

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DE DIEZ ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS
SOBRE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

DIEGO FERNANDO ZAMBRANO SUAREZ

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

2015

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DE DIEZ ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS
SOBRE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

DIEGO FERNANDO ZAMBRANO SUAREZ

Proyecto de grado para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

JONNY EDWARD DUQUE LUNA

Doctor en Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.1 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	15
1.2 CRIANZA, MANUTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE COLONIAS DE <i>A. aegypti</i>	15
1.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA Y DOSIS DIAGNOSTICAS	16
1.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DETERMINANDO CONCENTRACIONES LETALES	16
1.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVICIDA	17
1.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PUPICIDA	17
1.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADULTICIDA	17
1.8 EVALUACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS	18
1.9 EVALUACIÓN DEL EFECTO RESIDUAL	19
2. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE:	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA	21
3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DETERMINANDO CONCENTRACIONES LETALES	22
3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVICIDA	26
3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PUPICIDA	27
3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADULTICIDA	29

3.6 EVALUACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS	31
3.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO RESIDUAL	32
4. CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXOS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Evaluación de la actividad pupicida en las concentraciones de 100, 200, 250, 310 y 390 ppm	29
Figura 2. Evaluación de la actividad adulticida en las concentraciones de 1000, 300 y 30 ppm	30
Figura 3. Evaluación de la actividad larvicida del citral en las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 y 90 ppm	31
Figura 4. Evaluación de la actividad larvicida del acetato de geranilo en las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 y 90 ppm	32
Figura 5. Evaluación del efecto residual de <i>C. sinensis</i>	33
Figura 6. Evaluación del efecto residual de <i>C. flexuosus</i>	33

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Dosis diagnosticas para evaluar la actividad insecticida	21
Tabla 2. Evaluación de la actividad larvicida evaluando las LC50 y LC95	25
Tabla 3. Evaluación de la actividad ovicida en las concentraciones de 100 y 200 ppm, reflejando el número de huevos eclosionados en cada replica y en el control.	27

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Participación en el 40º congreso de SOCOLEN como autor	45
Anexo B: Participación en el 40º congreso de SOCOLEN como ponente	46
Anexo C. Artículo publicado	47

RESUMEN

TITULO: ACTIVIDAD INSECTICIDA DE DIEZ ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS SOBRE *AEDES AEGYPTI* (DIPTERA: CULICIDAE)

AUTOR: DIEGO FERNANDO ZAMBRANO SUAREZ**

PALABRAS CLAVE: aceites esenciales, *A. aegypti*, *Cymbopogon flexuosus*, *C. sinensis*.

Se evaluó la actividad ovicida, larvicida y pupicida de 9 aceites esenciales de plantas aromáticas más una mezcla de dos aceites esenciales combinados en *A. aegypti*, los resultados de la actividad ovicida no permitieron comparar la mortalidad debido a que el control no fue informativo, el aceite esencial con mayor efecto pupicida fue *L. origanoides* obteniendo en las concentraciones de 250 y 310 ppm una mortalidad del 93% y en la concentración de 390 ppm una mortalidad del 100%, los aceites esenciales con mayor efecto larvicida fueron *Cymbopogon flexuosus* (LC50 = 17,1; LC95 = 49 ppm) y *Citrus sinensis* (LC50 = 20,6; LC95 = 99 ppm); los tres aceites con mayor efecto insecticida en la determinación de dosis diagnosticas fueron los que se evaluaron en su actividad adulticida, *C. flexuosus* mostró mayor actividad adulticida con un porcentaje de mortalidad a los 1000 ppm de 96%, a los 300 ppm de 62% y a los 30 ppm de 40%, la evaluación del efecto residual se realizó en los dos aceites esenciales con mayor actividad larvicida (*C. flexuosus* y *C. sinensis*), estos dos aceites mostraron un efecto residual muy bajo debido a que los aceites esenciales están compuestos de volátiles con una gran tensión de vapor, la evaluación de compuestos mayoritarios se realizó en los dos compuestos mayoritarios (citril y acetato de geranilo) del aceites esencial con mayor actividad insecticida (*C. flexuosus*), el acetato de geranilo demostró una actividad insecticida muy eficaz teniendo las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39 y 50 unas mortalidades de 0, 0, 2,5, 2,5, 7,5, 25 y 80% respectivamente.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director Jonny Edward Duque Luna

ABSTRACT

TITLE: ACTIVITIES OF TEN INSECTICIDE PLANT ESSENTIAL OILS ON *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*)^{*}

AUTHOR: DIEGO FERNANDO ZAMBRANO SUAREZ^{**}

KEY WORDS: essential oils, *A. aegypti*, *Cymbopogon flexuosus*, *C. sinensis*.

