

## Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae)

Jenny Bazán-Calderón<sup>1</sup>, Roberto Ventura-Flores<sup>1</sup>, Massuo J. Kato<sup>2</sup>, Consuelo Rojas-Idrogo<sup>1</sup> & Guillermo E. Delgado-Paredes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú; Ciudad Universitaria, Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

<sup>2</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05599-970, São Paulo-SP, Brasil.

### Resumen

Correspondencia

G.E. Delgado

E-mail: guidelg2001@yahoo.es

**Recibido:** 30 agosto 2011

**Aceptado:** 1 diciembre 2011

**Publicado on-line:** 19 diciembre 2011

Se evaluó la acción insecticida sobre larvas del II y III estadio y el estadio adulto de *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis*, usando extracto DCM:MeOH 2:1, de espigas maduras y plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum*. El método de inoculación del extracto fue por suspensiones acuosas en el estadio larval y por aspersión en el estadio adulto. El mayor efecto tóxico correspondió a los extractos de espigas maduras respecto a plantas *in vitro*, a los estadios larvales II y III respecto al estadio adulto y a *Ae. aegypti* respecto a *An. pseudopunctipennis*, tal como lo expresan los resultados de las concentraciones letales a 50% (LC<sub>50</sub>) y 90% (LC<sub>90</sub>), en 2 h y 30 min de exposición, para los estadios larvales II y III y 24 h, para el estadio adulto. El potencial de *P. tuberculatum*, como un nuevo tipo de insecticida en el control de los mosquitos, es explorado.

**Palabras clave:** Actividad insecticida, Amidas, Culicidae, Piperaceae, Plantas *in vitro*.

### Abstract

*Insecticidal activity of Piper tuberculatum against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) and Anopheles pseudopunctipennis (Diptera: Culicidae).*

The insecticide action on II and III instars and adult stage of *Aedes aegypti* and *Anopheles pseudopunctipennis*, using DCM:MeOH 2:1 extract, of mature spikes and *in vitro* plants of *Piper tuberculatum* was evaluated. The inoculation method of extracts was by aqueous suspensions on the larval stage and by spray on the adult stage. The corresponding highest toxic effect was (a) for mature spikes as compared with *in vitro* plants, (b) II and III larval instars as compared with adult stage y (c) *Ae. egypti* as compared with *An. pseudopunctipennis*, according to the results showed for the lethal concentrations to 50% (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>), in 2 h and 30 min, for the II and III larval instars and 24 h, for the adult stage, of exposure. The potential of *P. tuberculatum* as new type of insecticide for the control of mosquitoes is explored.

**Key words:** Insecticidal activity, Amides, Culicidae, Piperaceae, *in vitro* plants.

## Introducción

Los mosquitos en general, conforman un importante grupo de insectos que transmiten diversas enfermedades como la malaria, la filariosis, el dengue, la encefalitis japonesa, entre otras, causando la muerte de millones de personas cada año (Das et al. 2007). El dengue es una enfermedad aguda, transmitida por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*, causada por cuatro serotipos del virus del dengue: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, estrechamente relacionados con los serotipos del género Flavivirus, familia Flaviviridae. Una variedad potencialmente mortal de la fiebre del dengue es el dengue grave o hemorrágico, que ocasiona pérdida de líquido o sangrados o daño grave de órganos, que puede desencadenar la muerte. En todo el mundo se estima que el número de afectados se encuentra entre los 50 a 100 millones de personas cada año, con un total de medio millón que necesitan atención hospitalaria por tener riesgo su vida y que dan lugar a unos 12.500 fallecimientos (WHO 2009). La malaria, conocida también como paludismo, es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios hemáticos del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*, habiendo provocado la muerte de 781.000 personas en el 2009 (WHO 2010).

La familia Piperaceae comprende 14 géneros y alrededor de 1950 especies (Mabberley 1997). Entre estos, *Piper* y *Peperomia* son los más abundantes en la flora del Perú, con aproximadamente 811 especies, de las cuales 528 son endémicas (Brako & Zarucchi 1993). Investigaciones fitoquímicas realizadas en diferentes especies de *Piper* permitió caracterizar numerosos compuestos bioactivos tales como amidas, alcaloides, lignanos, ácidos benzoicos, cromenas, entre otros (Parmar et al. 1997, Kato & Furlan 2007). Considerando la diversidad de especies de Piperaceae presentes en el Perú, nuestros estudios se han direccionado hacia el descubrimiento de nuevos agentes biocidas, basados en varios ensayos sobre actividad bactericida, fungicida e insecticida. De esta manera extractos crudos de MeOH, AcOEt y DCM-MeOH, obtenidos de espigas maduras (con frutos y semillas) de *Piper tuberculatum* demostraron una alta actividad larvicida contra *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Soberón et al. 2006) y actividad antifúngica contra *Microsporium canis*,

*M. gypseum* y *Trichophyton rubrum* (Palacios et al. 2009). Sin embargo, varios trabajos han reportado la actividad insecticida de sustancias puras, obtenidas de diversas especies de *Piper* que ocurren en las regiones tropicales del mundo; éstas sustancias correspondieron solamente al grupo de los lignanos y las amidas, a pesar que en las Piperaceae se presentan diversos grupos de metabolitos secundarios (Bernard et al. 1995, Parmar et al. 1997, Kato & Furlan 2007). Así tenemos que las amidas de *P. guanacastensis* ejercieron una fuerte actividad insecticida contra *Aedes atropalpus* (Pareda-Miranda et al. 1997) y las amidas de *P. tuberculatum* sobre *Anticarsia gemmatalis* (Navickiene et al. 2007), por citar algunos ejemplos.

El uso intensivo de insecticidas sintéticos en el control del mosquito ha creado numerosos problemas como el desarrollo de resistencia (Klein et al. 1991; Ocampo et al. 2011), efectos indeseables sobre organismos no específicos y la vida silvestre (Miranda et al. 2003) e impactos negativos en el medio ambiente (Lin et al. 2009). En América se demostró la resistencia de especies vectoras como *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. darlingi* y *An. vestitipennis* a carbamatos, piretroides y organofosforados; éste último grupo químico es responsable de la resistencia en más de veinte especies de mosquitos a nivel mundial (OMS 1992). Asimismo, se ha reportado casos de resistencia en varios países como Tailandia (Overgarrrd et al. 2005), Perú (Vargas et al. 2006), Tanzania (Mato et al. 2010) y Colombia (Ocampo et al. 2011), por citar algunos. Los productos naturales de origen vegetal, con actividad insecticida potencial, son considerados alternativas válidas sobre los pesticidas sintéticos convencionales en el control de una amplia variedad de insectos-plagas y vectores. Así, tenemos que los aceites esenciales de hojas y corteza de *Cryptomeria japonica* demostraron una alta actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (Cheng et al. 2003). Los extractos de *Murraya koenigii*, *Coriandrum sativum*, *Ferula asafetida* y *Trigonella foenum*, resultaron efectivos contra *Ae. aegypti* (Harve & Kamath 2004). Extractos con metanol y etanol de cinco especies de plantas aromáticas, *Aristolochia saccata*, *Annona squamosa*, *Gymnopetalum cochinchinensis*, *Caesalpinia* sp. y *Piper* sp., mostraron actividad larvicida sobre *Ae. albopictus* y *Culex quinquefasciatus*, variando los resultados dependiendo de la especie vegetal utilizada (Das et al. 2007) y los acei-

