

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REGULADORA DEL CRECIMIENTO DEL
ACEITE ESENCIAL *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) SOBRE EL
DESARROLLO DE *STEGOMYIA AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)**

SUGEY ORTIZ SERRANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REGULADORA DEL CRECIMIENTO DEL
ACEITE ESENCIAL *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) SOBRE EL
DESARROLLO DE *STEGOMYIA AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)**

SUGEY ORTIZ SERRANO

**Trabajo de Grado Modalidad Pasantía de Investigación para optar al título de
Bióloga**

**TUTOR
JONNY EDWARD DUQUE LUNA
Doctor en Ciencias Biológicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015**

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias, Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia “Francisco José de Caldas”, contrato RC-0572-2012-Bio-Red-CENIVAM por la financiación del proyecto.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales- CINTROP

Al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales- CENIVAM

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión- VIE de la Universidad Industrial de Santander por la financiación del Proyecto

Al profesor Jonny Edward Duque Luna por su apoyo incondicional como persona y como profesional

A todos los integrantes del grupo de trabajo, por sus aportes en mi formación y crecimiento como persona.

A la Escuela de Biología

A la Universidad Industrial de Santander

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional

A Alejandro por estar ahí siempre

A mis ángeles, siempre son muchos, aparecieron cuando los necesitaba

A Juliana Cuadros por su invaluable colaboración

A mis padres, Celso y Blanca Azucena

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
Competencias que desarrolló el Pasante	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 MATERIALES.....	19
2.1.1 Mantenimiento de colonia de <i>Stegomyia aegypti</i> , cepa Rockefeller	19
2.1.2 Aceite esenciales y Regulador del crecimiento de insectos	19
2.2 MÉTODOS.....	20
2.2.1 Bioensayos.....	20
2.2.1.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de <i>C. flexuosus</i> sobre <i>S. aegypti</i>	20
2.2.1.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en Adultos.....	21
2.2.1.2.1. Determinación del índice de desarrollo de <i>S. aegypti</i> bajo el efecto Del aceite esencial de <i>C. flexuosus</i>	22
2.2.1.2.2. Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de los Adultos.....	23
2.2.2 Análisis estadístico de los resultados	24
3. RESULTADOS	25
3.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de <i>C.</i> <i>flexuosus</i> sobre <i>S. aegypti</i>	25
3.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en Adultos.....	27
3.2.1 Determinación del índice de desarrollo de <i>S. aegypti</i> bajo el efecto del aceite esencial de <i>C. flexuosus</i>	31
Cálculo del índice de desarrollo	34
3.2.2 Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de los adultos ...	43
4. DISCUSIÓN.....	44
4.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de <i>C. flexuosus</i> Sobre <i>S. aegypti</i>	44

4.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en Adultos.....	44
4.2.1 Determinación del índice de desarrollo de <i>S. aegypti</i> bajo el efecto del aceite esencial de <i>C. flexuosus</i>.....	45
4.2.2 Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de los adultos ...	47
5. CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acetato de geranilo. Fuente: Quintans-Junior <i>et al.</i> , (2013)	20
Figura 2. Citral	20
Figura 3. Diflurobenzurona®	20
Figura 4. Medición de las partes esclerotizadas. A. diámetro de cabeza. B. longitud de sifón respiratorio (líneas rojas)	22
Figura 5. Medición de las distancias en las alas, se observa las medidas de A y B, utilizadas en la morfometría fluctuante. Imagen tomada de Junqueira (2006).....	23
Figura 6. Huevo expuesto a Diflurobenzurona® después de aclaramiento. Vista superior. C=Cabeza, T=tórax, A= Abdomen, O= Ojo. Fuente:	26
Figura 7. Huevos expuestos a aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> Después de aclaramiento. C=Cabeza, T=tórax, A= Abdomen, O= Ojo.	26
Figura 8. A. Larva eclosionada de huevos expuestos a 6 ppm de Diflurobenzurona®. Obsérvese el desprendimiento de la cápsula cefálica y la exposición de los tejidos cefálicos B. Larva eclosionada de huevos expuestos a Diflurobenzurona® a 6 ppm. Obsérvese el desprendimiento de la cápsula cefálica y adelgazamiento de los segmentos abdominales.	27
Figura 9. Larva eclosionada de huevo embrionado expuesto al blanco negativo ..	28
Figura 10. Presencia de atrofia en posición de ala de adulto tratado con aceite esencial a 30 ppm	28
Figura 11. Anormalidades en adultos emergidos de larvas tratadas con aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> a 30 ppm	29
Figura 12. Cantidad de emergencias de huevos tratados con aceite esencial	31
Figura 13. Diámetros de sifón de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> y su blanco negativo	32
Figura 14. Diámetros de cabeza de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> Citral ($p < 0,15446$)	32

Figura 15. Diámetros de sifón de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario citral.	33
Figura 16. Diámetros de cabeza de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Acetato de geranilo	33
Figura 17. Diámetro de sifón de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Acetato de geranilo.....	34
Figura 18. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> . A. Cantidad de empupamientos por día. B Porcentajes de empupamiento de larvas	35
Figura 19. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales de componente mayoritario del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , Citral. A. Cantidad de empupamientos por día. B. Porcentajes de empupamiento de larvas	36
Figura 20. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , Acetato de geranilo. A. Cantidad de empupamientos por día. B. Porcentajes de empupamientos de larvas	38
Figura 21. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> . A. Cantidad de imagos por día. B. Porcentaje de imagos por concentración..	39
Figura 22. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , Citral. A. Cantidad de imagos por día. B. Porcentaje de imagos por concentración..	40
Figura 23. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> , Acetato de geranilo. A. Cantidad de imagos por día. B. Porcentaje de imagos por concentración..	41
Figura 24. Estructura molecular de la hormona juvenil. Tomado de Blum (1985)	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje de eclosión de los huevos expuestos al aceite esencial.....	25
Tabla 2. Porcentaje de eclosión de los huevos expuestos a la Diflurobenzurona®	25
Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la emergencia de los huevos tratados con aceite esencial	30
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la emergencia de los huevos tratados con Diflurobenzurona® como control positivo	30
Tabla 5. Índice de desarrollo	42
Tabla 6. Ocurrencia de Asimetría fluctuante en adultos emergidos de larvas Expuestas a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	43

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REGULADORA DEL CRECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) SOBRE EL DESARROLLO DE *STEGOMYIA AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)¹

SUGEY ORTIZ SERRANO²

Palabras claves: Regulación del crecimiento, *Cymbopogon flexuosus*, *Stegomyia aegypti*, compuestos mayoritarios, citral, acetato de geranilo, Diflurobenzurona®

Se evaluó la actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y sus compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo a dosis sub-letales, sobre las fases de desarrollo de *Stegomyia aegypti*, utilizando la cepa susceptible Rockefeller CINTROP-UIS. Se alimentaron las hembras con sangre de rata para mantenimiento de la colonia y bioensayos. Para evaluar malformaciones se expusieron huevos embrionados a 6, 18 y 30 ppm del aceite comparándolos con huevos expuestos a Diflurobenzurona® a iguales concentraciones. Se calculó el porcentaje de eclosión bajo estos tratamientos. Para evaluar el aceite esencial y componentes mayoritarios se midió el diámetro de cabeza y sifón respiratorio del tercer instar larval, diariamente hasta su paso a pupa. Se cuantificó inhibición de la emergencia de adultos y el índice de crecimiento, malformaciones en larvas, pupas y adultos. Se evaluó asimetría fluctuante en ala. No se hallaron malformaciones en huevos expuestos al aceite, con porcentajes de eclosión del 43,33%, 85,5% y 78,33% en las concentraciones de 6, 18 y 30 ppm, en comparación al 23,33%, 18,33% y 31,67% de las concentraciones 6, 18 y 30 ppm de la Diflurobenzurona®. Se halló disminución del diámetro de cabeza y sifón. La mayor inhibición de emergencia de adultos fue 94,79% a 6 ppm, cercana a Diflurobenzurona® del 100%. Los mayores valores de índice de desarrollo para el acetato de geranilo significaron inadecuado proceso. Se presentaron malformaciones de tarso e irregularidades en la emergencia de adultos a 30 ppm del aceite esencial.

¹ Trabajo de Grado Modalidad Pasantía de Investigación.

² Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Tutor: Jonny Edward Duque Luna, Doctor en Ciencias Biológicas

ABSTRACT

EVALUATION OF GROWTH REGULATORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) ON DEVELOPING *STEGOMYIA AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)¹

SUGEY ORTIZ SERRANO²

Keywords: Growth regulation, *Cymbopogon flexuosus*, *Stegomyia aegypti*, major compounds, citral, geranyl acetate, Diflurobenzuron

Growth regulatory activity of essential oil of *Cymbopogon flexuosus* and its major compounds citral and geranyl acetate sub-lethal dose was evaluated on the development phases of *Stegomyia aegypti*, using the susceptible strain Rockefeller CINTROP-UIS. Females with rat blood for colony maintenance and bioassays were fed. To evaluate malformations embryonated eggs was exposed to 6, 18 and 30 ppm of oil compared with Diflurobenzurona® eggs exposed to equal concentrations. Hatching rate was calculated under these treatments. To evaluate the essential oil and major components diameter head and respiratory siphon third instar larvae was measured daily until passage pupa. Inhibition of adult emergence and growth rate, malformed larvae, pupae and adults were quantified. Hang fluctuating asymmetry was evaluated. No malformations in eggs exposed to oil, with hatching percentages of 43.33%, 78.33% and 85.5% at concentrations of 6, 18 and 30 ppm, compared to 23.33%, is found 18, 31.67% and 33% concentrations of 6, 18 and 30 ppm of Diflurobenzurona®. Decreased diameter of head and siphon was found. The greatest inhibition of adult emergence was 94.79% at 6 ppm, near 100% Diflurobenzurona®. Greater values development index geranyl acetate meant inadequate process. Tarsal malformations and irregularities in the emergence of adults at 30 ppm of essential oil is presented.

¹ Graduation Work Research Internship mode.

² Faculty of Science. School of Biology. Tutor: Jonny Edward Duque Luna, Doctor of Biological Sciences.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una amenaza epidemiológica. Se estima que aproximadamente 2,5 millones de personas presentan riesgo de contraerlo en más de 100 países tropicales y subtropicales (Protocolo de Vigilancia en Salud pública, junio 2014). Latinoamérica ha presentado epidemias en los últimos años. Durante el 2010 se presentaron brotes que superaron los datos históricos en el número de casos. Los países con brotes registrados fueron Bolivia, Brasil, Colombia, Guatemala, Honduras, Nicaragua, México, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, Venezuela y otros países y territorios en el Caribe inglés y francés (Protocolo de Vigilancia en Salud pública, junio 2014). De igual forma el virus de fiebre Chikungunya ya es transmitido de forma autóctona en gran parte del territorio colombiano (INS, Circular Externa del 8 de enero de 2015), a corte del 10 de noviembre de 2014 se había demostrado circulación viral en 26 entidades territoriales, así mismo se han notificado casos tanto sospechosos como confirmados por laboratorio (Atlántico, Antioquia, Barranquilla, Bolívar, Boyacá, Caldas, Cartagena, Cauca, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Guajira, Magdalena, Meta, Putumayo, Nariño, Norte de Santander, Sucre, Santander, Santa Marta, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca) (Boletín diario INS N.40 Noviembre 10 de 2014).

Según el Sistema de vigilancia en salud pública del Instituto Nacional de Salud de Colombia, hasta la semana epidemiológica 17 se ha notificado 35822 casos totales de dengue, 35073 (97,9%) de dengue y 749 (2,1%) de dengue grave, siendo ésta considerada como situación de alarma. El 45% de los casos de dengue se concentra en los menores de 14 años al igual que para el 57% del dengue grave. La incidencia nacional de dengue es de 134,1 casos por 100000 habitantes, cuya población en riesgo corresponde a la urbana del país (BES, semana epidemiológica número 17 de 2014), donde el 76.1% de los casos de dengue proceden de diez departamentos: Tolima, Valle, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Meta, Cesar, Huila, Antioquia y Putumayo (Protocolo de Vigilancia en Salud pública, Dengue, junio 2014).

Actualmente se reconocen cuatro serotipos denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 para el dengue. Los cuatro serotipos de virus de dengue pueden causar infección y enfermedad en el humano. La infección por un serotipo no produce inmunidad completa contra los demás y las personas que viven en áreas endémicas se pueden infectar sucesivamente por los cuatro serotipos a lo largo de sus vidas. Este último hecho es de gran importancia en la patogenicidad y las expresiones más graves de la enfermedad que son el dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue, surgiendo éstas a causa de infecciones sucesivas con distintos serotipos (Rossi & Almirón, 2004).

El dengue es transmitido por especies de mosquitos del género *Stegomyia* (*S. aegypti*, *S. albopictus*, *S. polynesiensis*, *S. scutellaris*) (Rossi & Almirón, 2004). Hasta ahora, la única forma de disminuir la incidencia de esta virosis es

controlar el vector (WHO, 2013). En Colombia, el principal vector, *Stegomyia aegypti*, se encuentra distribuido en todas las regiones del país con altitudes hasta los 2200 msnm, donde el control se ha ejercido a través de la utilización de insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos, principalmente, con efectos adversos sobre el ambiente y con reconocida generación de resistencia del vector hacia los mismos (Braga & Valle, 2007; Galvis & Soto-Giraldo, 2010; Santacoloma *et al.*, 2008, 2012), lo que hace estas prácticas inefectivas.

