromatograma se le pulverizó la solución y se detectaron cumarinas por la formación de una fluorescencia azul a 365 nm; las antroquinonas se detectaron por la aparición de color rojo.

Los flavonoides se detectaron pulverizando sobre el cromatograma difenilboriloxietilamina (NP) con CH<sub>3</sub>OH al 1%, seguido de polietilenglicol (PEG) con

EtOH al 5%; un color amarillo intenso, rojo, azul o verde fluorescente a 365 nm de UV indicó la presencia de flavonoides.

La presencia de taninos se demostró por la presencia de zonas oscuras (azul-negro) en las placas de TLC al aplicar cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 3%.

Para demostrar la presencia de terpenoides, se usó el reactivo de Godin; se pulverizó sobre el cromatograma una solución de vainillina en EtOH al 1% mezclada (1:1) (volumen:volumen) (v:v) con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 3% en agua, luego se pulverizó una solución al 10% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en EtOH. La placa se calentó a 105 °C por 3 min, la aparición de color rojo o azul mostró la presencia de terpenos.

El volumen de las manchas aplicadas en las placas cromatografías fue de 10  $\mu\text{L}$ . Se desarrollaron placas de TLC de extractos etanólico, metanólico y hexánico de *A. angustifolia* en sistemas de disolventes tolueno-acetona (SI) (80:20) (v:v) y tolueno-cloroformo-acetona (SII) (40:25:35) (v:v:v). Los cromatogramas se observaron primero sin tratamiento químico bajo luz ultravioleta de 365 nm y luego usando los reactivos de pulverización.

### ***Bioensayos de actividad larvicida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio***

Los bioensayos de actividad larvicida se realizaron de acuerdo con los Procedimientos Estándar de la Organización Mundial de la Salud (2015). La mortalidad

de los extractos evaluados se determinó durante tres días (24, 48 y 72 h) después de la aplicación de los tratamientos. Se continuó realizando un seguimiento de los insectos por 20 días para *Ae. aegypti* y 26 días para *Cx. quinquefasciatus* para observar las diferentes etapas de desarrollo (segundo, tercero, cuarto instar, pupas y adultos). Las larvas y pupas muertas se contaron y eliminaron diariamente en cada etapa de desarrollo. La mortalidad se evaluó utilizando dos criterios: 1) cuando una larva no mostró movimientos similares a los exhibidos por el grupo de control; 2) cuando la larva no mostro ninguna reacción al momento de ser alterada en el sifón y su región cervical. Cada tratamiento fue replicado tres veces (Granados-Echegoyen et al., 2015; Martínez-Tomás et al., 2018). Con la información recopilada se calculó el Índice de Inhibición de Crecimiento (IIC) usando la siguiente fórmula (Zhang et al., 1993):

$$IIC = \frac{\sum_1^4(\text{No. de insectos vivos} * \text{fase insecto}) + \sum_1^4[\text{No. de insectos muertos} * (\text{fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} * \text{total de fases del insecto})}$$

Donde 1, 2, 3 y 4 representan la fase de insecto de 2°, 3°, 4° instar y pupas formadas respectivamente. Se usaron 60 insectos para cada tratamiento y el número total de etapas del insecto fueron cuatro (tres larvas y pupa). El Índice de Crecimiento Relativo (ICR) se determinó mediante la fórmula:  $ICR = IIC \text{ tratamiento} / IIC \text{ control sin aplicación}$ .

### ***Duración larval y pupal en condiciones de laboratorio***

Para calcular la duración de las fases de larva y pupa siguió la metodología de Granados-Echegoyen et al. (2018), en la que menciona que se multiplica el porcentaje de pupas y adultos desarrollados por el número de días en que se desarrollaron en cada repetición. Estos valores se agregaron y el total se dividió por el porcentaje total de pupas y adultos desarrollados, mientras que la viabilidad larvaria y pupal se estimó contando el número de individuos que se convirtieron en pupas y adultos, expresado como un porcentaje con respecto al número inicial de individuos tratados.

### *Análisis estadístico*

Los bioensayos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza para identificar diferencias significativas y prueba de Tukey para separar las medias con  $p < 0.05$  y comparar el efecto de las diferentes concentraciones en cada etapa de desarrollo. El efecto mortal (%) durante los primeros tres días fue sometido a un análisis de Probit para calcular las concentraciones letales ( $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ ) y otros valores estadísticos con límite de confianza de 95%. El análisis se realizó utilizando el software Minitab v18.1 (Minitab, Inc. 2017).

## RESULTADOS

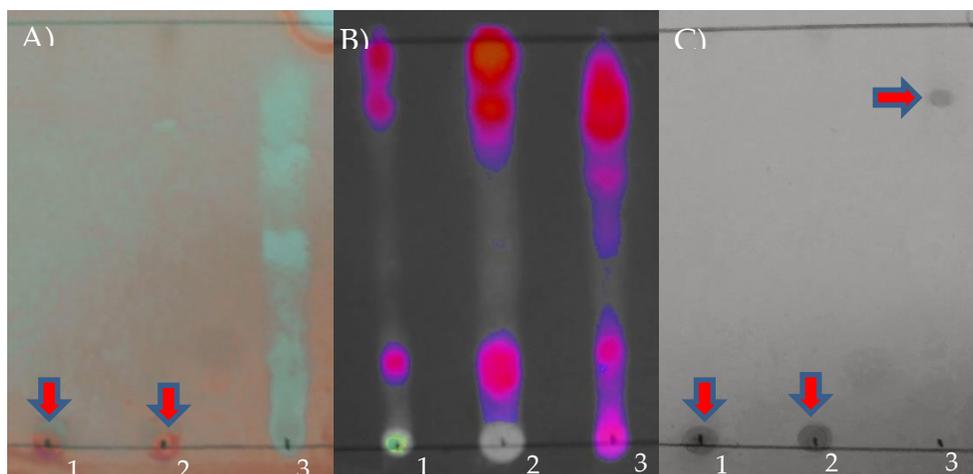
### *Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC*

El tamizaje fitoquímico cualitativo en dos sistemas de disolventes mostró que en todos los extractos estaban presentes las antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides. (Tabla 1). Las placas de TLC mostraron manchas naranjas características para alcaloides los extractos de etanol y metanol analizados bajo el sistema de disolventes I (SI) (Fig. 1). Con el reactivo para productos naturales, se observaron manchas rojas con una coloración azul muy débil característica de los flavonoides. Las manchas rojas se presentaron en la parte superior de la placa, indicando posiblemente flavonoides de menor polaridad. Las placas que se pulverizaron con cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) mostraron machas oscuras que determinan la presencia de taninos.

**Tabla 1.** Componentes fitoquímicos de diferentes extractos crudos de *Agave angustifolia*.

Metabolitos	SI			SII		
	E	H	M	E	H	M
Alcaloides	+	-	+	+	-	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Antroquinonas	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
Terpenoides	+	+	+	+	+	+

SI: Tolueno-acetona; SII: cloroformo-tolueno-acetona; E: Etanólico; H: Hexánico; M: Metanólico; NP: Productos naturales; PEG: Polietilenglicol.



**Figura 1.** Perfil químico de TLC de extractos de etanol (1), metanol (2) y hexano (3) de *A. angustifolia*. Manchas de TLC reveladas en sistemas de disolventes I con reactivo de Dragendorff (alcaloides) en A); reactivo para productos naturales (flavonoides) en B) y reactivo cloruro férrico (taninos) en C) en UV (365 nm).

#### *Actividad larvicida*

Se logró observar que las larvas de segundo instar tardío de *Ae. aegypti* sometidas a tratamiento con extracto a base de etanol de *A. angustifolia*, presentó 100% de efectividad a las 72 h (Tabla 2) con las concentraciones de 1000 y 500 ppm. En cambio, 24 h posteriores a la aplicación del tratamiento, estos presentaron 83.33% y 61.67% de mortalidad con una  $LC_{50}$  de 583.42 y  $LC_{90}$  de 957.15 ppm. Con el extracto a base de hexano, se obtuvo como registro más alto de mortalidad 76.67% a las 48 h, dato que es significativamente reducido a un máximo de 15% a las 72 h con la concentración de 500 ppm. Con extracto metanólico a las 24 h presentó un 100% de mortalidad con la concentración más alta de 1000 ppm y a las 72 h se presentó el mismo resultado (100%) con la concentración de 500 ppm registrando una  $LC_{50}$  de 348.78 y 251.95 ppm, respectivamente.

**Tabla 2.** Mortalidad a las 24, 48 y 72 h de larvas de mosquito *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos de *Agave angustifolia*.