tes esenciales de diversas plantas brasileñas, *Alpinia zerumbet*, *Syzygium jambolana*, *Ocimum americanum*, *Hytis suaveolens*, entre otras, fueron evaluadas positivamente en el control de larvas de *Ae. aegypti* (Cavalcanti et al. 2004). Asimismo, extractos obtenidos por decocción de *Paullinia clavigera* var. *bullata* e infusión de *Tradescantia zebrina* se ensayaron en el control del III estadio larval de *An. benarrochi*, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú (Pérez & Iannacone, 2004) y los extractos de aceites esenciales de *Capsicum annum* (Solanaceae), *P. nigrum* (Piperaceae) y *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) sobre el estadio adulto de *An. gambiae*, vector de la malaria (Foko et al. 2011).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la acción insecticida y determinar los niveles de susceptibilidad de extractos crudos DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras (con frutos y semillas) de plantas silvestres y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio y el estadio adulto de *Ae. aegypti*, mosquito vector del dengue y *An. pseudopunctipennis*, mosquito vector de la malaria, importantes enfermedades ampliamente diseminadas en el ámbito de la región Lambayeque, Perú.

## Materiales y Métodos

### Material biológico

El material botánico estuvo constituido por espigas maduras (con frutos y semillas) de *P. tuberculatum* Jacq., colectadas de plantas silvestres a orillas del Río Cumbil, provincia de Chota, región Cajamarca, entre los meses de enero a junio del 2007, así como plantas *in vitro* crecidas en condiciones asépticas. Las plantas fueron identificadas por el Dr. Guillermo E. Delgado Paredes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque basándose en la descripción realizada por Yuncker (1973). Una muestra herborizada se depositó en el Herbario de la UNPRG.

Las larvas de *Ae. aegypti* L. se colectaron en el distrito de Olmos (Lambayeque), en criaderos domiciliarios y peridomiciliarios, considerando diversos depósitos como tanques, cántaros, llantas, floreros, entre otros, conteniendo agua retenida. Después de identificadas, las larvas se colectaron con un gotero de plástico y colocaron en frascos

de boca ancha, conteniendo agua del mismo criadero. Las larvas de *An. pseudopunctipennis* Theobald se colectaron en los distritos de Leonardo Ortiz, Jayanca, Motupe y Olmos, pertenecientes a la región Lambayeque, en criaderos naturales como pozos, acequias y orillas de ríos. Después de identificadas, las larvas se colectaron con un cucharón de mango largo y luego se transfirieron, con ayuda de un gotero de plástico, a frascos de vidrio de boca ancha, conjuntamente con agua y vegetación del lugar.

### Obtención y cultivo de plantas *in vitro*

Las semillas de *P. tuberculatum* se desinfectaron con alcohol etílico 70% durante 3 minutos e hipoclorito de sodio 5,25% durante 5 minutos, luego enjuagadas con agua destilada esterilizada, e inoculadas en medio de cultivo conteniendo las sales minerales MS (Murashige & Skoog 1962), las vitaminas m-inositol 100 mg/l y tiamina. HCl 1 mg/l, sacarosa 2% y agar 0,8%; realizándose esta actividad en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG. Después de 3 meses de cultivo las plantas fueron micropropagadas por ápices caulinares y segmentos nodales, en medio de cultivo similar al anterior excepto que fue suplementado con ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) 0,02 mg/l, respectivamente. El pH del medio de cultivo fue ajustado en  $5,8 \pm 0,1$  con NaCl y HCl 0,1 N, respectivamente, y esterilizado en autoclave a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> de presión y 121 °C de temperatura durante 20 minutos. La incubación de los cultivos se realizó con 10 W.m<sup>-2</sup> de irradiancia, 24-26 °C de temperatura y 16-8 h de fotoperiodo.

### Obtención, identificación e inoculación de larvas

En el laboratorio, las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*, se incubaron en condiciones controladas de  $24 \pm 2$  °C de temperatura y  $80 \pm 5\%$  de humedad relativa, en bandejas de plástico de 22 x 16 x 5 cm, alimentándolas cada 24 h con 1.5 g de purina pulverizada; los estadios de pupa obtenidos se transfirieron para la emergencia del adulto a frascos de vidrio, en el interior de jaulas de 50 x 40 x 80 cm, acondicionadas con tela de organza y costalillo (Consoli & Lourenço de Oliveira 1994). Los estadios larvales de *Ae. aegypti* se identificaron mediante observaciones micros-

cópicas, considerando la presencia de las prominentes espinas laterales, una a cada lado del tórax, y la hilera de 7-12 escamas del peine en el VIII segmento abdominal; cada escama presentó una espina media y dientes laterales (Nelson 1986), en tanto que los estadios larvales de *An. pseudopunctipennis* se identificaron por la presencia de la cerda abdominal larga, plumosa en el I y III segmento y el aparato espiracular, en cuya parte posterior de la placa media existen dos espinas resistentes, negras, largas y curvas (Gorham et al. 1973). Las larvas completaron su ciclo biológico en el laboratorio hasta la fase adulta.

Los ensayos de susceptibilidad de larvas se realizaron utilizando suspensiones acuosas en frascos de vidrio de 6 cm de altura y 5 cm de diámetro de abertura, con una capacidad de 100 ml. Se seleccionaron larvas del II y III estadio y colocaron 20 larvas por estadio y tratamiento en 20 ml de la solución a ensayar, obtenida de los extractos crudos, con los solventes diclorometano (DCM): metanol (MeOH) 2:1, de espigas maduras y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum*. Las larvas se alimentaron tres horas antes de iniciar el experimento para evitar el canibalismo. Cada tratamiento se repitió cuatro veces utilizando 560 larvas más 20 larvas en el control. Las evaluaciones se realizaron 5 veces a intervalos de 30 minutos. Se consideró larvas muertas las que no reaccionaron al ser tocadas en la región cefálica con un puntero de punta roma y larvas moribundas las que se mantuvieron debajo de la superficie del agua o no tuvieron la reacción característica de sumergirse (Non-grados et al. 2000).

### Obtención e inoculación de adultos

El adulto hembra, por ser hematófago, se alimentó con sangre de Hunster, mientras que el adulto macho se alimentó con una solución de agua azucarada (agua y azúcar comercial) embebida en papel filtro y renovado diariamente. Para la oviposición se colocó, en el interior de las jaulas, tres recipientes oscuros utilizando la base de botellas de bebidas gaseosas descartables, conteniendo papel Kraft en su interior; éstos se llenaron con agua hasta aproximadamente un tercio de su altura y mantuvieron por 7 días. Después de la oviposición, los huevos se observaron con una lupa, se recolectaron y mantuvieron a temperatura ambiente hasta su establecimiento en bandejas de plástico con agua, para la eclosión y obtención de los estadios

larvales a utilizar en los bioensayos (Consoli & Lourenco de Oliveira 1994, Estrada-Franco & Craig 1995).