En la búsqueda de alternativas para las cuales el mosquito sea vulnerable a través del sistema de detoxificación, se ha encontrado que los aceites esenciales presentan propiedades repelentes, deterrentes, ovicidas, larvicidas, adulticidas (Prajapati *et al.*, 2005; Morales-Saldaña *et al.*, 2007; Coria *et al.*, 2008; Lucia *et al.*, 2007, 2011; Wahyui, 2012; Kim *et al.*, 2012; Tennyson *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2014), con CL₅₀ por debajo de 100 ppm y una composición altamente compleja por lo cual los vectores varían enormemente en respuesta y su sensibilidad, lo que se prevé que dificulta la aparición de resistencia (Regnault-Roger, 1997).

Particularmente el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* presenta las propiedades previamente nombradas y es un buen prospecto como base de un agente de control y/o apoyo al manejo del vector (Sharma *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2013). Ahora bien, se conoce el efecto de dosis letales de este aceite, pero la respuesta de las diferentes fases de desarrollo de *Stegomyia aegypti* a dosis sub-letales es desconocida. Se sabe que compuestos mayoritarios como el citral estimulan la oviposición e inhiben la eclosión de los huevos (Bentley & Day, 1989). El citral tiene la capacidad de desorganizar los microtúbulos del esqueleto celular, según el tiempo de exposición al mismo (Chaimovitsh *et al.*, 2010). Otro componente mayoritario, el isointermedeol puede activar las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis o muerte celular programada (Kumar *et al.*, 2008). En el caso del acetato de geranilo, que puede estar presente en la planta en un 20.08% (Sharma *et al.*, 2009) ha sido reportada su citotoxicidad ante células cancerígenas (Sharma *et al.*, 2009) Otros constituyentes mayoritarios, aunque en bajas proporciones, confieren actividad inmunoestimuladora ya sea el limoneno y actividad analgésica y anestésica ya sea el borneol (Sharma *et al.*, 2009).

En cuanto a la Asimetría fluctuante, ésta mide la estabilidad del desarrollo. La estabilidad de desarrollo (ED) se define como la capacidad de un organismo para producir un fenotipo predeterminado por un diseño corporal adaptativo bajo un conjunto de condiciones genéticas y ambientales específicas (Waddington (1942) en Benítez & Parra (2011)). Se refiere por tanto a las capacidades intrínsecas de un individuo para resistir accidentes y perturbaciones durante su crecimiento y desarrollo (Clarke (1998) en Benítez & Parra (2011)). De acuerdo a lo anterior, la Asimetría fluctuante es una medida de las pequeñas desviaciones al azar que ocurren entre el lado izquierdo y derecho de rasgos bilateralmente simétricos (Van Valen (1962) en Benítez & Parra (2011)).

Este trabajo pretendió determinar, identificar y describir posibles anomalías del desarrollo en las diferentes fases del vector, a través del análisis del efecto del aceite como regulador del crecimiento sobre *Stegomyia aegypti*, siendo evaluado en huevos embrionados, en el crecimiento de cabeza y sifón, desarrollo de pupas y asimetría fluctuante y anomalías morfológicas en adultos.

JUSTIFICACIÓN

Los productos químicos para control de vectores ya han mostrado desarrollo de resistencia en *Stegomyia aegypti* por su uso continuado (Braga & Valle, 2007). Entre las actuales estrategias alternativas que están llevando al decrecimiento del uso de insecticidas clásicos, el control ecoquímico basado en las relaciones planta-animal es uno de los métodos más promisorios. (Wahyui, 2012). Se sabe que es un limitado número de mecanismos en los insectos los que confieren la resistencia a los insecticidas organoclorados, organofosforados y los carbamatos (Hemingway, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantea como estrategia principal, describir las alteraciones del desarrollo que tienen lugar en cualquiera de sus etapas, cuando el vector crece bajo el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, del cual ya son reconocidas sus propiedades, siendo en este caso al nivel de sub-lethalidad dando una visión global del desempeño del aceite y de las posibles alteraciones del desarrollo bajo el efecto de semioquímicos. Este conocimiento puede ser útil en los programas del control del vector que utilizan métodos de control con derivados de plantas.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dosis sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre el desarrollo de *Stegomyia aegypti*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si se presentan malformaciones en el embrión de *Stegomyia aegypti* cuando son aplicadas concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*.

Identificar cambios morfológicos durante el desarrollo larvario de *Stegomyia aegypti* cuando son aplicadas concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*.

Describir las posibles malformaciones morfológicas de pupas cuando son aplicadas concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*.

Identificar variaciones morfométricas en las alas de los individuos adultos de *S. aegypti* cuando son aplicadas concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*.

Competencias desarrolladas en la Pasantía

1. Se entendió la importancia del control del vector *S. aegypti* como método para prevenir y vigilar la transmisión del dengue.
2. Se propusieron diseños metodológicos para identificar variaciones morfométricas cuando se aplican productos con acción inhibidora de metamorfosis en insectos.
3. Se reconoció la binomía de *Stegomyia aegypti*, así como el ciclo de vida y el mantenimiento de la colonia para la elaboración de los ensayos propuestos.
4. Se identificó cambios morfológicos y posibles variaciones morfométricas asociadas al efecto de las dosis sub-letales del aceite esencial *Cymbopogon flexuosus* sobre el desarrollo de *Stegomyia aegypti*.
5. Se analizó estadísticamente los resultados experimentales para dar una interpretación lógica.
6. Se socializó como ponencia en el 41 Congreso de SOCOLEN (Sociedad Colombiana de Entomología) en Cali, días 15 al 18 julio de 2014.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

Como parte importante de la Pasantía de Investigación, se elaboraron y ejecutaron una serie de protocolos que permitieron alcanzar los objetivos y las competencias propuestas.

2.1.1 Mantenimiento de colonia de *Stegomyia aegypti*, cepa Rockefeller (competencias 1- 3).

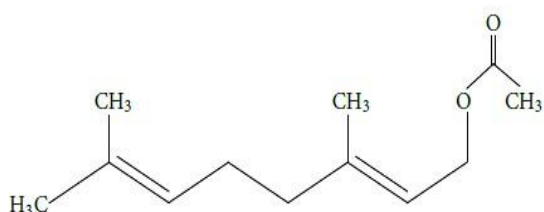
El Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales-CINTROP (Sede Parque Tecnológico Guatiguará-Piedecuesta) cuenta con una colonia de *Stegomyia aegypti*, cepa Rockefeller, mantenida en condiciones controladas ($T=24\pm 1$; $HR=75\pm 5\%$; fotoperíodo 12h), libre de cualquier infección. Los mosquitos adultos se mantuvieron en jaulas de cría, elaboradas en marco de madera de 45x45x45 cm, cubiertas con muselina blanca. Los machos adultos se alimentaron con una solución de agua-miel al 10% (100 gramos de miel/1000 mL de agua declorinada), la cual se cambió cada tercer día y las hembras se alimentaron de sangre para estimular la producción de huevos. Para ello, se empleó una rata tipo Wistar, suministrada por el Bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cada quince días o según la necesidad, previo consentimiento del comité de ética CEINCI-UIS, Acta No. 3 de 2013; la rata se sedó e introdujo durante 20 minutos en las cámaras de cría. Veinticuatro horas después se colocaron dispositivos de oviposición consistentes de un recipiente de 200 mL de boca ancha, dentro del cual se coloca papel filtro tipo Withman (diámetro 125 mm, grado 3 hW) doblado en forma de cono y humedecido con agua declorinada. El dispositivo se deja aproximadamente cuatro días. Los huevos se dejaron madurar aproximadamente 15 días, para posteriormente sumergirlos en agua declorinada durante 24 horas para su eclosión. Las larvas de primer instar se pasaron a bandejas plásticas de cría de 30x15x10 cm con capacidad para 1500 mL. Todos los instares larvales se alimentaron con concentrado para peces, siendo transferidas cuando llegaron a estadio de pupa (luego de 3-4 días) a las jaulas de cría en recipientes plásticos, donde emergieron los nuevos adultos.

2.1.2 Aceites esenciales y Regulador del crecimiento de insectos

El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y sus componentes mayoritarios Citral y acetato de geranilo, fueron suministrados por el CENIVAM-UIS (Figura 1-2). Para todas las diluciones se utilizó agua y Dimetil disulfóxido – DMSO.

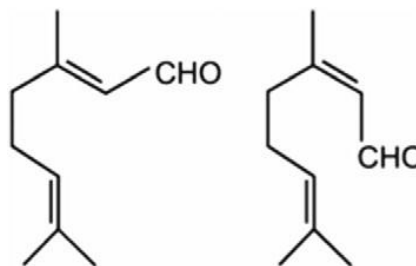
Compuestos Mayoritarios del Aceite Esencial de *Cymbopogon flexuosus*

Figura. 1. Acetato de geranilo



Fuente: Quintans-Junior *et al.*, (2013)

Figura. 2. Citral

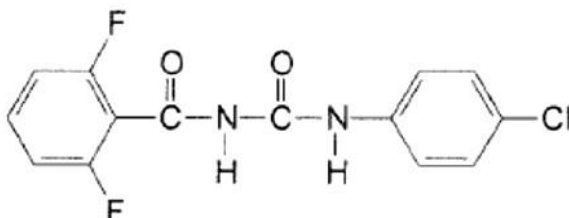


Fuente: Saddiq & Khayyat (2010)

Regulador del Desarrollo

Como control positivo para la prueba de la actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* se utilizó el regulador del crecimiento en insectos, Diflurobenzurona®, grado técnico (Figura.3). En todas las diluciones se utilizó como disolvente Dimetil disulfóxido-DMSO.

Figura .3. Diflurobenzurona®



Fuente: Ficha técnica Diflubensh 25 WP, Anasac Colombia

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Bioensayos

2.2.1.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de *C. flexuosus* sobre *S. aegypti* (competencia 4).

Inicialmente se establecieron las concentraciones del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* a evaluar teniendo en cuenta las dosis sub-letales pre-establecidas a partir de las CL₅₀ de Vera *et al.*, (2013). Se siguió la metodología modificada de Suman *et al.* (2013) y Leyva *et al.* (2013).

Se realizó modificación a la metodología inicialmente propuesta en cuanto a que sólo se expusieron huevos embrionados, ya que no fue posible obtener

huevos de menos de trece horas de puestos que corresponden a las características de huevos no embrionados. Huevos embrionados (que se han dejado incubar por 48 horas) fueron sometidos a las concentraciones diagnósticas 6,18 y 30 ppm por separado. Se hicieron cuatro réplicas del experimento. Para ello, se dispusieron recipientes de 200 mL de capacidad con 500 µl de aceite esencial en disolución, el volumen final fue de 100 mL. Se empleó un control negativo donde no se utilizó ningún tratamiento y un control positivo que fue Diflurobenzurona® a 6, 18 y 30 ppm (500µl). Todos los experimentos se realizaron tres veces y en días diferentes.

Después de siete días, los huevos no eclosionados de los tratamientos anteriores fueron aclarados con Hipoclorito de sodio, modificándose la concentración al 95% y el tiempo de exposición a dos horas. Posteriormente se lavaron con agua declorinada y se observaron al microscopio. Se buscaron posibles anomalías morfológicas como cambios en la cáscara del huevo, eclosión anormal o patrones deformados de desarrollo como los reportados por Suman *et al.* (2013). Como control positivo se utilizó los huevos tratados con el regulador de crecimiento de insectos Diflurobenzurona®, los cuales recibieron el mismo tratamiento de aclaramiento. Se registró el porcentaje de eclosión de los huevos y número de huevos con anomalías morfológicas para todos los tratamientos.

2.2.1.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en adultos.

Las larvas de cuarto instar, obtenidas de los huevos embrionados viables y de los controles del anterior experimento fueron observadas al microscopio para hallar posibles anomalías morfológicas como cabeza deforme en larvas, abdomen distendido en pupas, quimeras pupa-adulto, adultos parcialmente emergidos, adultos con tarsos deformados, anomalías reportadas por Giglio *et al.* (2012). La observación se realizó teniendo en cuenta el nivel de hidratación de las larvas. Se les permitió llegar hasta adulto.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la emergencia (IE%) mediante la siguiente fórmula (WHO 2005):

$$IE = \frac{100 - T \times 100}{C}$$

Donde T= porcentaje de sobrevivientes o adultos emergidos en los recipientes tratados. C=porcentaje de sobrevivientes o adultos emergidos en los controles.