Extracto	Especie de mosquito	Días (h)	Concentración (ppm) / Medias ± Error estándar					
			1000	500	250	125	62.5	Control
Etanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	83.33 a	61.67 b	16.67 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		48	95.00 a	93.33 a	20.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
		72	100.00 a	100.00 a	25.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	68.75 a	38.75 b	26.25 c	23.75 c	11.25 d	0.00 e
		48	83.75 a	71.25 b	52.50 c	42.50 cd	35.00 d	0.00 e
		72	96.25 a	87.50 a	65.00 b	58.75 bc	47.50 c	0.00 d
Hexano	<i>Ae. aegypti</i>	24	70.00 a	13.33 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		48	76.67 a	15.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		72	76.67 a	15.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	5.00 a	0.00b	0.00 c	0.00 d	0.00 e	0.00 f
		48	10.00 a	0.00 b	0.00 c	0.00 d	0.00 e	0.00 f
		72	21.25 a	8.75 b	6.25 bc	3.75 cd	0.00 d	0.00 d
Metanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	100.00 a	88.33 b	26.67 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		48	-	98.33 a	38.33 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
		72	-	100.00 a	43.33 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	73.75 a	71.25 a	67.50 a	61.25 a	26.25 b	0.00 c
		48	87.50 a	83.75 ab	77.50 ab	67.50 b	28.75 c	0.00 d
		72	96.25 a	96.25 a	87.50 ab	77.50 b	36.25 c	0.00 d

Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Las larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* sometidas a tratamiento con extracto etanólico de *A. angustifolia* después de 24 h se obtuvo 68.75% de efecto mortal con la concentración de 1000 ppm y a las 72 h se registró 96.25% (Tabla 2) de mortalidad. Con la aplicación de extracto de hexano, se registraron valores de mortalidad de 5 y 10% a las 24 y 48 h con la concentración de 1000 ppm, sin embargo, a las 72 h se registraron valores de 21.25% y 8.75% con las concentraciones de 1000 y 500 ppm. El extracto metanólico a las 24 h tuvo un efecto mortal máximo de 73.75% con la concentración de 1000 ppm, registrando  $LC_{50}$  de 130.82 y  $LC_{90}$  de 2484.77 ppm, mientras que a las 72 h se obtuvieron valores de 96.25% con la concentración de 1000 y 500 ppm.

**Tabla 3.** Concentraciones letales de extractos de *Agave angustifolia* contra larvas de segundo instar de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

Extracto	Especie de mosquito	Días (h)	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
Etanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	583.42 (527.15 - 648.76)	957.15 (865.84 - 1079.51)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	679.82 (585.16 - 808.86)	1492.22 (1265.28 - 1860.38)
Hexano	<i>Ae. aegypti</i>	24	845.14 (768.80 - 921.48)	1202.10 (1083.67 - 1409.36)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	1135.68 (*)	1204.30 (*)
Metanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	348.78 (320.15 - 380.66)	495.23 (454.79 - 550.44)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	130.82 (73.86 - 188.12)	2484.77 (1365.78 - 7629.39)

LC<sub>50</sub>: concentración letal que controla el 50% de la población de mosquitos; LC<sub>90</sub>: concentración letal que controla el 90% de la población de mosquitos; \* Los valores entre paréntesis indican los límites de confianza del 95% inferior y superior; (\*): Sin determinación de LC. No alcanza la convergencia para el criterio de cálculo. Bajo número de iteraciones.

### ***Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito***

La duración del ciclo biológico *Ae. aegypti* fue de 8.55 días considerando la duración larval de 6.50 y la pupal de 2.05, con un ICR de 1.00 en el control sin aplicación de tratamiento. Para las concentraciones evaluadas con el extracto crudo de etanol de *A. angustifolia* de 1000 y 500 ppm no se presentó ICR debido a que 100% de larvas murieron en las primeras 72 h, con el tratamiento de 250 ppm al finalizar el ciclo de vida del insecto se registró un 31.67% de mortalidad e ICR de 0.76 que es significativamente diferente al ser comparado con el control sin aplicación de tratamiento. Así mismo, no se presentaron diferencias significativas en la duración larval y pupal. El tratamiento a base de metanol presentó una prolongación del desarrollo en el periodo de pupa de 2.27 y 2.36 días con las concentraciones de 125 y 62.5 ppm respectivamente e ICR de 1.67 y 1.74 al ser comparadas con el control (1.00). Para el caso de extracto crudo de hexano se presentó un ICR de 0.22 y 0.77 y una

prolongación en el desarrollo del insecto de 9.64 y 9.34 días con las concentraciones de 1000 y 500 ppm, respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4.** Mortalidad total, duración larval y pupal e Índice de Inhibición de Crecimiento de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con extractos de *Agave angustifolia*.

Extracto	Concentración (ppm)	Mortalidad total (%)	Duración		ICR
			Larva*	Pupa**	
Etanol	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	250	31.67 b	6.23 a	2.00 a	0.76 b
	125	0.00 c	6.21 a	2.10 a	0.98 a
	62.5	0.00 c	6.01 a	2.08 a	0.99 a
	Control	0.00 c	6.50 a	2.05 a	1.00 a
Hexano	1000	78.33 a	7.09 b	2.55 a	0.22 a
	500	15.00 b	7.25 ab	2.09 a	0.77 b
	250	0.00 b	7.55 ab	2.01 a	0.89 ab
	125	0.00 b	7.65 a	2.15 a	0.88 ab
	62.5	0.00 b	7.35 ab	2.10 a	0.91 ab
	Control	0.00 b	6.50 c	2.05 a	1.00 a
Metanol	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	250	63.33 b	4.46 c	2.07 a	0.92 b
	125	31.67 c	5.38 b	2.27 a	1.67 a
	62.5	8.33 d	5.00 b	2.36 a	1.74 a
	Control	0.00 d	6.50 a	2.05	1.00 c

Núm.; Número de individuos; II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; \* Periodo de larva a pupa; \*\* Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; (\*): Sin registro o cálculo de datos; Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

La duración total del ciclo de biológico de *Cx quinquefasciatus* en el grupo control fue de 22.1 días (18.83 de larva y 3.27 de pupa). Las larvas tratadas con extracto etanólico de *A. angustifolia*, presentaron 100% de mortalidad en la mayoría de las concentraciones evaluadas, excepto con la concentración de 62.5 ppm que registró 87.50% de mortalidad durante el experimento, por lo que se registró un valor de ICR de 0.22 en comparación con el control (1.00). En las concentraciones de extracto

metanólico se obtuvieron valores superiores al 90% de mortalidad al finalizar el experimento; el ICR para la concentración más baja fue de 0.25 con la duración en el periodo de larva de 16.25 días y 2.87 días para el periodo de pupa. Las concentraciones de 125 y 62.5 ppm mostraron valores de 27.25 y 29.87 para la duración de larva que es mayor que el dato registrado en el control (18.83) (Tabla 5). En nuestro estudio, los extractos evaluados mostraron valores de ICR mas bajos en comparación con el control, lo que indica que los individuos permanecieron inmaduros (Zhang et al. 1993.).

**Tabla 5.** Mortalidad total, duración larval y pupal e Índice de Inhibición de Crecimiento de larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos de *Agave angustifolia*.

Extracto	Concentración (ppm)	Mortalidad total (%) / Error estándar	Duración		ICR
			Larva*	Pupa**	
Etanol	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	250	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	125	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	62.5	87.50 b	18.31 a	3.67 a	0.22 b
	Control	0.00 c	18.83 a	3.27 a	1.00 a
Hexano	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	250	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	125	93.75 a	27.25 a	2.87 a	0.47 c
	62.5	41.25 b	29.87 a	3.46 a	0.67 b
	Control	0.00 c	18.83 b	3.27 a	1.00 a
Metanol	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	250	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	125	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	62.5	93.75 b	16.25 a	2.33 a	0.25 b
	Control	0.00 c	18.83 a	3.27 a	1.00 a

Núm.; Número de individuos; II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; \* Periodo de larva a pupa; \*\* Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; (\*): Sin registro o cálculo de datos; Las medias seguidas por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

## DISCUSIÓN

Las plantas del genero *Agave* son fuente potencial de compuestos bioactivos. Estudios previos con *A. angustifolia* han demostrado la presencia de triterpenos y cumarinas volátiles en el extracto de etanol obtenido de hojas (Ahumada- Santos et al., 2013) y en el extracto acuoso de hojas Kajla et al. (2016) determinaron la presencia de alcaloides, fenoles, esteroides, flobataninos, flavonoides y saponinas. En *A. sisalana* se han realizado diferentes estudios que incluyen tamizaje fitoquimico, Jajere et al. (2016) reportaron la presencia de alcaloides, flavonoides y saponinas en el extracto de metanol de hojas, mientras que Ade-Ajayi et al. (2011) informan la presencia de saponinas, glucósidos, terpenoides, taninos, flavonoides y glucósidos cardíacos en el extracto acuoso del jugo, en contraste, Hammuel et al. (2011) reveló la presencia de saponinas, esteroides, taninos, flavonoides y glucósidos cardíacos en el extracto de metanol de hojas. Ahumada-Santos et al. (2013) informaron la presencia de flavonoides, taninos y saponinas en el extracto de cloroformo de *A. ornithobroma*. En nuestro estudio, se observó la presencia de la mayoría de los metabolitos secundarios previamente reportados en diferentes especies de *Agave*.

El extracto de metanol demostró tener efectos letales sobre las larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. Kajla et al. (2016) realizaron el único reporte de actividad larvicida de extractos de *A. angustifolia* sobre larvas de mosquito; informan que el extracto de acetona, etanol y hexano controló más del 80% de la población de larvas de

*Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* después de 24 h de exposición a una concentración de 100 ppm. Singh et al. (2014) reportaron que las larvas de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi* (*An. stephensi*) tratadas con extracto de metanol de *A. sisalana* obtuvieron LC50 de 220, 82 y 36 ppm respectivamente, resultados que son similares a los que se informan en nuestro estudio para el caso de *Cx. quinquefasciatus*. Pizarro et al. (1999) informaron que el extracto acuoso de *A. sisalana* eliminó el 50% de la población de larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con concentraciones de 322 y 183 ppm respectivamente. Las concentraciones reportadas, en comparación con el tratamiento en el que se sometieron las larvas de *Ae. aegypti* a extracto de metanol son menores a las informadas en este estudio, mientras que la concentración para *Cx. quinquefasciatus* es mayor. Sin embargo, Nunes et al. (2004) reportaron que los desechos líquidos disueltos en agua de la misma especie de Agave controlaron el 100% de la población de *Ae. aegypti* con una concentración de 20 mg/mL y una LC<sub>50</sub> de 5.9 mg/mL después de 24 h de exposición al tratamiento; que son concentraciones muy altas en comparación con las que reportadas en nuestro estudio. Por otra parte, Guimarães de Oliveira et al. (2016) determinó que el extracto crudo de *A. sisalana* presenta efectos citotóxicos contra *Ae. aegypti*.