Si bien en los bioensayos con mosquitos adultos la OMS recomienda el uso de papeles impregnados con el insecticida y colocados en cilindros plásticos de exposición (kits de la OMS) (WHO 1981, 1998), lo que permite realizar registros de "knockdown" ( $KT_{50}$  y  $KT_{95}$ ), en nuestro caso, como se trataba de extractos crudos obtenidos de plantas, los ensayos de susceptibilidad con adultos se realizaron con el método de aspersión, utilizando jaulas entomológicas construidas con dos anillos metálicos de 8 cm de diámetro, colocados en la parte inferior y en la parte superior, cubiertas con un tul fino y un pasador para abrirla, en la parte superior; se utilizaron 20 individuos por jaula, la que se instaló en el laboratorio a un metro de altura del suelo, aplicándose por aspersión y en horas de la mañana la solución de los extractos crudos DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum*. Cada tratamiento se repitió tres veces utilizando 360 adultos más 20 adultos en el control. La duración de las aspersiones fue de 30 segundos y las evaluaciones se realizaron a las 6, 12 y 24 horas, después de aplicado el tratamiento. Al igual que en los ensayos con larvas, se consideró adultos muertos los que no reaccionaron al ser tocados en la región cefálica con un puntero de punta roma. En los tratamientos control se incorporó a la solución acuosa la misma cantidad del solvente de disolución de los extractos crudos, para descartar el efecto tóxico del solvente.

### Preparación del extracto y obtención de las concentraciones

En el caso de plantas silvestres, las espigas maduras inicialmente se secaron al ambiente y luego en estufa a 50 °C durante una semana; posteriormente, la materia seca se molió para obtener un polvo fino y sometió a extracción con DCM:MeOH (2:1) por tres veces consecutivas durante 48 horas. En el caso de plantas *in vitro*, la materia seca, obtenida de individuos completos incluyendo tallos, hojas y raíces, de 6-8 meses de edad, se sometió a un proceso similar de extracción.

Las concentraciones del extracto crudo ensayadas resultaron de bioensayos previos, tomando como criterio el porcentaje de mortalidad de larvas y adultos en relación con el tiempo transcurri-

do de exposición. Para el caso de los ensayos con larvas se establecieron como concentraciones extremas 0,0078 y 0,03125 mg/ml, por lo tanto, para determinar las siete concentraciones ensayadas se utilizó como valor constante 0,00391, aplicado en progresión aritmética, estableciéndose las siguientes concentraciones: 0,0078; 0,01171; 0,01562; 0,01953; 0,02344; 0,02735 y 0,03125 mg/ml. En el caso de los ensayos con adultos se establecieron como concentraciones extremas 0,03125 y 0,05081 mg/ml y, aplicando el mismo criterio asumido para el ensayo con larvas, se establecieron las siguientes concentraciones: 0,03125; 0,03517; 0,03908; 0,04299; 0,04690 y 0,05081 mg/ml.

En la preparación de la solución madre del extracto crudo, utilizado para larvas, se pesó 30 mg y disolvió en 3 ml de metanol, obteniéndose una solución de 10.000 ppm, a partir de la cual se obtuvo 160 ml de solución a ensayar en cada tratamiento formulado. En el caso de la solución madre del extracto crudo, utilizado para adultos, se pesó 250 mg y disolvió en 25 ml de metanol, obteniéndose una solución de 10.000 ppm, a partir de la cual se obtuvo 1.000 ml de solución a ensayar en cada tratamiento formulado. Este mismo procedimiento se siguió para las espigas maduras como para las plántulas *in vitro*.

### Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente (Goode & Hatt 1986) donde los grupos experimentales estuvieron constituidos por larvas del II y III estadio y adultos de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* a los que se aplicó como estímulo concentraciones crecientes de extractos de DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras de plantas silvestres y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum*.

Los parámetros estadísticos  $LC_{50}$  (concentración letal media) y  $LC_{90}$  (concentración letal 90) y sus límites de confianza fueron determinados utilizando el software U.S. EPA Proobit Analysis Program Ver 1.5; Environmental Monitoring Systems laboratory, Cincinnati, OH, USA. Los datos de mortalidad observados fueron corregidos de acuerdo a la mortalidad de los individuos en el tratamiento control, según fórmula de Abbott (Busvine 1957).

## Resultados

De 93 g de materia seca, obtenida de espigas maduras de plantas silvestres de *P. tuberculatum*, sometida a extracción con DCM:MeOH (2:1) se obtuvo 5,6 g de extracto crudo, lo que significó 6,1% de rendimiento, en tanto que 6,4 g de materia seca, obtenida de individuos completos, incluyendo tallos, hojas y raíces, de plantas *in vitro* de 6-8 meses de edad, se obtuvo 0,58 g de extracto crudo, lo que significó 9,2% de rendimiento (datos no mostrados en tabla).

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos utilizando extracto crudo DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras, sobre los estadios larvales II y III de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*, en 2 h y 30 min de exposición. Para *Ae. aegypti* se alcanzó una mortalidad de 100% con 0,03126 mg/ml, la mayor concentración ensayada; asimismo, otras concentraciones ensayadas como 0,02735 y 0,02344 mg/ml, también alcanzaron tasas de mortalidad superiores a 90%; en la concentración más baja ensayada, 0,0078 mg/ml, únicamente se alcanzaron tasas de mortalidad de 40 y 17,5%, en los estadios II y III, respectivamente. Para *An. pseudopunctipennis*, tasas de mortalidad

Extracto (mg/ml)	Mortalidad (%) Estadio Larval			
	<i>Ae. aegypti</i>		<i>An. pseudopunctipennis</i>	
	II	III	II	III
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
0,00780	40,0	17,5	35,0	13,8
0,01171	58,6	32,5	52,5	31,3
0,01562	77,5	56,6	78,8	50,0
0,01953	83,8	60,0	85,0	53,8
0,02344	92,5	65,0	88,8	61,2
0,02735	98,8	92,5	95,0	87,5
0,03126	100,0	100,0	98,8	96,2

Tabla 1. Efecto del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras de *P. tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 2 h y 30 min de exposición.