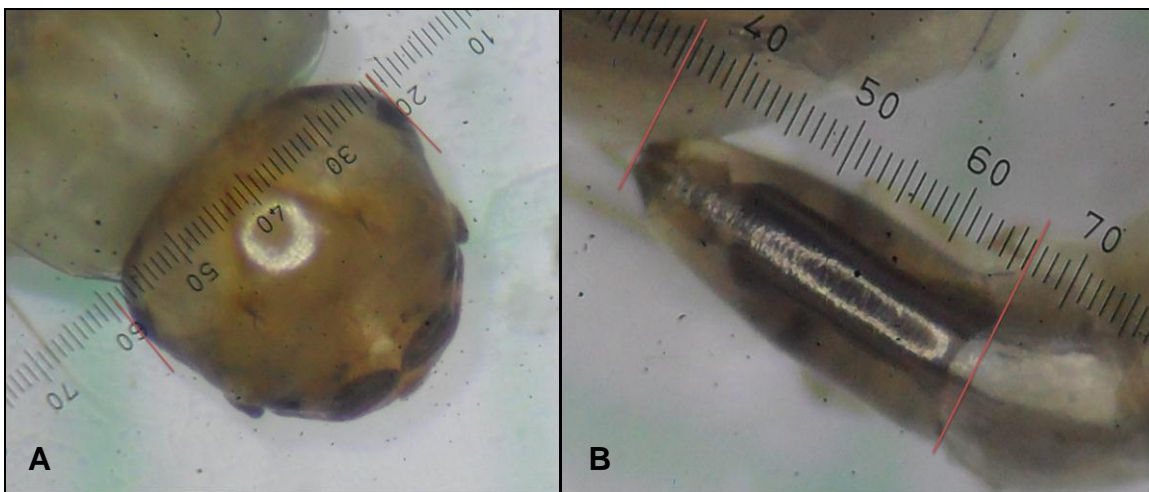
2.2.1.2.1 Determinación del índice de desarrollo de *S. aegypti* bajo el efecto del aceite esencial de *C. flexuosus*

Se modificó la metodología descrita por Ramar et al. (2013) y Arivori & Tennyson (2011). Se requirieron larvas entre tercer y cuarto instar, 40 larvas por concentración. Para ello, se emplearon recipientes de 200mL con 500 µL de aceite esencial de *C. flexuosus* para un volumen final de 100 mL. Adicionalmente, se evaluó el efecto de sus componentes mayoritarios: Citral y Acetato de Geranilo. Las concentraciones a evaluar en cada caso fueron 6, 18 y 30 ppm. Se realizaron cuatro réplicas y un control por cada concentración. El control consistió en DMSO al 0,5%. A todos los tratamientos se les suministró alimento para peces en dilución al 2%. Se llevó un registro diario de crecimiento de larvas, en el cual se midieron las partes más esclerotizadas: el diámetro de la cabeza y el largo del sifón respiratorio (Figura 4).

Se calculó promedios de todas las medidas tomadas por concentración y por tratamiento para cada estructura, ya fuera cabeza o sifón respiratorio. Posteriormente se evaluó la normalidad y el grado de confiabilidad de dichos promedios. De cada medición se realizó el registro fotográfico correspondiente. Adicionalmente, se registró la mortalidad larval, pupal, el porcentaje de pupación, la inhibición de emergencia del imago, período larval total en días, período pupal total en días, período total de desarrollo en días, además del índice de desarrollo (Arivori & Tennyson, 2011), donde:

$$\text{Índice de crecimiento} = \frac{\text{Porcentaje de la inhibición de la emergencia del adulto}}{\text{Porcentaje total de desarrollo en días}}$$

Figura. 4. Medición de las partes esclerotizadas de las larvas. A. diámetro de cabeza. B longitud de sifón respiratorio (líneas rojas)



2.2.1.2.2. Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de los adultos

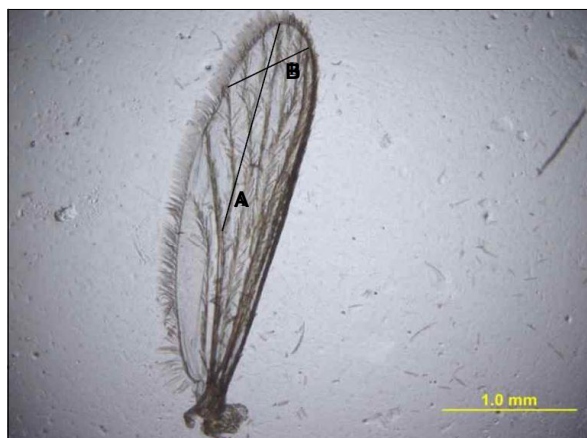
Para conocer el efecto de las concentraciones sub-letales en el desarrollo de los adultos, se siguió la metodología propuesta por Junqueira (2006). Se realizó un análisis morfométrico alar de los mosquitos adultos sobrevivientes a las diferentes concentraciones sub-letales. Se utilizaron machos y hembras. La selección de los individuos se hizo de manera aleatoria.

Cada ala fue fotografiada individualmente utilizando una cámara digital marca Samsung con resolución de 12.2 megapíxeles acoplada al estereoscopio marca Advanced Optical. Para esta prueba, se definieron cuatro puntos para la medición de las distancias en las alas donde generaron dos medidas. La medida "A" que es la distancia entre el punto de bifurcación de la nervadura CuA en las nervaduras CuA₁ y CuA₂ hasta el extremo de la nervadura R₄₊₅ en el margen del ala, la medida "B" es la distancia entre el punto de encuentro del extremo distal del nervio R₁ hasta el extremo de CuA₁ en el margen del ala (Figura 5). Las diferencias entre las medidas de los lados fueron consideradas para evaluar la ocurrencia de asimetría fluctuante (AF), que se calculó utilizando la siguiente fórmula según Junqueira (2006):

$$[(\sum|D-I|)/n]$$

Donde D es la medida del lado derecho y I es la medida del lado izquierdo, n es la cantidad de individuos utilizados.

Figura. 5. Medición de las distancias en las alas, se observa las medidas A y B, utilizadas en el cálculo de la asimetría fluctuante.



Fuente: Junqueira (2006)

2.2.2 Análisis estadístico de los resultados **(competencia 5)**.

Según el caso, cada uno de los conjuntos de datos obtenidos se utilizó para calcular los porcentajes de eclosión, emergencia, mortalidad y anormalidades morfológicas. En todos los casos, los cálculos se estimaron a partir del promedio de tres réplicas, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis por presentar n menores o iguales a 30 datos. En el caso de los compuestos mayoritarios, los cálculos se estimaron a partir del promedio de dos réplicas. En el caso del efecto de concentraciones sub-letales en adultos, para verificar si existía Asimetría Fluctuante inicialmente se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar si las medidas se ajustaban a la distribución normal y se utilizó el test t para verificar la presencia de asimetría direccional. El software que se utilizó para los análisis estadísticos fue *Statistica Release 11*.

3. RESULTADOS

3.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de *C. flexuosus* sobre *S. aegypti*

De la tabla 1 se puede decir, teniendo en cuenta el porcentaje de eclosión, que la concentración 18 ppm se comporta de manera similar al control negativo. En cuanto a las concentraciones 6 ppm y 30 ppm existe una disminución de la eclosión con respecto a las dos anteriores sin embargo el porcentaje de eclosión para 6 ppm es menor que para 30 ppm. En este caso la variación no es concentración-dependiente.

En cuanto al efecto de la Diflurobenzurona® (Tabla 2) se puede decir que es marcado pero es concentración-dependiente. La concentración 6 ppm del aceite tiene el efecto cercano al de la Diflurobenzurona®. Surge la inquietud del por qué 18 ppm no presenta comportamiento inhibitorio de la eclosión y por qué la eclosión aunque menor también se da a 30 ppm, siendo más inhibitorio de la eclosión 6 ppm según los datos.

Se registró el porcentaje de eclosión de los huevos (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1. Porcentaje de eclosión de los huevos expuestos al aceite esencial. KW, $H=(3, N=15)=12,41507$ $p<0,0061$. * indica que existen diferencias significativas

Concentración A.E. <i>C flexuosus</i> (ppm)	Media Huevos Eclosionados	%Eclosión	Desv. Estándar
0	14,333	95,556	±4,479
6 *	6,500	43,333	±2,828
18*	15,000	85,500	±5,127
30	11,000	78,333	±1,768

Tabla 2. Porcentaje de eclosión de los huevos expuestos a Diflurobenzurona® K W, $H=(3, N=15)=9,834275$ $p=0,0200$. * indica que existen diferencias significativas.

Concentración de Diflurobenzurona® (ppm)	Media Cantidad de huevos eclosionados	% Eclosión	Desviación Estántar
0*	15	100	±2,887
6	3,5	23,334	±0,577
18*	2,75	18,334	±1,258
30	4,75	31,667	±1,258

Los huevos expuestos a Diflurobenzurona® (Figura 6) y aclarados 7 días después, en ausencia de eclosión, no presentaron malformaciones al ser comparados con huevos control sumergidos en agua. Presentaron los tres segmentos corporales, cabeza, tres segmentos torácicos fusionados, abdomen formado por ocho segmentos, sifón respiratorio, como el patrón morfológico mostrado por Farnesi *et al.* (2009). De igual forma, los huevos expuestos al aceite esencial tampoco mostraron alguna anomalía morfológica cuando se compararon con los controles (Figura. 7). ○

Figura.6. Huevo expuesto a Diflurobenzurona®, después de aclaramiento. Vista superior. C= Cabeza, T= tórax, A= Abdomen, O= Ojo.



Figura.7. Huevos expuestos a Aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* después de aclaramiento. C= Cabeza, T= tórax, A= Abdomen, O= Ojo. Vista lateral.



3.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en adultos.

Se encontró que las larvas eclosionadas de los huevos tratados con Diflurobenzurona® no pasaron al segundo estadio de desarrollo, al llegar el momento de la muda perdían su cápsula cefálica sin que ésta se volviera a formar, quedando expuestos los tejidos blandos. Adicionalmente se observó la disminución de grosor de los segmentos abdominales (Figura.8). En la figura 9 se puede observar una larva L1 con cápsula cefálica y segmentos abdominales completamente formados.

Las larvas eclosionadas de los huevos tratados con las tres concentraciones del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, observadas al estereoscopio, no mostraron externamente ninguna anomalía en su desarrollo, fueron similares a las larvas del control negativo (agua + DMSO) (Fig. 9), en oposición a las larvas de control positivo con Diflurobenzurona®

Se pudo observar adultos parcialmente emergidos y adultos con tarsos deformados, emergidos de larvas expuestas a 30 ppm del aceite (10% de las larvas tratadas), anomalías como las reportadas por Giglio *et al.* (2012) (Fig.11).

Figura.8. A. Larva que eclosionada de huevos expuestos a Diflurobenzurona® a 6 ppm. Obsérvese el desprendimiento de la cápsula cefálica y la exposición de los tejidos cefálicos(flecha). **B.** Larva que eclosionada de huevos expuestos a Diflurobenzurona® a 6 ppm. Obsérvese el desprendimiento de la cápsula cefálica(flecha) y adelgazamiento de los segmentos abdominales

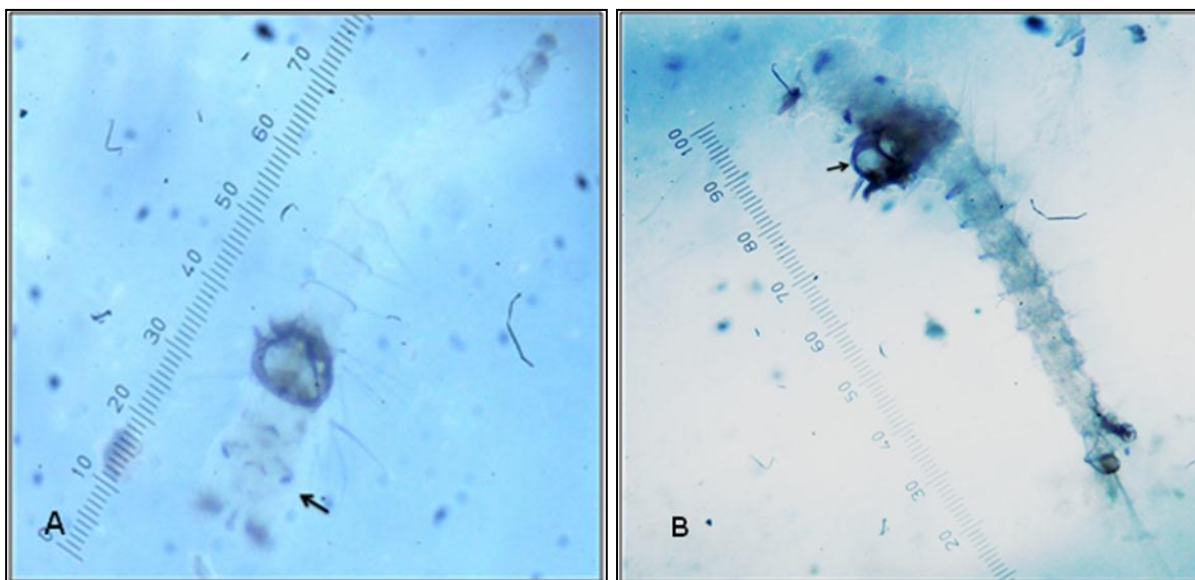


Figura.9. Larva eclosionada de huevo embrionado expuesto al blanco negativo.