Las plantas poseen metabolitos secundarios que contribuyen a la inhibición de crecimiento de diferentes especies de insectos. Granados-Echegoyen et al. (2014) evaluaron la aplicación de extractos de etanol y metanol de hojas de *Pseudocalymma*

*alliaceum* al 10% sobre larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* y reportaron ICR de 0.70 y 0.76 respectivamente, que son mayores a los que obtuvieron en nuestro estudio para la misma especie de mosquito, sin embargo son inferiores a los datos obtenidos para *Ae. aegypti*. La duración de larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extracto de metanol de semillas de *Ricinus communis* a una concentración de 162.5 ppm disminuyen el periodo larval (Martinez-Tomás et al. 2018), resultado similar al que obtuvimos en nuestro estudio con larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extractos de metanol y etanol. Por el contrario, Daniel et al. (1995) informó que los extractos de *Acalypha indica* aumentan en el periodo de larvas y pupas de *Cx. quinquefasciatus*, resultado similar al obtenido en nuestro estudio con las larvas de *Ae. aegypti* tratadas con extracto de hexano, sin embargo la ventaja de que las etapas de desarrollo se prolonguen es que el número de larvas se reduce debido al período más largo necesario para que una nueva generación complete el ciclo de vida.

Las variaciones de la actividad larvicida e inhibición de crecimiento de los extractos de plantas dependen de la polaridad del disolvente utilizado en el proceso de extracción de los compuestos bioactivos (Ghosh et al., 2012). En nuestro estudio los extractos crudos de *A. angustifolia* obtenidos con solventes de diferente polaridad (etanol, metanol y hexano), el efecto larvicida es mayor contra larvas de *Cx. quinquefasciatus* que contra larvas de *Ae. aegypti*.

Los extractos de Agave han sido estudiados por la presencia de metabolitos secundarios útiles. Herbert-Doctor et al. (2016) informaron que el extracto de hexano al 4% de hojas de *A. tequilana* presentaron 100% de mortalidad contra *Bemisia tabaci*, mientras que la aplicación de extracto de acetato de etilo al 0.4% eliminó el 100% de la población del nematodo *Panagrellus redivivus*. Otro estudio mostró que el extracto acuoso y etil acetato de residuos frescos de *A. sisalana* inhibieron el 100% la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de cabras con concentraciones de 10 y 0.32 mg/mL, respectivamente (Botura et al., 2013). Ahumada-Santos et al. (2013) informaron que el extracto de metanol de las hojas de *A. angustifolia* tenía un efecto inhibitorio contra la bacteria *Streptococcus* grupo A-4 y también reportaron que el mismo extracto posee actividad antioxidante. Allsopp et al. (2013) informaron que los fructanos aislados de jugo de *A. angustifolia* mostraron actividad prebiótica y ayudaron al tratamiento del cáncer de colon en un modelo artificial. El extracto de metanol y acuoso obtenido a partir de jugo *A. sisalana* tiene un efecto inhibitorio y bactericida contra *Shigella dysenteriae*, *Bacillus atrophaeus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Ade-Ajayi et al., 2011). El extracto de metanol de hojas de *A. attenuata* mostró fuerte actividad inhibitoria contra *Aspergillus flavus* y *Alternaria alternata*, mientras que el extracto de *n*-hexano mostró efecto inhibitorio contra *Pasturella multocida* (Rizwan et al., 2012).

## CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que los metabolitos secundarios que contienen los extractos de etanol y metanol de hojas de *A. angustifolia* muestran efectos larvicidas y/o larvostáticos sobre *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, lo que sugiere que son una alternativa que se pueden integrar en una estrategia para el control de las poblaciones de estos dípteros. El tamizaje fitoquímico permitió identificar los compuestos bioactivos que ejercen acción sobre las fases acuáticas del insecto, sin embargo, es necesario realizar la purificar, identificar y caracterizar los componentes activos responsables de la muerte e inhibición de crecimiento y desarrollo de los mosquitos.

## LITERATURA CITADA

Ade-Ajayi, A. F., Hammuel, C., Ezeayanaso, C., Ogabiela, E. E., Udiba, U. U., Anyim, B., & Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7), 180–183. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/JECE/article-abstract/5B7D3571875>

Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M. de J., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J. A., Heredia, J. B., Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 49, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.050>

Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2018). Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and *Bancroftian filariasis* vector, *Culex quinquefasciatus*. *South African Journal of Botany*, 114, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.018>

Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I. S., Gill, C., & Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, 22, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.006>

Baskar, K., Sudha, V., Nattudurai, G., Ignacimuthu, S., Duraipandiyan, V., Jayakumar, Al-Dhabi, N. A. M. & Benelli, G. (2017). Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target zebra fish. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.03.002>

Benelli, G., Caselli, A., & Canale, A. (2017a). Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints Nanoparticles for mosquito control. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.006>

Benelli, G., Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S. & Khaled, J. M. (2017b). Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitology Research*, 116(4), 1175–1188. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5395-0>

Botura, M. B., dos Santos, J. D. G., da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Oliveira, J. V. A., de Almeida, M. A. O., Batatinha, M. J. M. & Branco, A. (2013). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.012>

Chimal-Sánchez, E., I. Reyes Jaramillo, J. Y. Salmerón-Castro, N. Vázquez-Pérez L. & Varela-Fregoso. (2018). Cuatro nuevos registros de hongos micorrizógenos arbusculares (Glomeromycota) asociados con *Agave karwinskii* y *A. angustifolia* (Agavaceae) de Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* 125.

Daniel T., Umarani S. & Sakthivadivel M. (1995) Insecticidal action of *Ervatamia divaricata* L. and *Acalypha indica* L. against *Culex quinquefasciatus* Say. *Geobios New Rep* 14(2):95–98

Das, D., & Chandra, G. (2012). Mosquito larvicidal activity of *Rauvolfia serpentina* L. seeds against *Culex quinquefasciatus* Say. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(1), 42–45. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60243-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60243-5)

Dharmshaktu, N. S., Prabhakaran, P. K., & Menon, P. K. M. (1987). Laboratory study on the mosquito larvicidal properties of leaf and seed extract of the plant *Agave americana*. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 79–82.

García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87., 14–23.

Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 581–598.

Govindarajan, M., & Karuppanan, P. (2011). Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes*

*aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(1), 24–28.  
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60026-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60026-6)

Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., & Anandan, A. (2011). Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 109(2), 353–367. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2263-1>

Govindarajan, M., & Sivakumar, R. (2014). Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(2), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3709-4>

Govindarajan, M., Sivakumar, R., Amsath, A., & Niraimathi, S. (2011). Mosquito larvicidal properties of *Ficus benghalensis* L. (Family: Moraceae) against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(7), 505–509. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60135-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60135-1)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., & Rojas-Olivos, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill

(Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(6), 463–467. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60816-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60816-7)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernandez, N., & Gato-Armas, R. (2014). Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594–601. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)

Guimarães de Oliveira, L. H., Alexandria Paiva Silva de Sousa, P., Felipe Hilario, F., Joventino Nascimento, G., Morais, J. P. S., Paulo de Medeiros, E., Francisco de Sousa, M. & da Cruz Nunes, F. (2016). *Agave sisalana* extract induces cell death in *Aedes aegypti* hemocytes increasing nitric oxide production. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 396–399. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.018>

Hammuel, C., Yebpella, G. G., Shallangwa, G. A., Magomya, A. M., & Agbaji, A. S. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68(4), 535–539.

Herbert-Doctor, L. A., Saavedra-Aguilar, M., Villarreal, M. L., Cardoso-Taketa, A., & Vite-Vallejo, O. (2016). Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice

against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. *Southwestern Entomologist*, 41(1), 27-40.  
<https://doi.org/10.3958/059.041.0105>

Hong, T. kyun, Perumalsamy, H., Jang, K. H., Na, E. S., & Ahn, Y. J. (2018). Ovicidal and larvicidal activity and possible mode of action of phenylpropanoids and ketone identified in *Syzygium aromaticum* bud against *Bradysia procera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 145(October 2017), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.01.003>

Jajere, U. M., Hammuel, C., Mohammed, M., Okibe, P. O., Ali, E. O., & Abubakar, A. (2016). Phytochemical and Toxicological Studies of Methanol Extract of *Agave Sisalana* (Agaveceae ), 5(6), 132–142. <https://doi.org/10.20959/wjpps20166-6186>

Kajla, M., Bhattacharya, K., Gupta, K., Banerjee, U., Kakani, P., Gupta, L., & Kumar, S. (2016). Identification of the Temperature Induced Larvicidal Efficacy of *Agave angustifolia* against *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* Larvae. *Frontiers in Public Health*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00286>

López-Romero, J. C., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., Peña-Ramos, E. A., & González-Ríos, H. (2018). Biological activities of *Agave* by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2461–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8738>

Macedo, A. L., Duprat, R. C., Moreira, D. de L., Kaplan, M. A. C., Vasconcelos, T. R. A., Pinto, L. C., Montenegro, R. C., Ratcliffe, N. A., Mello, C. B. & Valverde, A. L. (2017).

Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). *Natural Product Research*, 6419(September), 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1374265>

Martinez-Tomás, S. H. , Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. de J. R., & López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 221–238. <https://doi.org/10.3958/059.043.0114>

Minitab Inc., 2017. Base Minitab software, versión 18.1. USA.