Table 1. Effect of DCM:MeOH (2:1) crude extract of mature spikes of *P. tuberculatum* against II and III larval instars of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 2 h and 30 min of exposure.

tan altas como 95 a 96,8% se alcanzaron en los estadios II y III, en las concentraciones más altas ensayadas, 0,02735 y 0,03126 mg/ml, en tanto que en la concentración más baja ensayada, 0,0078 mg/ml, únicamente se alcanzaron tasas de mortalidad de 35 y 13,8%, en los estadios II y III, respectivamente.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos utilizando extracto crudo DCM:MeOH (2:1) de plantas *in vitro* sobre los estadios larvales II y III de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*, en 2 h y 30 min de exposición. Para *Ae. aegypti* se alcanzó una mortalidad entre 97,5 a 100% con 0,03126 y 0,02735 mg/ml, las mayores concentraciones ensayadas; en la concentración más baja ensayada, 0,0078 mg/ml, únicamente se alcanzaron tasas de mortalidad de 22,5 y 11,2%, en los estadios II y III, respectivamente. Para *An. pseudopunctipennis*, las tasas de mortalidad más altas fueron 87,5 y 75%, que correspondieron a los estadios II y III, respectivamente, en la concentración más alta ensayada, 0,03126 mg/ml, en tanto que en la concentración más baja ensayada, 0,0078 mg/ml, únicamente se alcanzaron tasas de mortalidad de 15 y 13,8%, en los estadios II y III, respectivamente.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos utilizando extracto crudo DCM:MeOH (2:1), tanto de espigas maduras como de plantas

*in vitro*, sobre el estadio adulto de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*, en 24 h de exposición. En *Ae. aegypti* se alcanzó una mortalidad máxima de 96,6%, utilizando extracto de espigas maduras, y 66,6%, utilizando extracto de plantas *in vitro*, con 0,05081 mg/ml, la concentración más alta ensayada, en tanto que en la concentración más baja ensayada, 0,03126 mg/ml, se alcanzó una mortalidad de 8,3%, para extracto de espigas maduras, y 5%, para extracto de plantas *in vitro*. En *An. pseudopunctipennis* se alcanzó una mortalidad máxima de 65%, utilizando extracto de espigas maduras, y 41,6%, utilizando extracto de plantas *in vitro*, con 0,05081 mg/ml, la concentración más alta ensayada, en tanto que en la concentración más baja ensayada, 0,03126 mg/ml, se alcanzó una mortalidad de 5%, para extracto de espigas maduras, y 1,7%, para extracto de plantas *in vitro*.

En los tratamientos control no se observó mortalidad alguna en los ensayos con los estadios larvales II y III y el estadio adulto, tanto en la evaluación de los extractos crudos, obtenidos de espigas maduras, como de plantas *in vitro*, sobre *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. Asimismo, las evaluaciones a 30, 60, 90 y 120 minutos de exposición del extracto crudo sobre los estadios larvales II y III, y 6 y 12 h de exposición del extracto crudo sobre el estadio adulto, no se presentan en tablas puesto que no se observó niveles significativos de mortalidad.

Extracto (mg/ml)	Mortalidad (%) Estadio Larval			
	<i>Ae. aegypti</i>		<i>An. pseudopunctipennis</i>	
	II	III	II	III
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
0,00780	22,5	11,3	15,0	13,8
0,01171	33,8	16,3	23,8	22,5
0,01562	43,8	26,3	26,3	23,8
0,01953	48,8	38,8	35,0	37,5
0,02344	61,2	51,3	53,8	38,8
0,02735	97,5	87,5	63,8	56,3
0,03126	100,0	98,8	87,5	75,0

Tabla 2. Efecto del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 2 h y 30 min de exposición.

Table 2. Effect of DCM:MeOH (2:1) crude extract of *in vitro* plants of *P. tuberculatum* against II and III larval instars of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 2 h and 30 min of exposure.

Extracto (mg/ml)	Mortalidad (%)			
	<i>Ae. aegypti</i>		<i>An. pseudopunctipennis</i>	
	Espigas maduras	Plantas <i>in vitro</i>	Espigas Maduras	Plantas <i>in vitro</i>
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
0,03126	8,3	5,0	5,0	1,7
0,03517	15,0	10,0	11,6	6,6
0,03908	36,6	16,6	25,0	11,6
0,04299	53,3	26,6	46,6	18,3
0,04690	71,6	40,1	48,3	26,6
0,05081	96,6	66,6	65,0	41,6

Tabla 3. Efecto del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre el estadio adulto de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 24 h de exposición.

Table 3. Effect of DCM:MeOH (2:1) crude extract of mature spikes and *in vitro* plants of *P. tuberculatum* against adult stage of *An. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 24 h of exposure.

SP	Estadio Larval	LC <sub>50</sub>	Límites	LC <sub>90</sub>	Límites
<i>Ae. aegypti</i>	II	0,010	0,090 0,011	0,021	0,019 0,023
	III	0,015	0,011 0,180	0,030	0,024 0,025
<i>An. pseudopunctipennis</i>	II	0,010	0,090 0,011	0,022	0,022 0,025
	III	0,016	0,013 0,019	0,034	0,027 0,056

Tabla 4. Concentraciones letales (mg/ml) LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras de *P. tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 2 h y 30 min de exposición.

Table 4. Lethal concentrations (mg/ml) LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> of DCM:MeOH (2:1) crude extracts of mature spikes of *P. tuberculatum* against II and III larval instars of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 2 h and 30 min of exposure.

SP	Estadio Larval	LC <sub>50</sub>	Límites	LC <sub>90</sub>	Límites
<i>Ae. aegypti</i>	II	0,015	0,009 0,021	0,033	0,019 0,023
	III	0,019	0,014 0,026	0,035	0,026 0,112
<i>An. pseudopunctipennis</i>	II	0,021	0,016 0,028	0,051	0,035 0,167
	III	0,024	0,020 0,034	0,072	0,045 0,265

Tabla 5. Concentraciones letales (mg/ml) LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre larvas del II y III estadio de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 2 h y 30 min de exposición.

Table 5. Lethal concentrations (mg/ml) LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> of DCM:MeOH (2:1) crude extracts of *in vitro* plants of *P. tuberculatum* against II and III larval instars of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 2 h and 30 min of exposure.

Especie	Estruct. Vegetal	LC <sub>50</sub>	Límites	LC <sub>90</sub>	Límites
<i>Ae. aegypti</i>	Espigas Maduras	0,041	0,040 – 0,042	0,051	0,049 – 0,054
	Plantas <i>in vitro</i>	0,048	0,046 – 0,051	0,065	0,060 – 0,075
<i>An. pseudopunctipennis</i>	Espigas Maduras	0,047	0,045 – 0,049	0,064	0,059 – 0,074
	Plantas <i>in vitro</i>	0,055	0,051 – 0,062	0,078	0,067 – 0,103

Tabla 6. Concentraciones letales (mg/ml) LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> del extracto crudo de DCM:MeOH (2:1) de espigas maduras y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre el estadio adulto de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* después de 24 h de exposición.

Table 6. Lethal concentrations (mg/ml) LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> of DCM:MeOH (2:1) crude extracts of mature spikes and *in vitro* plants of *P. tuberculatum* against adult stage of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* after 24 h of exposure.

En la tabla 4 se presentan los valores de concentraciones letales a 50 (LC<sub>50</sub>) y 90% (LC<sub>90</sub>), con sus límites de confianza, en 2 h y 30 min de exposición de los extractos crudos de espigas maduras sobre los estadios larvales II y III de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. En *Ae. aegypti*, los extractos alcanzaron un patrón de efectividad ligeramente superior sobre el estadio larval II respecto al estadio larval III. Así, 50% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,010 mg/ml, respecto al estadio III utilizando 0,015 mg/ml, en tanto que 90% de mortalidad larval se al-

canzó, para el estadio II con 0,021 mg/ml, respecto al estadio III con 0,030 mg/ml.