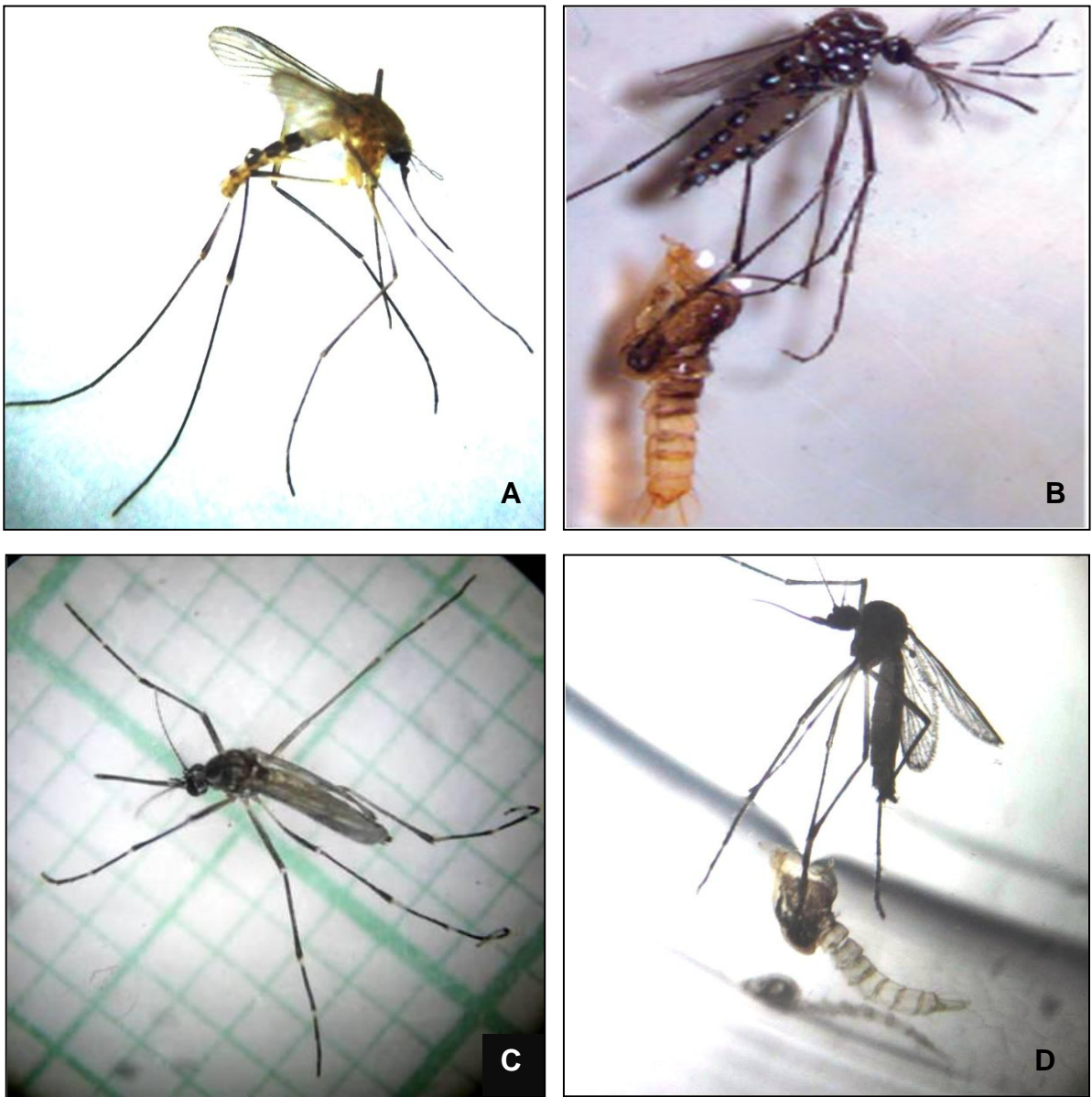


Figura.10. Presencia de atrofia en posición de ala, tratamiento aceite esencial a 30 ppm



La alteración de la simetría bilateral de ala sólo fue observada en un individuo emergido de larva expuesta al aceite esencial a 30 ppm (2,5%) (Fig.10). Si bien es el único caso presente, en la colonia en ningún momento se observó anomalías como ésta.

Figura 11. Anormalidades en adultos emergidos de larvas tratadas con aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* a 30 ppm. A Adulto control. B. Aspecto de adulto emergido de larvas expuestas a novaluron (Giglio *et al.*, 2012). C. Malformación en tarsos. D. Anormalidad en la emergencia similar a B.



Como parte de la determinación de los efectos sobre el desarrollo en huevos y adultos se calcularon porcentajes de inhibición de emergencia (IE%) de adultos:

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de la emergencia de los huevos tratados con aceite esencial. KW, $H=(3, N=15)= 13,07297$ $p<0,0045$. * indica diferencias significativas.

Concentración del A.E. (ppm)	Promedio de emergencias	%Emergencias	% Inhibición de la Emergencia	Desv. Estándar
*0	11,333	25,185	74,815	±0,943
*6	3,125	5,208	94,792	±2,652
18	7,875	13,125	86,875	±5,480
30	5,500	9,167	90,833	±2,475

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de la emergencia de los huevos tratados con Diflurobenzurona® como control positivo.

Concentración de Diflurobenzurona® (ppm)	Cantidad de Emergencias	% Emergencia	% Inhibición de la Emergencia	Desv. Estándar
0	12	26,667	73,333	±1,732
6	0	0	100	±0
18	0	0	100	±0
30	0	0	100	±0

Se encontró que el efecto de inhibición de la emergencia de adultos del aceite esencial sobre los huevos embrionados no es concentración-dependiente, se esperaba que 30 ppm presentara mayor inhibición que 6 ppm, sin embargo ocurre todo lo contrario (Tabla 3).

La inhibición se da con valores superiores al 50% correspondiéndose un buen desempeño teniendo en cuenta que el control positivo Diflurobenzurona® la presenta al 100% (Tabla 4).

3.2.1 Determinación del índice de desarrollo de *S. aegypti* bajo el efecto del aceite esencial de *C.flexuosus*

Analizando las gráficas, se observa que en el caso del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* no hubo una disminución concentración-dependiente de los diámetros de la cabeza en las tres concentraciones a las cuales se expuso las larvas tratadas, con respecto al control negativo, en este caso agua con DMSO. Se presentó un aumento en diámetro a 6 ppm. Las concentraciones 18 y 30 ppm se comportaron de manera similar entre ellas y con respecto al control, sin embargo su variación se dio entre ciertos límites, es decir que a pesar de comportarse como el control, las medidas estuvieron entre 0,360 y 0,380 mm, mientras el control estuvo en el rango de 0,355 a 0,387 mm (Figura 12).

En cuanto a su efecto en el diámetro del sifón, se observa que fue concentración-dependiente, se presentó disminución de diámetro con respecto al control negativo, a pesar de ello ni las medidas de cabeza ni las medidas de sifón muestran diferencias significativas (Figura13).

Figura 12. Diámetros(mm) de cabeza de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, y su blanco negativo. KW, H (3, N=15)= 3,368855, $p < 0,3382$.

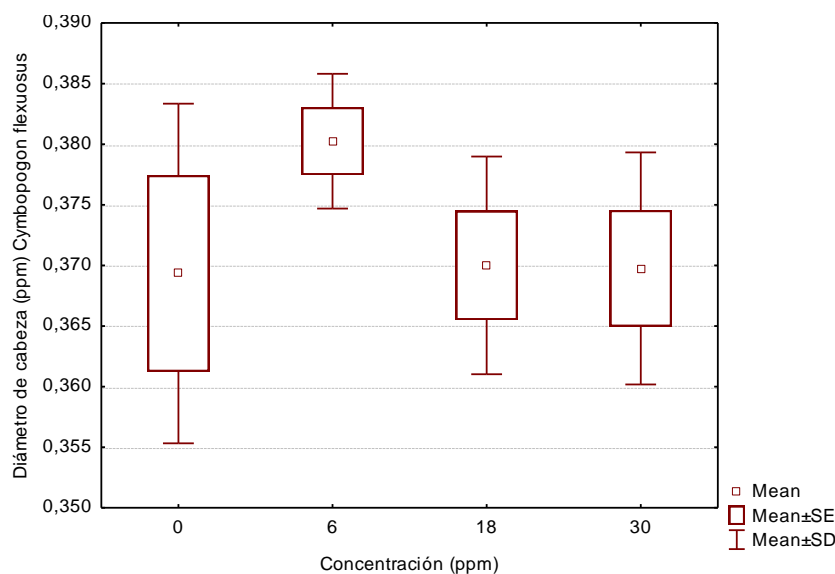


Figura 13. Diámetros (mm) de sifón de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, y su blanco negativo. KW, H (3, N=15) = 5,617323 $p < 0,1318$.

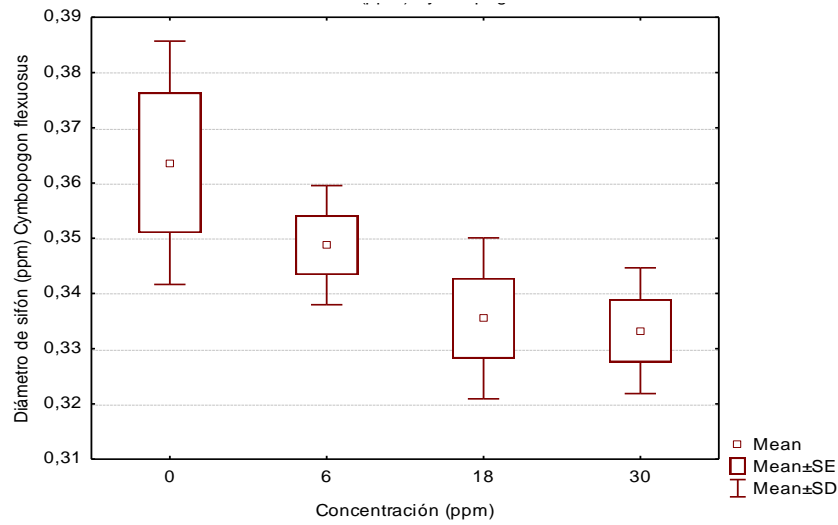
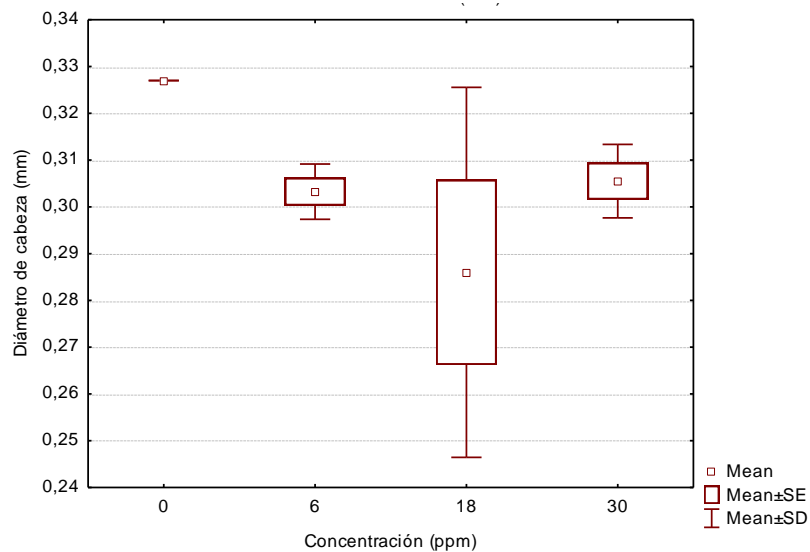


Figura 14. Diámetros (mm) de cabeza de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Citral. KW, H (3, N=15) = 6,943243, $P < 0,0737$.



Al comparar las medidas de cabeza de larvas expuestas al aceite esencial con las medidas de cabeza de larvas expuestas a los compuestos mayoritarios, citral y acetato de geranilo, se encuentra que el citral presenta medidas ligeramente menores que las presentadas por el control (cero)(Figura 14). En cuanto al acetato de geranilo (Figura 16) se presentó disminución del tamaño a 18 y 30 ppm y aumento a 6 ppm con respecto al control, sin embargo no hubo diferencias significativas.

Figura 15. Diámetros de sifón (mm) de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Citral. KW, H (3, N=15)=7,183213 $p < 0,663$

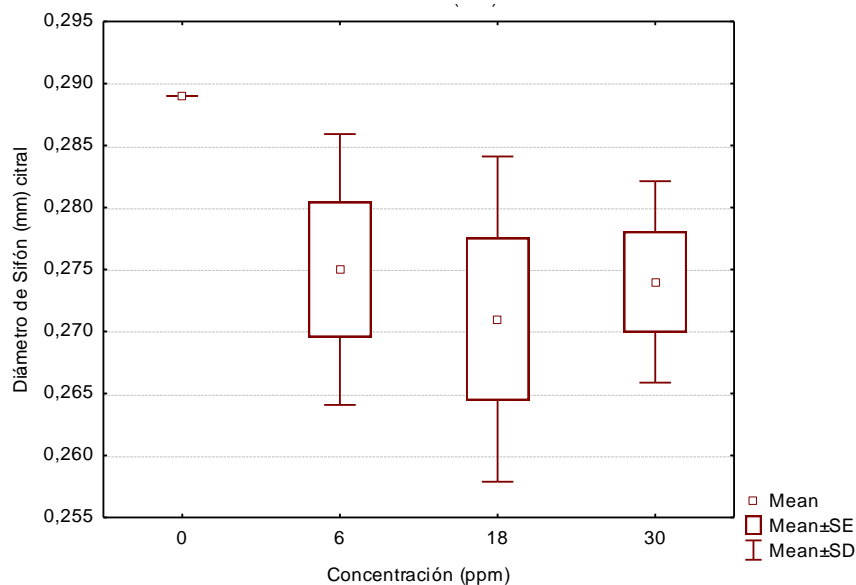


Figura 16. Diámetros de cabeza (mm) de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Acetato de geranilo. KW, H (3, N=15)= 2,228417 $p < 0,5264$.