Nunes, F., Leite, J., Oliveira H. G. L., Sousa, A. P. S. P., Menezes, M. C., Moraes, J. P. S., Mascarenhas, S. R. & Braga, V. (2014). The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitology Research*, 114 (2), 543–549.

Pascual, M. E., Carretero, M. E., Slowing, K. V., & Villar, A. (2008). Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. *Pharmaceutical Biology*, 40 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.2.139.5849>

Pérez del Río, R., Caballero Caballero, M., Hernández Gómez, L. H., & Bernabé Montes, J. L. (2013). Diseño y construcción de una desfibradora de hojas de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Ciencias Técnica Agropecuarias*, 22(4), 5–14.

Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. y G. Ramírez V. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 141-152.

Pizarro, A. P. B., M Oliveira Filho, A., P Parente, J., Melo, M. T. V, dos Santos, C., & R Lima, P. (1999). Utilization of the waste of sisal industry in the control of mosquito larvae. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 23–29.

Rahuman, A. A., & Venkatesan, P. (2008). Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research*, 103(1), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0940-5>

Rajesh, K., Dhanasekaran, D., & Tyagi, B. K. (2015). Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.08.001>

Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>

Rawani, A., Haldar, K. M., Ghosh, A., & Chandra, G. (2009). Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105(5), 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1573-z>

Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *agave attenuata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6440–6451. <https://doi.org/10.3390/ijms13056440>

Rojas-Olivos, A., Solano-gómez, R., & Granados-echegoyen, C. (2018). Major Article Larvicidal effect of *Clinopodium macrostemum* essential oil extracted by microwave-assisted hydrodistillation against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), 51(3), 291–296. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0284-2017>

Singh, R. K., Mittal, P. K., Kumar, G., & Dhiman, R. C. (2014). Evaluation of mosquito larvicidal efficacy of leaf extract of a cactus plant, *Agave sisalana*. *Journal Entomology and Zoology Studies*, 2, 83-6.

Subarani, S., Sabhanayakam, S., Kamaraj, C., Elango, G., & Kadir, M. A. (2013). Efficacy of larvicidal and pupicidal activity of *Catharanthus roseus* aqueous and solvent extracts against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 625–630. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60107-8)

WHO (World Health Organization). (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>

Zhang, M., Chaudhuri, S. K., & Kubo, I. (1993). Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *Journal of Chemical Ecology*, 19(6), 1109–1118. <https://doi.org/10.1007/BF00987372>

## **Primer reporte de actividad larvicida e inhibición de crecimiento de larvas de mosquitos vectores de enfermedades con extractos de *Agave karwinskii* (Asparagaceae: Agavoideae).**

First report of larvicidal activity and growth inhibition of mosquito larvae disease vectors with extracts of *Agave karwinskii* (Asparagaceae: Agavoideae).

### **RESUMEN**

*Aedes aegypti* Linn. y *Culex quinquefasciatus* Say. son mosquitos con distribución global, con mayor presencia en zonas tropicales y subtropicales, vectores de diversas enfermedades como dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla y filariasis linfática. *Agave karwinskii* Zucc. se utiliza para la elaboración de mezcal y durante su cosecha las hojas son abandonadas en campo para su degradación, sin embargo, este órgano vegetativo posee metabolitos secundarios con potencial como agente de control de insectos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto larvicida de mosquitos con extracto etanólico de hojas de *A. karwinskii*. El extracto de hojas se obtuvo mediante un proceso de maceración y se realizó un análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina. Se evaluaron grupos de 20 larvas colocadas en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada y 1 mL de cada una de las concentraciones, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Las larvas se monitorearon diariamente hasta que se observó la emergencia del 98% en el control. Los resultados de la cromatografía de capa fina demuestran la presencia de alcaloides, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides. El efecto larvicida mayor al 60% en ambas especies

de mosquitos con la aplicación de la concentración de 1250 ppm después de 24 h, apreciando una reducción proporcional sobre el efecto al disminuir las concentraciones. Con la aplicación del extracto de hexano sobre larvas de *Ae. aegypti* no se presentaron diferencias significativas en el índice de inhibición de crecimiento entre los tratamientos. Las larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con concentraciones entre 1250 y 156 ppm de extracto etanólico presentaron 100% de mortalidad al final del experimento. Con la aplicación de los extractos de hexano y metanol, se aceleró el crecimiento de las larvas de *Cx. quinquefasciatus* en comparación con el control. El extracto de etanol de *A. karwinskii* posee potencial para ser incluido dentro de una estrategia de manejo integrado para reducir las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades.

***Palaras clave:*** extractos botánicos, mortalidad, mosquitos, análisis fitoquímico.

## **ABSTRACT**

*Aedes aegypti* Linn. and *Culex quinquefasciatus* Say. are mosquitoes with global distribution, with major presence in tropical and subtropical zones, vectors of diverse illnesses like fastidiousness, zika, chikungunya, yellow fever and filariasis lymphatic. *Agave karwinskii* Zucc. is used for the tequila making and during its harvest the sheets are left in field for its degradation, nevertheless, this vegetative organ it possesses metabolites secondary with potential like agent of control of insects. The target of this study was to evaluate the effect larvicida of mosquitoes with extract etanólico of sheets

of *A. karwinskii*. The sheets extract was obtained by means of a maceration process and an analysis was realized phytochemical by chromatography of thin layer. There were evaluated groups of 20 larvae placed in glasses of plastic with 100 ml of distilled water and 1 ml of each of the concentrations, an experimental design was used completely at random with three repetitions. The larvae monitored every day until there was observed the emergency of 98% in the control. The results of the chromatography of thin layer demonstrate the presence of alkaloids, anthraquinones, flavonoids, tannins and terpenoids. The effect larvicidal bigger than 60% in both mosquitoes species with the application of the concentration of 1250 ppm after 24 h, appreciating a proportional reduction on the effect on having diminished the concentrations. After 72 h, there were eliminated 100 % of larvae of *Cx quinquefasciatus* submitted to concentrations between 1250 and 156.2 ppm. With the application of the extract of hexane on *Ae. aegypti* larvae significant differences did not appear in the index of inhibition of growth between the treatments. The larvae of *Cx. quinquefasciatus* treated with concentrations between 1250 and 156 ppm of extract ethanolic presented 100 % of mortality at the end of the experiment. With the application of the extracts of hexane and methanol, I hasten the growth of the larvae of *Cx. quinquefasciatus* compared to the control. The extract of ethanol of *A. karwinskii* possesses potential to be included inside a handling strategy integrated to reduce the mosquitoes populations illnesses vectors.

**Key Words:** botanical extracts, mortality, mosquitoes, analysis phytochemical.

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) son los organismos que causan el mayor sufrimiento y la muerte de millones de personas y animales alrededor del mundo (Benelli, 2016). Estos culícidos transmiten patógenos y parásitos que causan enfermedades importantes como la malaria, dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla, filariasis, encefalitis japonesa y virus del Nilo Occidental (Benelli et al., 2017a; Granados-Echegoyen et al., 2018)

*Aedes aegypti* Linnaeus (*Ae. aegypti*) es vector de diferentes enfermedades entre las que destaca el dengue, fiebre amarilla, chikungunya y zika. El dengue se ha convertido en un importante problema de salud y prevalece en más de 100 países y amenaza la salud de aproximadamente 2,500 millones de personas, mientras que alrededor de 80 millones de personas se infectan anualmente con una tasa de ataque del 4% en todo el mundo (Govindarajan & Sivakumar, 2014; Reegan et al., 2014). *Culex quinquefasciatus* Say (*Cx. quinquefasciatus*) es vector del nematodo *Wuchereria bancrofti* responsable de la filariasis linfática que mantiene 120 millones de personas infectadas y 44 millones con manifestaciones crónicas en todo el mundo. También es vector de enfermedades arbovirales importantes y peligrosas, incluido el virus del Nilo Occidental y la encefalitis japonesa (Subarani et al., 2013; Benelli et al., 2017b).

Las estrategias de control de las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades se basan en uso prolongado e irracional de pesticidas químicos sintéticos que generan

implicaciones negativas, entre las que se incluye el desarrollo de resistencia, toxicidad en organismos no objetivo, desestabilización de la salud humana y contaminación del ambiente (Rawani et al., 2009; Govindarajan et al., 2011; Das & Chandra, 2012). La etapa de desarrollo de los insectos es importante para seleccionar adecuadamente la estrategia de control. Las investigaciones que se han llevado a cabo para evaluar la efectividad de productos naturales obtenidos de plantas (Govindarajan & Sivakumar, 2014; Kovendan et al., 2014; Munusamy et al., 2016; Mathalaimuthu et al., 2017), se realizan contra una etapa particular del mosquito (huevos, larvas de I, II, III, IV instar, fase de pupa o adulto), sin embargo, para determinar la influencia de los productos naturales en el ciclo de vida del mosquito de los productos naturales es necesario realizar estudios que incluyan la duración de las fases de larva a pupa y la fase de pupa a adulto, así como la inhibición de crecimiento y desarrollo de los mosquitos después de la exposición (Granados-Echegoyem et al., 2018).