En *An. pseudopunctipennis*, los extractos alcanzaron, también, un patrón de efectividad ligeramente superior sobre el estadio larval II respecto al estadio larval III. Así, 50% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,010 mg/ml, respecto al estadio III utilizando 0,016 mg/ml, en tanto que 90% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II con 0,022 mg/ml, respecto al estadio III con 0,034 mg/ml. Los límites de confianza se establecieron en rangos bastante estrechos

para todos los casos.

En la tabla 5 se presentan los valores de  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ , con sus límites de confianza, en 2 h y 30 min de exposición de los extractos crudos de plantas *in vitro* sobre los estadios larvales II y III de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. En *Ae. aegypti*, los extractos alcanzaron un patrón de efectividad ligeramente superior sobre el estadio larval II respecto al estadio larval III. Así, 50% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,015 mg/ml, respecto al estadio III con 0,019 mg/ml, en tanto que 90% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,033 mg/ml, respecto al estadio III con 0,035 mg/ml. En *An. pseudopunctipennis*, los extractos alcanzaron, también, un patrón de efectividad ligeramente superior sobre el estadio larval II respecto al estadio larval III, para  $LC_{50}$  pero no para  $LC_{90}$  donde las diferencias resultaron relevantes. Así, 50% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,021 mg/ml, respecto al estadio III con 0,024 mg/ml, en tanto que 90% de mortalidad larval se alcanzó, para el estadio II utilizando 0,051 mg/ml, respecto al estadio III con 0,072 mg/ml. Los límites de confianza se establecieron en rangos bastante estrechos para todos los casos.

En la tabla 6 se presentan los valores de  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ , con sus límites de confianza, en 24 h de exposición de los extractos crudos de espigas maduras y plantas *in vitro* sobre el estadio adulto de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. De manera similar a lo ocurrido con los estadios larvales, en el caso de espigas maduras los extractos alcanzaron un patrón de efectividad ligeramente superior sobre los de plantas *in vitro*. Así, 50% de mortalidad de adultos se alcanzó utilizando 0,041 mg/ml de espigas maduras, respecto a 0,048 mg/ml de plantas *in vitro*, en tanto que 90% de mortalidad de adultos se alcanzó utilizando 0,051 mg/ml de espigas maduras, respecto a 0,065 mg/ml de plantas *in vitro*. En *An. pseudopunctipennis*, en el caso de espigas maduras los extractos alcanzaron un patrón de efectividad ligeramente superior sobre los de plantas *in vitro*. Así, 50% de mortalidad de adultos se alcanzó con 0,047 mg/ml de espigas maduras, respecto a 0,055 mg/ml de plantas *in vitro*, en tanto que 90% de mortalidad de adultos se alcanzó con 0,064 mg/ml de espigas maduras, respecto a 0,078 mg/ml de plantas *in vitro*. Los límites de confianza se establecieron en rangos bastante estrechos para todos los casos.

## Discusión

Trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo con extractos crudos de diversas partes de plantas silvestres adultas (raíces, hojas, tallos y espigas maduras) y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum*, obtenidos por decocción y varias clases de solventes (MeOH, EtOH, AcOEt y DCM:MeOH), y ensayos sobre larvas de *D. saccharalis* (Soborón et al. 2006) y hongos dermatofitos (Palacios et al. 2009), determinaron que el extracto crudo con mayor actividad biocida fue el obtenido de espigas maduras y de plantas *in vitro* completas, mayores de 6 meses de edad y extraído con EtOH y DCM:MeOH (2:1), razón por la cual, en el presente trabajo se siguió un procedimiento similar utilizando DCM:MeOH (2:1) como único solvente de extracción.

En general, en el trabajo que se presenta, se estableció una relación directa entre la toxicidad del extracto crudo de espigas maduras y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* con la concentración del extracto y el tiempo de exposición sobre los estadios biológicos de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. Tal como lo expresan los valores de mortalidad en las tablas y los valores de  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ , los extractos crudos de espigas maduras exhibieron una mayor toxicidad que los extractos crudos de plantas *in vitro*, que el estadio larval II fue más susceptible que el estadio larval III y que éstos lo fueron respecto al estadio adulto y que tanto los estadios larvales y adulto de *Ae. aegypti* fueron más susceptibles que los correspondientes a *An. pseudopunctipennis*. Por otro lado, si bien es cierto que el extracto crudo de plantas *in vitro* exhibió una menor toxicidad respecto a los extractos crudos de espigas maduras, esta metodología se presenta como una posibilidad para biosintetizar los principios activos a gran escala mediante la inducción de callos y el establecimiento de suspensiones celulares (Danelutte et al. 2005, Kato & Furlan 2007).

En relación a la caracterización de los criaderos larvales, el hábitat de las larvas de *Ae. aegypti* fue en especial de aguas claras, de uso doméstico, domiciliar y peridomicilar, procedentes de agua potable y agua de noria, contenidas en cántaros y macetas, con 50% de preferencia por las tinajas de arcilla, lo que señala su condición altamente doméstica, tendencia antropofílica del adulto, mejores condiciones para la ovipostura y alta sensibili-

dad de las larvas a la luz solar. En el caso de *An. pseudopunctipennis*, las larvas se desarrollaron en hábitats de aguas con poca corriente o lénticas (brazos de ríos, acequias y pozos), con presencia de algas filamentosas, vegetación circundante y una fauna variada de arácnidos e insectos acuáticos; éstos lugares resultan ideales para la oviposura, protección y sustrato de adherencia de las larvas (CICE, 2000). Las larvas de *Anopheles* fueron encontradas conviviendo con larvas de *Cx. quinquefasciatus* y contrariamente a lo reportado por Consoli & Lourenço de Oliveira (1994), en lugares de elevada descomposición orgánica. Con certeza, los lugares con alto deterioro ambiental, inundaciones, deforestación, migración humana y pobreza creciente en las zonas urbanas, conllevan a la aparición de nuevos lugares de reproducción de vectores y al consecuente incremento de la transmisión del dengue y la malaria (Githeco et al. 2001).

Por otro lado, se conoce que numerosas especies de varias familias vegetales se han utilizado en el control de diversos insectos responsables en la transmisión de enfermedades o como plagas en todos los cultivos del mundo. Entre estas familias destaca la Piperaceae, especialmente los miembros del género *Piper* (Bernard et al. 1995). Así tenemos que *P. guineense* y *P. nigrum*, se utilizan como insecticidas y molusquicidas en diferentes lugares del África (Ivbijaro & Bolaji 1990); las especies de la India *P. longum*, *P. betle*, *P. peepuloides* y *P. cubeba* demostraron actividad insecticida contra mosquitos y moscas (Miyakado et al. 1989) y *P. umbellatum*, *P. hispidum* y *P. auritum*, nativas de América Central y el Noroeste de la Amazonía, son utilizados por las poblaciones indígenas para prevenir la malaria (Schultes 1980). Algunas especies, como *P. aduncum*, *P. aequale*, *P. hispidum*, *P. reticulatum* y *P. tuberculatum*, que ocurren en el Perú, presentan significativa actividad en el control del mosquito *Aedes* (Bernard et al. 1995). Las amidas presentes en *P. guanacastensis* mostraron actividad insecticida contra *Ae. atropalpus* (Pereda-Miranda et al. 1997). Extractos etanólicos de *P. longum*, *P. ribesoides* y *P. sarmentosum*, colectados en Tailandia, fueron ensayados con éxito en el control de *Stegomyia aegypti* (= *Ae. aegypti*) (Choochote et al. 2006) y extractos etanólicos de frutos de las especies de *P. longum* y *P. nigrum* (var. Blanco y Negro), colectados en la India, mostraron una fuerte actividad in-

secticida contra *Ae. aegypti* (Kumar et al. 2010).