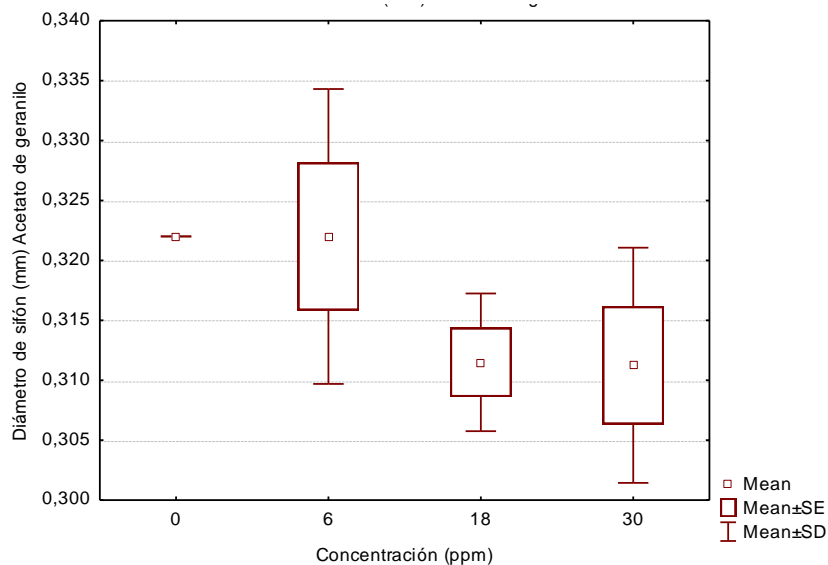
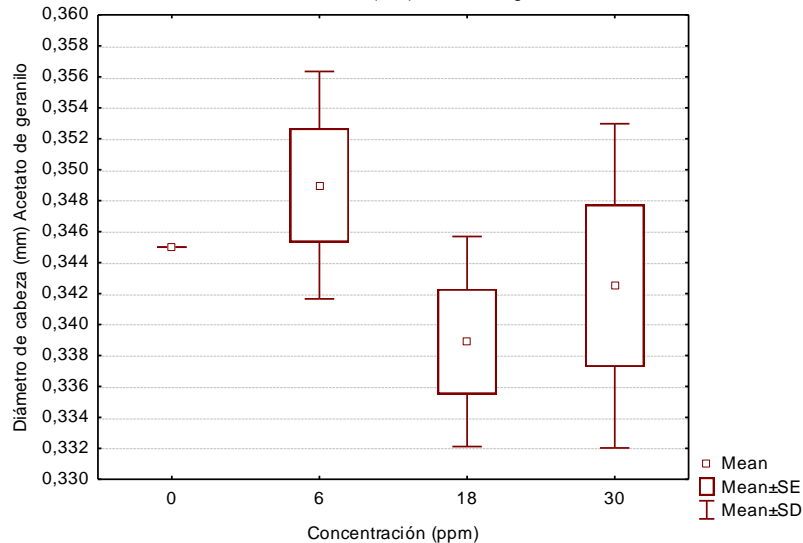


Figura 17. Diámetros de sifón (mm) de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario Acetato de geranilo. KW, H (3, N=15)= 6,526173 $p < 0,0886$.



Las medidas de sifón de las larvas expuestas a los compuestos mayoritarios son similares en cuanto a que se presentó disminución del diámetro. El citral presentó efecto mayor a 18 ppm (Figura 15). En el caso del Acetato de geranilo se observa una disminución a 18 y 30 ppm, pero 6 ppm se comporta como el control, es decir que ni aumenta ni disminuye de tamaño (Figura 17).

Independientemente de las condiciones de cría en cuanto a alimentación y oxigenación, las medidas de las larvas estuvieron en el rango de 0,245 mm a 0,386 mm para cabeza y en el rango de 0,257 mm a 0,385 mm para sifón, es decir que no existe una medida estándar para larvas, de ser así todas las larvas de todos los controles negativos (agua más DMSO) del aceite esencial, citral y acetato de geranilo hubieran presentado la misma medida. Independientemente de lo anterior se observó que el comportamiento de los compuestos mayoritarios y el aceite fue similar tanto para cabeza como para sifón, es decir que en las larvas hubo variación del diámetro de cabeza a la vez que hubo variación del diámetro del sifón.

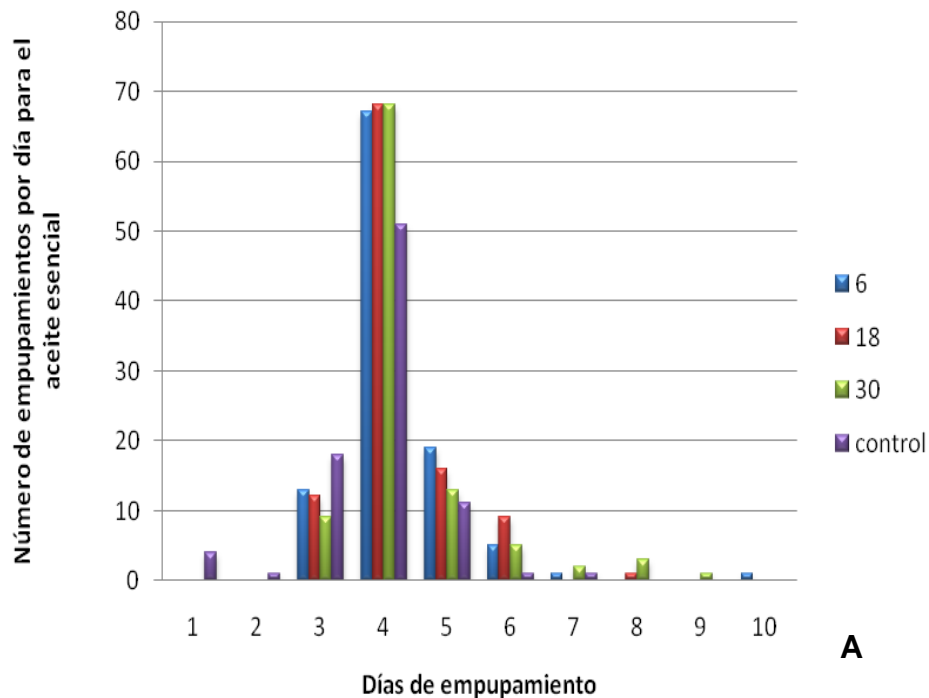
Cálculo del índice de desarrollo

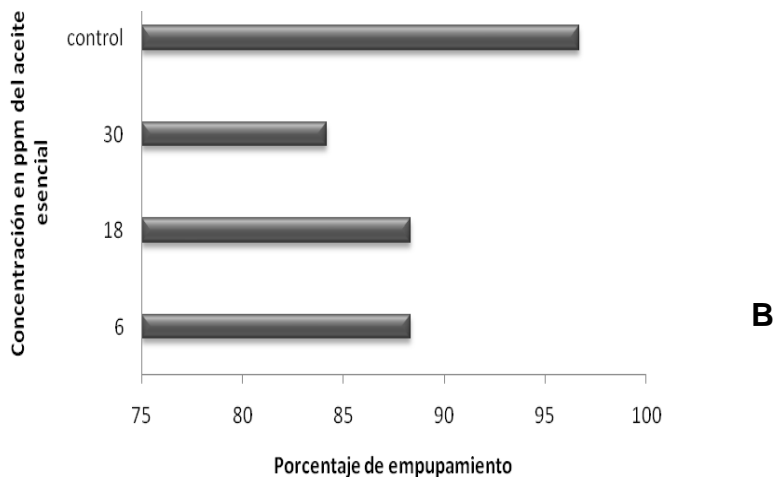
Se registró la mortalidad larval, pupal, el porcentaje de pupación, la inhibición de emergencia del imago, período larval total en días, período pupal total en días, período total de desarrollo en días, además del índice de desarrollo (Arivori & Tennyson, 2011):

$$\text{Índice de desarrollo} = \frac{\text{Porcentaje de la inhibición de la emergencia del adulto}}{\text{Porcentaje total de desarrollo en días}}$$

La figura 18 A muestra que fue en el control que comenzó el empupamiento, las larvas expuestas a las tres concentraciones del tratamiento con aceite esencial comenzaron a empupar dos días después de esto, dándose el máximo de empupamiento al cuarto día para los tres tratamientos y el control, pero éste último presentando la menor cantidad de larvas empupadas. Si bien el proceso se dio en diez días, se presentaron empupamientos unitarios para 30 ppm al noveno día y 6 ppm el décimo día. El control terminó de empupar al séptimo día, con un total de empupamiento mayor al 95% (Figura 18 B) Los porcentajes de empupamiento de 6 ppm y 18 ppm no llegaron al 90%, mientras 30 ppm no llegó al 85%. En resumen el aceite esencial retardó el ciclo de *Stegomyia aegypti* y disminuyó el porcentaje de empupamiento de forma concentración-dependiente, a mayor concentración, menor el porcentaje de empupamiento.

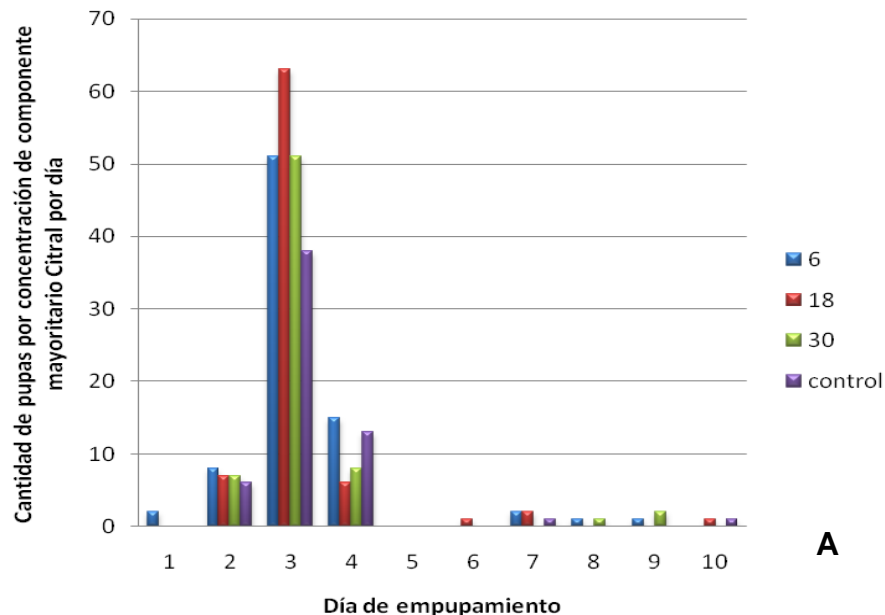
Figura 18. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. A. Cantidad de empupamientos por día B. Porcentajes de empupamiento de larvas

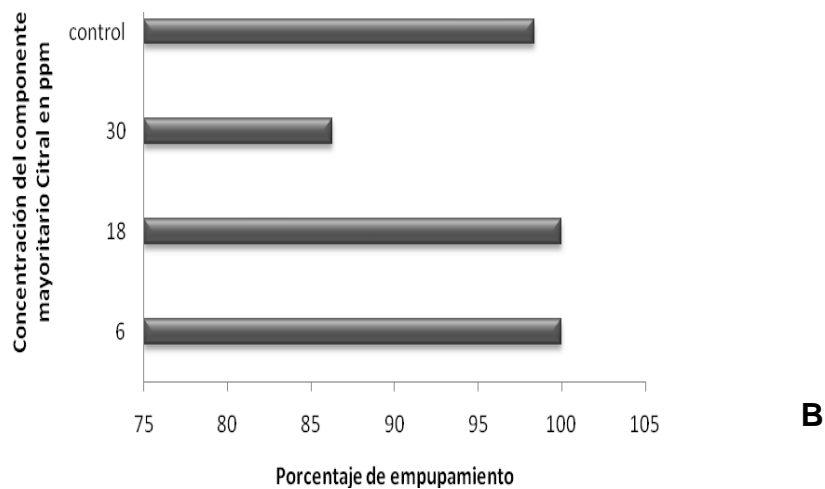




La figura 19 A muestra el comportamiento del compuesto mayoritario citral. En este caso el empupamiento se inició en las larvas expuestas a la concentración 6 ppm, presentándose un pico de empupamiento al tercer día en todas las concentraciones, incluido el control, el cual fue el que mostró menor cantidad de empupamientos ese día. Se puede hablar de que fueron otros los factores que también afectaron el proceso porque se observa que no hubo empupamientos ni siquiera para el control el día 5 y sólo para 18 ppm el día 6. Se muestra un retardo en el proceso ya que presenta empupamientos hasta el décimo día. La gráfica 19 B muestra que 30 ppm fue la única concentración inhibitoria del empupamiento con un porcentaje menor al 90%.