El género *Agave* pertenece a la familia Asparagaceae, que es endémica del continente americano y se encuentra integrada por nueve géneros y aproximadamente 330 especies distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Venezuela; se han descrito. El género *Agave* tiene más de 275 especies y el 75% de estas se encuentra presente en México con un alto grado de endemismo (García-Mendoza, 2007). Los Agaves poseen importancia económica y cultural por sus diversos usos en la medicina tradicional (anti-inflamatorios, anti-diarreicos, anti-virales, hepatoprotectores y anti-

cancerígenos) (Mathalaimuthu et al., 2017), como fuente de comida, fibra y bebidas alcohólicas (Vargas-Ponce, et al., 2009; Kajla, et al., 2016). *Agave karwinskii* Zucc. (*A. karwinskii*) es una planta que se caracteriza por tener un tallo caulinar. En Oaxaca, México dependiendo del lugar donde crece, es conocida por varios nombres comunes, incluyendo cuishe, san martín y tobasiche, en los Valles Centrales; mientras que bicuishe y madrequishe en la Sierra Sur de Oaxaca (Chimal-Sánchez et al., 2018). El tallo, que representa el 45% de la planta de *A. karwinskii* se utiliza para elaboración de la bebida artesanal denominada mezcal y las hojas (55% de la planta) son abandonadas en campo para su degradación, sin embargo, las hojas poseen propiedades bioactivas que sugieren un uso potencial alternativo como agente de control de insectos (Pérez del Río et al., 2013; López-Romero et al., 2018). Por esta razón el objetivo del estudio fue evaluar el efecto tóxico de extractos obtenidos de hojas de *A. karwinskii* contra larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Obtención de material biológico***

#### ***Cría de mosquitos***

Se colectaron huevos, larvas y pupas de *Ae. aegypti* en agua sucia acumulada en la Ciudad de Campeche, México (19°49'36.7"N 90°33'15.6"W) y de *Cx. quinquefasciatus* en agua sucia acumulada de floreros del cementerio municipal de Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México (16°47'32.4"N 96°40'50.2"W). Los huevos de ambas especies se

trasladaron al laboratorio y se colocaron en bandejas de plástico (47 x 35 x 12 cm) con 300 mL de agua para su eclosión. Las larvas se alimentaron con alimento molido para peces tilapia (Api-tilapia nivel 1®) hasta que alcanzaron la fase pupal. Las pupas se transfirieron a recipientes (30 x 20 x 6 cm) con 300 mL de agua y se introdujeron en jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos machos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y semanalmente se introdujo un conejo (*Oryctolagus cuniculatus*) inmovilizado por una noche como material hematofágico para las hembras. La cría se mantuvo en laboratorio a 27±2 °C, 60-70 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad (Pérez-Pacheco et al., 2004; Rahuman & Venkatesan, 2008; Granados-Echegoyen et al., 2015).

### ***Colecta de plantas y preparación de extractos***

Las hojas frescas de *A. karwinskii* de cinco años de edad se recolectaron de campos agrícolas en la comunidad de Santa Ana Zegache, Oaxaca, México (16°50'04.7" N, 96°43'53.5" W). Las hojas se lavaron con agua de grifo para eliminar las partículas de polvo y se secaron completamente a la sombra con temperatura ambiente (26±2 °C) durante aproximadamente 50 días. Las hojas secas de la planta se cortaron en partes de 10 x 2 cm y se pulverizaron con un molino eléctrico de cuchillos universal (Fritsh, Pulverisette 19) con una malla de 1 mm. (Granados-Echegoyen et al., 2014).

Los extractos de etanol (EtOH), metanol (CH<sub>3</sub>OH) y hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) se prepararon poniendo 100 g polvo de hojas en un matraz con 250 mL de cada disolvente, agitando

y dejando reposar durante 72 h (maceración). La solución se filtró con papel Whatman N° 1 y el disolvente se evaporó completamente a presión reducida en un evaporador rotatorio (Buchi B-490) para obtener los extractos crudos. Las hojas de *A. karwinskii* y se autenticaron por el Dr. Carlos Granados-Echegoyen; un ejemplar de la colecta fue depositado en el herbario del CIIDIR – Oaxaca. Los extractos se almacenaron a  $4\pm 1$  °C (Mabe RMF0260XMXX2) hasta su uso (Granados-Echegoyen et al., 2018)

### ***Preparación de concentraciones para bioensayos***

Del extracto de etanol se tomó 1.25 g y se solubilizo en 11 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.7% como agente emulsificante para obtener la concentración inicial de aplicación de 125000 ppm, posteriormente por dilución volumétrica en serie se prepararon las concentraciones de aplicación (62500, 31250 15625y 7812.5 ppm). De los extractos de metanol y hexano se tomaron 2 g y se solubilizaron en 11 mL de DMSO para obtener la concentración inicial de aplicación de 200000 ppm y por disolución volumétrica en serie se obtuvieron las concentraciones subsecuentes (WHO, 2005). Para cada tratamiento se seleccionaron grupos de 20 larvas y se colocaron en vasos de plástico con 100 mL de agua destilada y 1 mL de las concentraciones de aplicación; las concentraciones finales a las que sometieron las larvas con extracto de etanol fueron de 1250, 625, 312.5, 156.2 y 78.5 ppm, mientras que las concentraciones finales utilizadas para los extractos de metanol y hexano fueron fueron de 2000, 1000, 500, 250 y 125 ppm.

### *Análisis fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC)*

Los extractos evaluados se analizaron para detectar la presencia de alcaloides, cumarinas, antroquinonas, flavonoides, taninos y terpenoides tal como lo describen Pascual et al. (2008).

Los alcaloides se detectaron pulverizando el reactivo de Dragendorff sobre la placa seca de TLC. La aparición de manchas color anaranjado indicaron la presencia de alcaloides.

La presencia de cumarinas y antroquinonas se realizó usando solución de Bornträger (hidróxido de potasio (KOH) en EtOH al 5%); al cromatograma se le pulverizó la solución y se detectaron cumarinas por la formación de una fluorescencia azul a 365 nm; las antroquinonas se detectaron por la aparición de color rojo.

Los flavonoides se detectaron pulverizando sobre el cromatograma difenilboriloxietilamina (NP) con CH<sub>3</sub>OH al 1%, seguido de polietilenglicol (PEG) con EtOH al 5%; un color amarillo intenso, rojo, azul o verde fluorescente a 365 nm de UV indicó la presencia de flavonoides.

La presencia de taninos se demostró por la presencia de zonas oscuras (azul-negro) en las placas de TLC al aplicar cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 3%.

Para demostrar la presencia de terpenoides, se usó el reactivo de Godin; se pulverizó sobre el cromatograma una solución de vainillina en EtOH al 1% mezclada

(1:1) (volumen:volumen) (v:v) con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 3% en agua, luego se pulverizó una solución al 10% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en EtOH. La placa se calentó a 105 °C por 3 min, la aparición de color rojo o azul mostró la presencia de terpenos.

El volumen de las manchas aplicadas en las placas cromatografías fue de 10  $\mu\text{L}$ . Se desarrollaron placas de TLC de extractos etanólico, metanólico y hexánico de *A. karwinskii* en sistemas de disolventes tolueno-acetona (SI) (80:20) (v/v) y tolueno-cloroformo-acetona (SII) (40:25:35) (v:v:v). Los cromatogramas se observaron primero sin tratamiento químico bajo luz ultravioleta de 365 nm y luego usando los reactivos de pulverización.

#### ***Bioensayos de actividad larvicida e inhibición de crecimiento en condiciones de laboratorio***

Los bioensayos de actividad larvicida se realizaron de acuerdo con los Procedimientos Estándar de la Organización Mundial de la Salud (2015). La mortalidad de los extractos evaluados se determinó durante tres días (24, 48 y 72 h) después de la aplicación de los tratamientos. Se siguió realizando un seguimiento de los insectos durante 20 días para *Ae. aegypti* y 26 días para *Cx. quinquefasciatus* para observar las diferentes etapas de desarrollo (segundo, tercero, cuarto instar, pupas y adultos). Las larvas y pupas muertas se contaron y eliminaron diariamente en cada etapa de desarrollo. La mortalidad se evaluó utilizando dos criterios: 1) cuando una larva no mostró movimientos similares a los exhibidos por el grupo de control; 2) cuando la

larva no mostro ninguna reacción al momento de ser alterada en el sifón y su región cervical. Cada tratamiento fue replicado cuatro veces (Granados-Echegoyen et al., 2015; Martínez-Tomás et al., 2018). Con la información recopilada se calculó el Índice de Inhibición de Crecimiento (IIC) usando la siguiente fórmula (Zhang et al., 1993):

$$IIC = \frac{\sum_1^4(\text{No. de insectos vivos} * \text{fase insecto}) + \sum_1^4[\text{No. de insectos muertos} * (\text{fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} * \text{total de fases del insecto})}$$

Donde 1, 2, 3 y 4 representan la fase de insecto de 2°, 3°, 4° instar y pupas formadas respectivamente. Se usaron 60 insectos para cada tratamiento y el número total de etapas del insecto fueron cuatro (tres larvas y pupa). El Índice de Crecimiento Relativo (ICR) se determinó mediante la fórmula:  $ICR = IIC \text{ tratamiento} / IIC \text{ control sin aplicación}$ .

#### *Duración larval y pupal en condiciones de laboratorio*

Para calcular la duración de las fases de larva y pupa siguió la metodología de Granados-Echegoyen et al. (2018), en la que menciona que se multiplica el porcentaje de pupas y adultos desarrollados por el número de días en que se desarrollaron en cada repetición. Estos valores se agregaron y el total se dividió por el porcentaje total de pupas y adultos desarrollados, mientras que la viabilidad larvaria y pupal se estimó contando el número de individuos que se convirtieron en pupas y adultos, expresado como un porcentaje con respecto al número inicial de individuos tratados.

### *Análisis estadístico*

Los bioensayos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza para identificar diferencias significativas y prueba de Tukey para separar las medias con  $p < 0.05$  y comparar el efecto de las diferentes concentraciones en cada etapa de desarrollo. El efecto mortal (%) durante los primeros tres días fue sometido a un análisis de Probit para calcular las concentraciones letales ( $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ ) y otros valores estadísticos con límite de confianza de 95%. El análisis se realizó utilizando el software Minitab v18.1 (Minitab, Inc. 2017).