Referente a *P. tuberculatum*, 100 mg/l de extracto crudo hexánico de hojas indujo una mortalidad de 54% en larvas de estadio II de *Ae. atropalpus*, después de 24 h de exposición (Bernard et al. 1995); los autores atribuyeron la toxicidad del extracto a la presencia de la amida isobutílica 4,5-dihidropiperlonguminina, puesto que 0,01 mg/l de la sustancia pura indujo una mortalidad larval de 47%, en el mismo tiempo de exposición. Comparando éstos resultados, en nuestro trabajo se demostró que concentraciones tan bajas como 0,01562 mg/ml, para extractos de espigas maduras, y 0,02735 mg/ml, para extractos de plantas *in vitro*, indujeron una mortalidad superior a 50%, en los estadios larvales II y III de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. Esta abrumadora diferencia puede atribuirse a que el extracto crudo de hojas de *P. tuberculatum* tiene una presencia restringida de amidas y de otros compuestos con actividad insecticida, tal como fue demostrado por Soberón et al. (2006), trabajando con el III estadio larval de *D. saccharalis*, donde los extractos crudos de hoja no ejercieron efecto alguno. En otro trabajo, utilizando extractos EtOH de hojas y tallos de *P. tuberculatum* y extractos AcOEt de semillas de *P. guineense* y *P. nigrum* sobre el IV estadio larval de *Ae. atropalpus*, se demostró que la concentración efectiva (EC) para 50% de mortalidad se alcanzó en un rango de 0,8 a 2,4 µg/ml (0,0008 a 0,0024 mg/l) en 24 h de exposición (Scott et al. 2002), que si bien es cierto resultaron inferiores a las LC<sub>50</sub> de nuestro trabajo (0,01562 mg/ml, para extractos de espigas maduras, y 0,02735 mg/ml, para extractos de plantas *in vitro*), habría de considerar que nuestras evaluaciones se realizaron en 2 h y 30 min de exposición; en el mismo trabajo se reportó que en las combinaciones ternarias y cuaternarias se alcanzó más de 50% de mortalidad respecto a las combinaciones binarias de las amidas 4,5-dihidropiperlonguminina, piperlonguminina, 4,5-dihidropiperina y piperina. Por otro lado, los extractos EtOH de frutos de *P. nigrum* var. Blanco fueron 7 y 47% más tóxicas respecto a los extractos EtOH de frutos de *P. nigrum* var. Negro y *P. longum*, respectivamente, sobre el III estadio larval de *Ae. aegypti*; los extractos de las especies ensayadas fueron 11-25 veces más tóxicas sobre el III estadio larval en comparación con el IV estadio larval y las concentraciones letales 50% y 90% fueron 0,022; 0,015 y 0,016 mg/l y 0,054;

0,034 y 0,046 mg/ml, respectivamente, para *P. longum*, *P. nigrum* var. Blanco y *P. nigrum* var. Negro, respectivamente, sobre el III estadio larval (Kumar et al. 2010); éstos valores resultaron muy superiores si consideramos que en nuestro trabajo se alcanzó un 50% de mortalidad (LC<sub>50</sub>) con 0,01562 mg/ml, para extractos de espigas maduras, y 0,02735 mg/ml, para extractos de plantas *in vitro*. Asimismo, extractos EtOH de frutos, tallos y plantas completas de *P. longum*, *P. ribesoides* y *P. sarmentosum*, respectivamente, fueron ensayados en el control de hembras adultas de *Stegomyia aegypti* (= *Ae. aegypti*), determinándose valores LC<sub>50</sub> de 0,14; 0,15 y 0,26 µg/mg del insecto (0,00014; 0,00015 y 0,00026 mg/mg del insecto), en 24 h de exposición (Choochote et al. 2006), valores muy difíciles de correlacionar con nuestros resultados, pero que con certeza fueron concentraciones significativamente bajas.

Pero no solamente la familia Piperaceae ha mostrado acción insecticida puesto que extractos obtenidos de especies de otras familias vegetales como *Paullinia clavigera* var. *bullata* (Sapindaceae) y *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae), ensayados sobre el III estadio larval de *An. benarrochi*, en 24 h de exposición, alcanzaron 100% de mortalidad en concentraciones de 10 y 20% de *Pa. clavigera* y 10% de *T. zebrina*; *Pa. clavigera* mostró más eficiencia insecticida sobre *An. benarrochi* en comparación con *T. zebrina* en términos de LC<sub>50</sub> de 1 a 12 h de exposición; sin embargo, a 24 h los valores de LC<sub>50</sub> fueron similares (*Pa. clavigera*, LC<sub>50</sub>= 0,81% y *T. zebrina* LC<sub>50</sub>= 0,86 %) (Pérez & Iannacone 2004). Extractos metanólicos de hojas de *Atlantia monophylla* (Rutaceae) se evaluaron sobre estadios larvales y pupales de *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi* y *Ae. aegypti*, en 24 h de exposición, estableciéndose que para los estadios larvales los valores de LC<sub>50</sub> fueron 0,14; 2,03 y 0,09 mg/l, respectivamente, en tanto que para los estadios pupales los valores de LC<sub>50</sub> fueron 0,07; 0,05 y 0,07 mg/l, respectivamente (Sivagnaname & Kalyanasundaram 2004). De igual manera, extractos etanólicos de diversos órganos de *Annona muricata* (Annonaceae), ensayados sobre larvas del IV estadio de *Ae. aegypti*, alcanzaron 100% de mortalidad con extractos de semillas 0,5, flores 10 y hojas 100 mg/ml, en 24, 48 y 36 h de exposición, respectivamente (Bobadilla et al. 2005). También, extractos acuosos y con solventes polares y no polares de *Solanum villosum* (Solana-

ceae), se ensayaron sobre estadios larvales de *Stegomyia aegypti* (= *Ae. aegypti*), estableciéndose que en 72 h de exposición la más alta mortalidad se alcanzó con 0,5% de extracto acuoso, en tanto que similar tasa de mortalidad se alcanzó con 50 ppm (mg/l) de extracto cloroformo:metanol (1:1) (Chowdhury et al. 2008). Asimismo, extractos de aceites esenciales de *Capsicum annum* (Solana-ceae), *P. nigrum* (Piperaceae) y *Z. officinale* (Zingiberaceae), ensayados sobre adultos de *An. gambiæ*, en 3 min de exposición, alcanzaron más de 95% de mortalidad en concentraciones de 7,8 y 3,9% de *Ca. annum* y *Z. officinale* y 70%, en las mismas concentraciones, de *P. nigrum* (Foko et al. 2011). Si comparamos estos resultados con los mostrados en el trabajo que se presenta, se confirmará que si bien es cierto que los extractos evaluados ejercieron una acción insecticida, en la mayoría de los casos fue necesario utilizar concentraciones muy altas y con tiempos prolongados de exposición que con excepción del trabajo de Sivagnaname & Kalyanasundaram (2004), no se conoce el efecto incidental de estos extractos sobre la vida silvestre.