Figura 19. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, Citral. **A.** Cantidad de empupamientos por día **B.** Porcentajes de empupamiento de larvas.

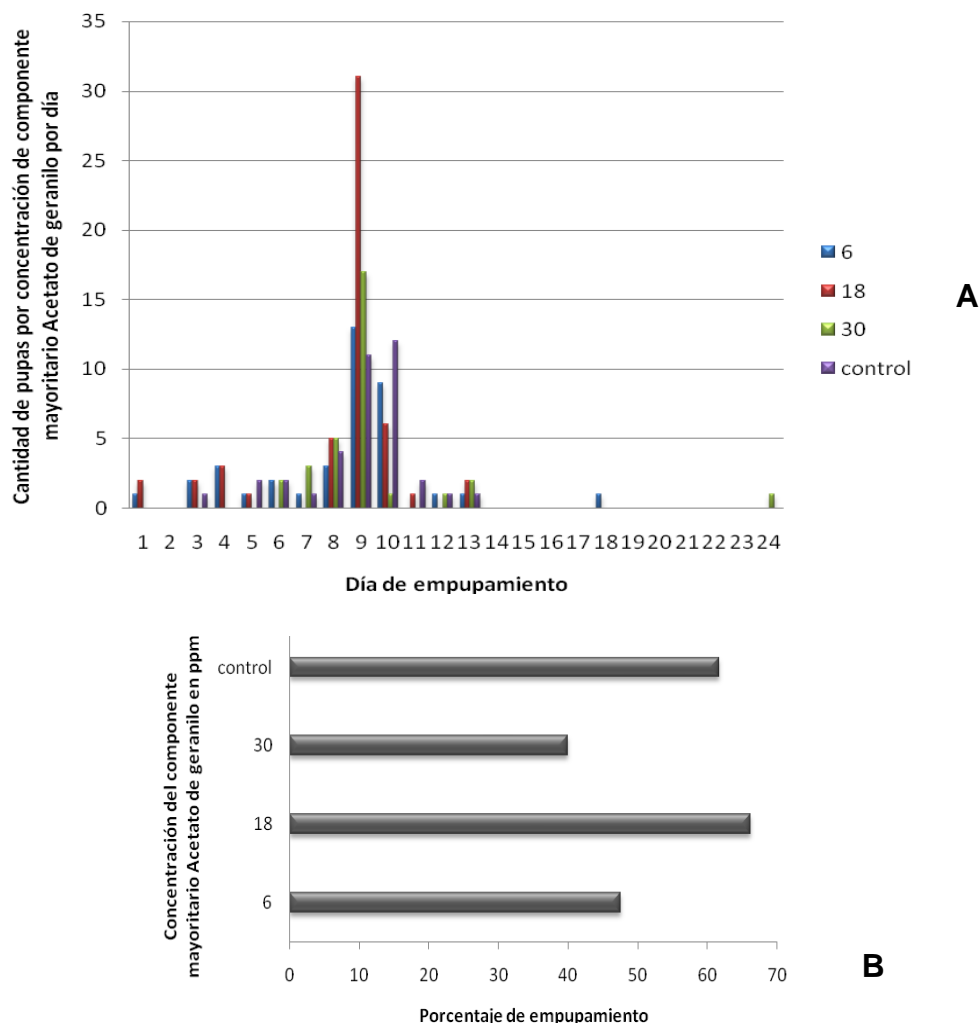




En cuanto al componente mayoritario acetato de geranilo, se encuentra que hubo inicio de empupamiento en las concentraciones 6 y 18 ppm y que para la concentración 30 ppm ésta sólo ocurrió al sexto día. La concentración 18 ppm no presentó empupamientos los días 6 y 7 luego, al noveno día se presentó el pico de empupamiento para todas las concentraciones, principalmente para 18 ppm. Se observa que 30 ppm tiene un comportamiento retardado con respecto a las demás concentraciones y el control. El control presenta su máximo pico de empupamiento el día 10 y termina de empupar el día 13 (Figura 20A).

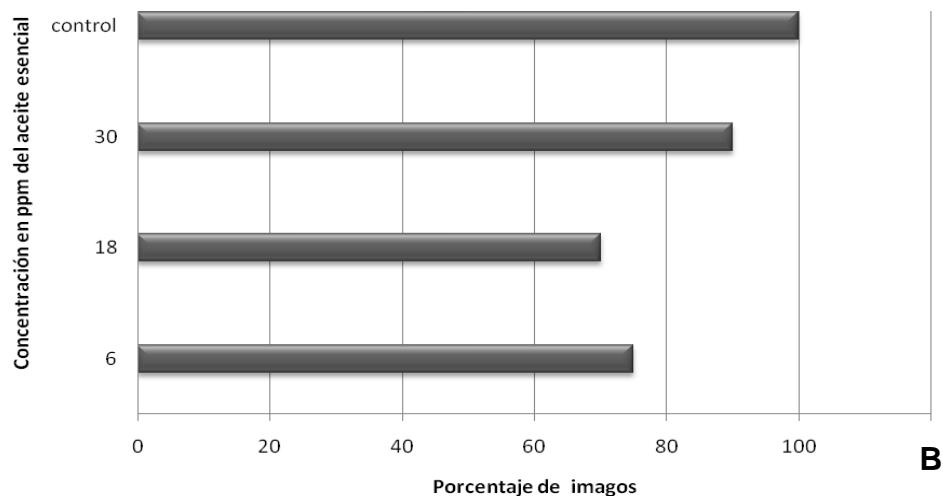
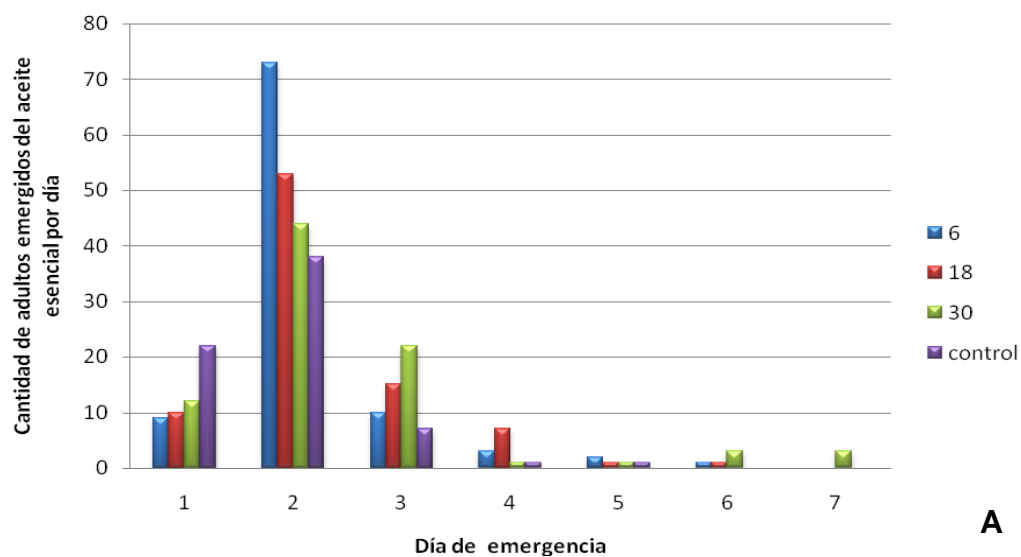
Adicionalmente la gráfica 20B muestra que 18 ppm presenta el máximo porcentaje de empupamiento (mayor incluso que el blanco), 30 ppm, además de mostrar retardo en el tiempo de empupamiento, está presentando menor porcentaje del mismo, incluso por debajo del 50%. Se debe tener en cuenta que este porcentaje para el control tan sólo fue mayor a 60%, lo que posiblemente muestra efecto de las condiciones de experimentación.

Figura 20. Conteo de empupamientos de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, Acetato de geranilo. **A.** Cantidad de empupamientos por día **B.** Porcentajes de empupamiento de larvas.



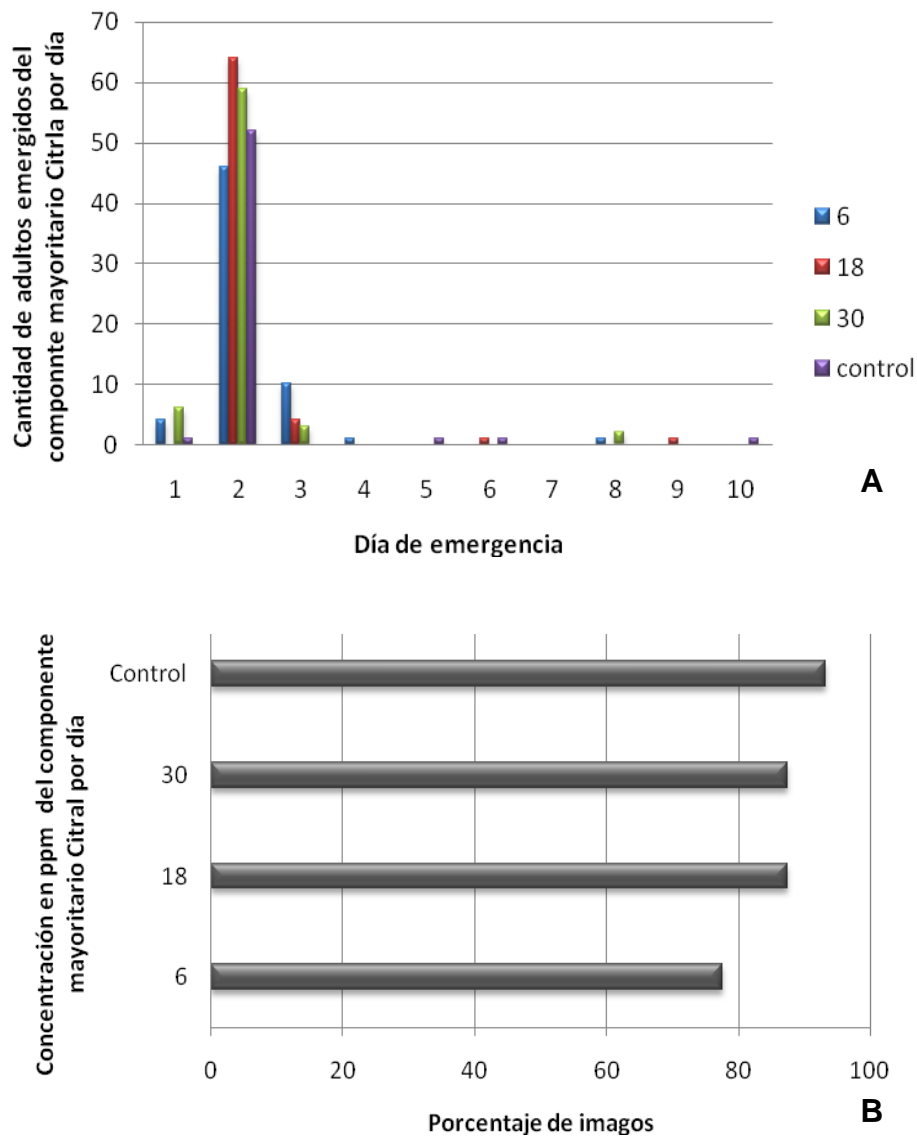
En las repeticiones, los máximos de emergencia de imagos se dieron uno o dos días después del máximo pico de empupamiento. En la gráfica 21 A se observa el consolidado de las emergencias, donde se muestra el mayor pico al segundo día después de haber comenzado a emerger. Las diferentes concentraciones presentaron mayor emergencia de imagos que el control desde el segundo hasta el séptimo y último día. El control sólo presentó un pico mayor que las concentraciones el primer día de emergencia de imagos. La gráfica 21 B muestra que en este caso el mayor porcentaje es para 30 ppm sin mostrar dependencia de la concentración, es decir que no se presentó el caso en el que se da mayor efecto a mayor concentración, teniendo en cuenta que tuvo 90% de empupamiento.

Figura 21. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuestas a concentraciones sub-letales de aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. **A.** Cantidad de imagos por día. **B.** Porcentaje de imagos por concentración



En cuanto al proceso de emergencia de adultos para el componente mayoritario citral, éste comenzó dos días después del pico máximo de empupamiento, presentándose un máximo de emergencias al segundo día, para todos los tratamientos, incluido el control; sin embargo, fue mayor para el citral a 18 ppm, coherente con su mayor empupamiento el día dos después del comienzo del mismo proceso (Figura 22)

Figura 22. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuestas a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, Citral. **A.** Cantidad de imagos por día. **B.** Porcentaje de imagos por concentración



Para el Acetato de geraniol (Figura 23) se da un máximo de emergencias el día 10 para todas las concentraciones, incluido el control, sin embargo el mayor pico es para la concentración 18 ppm, coherente con su mayor empupamiento el día nueve después del comienzo de dicho proceso. También se observa que existe un retardo en

el proceso para 30 ppm, relacionado con su retardo en el empupamiento, sin embargo se observa que el proceso de emergencia se da a la par con el del control, por lo tanto habría una emergencia precoz para 6 y 18 ppm. En este caso se debe tener en cuenta las condiciones de desarrollo del bioensayo ya que sólo hubo un porcentaje algo mayor del 50% de emergencia para el control. No hubo dependencia de la concentración con relación a los diferentes tratamientos.