## RESULTADOS

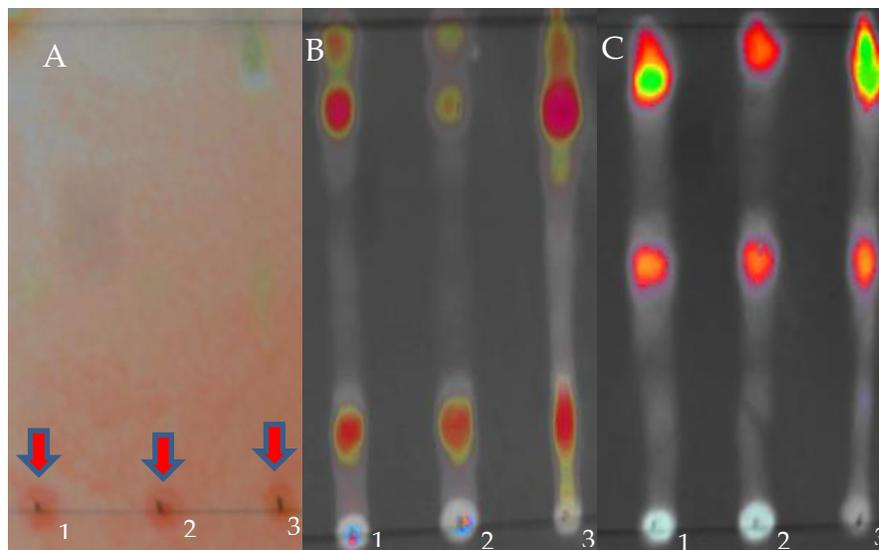
### *Tamizaje fitoquímico y análisis de TLC*

El tamizaje fitoquímico cualitativo en los dos sistemas de disolventes mostró que en todos los extractos estaban presentes las antroquinonas, flavonoides y terpenoides. En el sistema de disolventes I, se encontraron taninos en el extracto de hexano, mientras que en el sistema II se registraron en los tres extractos (Tabla 1). Las placas de TLC mostraron manchas naranjas características para alcaloides en los tres extractos analizados bajo el sistema de disolventes II (SII) (Fig. 1). En el caso de los alcaloides, se observaron manchas anaranjadas en el sitio de aplicación de la muestra, posiblemente indicando alcaloides de mayor polaridad. Los flavonoides en ambos sistemas presentaron patrones similares, sin embargo, en el sistema de disolventes I se observaron manchas rojas con verde fluorescente muy débil, mientras que las placas tratadas con el sistema de disolventes II, las manchas se observan con un color verde fluorescente más intenso.

**Tabla 1.** Componentes fitoquímicos de diferentes extractos crudos de *Agave karwinskii*.

Metabolitos	SI			SII		
	E	H	M	E	H	M
Alcaloides	-	-	-	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Antroquinonas	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	+	-	+	+	+
Terpenoides	+	+	+	+	+	+

SI: Tolueno-acetona; SII: cloroformo-tolueno-acetona; E: Etanólico; H: Hexánico; M: Metanólico; NP: Productos naturales; PEG: Polietilenglicol.



**Figura 1.** Perfil químico de TLC de extractos de etanol (1), metanol (2) y hexano (3) de *A. karwinskii*. Manchas de TLC reveladas con reactivo de Dragendorff (alcaloides) en A); reactivo para productos naturales (flavonoides) en B) con sistema de disolventes I y C) con sistema de disolventes II en UV (365 nm).

#### *Actividad larvícida*

Las larvas de segundo instar de *Ae. aegypti* sometidas a extractos etanólicos de *A. karwinskii* registraron valores de 61.67% y 71.67% después de 24 y 72 h de la aplicación del tratamiento con concentración (Tabla 2). Con las concentraciones evaluadas de extracto de hexano no se registraron datos de mortalidad durante los tres primeros días. Con extracto metanólico se obtuvo 83.33% de mortalidad 72 h después de la aplicación del tratamiento. Las  $LC_{90}$  para *Ae. aegypti* fueron mayores la concentración más alta empleada con los extractos de etanol y metanol, mientras que la  $LC_{50}$  fue menor con el extracto de etanol y de metanol. Para el extracto de hexano no se calcularon las dosis letales, debido a que no se presentó mortalidad de larvas durante las primeras 24 h después de la aplicación del tratamiento. La  $LC_{50}$  en larvas de *Cx.*

*quinquefasciatus* fueron mayores a la concentración más alta en los tratamientos con extracto de hexano y metanol y fueron menores con la aplicación de extracto de etanol.

**Tabla 2.** Mortalidad durante los primeros tres días (24, 48 y 72 h) de larvas de mosquito *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos de *Agave karwinskii*.

Extracto	Especie de mosquito	Días (h)	Concentración (ppm) / Medias (%)					
			1250	625	312.5	156.25	78.12	Control
Etanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	61.67 a	25.00 b	11.67 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		48	68.33 a	40.00 b	15.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		72	71.67 a	41.67 b	15.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	92.50 a	48.75 b	37.50 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		48	100.00 a	95.00 a	91.25 a	15.00 b	7.50 bc	0.00 c
		72	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a	73.75 b	0.00 c
			2000	1000	500	250	125	Control
Hexano	<i>Ae. aegypti</i>	24	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
		48	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
		72	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	31.25 a	31.25 a	12.50 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
		48	53.75 a	50.00 a	25.00 b	3.75 c	0.00 c	0.00 c
		72	68.75 a	66.25 a	42.50 b	13.75 c	10.00	0.00 c
Metanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	68.33 a	56.67 a	13.33 b	0.00 b	0.00 b	0.00 b
		48	80.00 a	56.67 b	15.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
		72	83.33 a	56.67 b	15.00 c	0.00 d	0.00 d	0.00 d
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	22.50 a	13.75 b	13.75 b	0.00 c	0.00 c	0.00 c
		48	88.75 a	45.00 b	32.50 c	16.25 d	8.75 d	0.00 e
		72	100.00 a	100.00 a	95.00 a	75.00 b	52.50 c	0.00 d

Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

**Tabla 3.** Concentraciones letales y análisis de regresión de larvas de segundo instar tardío de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* tratadas con extractos de *Agave karwinskii*.

Extracto	Especie de mosquito	Días (h)	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
Etanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	1026.43 (889.33 - 1212.58)	1979.61 (1600.23 - 2757.32)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	580.70 (517.10 - 646.47)	1152.53 (1015.51 - 1348.34)
Hexano	<i>Ae. aegypti</i>	24	(*)	(*)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	2335.77 (1987.92 - 2931.67)	4033.66 (3326.43 - 5321.75)
Metanol	<i>Ae. aegypti</i>	24	1263.35 (1095.23 - 1456.08)	2650.71 (2206.65 - 3424.91)
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	3046.23 (2439.32 - 4373.52)	5124.80 (3957.01 - 7775.11)

LC<sub>50</sub>: concentración letal que controla el 50% de la población de mosquitos; LC<sub>90</sub>: concentración letal que controla el 90% de la población de mosquitos; \* Los valores entre paréntesis indican los límites de confianza del 95% inferior y superior; (\*): Sin determinación de LC. No alcanza la convergencia para el criterio de cálculo. Bajo número de iteraciones.

Las larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extractos etanólicos de *A. karwinskii* se observó 100% de mortalidad a las 48 h (Tabla 2). Con el extracto hexánico se obtuvieron valores máximos de actividad larvicida de 53.75% y 68.75% a las 48 y 72 h, respectivamente. Con extractos a base de metanol registraron 100% de mortalidad 72 h después de la exposición con LC<sub>50</sub> de 72.52 y LC<sub>90</sub> de 979.16 ppm.

### ***Inhibición del crecimiento y efectos parciales sobre larvas de mosquito***

El índice de inhibición del crecimiento (IIC) permite observar una reducción en el tiempo del desarrollo de las fases del insecto. Las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a una concentración de 125 ppm de extracto metanólico de *A. karwinskii* presentó un ICR de 1.22, mientras que con la concentración de 250 ppm se registró 1.00 de ICR, que son datos sin diferencias significativas en comparación con control sin aplicación de tratamiento (1.00), sin embargo, la duración larval fue estadísticamente diferente al grupo control (6.50) al reportar valores de 5.91 y 6.13 con las mismas concentraciones (Tabla 4). La exposición de las larvas a extracto etanólico con concentración de 78 ppm

registro 1.27 de ICR. El valor máximo de mortalidad total corresponde a la concentración de 1250 ppm (80%), mientras que con las concentraciones de 156 y 78 ppm, no se registró mortalidad. El extracto de hexano con concentraciones de 2000 y 500 ppm presentaron 1.47 y 1.26 de ICR, respectivamente en comparación con el tratamiento control, sin embargo, estos datos no presentan diferencias significativas. La concentración de 2000 ppm presentó valor máximo 20% de mortalidad.

**Tabla 4.** Mortalidad total, duración larval y pupal e Índice de Inhibición de Crecimiento de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con extractos de *Agave karwinskii*.