El uso de extractos vegetales crudos tiene una profunda significación y ventaja ecológica puesto que por ser fuente de una complejidad de moléculas muestra diversas bioactividades, lo que eleva los niveles de toxicidad en relación a los compuestos individuales químicamente puros, a lo que se suma el riesgo de inducir resistencia (Bobadilla et al. 2005). Como es conocido, la fitoquímica del género *Piper* ha revelado la ocurrencia de diversos compuestos como alcaloides, fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, terpenos, flavononas, entre otros (Parmar et al. 1997, Kato & Furlan 2007), aún cuando solamente los lignanos y las amidas, en especial las isobutílicas y las piperídnicas, han demostrado potencial actividad insecticida hasta la fecha (Navickiene et al. 2007). Muchos de los compuestos químicos mencionados sinergizan insecticidas naturales y sintéticos (Bernard et al. 1995), por ejemplo, el fenilpropanoide dillapiol sinergiza no solamente con las piretrinas sino también con carbamatos y organocloratos (Parmar & Tomar 1983). Recientemente, se ha propuesto como estrategia de trabajo el uso de extractos heterogéneos de toda la biomasa de la planta, para inducir un efecto sinérgico sobre algún organismo específico (Leatemala & Isman 2004). Al respecto, la combinación cuaternaria de

amidas de *P. tuberculatum*, sobre larvas de *Ae. atropalpus*, alcanzó 84% de mortalidad, resultando de mayor toxicidad que las combinaciones terciarias, binarias e incluso de las amidas ensayadas de manera individual (Scott et al. 2002), demostrando la significación ecológica del sinergismo entre las piperamidas, en tanto que en el control del IV estadio larval de *Anticarsia gemmatalis*, se reportó que los extractos crudos de semillas, hojas y tallos, causaron 80% de mortalidad con 800 µg/insecto y las amidas pillitorina y 4,5-dihidropiperlonguminina causaron 100% de mortalidad con 200 y 700 µg/insecto (Navickiene et al. 2007), lo que de alguna manera confirmó la importancia de utilizar extractos crudos.

Se conoce muy poco sobre cómo estaría operando la 4,5-dihidropiperlonguminina y otras amidas relacionadas sobre el II y III estadio larval y estadio adulto de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*; sin embargo, se atribuye su toxicidad a la presencia en su estructura molecular del anillo metilenedioxifenil (MDP) (Bernard et al. 1995), tal como se reportó para otros compuestos de estructura química similar como piperocida, guineensinamida, guineensina, pellitorina y kalecida, aisladas de *P. guineense* y muy activas en el control de adultos de *Musca domestica* (Gbewonyo et al. 1993). Adicionalmente, las piperaminas presentan actividad biológica dual, como neurotóxico, afectando la actividad del sistema nervioso central y como inhibidor del citocromo P450; éstas características son útiles para las especies de *Piper* puesto que constituyen una estrategia de defensa contra los animales herbívoros (Navickiene et al. 2007). Observaciones microscópicas han revelado la ocurrencia de una deformación estructural, a manera de plegamiento, en la membrana interna de la papila anal de las larvas, sugiriéndose como el sitio probable de acción de los extractos de *Piper* (Kumar et al. 2010). Por otro lado, 4,5-dihidropiperlonguminina, al igual que otras isobutilamidias alquil y olefínicas, se encuentra restringida a miembros de muy pocas familias de gran presencia en los trópicos húmedos como son las Piperaceae, Asteraceae y Rutaceae, donde la herbivoría es una potente fuerza selectiva. Las isobutilamidias aisladas en Piperaceae tienen bajo peso molecular, contienen un único átomo de nitrógeno y se presume que no sería “costosa” su biosíntesis (Greger 1988), lo que significa que es posible biosintetizar a gran escala los metabolitos secunda-

rios de *P. tuberculatum* mediante el establecimiento de suspensiones celulares, tal como se viene realizando en varias especies de importancia medicinal (Yeoman & Yeoman 1996). En el caso de especies de *Piper*, en suspensiones celulares de *P. cernuum* fueron producidas las feniletilaminas dopamina y tiramina, y en *P. crassinervium* predominaron cuatro alkamidias, entre ellas la inédita 2,3,4-trimetoxi-N-metil-aristolactamano, en tanto, que en plantas adultas fenilpropanoides y ácidos benzoico prenilados, respectivamente, fueron los mayores compuestos detectados (Danelutte et al. 2005, Kato & Furlán 2007). Adicionalmente, utilizando el método HPLC en fase reversa fueron detectadas las amidas antifúngicas e insecticidas dihidropiplartina, piplartina,  $\Delta\alpha,\beta$ -dihidropiperina y pellitorina en plantas *in vitro* y callos de *P. tuberculatum* (Navickiene et al. 2003). Estos trabajos reafirman la importancia de varias modalidades de los cultivos *in vitro* en la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios.

## Conclusiones

Los resultados de la presente investigación mostraron que los extractos crudos DCM:MeOH (2:1) de inflorescencias de plantas silvestres y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* ejercieron un efecto insecticida sobre larvas del estadio II, III y adultos de los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*, vectores del dengue y malaria, respectivamente. Los extractos de inflorescencias mostraron un mayor efecto biocida respecto al extracto de plantas *in vitro*, el estadio larval II mostró mayor susceptibilidad respecto al estadio larval III, en ambas especies; ambos estadios larvales fueron más susceptibles respecto al estadio adulto, en ambas especies, y entre especies, *Ae. aegypti* fue más susceptible que *An. pseudopunctipennis*.

## Referencias

- Bernard CB, Krishnamurty HG, Chauret D, Durst T, Philogène BJR, Sánchez-Vindas I, Hasbun C, Póveda L, San Román L & Arason JT. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology* 21: 801-814.
- Bobadilla M, Zavaleta F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J & Taramona L. 2005. Evaluación larvicida de suspensiones celulares acuosas de *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus. *Revista Peruana de Biología* 12: 145-152.