Figura 23. Conteo de imagos emergidos por día de larvas expuesta a concentraciones sub-letales del componente mayoritario del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, Acetato de geranilo. **A.** Cantidad de imagos por día. **B.** Porcentaje de imagos por concentración

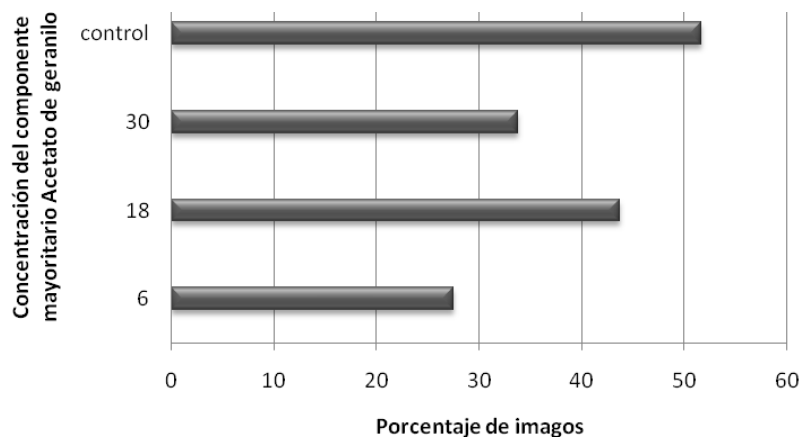
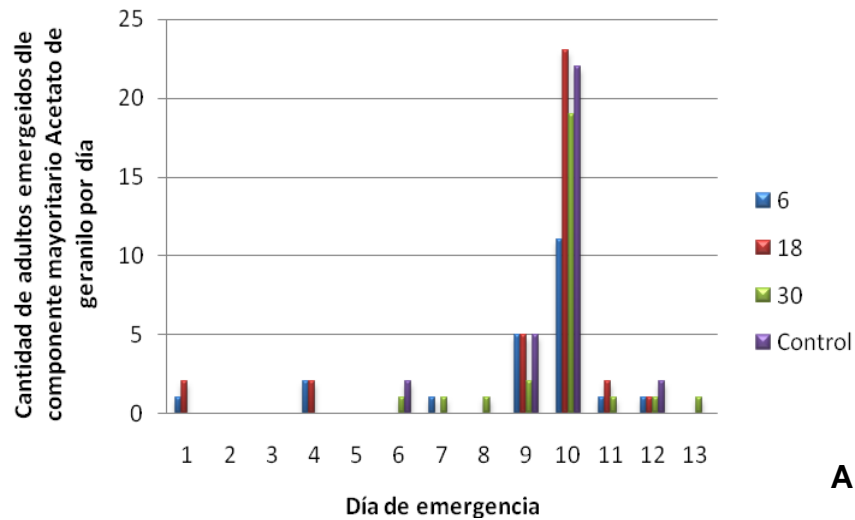


Tabla 5. Índice de desarrollo

Sustancia	Concentración	Mortalidad larval	Período larval total en días	Mortalidad pupal	Período pupal total en días	Inhibición de emergencia de adulto (%)	Período total desarrollo en días	Índice desarrollo
<i>C.flexuosus</i>	0	0	8,6	3	2	4,6	17,8	0,2588
	6	6	9,3	0	2,1	20,6	22,3	0,924
	18	2	9,3	2	2	14,7	22,3	0,659
	30	6	9,5	2	2	19,4	22,3	0,870
Citral	0	0	9,5	0	2	1,5	17,5	0,086
	6	4	9	3	2	2,8	17,5	0,160
	18	2	9,5	0	2,5	6,2	18	0,344
	30	11	9,5	1	1,5	15,5	20	0,775
Acetato de Acetato	0	3	11,5	0	1,3	25	19,5	1,282
	6	7	10	1	2,5	68,8	30	2,293
	18	0	10	0	2,5	39,1	30	1,303
	30	9	10	1	2,3	76,6	30	2,553

Las larvas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial presentaron similares períodos de duración o tiempos de vida larvales (9,3 días), mayores a los presentados por las larvas control, igual que para los períodos totales de desarrollo (22,3 días), transcurriendo menor cantidad de tiempo para los controles, una reducción de 5 días. En cuanto al Citral los períodos larvales fueron similares al presentado por el control, los períodos totales de desarrollo para 6 y 18 ppm fueron similares al presentado por las larvas control pero aumentó 2,5 días para 30 ppm. Para el acetato de geranilo se encontró que el período pupal fue mayor que el presentado por el control y el período total de desarrollo fue mucho mayor con respecto al del control en 10,5 días.

En el citral y acetato de geranilo se presentó alta mortalidad larval a 30 ppm, 13,8% para el citral y 11,3% para el segundo. El período pupal fue similar en todas las concentraciones a las del aceite esencial, menor para 30 ppm del citral y mayor para los tratamientos del acetato de geranilo con respecto al control.

En cuanto a los índices de desarrollo, se puede decir que a menor inhibición de emergencia del adulto, fue menor el valor, igual caso se presentó cuando la inhibición de la emergencia del adulto fue mayor que el período total de desarrollo, tomándose como índice poco informativo en este último caso. Sí el índice arroja menor valor se interpreta como excelentes condiciones de desarrollo en las que los individuos completan su ciclo de vida, a pesar de que éste sea prolongado. Sólo los controles para los tratamientos con aceite y el citral y 6 ppm del citral estuvieron cercanos a cero. En general, los períodos totales de

desarrollo fueron mayores al ciclo de vida estandarizado que se reconoce para la colonia de laboratorio.

3.2.2 Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de alas de adultos

Tabla 6. Ocurrencia de Asimetría direccional y antisimetría en adultos emergidos de larvas expuestas a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. Para Diflurobenzurona® no hubo medidas porque no hubo adultos, ya que las larvas no pasaron de L1

Tratamiento	Media DI ± Desv. Est. (n)*	Asimetría direccional		Anti simetría	
		t	P	D	P
Control					
Medida de ala A	0,036 ± 0,056 (30)	3,515	0,0015	0,700	1,696 x10 ⁻⁹
Medida de ala B	0,019 ± 0,024 (30)	4,255	0,0002	0,733	2,213 x10 ⁻¹⁰
Aceite esencial <i>C. flexuosus</i>					
Medida de ala A	0,034 ± 0,055 (30)	3,364	0,0022	0,750	7,7144 x10 ⁻¹¹
Medida de ala B	0,011 ± 0,026 (30)	2,349	0,0259	0,417	0,0012

*DI=valor derecho – valor izquierdo; Desv. Est.=Desviación Estándar; n=número de individuos

.Si bien los individuos se expusieron a las concentraciones 6 ,18 y 30 ppm del aceite esencial, se tomó en conjunto la medida de asimetría para determinar los valores de asimetría direccional y antisimetría. Se verificó que las medidas de asimetría se ajustaban a la distribución normal. Tanto las medidas de los controles como de los tratamientos con aceite esencial mostraron ocurrencia de asimetría direccional, por lo que en ese caso ya no se puede constatar la presencia de asimetría fluctuante (Tabla 6).

4. DISCUSIÓN

4.1 Actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial de *C. flexuosus* sobre *S. aegypti*

Aunque no se encontró malformaciones en huevos expuestos al aceite esencial se corroboró que el porcentaje de eclosión fue menor con respecto al control negativo. Si bien el huevo presenta la cutícula serosa que lo protege de la desecación por pérdida de agua, la cual se forma cuando se completa la embriogénesis (Rezende *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2014), es posible que compuestos de dicha cutícula sean de naturaleza lipídica y/o lipofílica y tengan afinidad con los componentes del aceite. Uno de los compuestos mayoritarios del aceite es el citral, el cual demostraron Saxena y Sharma (1972) que inhibe el desarrollo embrionario y previene la eclosión de huevos de *Stegomyia aegypti*, entonces puede no haber malformaciones pero los procesos bioquímicos como el trabajo de hormonas puede haber sido alterado por el efecto del citral, impidiendo la eclosión. Algo para tener en cuenta es que a mayor edad del huevo, menor es la susceptibilidad a la inhibición, es decir que estos huevos embrionados y almacenados tenían menor probabilidad de disminuir su capacidad para eclosionar (Saxena & Sharma, 1972). Otro impedimento de la entrada del aceite es la capa de quitina que también presentan los huevos (Rezende *et al.*, 2008) la cual los vuelve aun más resistentes a la penetración. A pesar de que el porcentaje de eclosión en los huevos expuestos al aceite es mayor que el mostrado por los expuestos a Diflurobenzurona®, no existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos. La Diflurobenzurona® puede penetrar el huevo porque inhibe la formación de las microfibrillas de quitina, esta acilúrea inhibe el transporte transmembranal de los precursores de la síntesis de quitina (Reynolds, 1987). En el caso del huevo, es posible que desestabilice la capa de quitina. Por otra parte se sabe que compuestos mayoritarios del aceite como el monoterpeno citral puede inhibir la eclosión de los huevos (Bentley & Day, 1989).

4.2 Determinación de los efectos sobre el desarrollo larval, pupal y en adultos.

Los huevos expuestos a Diflurobenzurona® presentaron eclosión en las tres concentraciones pero estas larvas no pasan a segundo instar, posiblemente por la inhibición de la síntesis de quitina (Figura 8), interfiriendo con el proceso de ecdisis, impidiendo la liberación de la cutícula antigua que se acumula en los espacios intersegmentales y estrangulando las porciones segmentales en un proceso sucesivo y acumulativo, bloqueando los cambios y causando la muerte de la larva. También actúa destruyendo las células del intestino medio (Alves *et al.*, 2012) y generando rompimiento de la región cefálica (Alves *et al.*, 2012), similar al desprendimiento de cápsula cefálica observado en primer instar. En el caso del aceite esencial, aunque en menor proporción y como se muestra en la tabla 3, éste es capaz de inhibir la emergencia de adultos, alcanzando el 94,8% a 6 ppm en

huevos embrionados, lo que significa que el aceite incluso a concentraciones sub-letales ejerce efecto sobre los procesos fisiológicos del mosquito.

Se analizó al estereoscopio las pupas generadas del tratamiento con aceite esencial y no se observó ninguna anomalía morfológica pudiendo emerger adultos aparentemente en buenas condiciones, sin embargo y aunque en sólo 10% de los casos, se presentó irregularidades en la emergencia de adultos y deformidades en los tarsos de individuos expuestos a la concentración de 30 ppm (Figura. 11), corroborando en este caso que el efecto es concentración-dependiente.

Los resultados hasta ahora mostrados soportan la hipótesis de que el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* se comporta como un regulador del crecimiento de insectos al inhibir la eclosión de los huevos y disminuir la emergencia de adultos.

4.2.1 Determinación del índice de desarrollo de *S.aegypti* bajo el efecto del aceite esencial de *C.flexuosus*

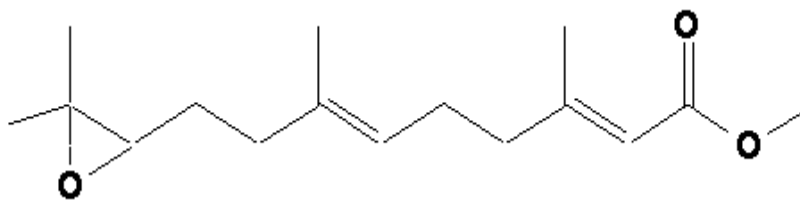
Como todo aceite esencial, el de *Cymbopogon flexuosus* es una mezcla compleja de compuestos, cuya bioactividad es poco conocida. Al evaluar el crecimiento en diámetro de las estructuras esclerotizadas de larvas expuestas a diferentes concentraciones, se encuentra que puede ser concentración-dependiente y que si bien se presenta preponderantemente disminución del diámetro con respecto al control, también se pueden presentar aumentos lo que puede significar que el complejo está afectando algún punto de la vía de síntesis de la quitina, haciendo que ésta se secrete en mayor o menor proporción por lo cual estas estructuras aumentarían o disminuirían en tamaño.