Extracto	Concentración (ppm)	Mortalidad total (%)	Duración		ICR
			Larva*	Pupa**	
Etanol	1250	80.00 a	4.61 b	2.49 a	0.40 b
	625	43.33 b	4.80 b	2.12 a	0.74 ab
	312.5	20.00 c	5.12 b	2.09 a	0.87 ab
	156.2	0.00 d	5.16 b	2.01 a	1.01 a
	78.1	0.00 d	5.28 b	2.11 a	1.27 a
	Control	0.00 d	6.25 b	2.05 a	1.00 a
Hexano	2000	20.00 a	5.26 b	1.94 a	1.47 a
	1000	8.33 b	5.48 b	1.85 a	0.99 a
	500	8.33 b	5.18 b	2.03 a	1.26 a
	250	3.33 b	5.51 b	2.11 a	1.00 a
	125	0.00 b	5.28 b	2.03 a	1.00 a
	Control	0.00 b	6.50 a	2.05 a	1.00 a
Metanol	2000	100.00 a	5.77 a	0.00 b	0.28 c
	1000	73.33 b	6.26 a	2.03 a	0.50 bc
	500	23.33 c	6.15 a	1.90 a	0.84 ab
	250	16.67 c	6.13 a	1.92 a	1.00 a
	125	13.33 c	5.91 a	1.92 a	1.22 a
	Control	0.00 d	6.50 b	2.05 a	1.00 a

Núm.; Número de individuos; II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; \* Periodo de larva a pupa; \*\* Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; (\*): Sin registro o cálculo de datos; Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control

En la tabla 5 se muestra que la duración total del ciclo de vida del *Cx. quinquefasciatus* en el tratamiento control sin aplicación de extracto fue de 21.60 días en las que se consideran 18.83 de larva y 3.27 de pupa e ICR de 1.00. Con la concentración de 125 ppm de extracto de metanol de *A. karwinskii* se registró 0.64 de ICR, que presenta diferencias significativas al ser comparado con el control sin la aplicación de tratamiento. Se registró el 100% de mortalidad al final del experimento con las concentraciones de 2000 y 1000 ppm, debido a que las larvas murieron durante las primeras 72 h. En la concentración de 78 ppm de extracto de etanol se registró 0.23 de ICR, que mostro diferencias significativas en comparación con el tratamiento control. En las concentraciones de 1250, 625, 312.5 y 156 ppm se registró 100% de mortalidad al final del experimento, porque el efecto se presentó durante las primeras 72 h. El efecto del extracto de hexano se presentó con un ICR de 0.72 y 0.69 con las concentraciones de 250 y 125 ppm, que muestras diferencias significativas en comparación con el controla duración larval y pupal presentaron diferencias significativas en todas las concentraciones evaluadas en comparación con el grupo control. Se registró la mortalidad máxima (86.25%) al finalizar experimento con la concentración de 2000 ppm.

**Tabla 5.** Mortalidad total, duración larval y pupal e Índice de Inhibición de Crecimiento de larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* tratadas con extracto de *Agave karwinskii*.

Extracto	Concentración (ppm)	Mortalidad total (%)	Duración		ICR
			Larva*	Pupa**	
Etanol	1250	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	625	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	312.5	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	156	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	78	80.00 b	8.75 b	1.32 b	0.23 b
	Control	0.00 c	18.83 a	3.27 a	1.00 a
Hexano	2000	86.25 a	7.97 bc	2.29 bc	0.25 d
	1000	76.25 a	7.83 c	2.62 ab	0.36 d
	500	60.00 b	7.69 c	2.42 bc	0.54 c
	250	46.25 c	9.21 b	1.86 c	0.72 b
	125	45.00 c	8.43 bc	2.52 bc	0.69 b
	Control	0.00 d	18.83 a	3.27 c	1.00 a
Metanol	2000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	1000	100.00 a	(*)	(*)	(*)
	500	96.25 ab	4.50 bc	1.12 bc	0.04 c
	250	81.25 b	6.92 b	1.38 bc	0.20 c
	125	58.75 c	8.86 b	2.07 ab	0.64 b
	Control	0.00 d	18.83 a	3.27 a	1.00 a

Núm.; Número de individuos; II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; \* Periodo de larva a pupa; \*\* Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; (\*): Sin registro o cálculo de datos; Las medias seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna y extracto son significativamente diferentes en  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

## DISCUSIÓN

Se ha informado que los extractos de diferentes especies de agave contienen diferentes tipos de metabolitos secundarios. Ahumada-Santos et al. (2013) reportaron que, en los extractos de metanol obtenidos de hojas de *A. impressa*, *A. ornithobroma*, *A. tequilana* y *A. schidigera* se detectó la presencia de triterpenos, flavonoides y taninos. Kajla et al. (2016) determinaron la presencia de alcaloides, fenoles, esteroides, flobataninos, flavonoides y saponinas en extracto acuoso de hojas de *A. angustifolia*.

Otros estudios realizados con extractos de *A. sisalana* también han revelado la presencia de metabolitos secundarios. Ade-Ajayi et al. (2011) informan la presencia de saponinas, glucósidos, terpenoides, taninos, flavonoides y glucósidos cardíacos en el extracto acuoso del jugo, mientras que Hammuel et al. (2011) revelaron la presencia de saponinas, esteroides, taninos, flavonoides y glucósidos cardíacos en el extracto de metanol de hojas y recientemente también reportaron la presencia de alcaloides, flavonoides y saponinas en el extracto de metanol de hojas de la misma especie de *Agave* (Jajere et al., 2016). En comparación con nuestro estudio, los extractos de *A. karwinskii* contienen diferentes tipos de metabolitos secundarios similares a los que se encontraron en otras especies, sin embargo, no existen estudios previos similares al nuestro, en los que se determine la presencia de metabolitos secundarios, por lo que en este estudio se realiza el primer reporte de tamizaje fitoquímico cualitativo.

Las larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con los extractos obtenidos de hojas de *A. karwinskii* mostraron mayor susceptibilidad. El extracto de etanol a las 24 horas presentó mortalidad mayor al 90%, resultado similar al que obtuvieron Nunes et al. (2004), puesto que reportan que el extracto acuoso de desechos líquidos de *A. sisalana* controlaron el 100% de la población de larvas de *Ae. aegypti* con una concentración de 20 mg/mL y una LC<sub>50</sub> de 5.9 mg/mL después de 24 h de exposición al tratamiento, sin embargo, las concentraciones son superiores a las que se utilizaron en nuestro estudio. También, Pizarro et al. (1999) informaron que el extracto de *A. sisalana* eliminó el 50%

de la población de larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* con concentraciones de 322 y 183 ppm respectivamente, resultado similar al obtenido en nuestro estudio en comparación con las larvas de *Cx. quinquefasciatus* sometidas a una concentración de 125 ppm de extracto de metanol. Singh et al. (2014) reportaron que las larvas de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi* (*An. stephensi*) tratadas con extracto de metanol de *A. sisalana* obtuvieron LC<sub>50</sub> de 220, 82 y 36 ppm respectivamente, resultados que son similares a los que se informan en nuestro estudio para las larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extracto de etanol después de 48 y 72 de la aplicación del tratamiento. Kajla et al. (2016) evaluó la actividad larvicida de extractos de *A. angustifolia* sobre larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* e informaron que el extracto de acetona, etanol y hexano controló más del 80% de la población de larvas de las dos especies de mosquitos después de 24 h de exposición a una concentración de 100 ppm, sin embargo, los resultados de nuestro estudio no son comparables debido a que en ninguno de nuestros tratamientos se presentó el 100% de mortalidad a las 24 h de la aplicación del tratamiento. Cabe destacar que no existen reportes de la actividad biológica de extractos de *A. karwinskii* sobre insectos u otros organismos.

Diferentes especies de plantas contribuyen a la que contribuyen a la inhibición de crecimiento de larvas de mosquitos. Granados-Echegoyen et al. (2014) evaluaron la aplicación de extractos de etanol y metanol de hojas de *Pseudocalymma alliaceum* al 10% sobre larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* y reportaron ICR de 0.70 y 0.76

respectivamente, resultados similares a los que se obtuvieron en este estudio las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a la concentración de 625 ppm de extracto de etanol, y para las larvas de *Cx quinquefasciatus* sometidas a tratamiento con extracto de metanol de 125 ppm y extracto de hexano de 125 y 250 ppm. La duración de larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extracto de metanol de semillas de *Ricinus communis* a una concentración de 162.5 ppm disminuyen el periodo larval, mientras que las lavas tratadas con extracto de hexano prologaron el periodo de larvas (Martinez-Tomás et al. 2018), resultado similar al que obtuvimos en nuestro estudio con las larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extractos de metanol, sin embargo, nuestros resultados difieren con la aplicación del extracto de hexano de *A. karwinskii* debido a que las larvas de las dos especies de mosquito redujeron la duración de larvas en relación al control, a su vez estos resultados son similares a los que reportan Daniel et al. (1995) en el que evaluaron extractos de *Acalypha indica* e indican que el periodo de larva y pupa se prolonga en bioensayos realizados con *Cx. quinquefasciatus*. La ventaja de que las etapas de desarrollo se prolonguen es que el número de larvas se reduce debido al período más largo necesario para que una nueva generación complete el ciclo de vida.

Las variaciones de la actividad larvicida e inhibición de crecimiento de los extractos de plantas dependen de la polaridad del disolvente utilizado en el proceso de extracción de los compuestos bioactivos (Ghosh et al., 2012). En nuestro estudio los

extractos crudos de *A. karwinskii* obtenidos con solventes de diferente polaridad (etanol, metanol y hexano), el efecto larvicida e insectistático es mayor contra larvas de *Cx quinquefasciatus* que contra larvas de *Ae. aegypti*.