- Brako L & Zarucchi JL. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden. 1286 p.
- Busvine JR 1957. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. 2da Ed. Commonwealth Agriculture Bureaux. London. Pp. 267-268.
- Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA & Santana EWP. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 541-544.
- Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, Rattanachanpichal E, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, Champakaew D, Tuetun B & Pitasawat B. 2006. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three Piper sp. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48: 33-37.
- Chowdhury N, Ghosh A & Chandra G. 2008. Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 8: 62.
- Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH & Chen WJ. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource. Technology* 89: 99-102.
- CICE (Centro de Investigación y Capacitación de Entomología). 2000. Preferencia aédica de recipientes. Sub Región de Salud Luciano Castillo Colonna. Boletín II. Sullana, Piura. 2 pp.
- Consoli R & Lourenço de Oliveira R. 1994. Principais mosquitos de importancia sanitária no Brasil. Edit. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Danelutte AP, Costantin MB, Delgado GE, Braz-Filho R & Kato MJ. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (6B): 1425-1430.
- Das NG, Goswami D & Rabha B. 2007. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. *Journal of Vector Borne Diseases* 44: 145-148.
- Estrada-Franco JG & Craig GB. 1995. Biología, Relaciones con Enfermedades y Control de *Aedes albopictus*. Cuaderno Técnico 42. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. (Spanish version of technical paper #42).
- Foko GA, Tamesse JL & Fekam F. 2011. Adulticidal effects of essential oils extracts from *Capsicum annum* (Solanaceae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) on *Anopheles gambiae* (Diptera-Culicidae), vector of malaria. *Journal of Entomology* 8: 152-163.
- Gbewonyo WSK, Candy DJ & Anderson M. 1993. Structure-activity relationships of insecticidal amides from *Piper guineense* root. *Journal of Pest Science* 37: 57-66.
- Githco A, Lindsay S, Confalonieri U & Patz J. 2001. Salud y Medio Ambiente. El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: Análisis regional – OMS – 2000. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. Recopilación de artículo N° 4, pp.72-73.
- Goode W & Hatt P. 1986. Métodos de Investigación Social. Decima Cuarta Reimpresión. Trillas S.A. México. 235 pp.
- Gorham JR, Stojonovich CJ & Scott HG. 1973. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Occidental. *Mosquito Systematics* 5: 97-139.
- Greger H. 1988. Comparative phytochemistry of the alkaloids. In *Chemistry and Biology of Naturally Occurring Acetylenes and Related Compounds. Bioactive Molecules* (Lam J, Breteler H, Arnason T & Hansen I, eds.). Vol. 7. Elsevier, Amsterdam, pp. 159-178.
- Harve G & Kamath V. 2004. Larvicidal activity of plant extracts used alone and in combination with known synthetic larvicidal agents against *Aedes aegypti*. *Indian Journal of Experimental Biology* 42: 1216-1219.
- Ivbijaro MF & Bolaji OO. 1990. Effects of cypermethrin + dimethoate and extracts of *Piper guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and yield of cowpea, *Vigna unguiculata*. *Journal of Agricultural Science* 115: 227-231.
- Kato MJ & Furlan M. 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* 79: 529-538.
- Klein TA, Lima JB, Tada MS & Miller R. 1991. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45: 463-470.
- Kumar S, Warikoo R & Wahab N. 2010. Larvicidal potential of ethanolic extracts of dried fruits of the three species of peppercorns against different instars of an Indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera. Culicidae). *Parasitology Research* 107: 901-907.
- Leatemia J & Isman B. 2004. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 150-158.
- Lin CY, Wu DC, Yu JZ, Chen BH, Wang CL & Ko WH. 2009. Control of silverleaf whitefly, cotton aphid and kanzawa spider mite with oil and extracts from seeds of sugar apple. *Neotropical Entomology* 38: 531-536.
- Mabberly DJ. 1997. The Plant-book. A Portable Dictionary of the Higher Plants. Cambridge University Press, New York, USA.
- Matowo J, Kulkarni MA, Mosha FW, Oxborough RM, Kitau JA, Tenu F & Rowland M. 2010. Biochemical basis of permethrin resistance in *Anopheles arabiensis* from Lower Moshi, north-eastern Tanzania. *Malaria Journal* 9: 193-201.
- Miranda JEM, Navickiene HMD, Nogueira-Couto RH, De Bartolo S, Kato MJ, Bolzani VS & Furlan M. 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie* 34: 409-415.
- Miyakado M, Nakayama I & Ohno N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides: From natural products to agrochemical leads. In *Insecticides of Plant Origin* (Arnason JT, Philogène BJR & Morand P, eds.). ACS

- Symposium Series 387, American Chemical Society, New York, pp. 183-187.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Navickiene HMD, Bolzani VS, Kato MJ, Pereira AMS, Bertoni BW, França SC & Furlan M. 2003. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 14: 281-284.
- Navickiene HMD, Miranda JE, Bartoli SA, Kato MJ, Bolzani VS & Furlan M. 2007. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Pest Management Science* 63: 399-403.
- Nelson M. 1986. *Aedes aegypti*. *Biología y Ecología*. OPS/OMS. Washington, USA. 49 pp.
- Nongrados D, Castro J, Mariños C, Laguna A & Ríos R. 2000. Eficacia de *Bacillus sphaericus* 2362 en el control de larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* (Tehobal 1901) y *Culex quinquefasciatus* (Say 1823) en bioensayos de laboratorio. *Revista Peruana de Biología* 7: 176-190.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1992. Resistencia de los Vectores de Enfermedades a los Plaguicidas. 15º Informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de Vectores y Lucha Antivectorial (Serie de Informes Técnicos N° 818). Ginebra.
- Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J & Brogdon W. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica* 118: 37-44.
- Overgaard HJ, Sandve SR & Suwonkerd W. 2005. Evidence of anopheline mosquito resistance to agrochemicals in northern Thailand. *The Southern Asian Journal of Tropical and Public Health*. 36 Suppl. 4: 152-157.
- Palacios ZGF, Delgado GE, Moreno MC, Kato MJ & Rojas C. 2009. Actividad antifúngica in vitro de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. *Revista Peruana de Biología* 16: 209-214.
- Parmar BS & Tomar SS. 1983. Review of research on insecticide synergists in India – retrospect and prospect. *International Journal of Tropical Agricultural* 1: 7-17.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OM, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE & Boll PM. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Pereda-Miranda R, Bernard CB, Durst T, Arnason JT, Sánchez-Vindas P, Poveda L & San Román L. 1997. Methyl 4-hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoate, major insecticidal principle from *Piper guanacastensis*. *Journal of Natural Products*. 60: 282-284.
- Pérez D & Iannacone J. 2004. Efecto insecticida de sacha yoco (*Paullinia clavifera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) Commelinaceae en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. *Ecología Aplicada* 3: 64-72.
- Scott IM, Puniani E, Durst T, Phelps D, Merali S, Assabgui RA, Sánchez-Vindas P, Poveda L, Philogène BJR & Arnason JT. 2002. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. Extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology* 4: 137-144.
- Schultes RF. 1980. De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Commentationes XXVI. Ethnopharmacological notes on the flora of north-western South America. *Botanical Museum Leaflet Harvard University* 28: 1-45.
- Sivagnaname N & Kalyanasundaram M. 2004. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 115-118.
- Soberón GV, Rojas C, Saavedra J, Kato MJ & Delgado GE. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista Peruana de Biología* 13: 107-112.
- Vargas F, Córdova O & Alvarado A. 2006. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 23: 259-264.
- WHO (World Health Organization). 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphorous and carbamate insecticides. Unpublished document. WHO/VBC.81.806.
- WHO (World Health Organization). 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Geneva, Switzerland.
- WHO (World Health Organization). 2009. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Ginebra.
- WHO (World Health Organization). 2010. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report 2010. Ginebra. 238 pp.
- Yeoman MM & Yeoman CL. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *Tansley Review* N° 90. *New Phytologist* 134: 553-569.
- Yuncker TG 1973. The Piperaceae of Brazil II: *Piper* – Group V; *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* 3: 29-284.