Se deseaba conocer el comportamiento del citral a concentraciones sub-letales basadas en la concentración letal del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. Se encontró que altera el crecimiento en diámetro de las estructuras esclerotizadas, pero en este caso se desconoce su mecanismo de acción, ya que no corresponde con los actualmente aceptados (Rattan, 2010). Las larvas se encuentran inmersas en el tratamiento con la molécula, en este caso la ingieren pero los mecanismos de detoxificación del intestino medio, que es el sistema aleloquímico de defensa, posiblemente impide que todas las moléculas entren a los tejidos larvales por esta vía (Rattan, 2010) sin embargo, los terpenos como el citral, actúan como solventes de otras toxinas para facilitar su paso a través de las membranas (Rattan, 2010) lo que significa que puede atravesar los tejidos larvales. Se sabe que el compuesto mayoritario citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal, nombre de una mezcla natural de dos aldehídos isoméricos monoterpénos acíclicos) puede inhibir la acetilcolinesterasa (AChE), paralizando y matando el insecto (Ryan & Byrne (1988) en López & Pascual-Villalobos(2009)), puede generar la alquilación de ADN, proteínas y otras biomoléculas al convertirse en epóxido por la oxidación en contacto con el aire, intensificado por el calor y atrapar especies de oxígeno activado ((Elgendy, 1997 en Saddiq & Khayyat, 2010), puede inducir hemólisis ya sea a altas o bajas concentraciones, generando radicales libres en este último caso (Tamir et al., 1984), puede alterar la organización de los

microtúbulos de células de plántulas de *Arabidopsis* y de células animales con exposiciones tiempo y dosis dependientes (Chaimovith *et al.*, 2010), puede inhibir la germinación de las semillas (Dudai *et al.*, 1999) y tiene buena actividad antibacteriana y antifúngica (Saddiq & Khayyat, 2010). Sin embargo su mayor porcentaje de inhibición de la emergencia de adultos fue de 15,5% para la concentración 30 ppm, observándose en este caso un índice de desarrollo menor a 1, más cercano a cero. Se debe recordar que los aceites esenciales presentan propiedades antioxidantes, incluso el citral presenta propiedades antimutagénicas (Gomes-Carneiro *et al.*, 1998, 2005). En cuanto a los procesos de empupamiento (Figura 19) y emergencia de adultos (Figura 22) el citral mostró que puede demorar el paso de pupa a imago a 30 ppm.

En el caso del Acetato de geranilo, el otro componente mayoritario evaluado, también monoterpreno, se observa que tanto para cabeza como para sifón, el diámetro es menor con respecto al control, a 18 ppm. También fue ingerido y asimilado a través de las membranas de las larvas y metabolizado a través del sistema de detoxificación al presentarse como una molécula extraña al organismo. El Acetato de geranilo presenta propiedades antioxidantes a altas concentraciones (200 mg/kg) (Quintals-Junior *et al.*, 2013) y propiedades farmacológicas como potente antiinflamatorio (Quintals-Junior *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2011), sin embargo presentó altos porcentajes de inhibición de la emergencia de adultos, 68,8% para 6 ppm, 39,1% para 18 ppm y 76,6% para 30 ppm, también presentando períodos totales de desarrollo superiores a 25 días, lo que da como resultado índices de desarrollo mayores a 2, bastante alejados de 0 que es el mejor valor. Ya que la estructura molecular del acetato de geranilo es similar a la de la neotenina u hormona juvenil (Figura 24) puede actuar como un IGR tipo mimético de las hormonas juvenoides (Villarreal, 2012), interpretando los resultados, en cuanto a que hubo un retardo en el paso de larva a pupa, se asume que el componente mayoritario aumentó los niveles de dicha hormona en la hemolinfa haciendo que la larva no cambiara de estado, por lo tanto impidiendo que el pico de ecdisona aumentara y se presentara la muda. Los resultados anteriores demuestran que el acetato de geranilo impide el normal desarrollo de *S. aegypti*.

Figura 24. Estructura molecular de la hormona juvenil



Tomado de Blum (1985)

4.2.2 Efecto de concentraciones sub-letales en el desarrollo de los adultos

la Asimetría fluctuante ha sido utilizada para comparar los niveles de inestabilidad del desarrollo en poblaciones sometidas a factores de estrés ambiental como temperatura, bajos niveles nutricionales, radiación, productos químicos, la densidad poblacional, efectos sonoros, parasitismo, condiciones de luz, riesgo de depredación, la estructura del hábitat (Hoffmann & Woods, 2003; Zamora & Soler, 1999; Moller & Swaddle, 1997). En este caso se esperaba hallar AF como efecto de la exposición a las diferentes concentraciones sub-letales, en lugar de ésta, se determinó la presencia de asimetría direccional. Esta última también informa acerca de la estabilidad del desarrollo de los individuos en estudio. La asimetría direccional está presente en aquellos caracteres en los que el desarrollo en un lado del cuerpo es normalmente mayor que en el otro lado, adicionalmente siguiendo sus frecuencias una distribución normal, se diferencia de la asimetría fluctuante en que su valor medio es distinto de cero (Zamora & Soler, 1999). La presencia de antisimetría, que es un tipo de asimetría no direccional (como la asimetría fluctuante) nos dice que estos datos también pueden presentar un valor medio de asimetría igual a cero y una distribución de frecuencias que no sigue una distribución normal, es decir de tipo bimodal, esto quiere decir que aunque la media de asimetría es cero, individuos con caracteres simétricos son más escasos que individuos con caracteres asimétricos y además, la abundancia de individuos con el lado derecho del carácter más desarrollado que el lado izquierdo es similar a la de individuos con el lado izquierdo desarrollado (Zamora & Soler, 1999). Teniendo en cuenta lo anterior, se requieren más criterios para definir la asimetría presente.

5. CONCLUSIONES

Se evaluó el desarrollo de *Stegomyia aegypti* bajo el efecto de dosis sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, encontrándose actividad reguladora del desarrollo sobre el vector en las etapas de huevo, pupa, larva y adulto.

No se presentaron malformaciones en el embrión de *Stegomyia aegypti* cuando se expuso huevos embrionados a concentraciones sub-letales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* pero disminuyó el porcentaje de eclosión de huevos, de forma similar a como lo hizo el regulador de crecimiento de insectos, Diflurobenzurona®.

Se pudo constatar que el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* a dosis sub-letales hace que disminuya el diámetro de cabeza y sifón respiratorio. Lo que se traduce en un cambio morfológico.

El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* no causó malformaciones en pupas pero retardó el empupamiento de *Stegomyia aegypti*.

Es posible identificar un tipo de asimetría en las alas de adultos cuando son aplicadas dosis subletales del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y a las vez corroborar que éste influencia irregularidades en la emergencia de adultos y deformidades en tarsos.

La inhibición de la emergencia de adultos por parte del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* fue concentración-dependiente.

El Acetato de geranilo, en mayor proporción que el Citral y el aceite esencial total, promueve la inhibición de emergencia de los adultos.

El efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* puede deberse a su componente mayoritario Acetato de geranilo o la sinergia de todos los compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALVES *et al.* Mecanismos da ação larvívica do Diflurobenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. *Revista de Patología Tropical*. 2012. Vol. 41 (2): 222-232p. Abr-jun.
- ARIVORI,S. & TENNYSON,S. Studies on the Mosquitocidal Activity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng (Rutaceae) Leaf Extracts against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian J. Exp. SCI*. 2011.Vol.2(4). 721-730 p.
- BENITEZ, H. & PARRA, L. Asimetría fluctuante: Una herramienta morfo-funcional para Medir Estabilidad de Desarrollo. *Int. J. Morphol.* 2011. 29(4): 1459-1469
- BENTLEY, M & DAY, J. Chemical Ecology and Behavioral aspects of Mosquito Oviposition. *Ann Rev. Entomol.* 1989. 401-421p.
- Boletín Epidemiológico Chikungunya. Evento Prioritario. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Boletín diario N.40 Noviembre 10 de 2014. 9 p.
- Boletín Epidemiológico Semanal. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica número 17 de 2014 (20 abril al 26 abril). 20-21p
- BRAGA, I . & VALLE,D .*Aedes aegypti*: insecticidas, necanismos de açãõ e resistencia.*Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília.* 2007. 16(4):279-293p.out-dez
- CHAIMOVISH *et al.* Microtubulos are an intracelular target of the plant terpene citral. *The Plant Journal*. 2010. 61. 399-408 p.
- Circular Externa, del Intituto Nacional de Salud. 8 enero de 2015. 5p.
<http://www.ins.gov.co/Noticias/Chikungunya/Circular%20001-2015.pdf>
consultado 12 de febrero de 2015.
- CORIA, C.*et al.* Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresourse Technology*. 2008. 99. 3066-3070 p.
- ELGENDY. Epoxidation reactions of natural limoneno piperine and piperic acid as intercalative alkylating agents for DNA. *Boll. Chim. Farm.*1997. 27. 36-532p.

FARNESI, L. *et al.* Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009. Río de Janeiro. Febrero. Vol. 104(1): 124-126p.

GALVIS, S. & SOTO-GIRALDO, A. Niveles de resistencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al insecticida Temephos en el Departamento de Caldas. Agronomía. 2010.18(1):69-76

GIGLIO, N. *et al.* The Efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 2012. Vol. 107(3): 387-395 p.

GONÇALVES *et al.* Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. Industrial Crops and Products. 2011. 35:166-171p.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2000. 30:1009-1015p.

JUNQUEIRA. Potencial dos Reguladores de Crescimento de Insetos (IGRs) Diflurobenzuron e Methoprene, no controle de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Uberlândia – MG. Tesis presentada al Colegio de Posgraduado en Inmunología y Parasitología Aplicadas como parte de los requisitos necesarios para obtención del título de Doctora. Universidad Federal de Uberlândia. Instituto de Ciencias Biomédicas. Programa de Pos-Graduación en Inmunología y Parasitología Aplicadas. 2006. 77p.

KIM, S. *et al.* Toxicity and Synergic Repellency of Plant Essential Oil Mixtures with Vanillin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 2012.49(4): 876-885p.

KUMAR, *et al.* An essential oil and its mayor constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. Chemo-Biological Interactions. 2008. 171. 332-347p.

LEYVA, M. *et al.* Efecto de un aceite de trementina obtenido de *Pinus tropicalis* Morelet sobre la biología de una cepa de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 resistente a insecticidas. Anales de Biología. 2013. 35: 75-84 p.

LUCIA, A. *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 2011. 12 p.

LUCIA, A. *et al.* Larvicidal Effect of *Eucalyptus grandis* essential oils and Turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. Journal of the American Mosquito Control Association. 2007. 23(3): 299-303 p.

MARTINS *et al.* Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aguasalis* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Physiology. 2014. Vol. 62. 54-60p.

MARTINS, F. & GARCIA, I. Avaliação da atividade inibidora do diflurobenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2004. Vol. 37 (2). 135-138p. Mar-abr.

PRAJAPATI, V.*et al.* Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bioresource Technology. 2005. 96. 1749-1757 p.

Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Dengue. 2014. Junio. Versión 3. Instituto Nacional de Salud.

QUINTANS-JUNIOR *et al.* Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. Hindawi Publishing Corporation. 2013.

RAMAR, M. *et al.* Toxicity effect of *Croton sparciflorus* Linn. (Euphorbiaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus* say. African Journal of Vector Biology. 2013. Vol 1(1):001-001p.

REGNAULT-ROGER, C. The Potencial of botanical essential oils insects pest control. Integrated Pest Management Reviews. 1997. N.2.25-34.

REYNOLDS, S. The cuticle, growth and moulting in insects: The essential background to the action of acylurea insecticides. Pesticide Science. 1987. Vol. 20. N. 2. 131-146p.

REZENDE, *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. BMC Developmental Biology. 2008. Vol.8. N.82.

ROSSI, G. & ALMIRÓN, W. Clave para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Fundación Mundo Sano. Buenos Aires. Argentina. 2004. 53 p.

SANTACOLOMA, L., *et al.* Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales. Biomédica. 2012. Vol 32, N. 3. 9 p.

SANTACOLOMA, L., *et al.* Sensibilidad de *Anopheles darlingi* Root 1840 a insecticidas, en dos localidades de los departamentos de Santander y Caquetá, Colombia. *Biomédica*. 2012. 32 (suplemento): 22-28p.

SANTACOLOMA, L., *et al.* Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2010. 27(1). 66-73 p.

SAXENA, R. & SHARMA, K. Embryonic inhibition and Oviposition Induction in *Aedes aegypti* by certain terpenoids. *Journal of Economic Entomology*. 1972. Vol. 65. N.6. Dec. 1588-1591 p.

SHARMA, *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-Biological Interactions*. 2009. 179. 160-168p.

SUMAN, D. *et al.* Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes aegypti* and *Culex* mosquitoes. *Acta Tropica*. 2013. 128:103-109p.

TAMIR *et al.* The hemolytic activity of citral: evidence for free radical participation. *Pharmacol*. 1984.

TENNYSON, S. *et al.* Larvicidal Efficacy of Plant Oils against the Dengue Vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *East Journal of Scientific Research*. 2013. 13(1): 64-68 p.

VERA, S. *et al.* Insecticidal activity, mitochondrial bioenergetics and apoptosis evidence generated by essential oils de *Eucalyptus citridora* (Myrtaceae) and *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) on *Aedes aegypti* larvae. 2013

VILLARREAL, L. Determinación de las concentraciones diagnósticas de los reguladores de crecimiento de insectos piriproxifen y diflubenzurón para *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) cepa Rockefeller y el estado de la resistencia de seis poblaciones de campo en Colombia. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Infecciones y Salud en el Trópico. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012. 96 p.

WAHYUI, D. Larvicidal Activity of essential oils of *Piper betle* from Indonesian plants against *Aedes aegypti* L. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 2012. 2(6): 249-254 p.

ZAMBRANO, P. & MERCADO, M. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. 2014. Versión 03. Junio 11. 25 p.