Los extractos de *Agave* han sido estudiados por la presencia de metabolitos secundarios útiles. Herbert-Doctor et al. (2016) informaron que el extracto de hexano al 4% de hojas de *A. tequilana* presentaron 100% de mortalidad contra *Bemisia tabaci*, mientras que la aplicación de extracto de acetato de etilo al 0.4% eliminó el 100% de la población del nematodo *Panagrellus redivivus*. Otro estudio mostró que el extracto acuoso y etil acetato de residuos frescos de *A. sisalana* inhibieron el 100% la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de cabras con concentraciones de 10 y 0.32 mg/mL, respectivamente (Botura et al., 2013). Ahumada-Santos et al. (2013) informaron que el extracto de metanol de las hojas de *A. angustifolia* tenía un efecto inhibitorio contra la bacteria *Streptococcus* grupo A-4 y también reportaron que el mismo extracto posee actividad antioxidante. Allsopp et al. (2013) informaron que los fructanos aislados de jugo de *A. angustifolia* mostraron actividad prebiótica y ayudaron al tratamiento del cáncer de colon en un modelo artificial. El extracto de metanol y acuoso obtenido a partir de jugo *A. sisalana* tiene un efecto inhibitorio y bactericida contra *Shigella dysenteriae*, *Bacillus atrophaeus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Ade-Ajayi et al., 2011). El extracto de metanol de hojas de *A. attenuata* mostró fuerte actividad inhibitoria contra *Aspergillus flavus* y *Alternaria alternata*,

mientras que el extracto de *n*-hexano mostró efecto inhibitorio contra *Pasturella multocida* (Rizwan et al., 2012).

## CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que las hojas de *A. karwinskii* contienen diferentes metabolitos secundarios que tienen efectos de larvicidas y larvistáticos sobre *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. El extracto de metanol y etanol se pueden sugerir como un método de control para incluir en una estrategia de control integrado de las poblaciones de estos insectos. Se realizó el primero tamizaje fitoquímico para *A. karwinskii* que permitió identificar los compuestos bioactivos que ejercen acción la acción biológica contra las larvas de mosquito, sin embargo, es necesario realizar evaluaciones con extractos a base de solventes de polaridad variable y purificar, identificar y caracterizar los componentes activos responsables de la muerte e inhibición de crecimiento y desarrollo de los mosquitos.

## LITERATURA CITADA

Ade-Ajayi, A. F., Hammuel, C., Ezeayanaso, C., Ogabiela, E. E., Udiba, U. U., Anyim, B., & Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7), 180–183. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/JECE/article-abstract/5B7D3571875>

Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M. de J., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J. A., Heredia, J. B., Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 49, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.050>

Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I. S., Gill, C., & Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, 22, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.006>

Benelli, G. (2016). Plant-mediated synthesis of nanoparticles: A newer and safer tool against mosquito-borne diseases? *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4), 353–354. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.10.015>

Benelli, G., Caselli, A., & Canale, A. (2017a). Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints Nanoparticles for mosquito control. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.006>

Benelli, G., Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S. & Khaled, J. M. (2017b). Larvicidal activity of *Blumea eriantha* essential oil and its components against six mosquito species, including Zika virus vectors: the promising potential of (4E,6Z)-allo-ocimene, carvotanacetone and dodecyl acetate. *Parasitology Research*, 116(4), 1175–1188. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5395-0>

Botura, M. B., dos Santos, J. D. G., da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Oliveira, J. V. A., de Almeida, M. A. O., Batatinha, M. J. M. & Branco, A. (2013). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.012>

Chimal-Sánchez, E., I. Reyes Jaramillo, J. Y. Salmerón-Castro, N. Vázquez-Pérez L. & Varela-Fregoso. (2018). Cuatro nuevos registros de hongos micorrizógenos arbusculares (Glomeromycota) asociados con *Agave karwinskii* y *A. angustifolia* (Agavaceae) de Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana* 125.

Daniel T., Umarani S. & Sakthivadivel M. (1995) Insecticidal action of *Ervatamia divaricata* L. and *Acalypha indica* L. against *Culex quinquefasciatus* Say. *Geobios New Rep* 14(2):95–98

Das, D., & Chandra, G. (2012). Mosquito larvicidal activity of *Rauwolfia serpentina* L. seeds against *Culex quinquefasciatus* Say. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(1), 42–45. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60243-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60243-5)

García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87., 14–23.

Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 581–598.

Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., & Anandan, A. (2011). Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 109(2), 353–367. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2263-1>

Govindarajan, M., & Sivakumar, R. (2014). Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(2), 777–791. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3709-4>

Granados-Echegoyen, C. A., Chan-Bacab, M. J., Ortega-Morales, B. O., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., Diego-Nava, F., & Gaylarde, C. (2018). *Argemone mexicana* (Papaverales: Papavaraceae) as an Alternative for Mosquito Control: First Report of Larvicidal Activity of Flower Extract. *Journal of Medical Entomology*, tjy159-tjy159. <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tjy159>

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., & Rojas-Olivos, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(6), 463–467. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60816-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60816-7)

Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernandez, N., & Gato-Armas, R. (2014). Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594–601. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)

Hammuel, C., Yebpella, G. G., Shallangwa, G. A., Magomya, A. M., & Agbaji, A. S. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68(4), 535–539.

Herbert-Doctor, L. A., Saavedra-Aguilar, M., Villarreal, M. L., Cardoso-Taketa, A., & Vite-Vallejo, O. (2016). Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. *Southwestern Entomologist*, 41(1), 27-40. <https://doi.org/10.3958/059.041.0105>

Jajere, U. M., Hammuel, C., Mohammed, M., Okibe, P. O., Ali, E. O., & Abubakar, A. (2016). Phytochemical and Toxicological Studies of Methanol Extract of *Agave Sisalana* (Agaveceae ), 5(6), 132–142. <https://doi.org/10.20959/wjpps20166-6186>

Kajla, M., Bhattacharya, K., Gupta, K., Banerjee, U., Kakani, P., Gupta, L., & Kumar, S. (2016). Identification of the Temperature Induced Larvicidal Efficacy of *Agave angustifolia* against *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* Larvae. *Frontiers in Public Health*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00286>

Kovendan, K., Shanthakumar, S. P., Praseeja, C., Kumar, P. M., Murugan, K., & Vincent, S. (2014). Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(S1). [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60435-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60435-7)

López-Romero, J. C., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., Peña-Ramos, E. A., & González-Ríos, H. (2018). Biological activities of *Agave* by-products and their

possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2461–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8738>

Martinez-Tomás, S. H. , Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. de J. R., & López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. *Southwestern Entomologist*, 43(1), 221–238. <https://doi.org/10.3958/059.043.0114>

Mathalaimuthu, B., Shanmugam, D., Kovendan, K., Kadarkarai, M., Jayapal, G., & Benelli, G. (2017). *Coleus aromaticus* leaf extract fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? *Process Safety and Environmental Protection*, 106, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.12.003>

Munusamy, R. G., Appadurai, D. R., Kuppusamy, S., Michael, G. P., & Savarimuthu, I. (2016). Ovicidal and larvicidal activities of some plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(6), 468–471. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61070-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61070-8)

Minitab Inc., 2017. Base Minitab software, versión 18.1. USA.

Nunes, F., Leite, J., Oliveira H. G. L., Sousa, A. P. S. P., Menezes, M. C., Moraes, J. P. S., Mascarenhas, S. R. & Braga, V. (2014). The larvicidal activity of *Agave sisalana* against

L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitology Research*, 114 (2), 543–549.

Pascual, M. E., Carretero, M. E., Slowing, K. V., & Villar, A. (2008). Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. *Pharmaceutical Biology*, 40 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.2.139.5849>

Pérez del Río, R., Caballero Caballero, M., Hernández Gómez, L. H., & Bernabé Montes, J. L. (2013). Diseño y construcción de una desfibradora de hojas de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Ciencias Técnica Agropecuarias*, 22(4), 5–14.

Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. y G. Ramírez V. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 141-152.

Pizarro, A. P. B., M Oliveira Filho, A., P Parente, J., Melo, M. T. V, dos Santos, C., & R Lima, P. (1999). Utilization of the waste of sisal industry in the control of mosquito larvae. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 23–29.

Rawani, A., Haldar, K. M., Ghosh, A., & Chandra, G. (2009). Larvicidal activities of three plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105(5), 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1573-z>

Reegan, A. D., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2014). Effect of niloticin, a protolimonoid isolated from *Limonia acidissima* L. (Rutaceae)

on the immature stages of dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 139, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.002>

Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *agave attenuata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6440–6451. <https://doi.org/10.3390/ijms13056440>

Singh, D. R., Mittal, P., Kumar, G., & Dhiman, R. (2014). Evaluation of mosquito larvicidal efficacy of leaf extract of a cactus plant, *Agave sisalana*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2.

Subarani, S., Sabhanayakam, S., Kamaraj, C., Elango, G., & Kadir, M. A. (2013). Efficacy of larvicidal and pupicidal activity of *Catharanthus roseus* aqueous and solvent extracts against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 625–630. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60107-8)

Singh, R. K., Mittal, P. K., Kumar, G., & Dhiman, R. C. (2014). Evaluation of mosquito larvicidal efficacy of leaf extract of a cactus plant, *Agave sisalana*. *Journal Entomology and Zoology Studies*, 2, 83-6.

Subarani, S., Sabhanayakam, S., Kamaraj, C., Elango, G., & Kadir, M. A. (2013). Efficacy of larvicidal and pupicidal activity of *Catharanthus roseus* aqueous and solvent extracts against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:

Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 625–630.  
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60107-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60107-8)

Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany*, 96(2), 448–457. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800176>

WHO (World Health Organization). (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>

Zhang, M., Chaudhuri, S. K., & Kubo, I. (1993). Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. *Journal of Chemical Ecology*, 19(6), 1109–1118. <https://doi.org/10.1007/BF00987372>