Was evaluated the ovicidal activity, larvicidal and pupicidal of 9 essential oils from aromatic plants plus a mixture of two essential oils combined in *A. aegypti*, the results of the ovicidal activity didn't allow to compare mortality because the control wasn't informative, the essential oil with higher pupicidal effect was *L. origanoides* obtaining in the concentrations of 250 and 310 ppm a mortality of 93 % and in the concentration of 390 ppm a mortality of 100%, the essential oils with higher larvicidal effect were *Cymbopogon flexuosus* (LC50 = 17,1; LC95 = 49 ppm) and *Citrus sinensis* (LC50 = 20,6; LC95 = 99 ppm); the three oils with higher insecticidal effect on the determination of diagnostic doses were those who were evaluated for adulticide activity, *C. flexuosus* showed higher adulticidal effect with a percentage of mortality at 1000 ppm of 96%, at 300 ppm of 62% and at 30 ppm of 40%, the evaluating of the residual effect was performed on the two essential oils with higher larvicidal activity (*C. flexuosus* and *C. sinensis*), these two oils showed a very low residual effect because the essential oils are compounds of volatiles with a high vapor pressure, the evaluation of major compounds was performed on the two major compounds (citral and geranyl acetate) of the essential oil with higher insecticidal activity (*C. flexuosus*), the geranyl acetate showed a highly effective insecticidal activity having the concentrations of 5, 11, 16, 25, 39 y 50 a mortalities of 0, 0, 2,5, 2,5, 7,5, 25 y 80% respectively.

* Project of grade

** Faculty of Sciences. School Biology. Director Jonny Edward Duque Luna

INTRODUCCIÓN

El dengue hemorrágico es una enfermedad transmitida por mosquitos que amenaza la salud pública mundial. La enfermedad se encuentra en muchos países tropicales y subtropicales de todo el mundo especialmente en áreas urbanas y suburbanas¹. El dengue grave puede ser causado por los virus del dengue pertenecientes al género *Flavivirus* del cual hay cuatro serotipos conocidos como son DEN-1, DEN-2, DEN-3 Y DEN-4². *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los principales vectores de esta enfermedad, pero *Aedes aegypti* es el vector más eficiente de la fiebre del dengue, debido a que habitan en zonas urbanas³.

Hasta ahora no existe una vacuna completamente eficiente para actuar frente a los cuatro serotipos del virus del dengue para la prevención de la propagación de la fiebre del dengue⁴. Por lo tanto, el control del vector es el método más efectivo para disminuir la enfermedad⁵, y el uso de insecticidas químicos es un método que permite reducir las poblaciones de *A.aegypti* y así reducir la incidencia del dengue hemorrágico (Rayyanachanpichal et al, 2006).

Desafortunadamente el incontrolado uso de insecticidas químicos como los organofosforados y los piretroides han resultado en problemas de resistencia a los

¹ WHO. Global Insecticide Use for Vector-borne Disease Control. Geneva: World Health Organization. 2009

² WHO. Prevention and Control Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Comprehensive Guidelines WHO Regional Publication, SEARO, No 29. Geneva: World Health Organization. 1999

³ ROHANI, A., NAZNI W.A., NGO L.V., IBRAHIM I. Y LEE H.L.. Adulcicial properties of the essential extracts of some Malaysian plants on vector mosquitoes. Tropical Biomedicine, 1997;14: 5-9.

⁴ Chapagain, B.P., Saharan V. and Wiesman. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. Bioresource Technology, 2008 99: 1165-1168.1165-1168.

⁵ ZAIM, M. y P. GUILLET. Alternatives insecticides: an urgent need. Trends in Parasitology 2002 18(4): 161-163.

insecticidas⁶ y la degradación del insecticida en metabolitos tóxicos conduce a contaminación ambiental en aguas superficiales y subterráneas⁷, generando efectos adversos sobre otros organismos, llegando a generar serios problemas en la salud humana⁸.

Reconociendo este problema, los científicos buscan nuevas alternativas en la producción de insecticidas respetuosos del medio ambiente y al mismo tiempo que ayuden en la prevención de la resistencia en el vector. Esta situación ha conllevado al surgimiento de recursos alternativos como la utilización de insecticidas botánicos a partir de extractos naturales y aceites esenciales provenientes de plantas⁹, que han resultado de potencial ayuda en el control de Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV)¹⁰.

Los aceites esenciales derivados de plantas han emergido como fuentes potenciales para el control de ETV ya que contienen una gran cantidad de compuestos bioactivos que son biodegradables y con especificidad en el control de mosquitos, estos han reportado eficiencia sobre las diferentes fases del ciclo de vida de los mosquitos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto insecticida de diez aceites esenciales de plantas que son: *Tagetes lucida* (CAV.) de la familia Asteraceae, *Cymbopogon*

⁶ SOMBOON P., PRAPANTHADARA L.A. y SUWONKERD W. Insecticides susceptibility test of *Anopheles minimus* S.L., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 2003 30: 184-194.

⁷ DUA V.K., PANDEY A.C. y DASH A.P. . Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. Indian J. Med. Res., 2010 131: 434-439.

⁸ YANG Y.C., LEE S.G., LEE H.K., LEE M.K. y LEE H.S.. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. J. Agric. Food Chem. 2002, 50: 3765-3767.

⁹ WEINZIERL R. y HENN T. Alternatives in insect management: Biological and biorational approaches. North Central Regional Extension Publication 401. University of Illinois at Urbana-Champaign. 1992

¹⁰ ZIMMERMAN R. Control selectivo de vectores y el rol de Bti en el control de vectores. En Guía de Prácticas para la Producción de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. OPS/OMS/ROW/IMTA vH. 2001

citratus (DC.) STAPF y *Cymbopogon flexuosus* (NEES EX STEUD.) WATSON de la familia Poaceae, *Swinglea glutinosa* (BLANCO) MERR. y *Citrus sinensis* (OSBECK) de la familia Rutaceae, *Eucalyptus citriodora* (Hook.) de la familia Myrtaceae, *Cananga odorata* (LAM.) HOOK.F. & THOMSON de la familia Annonaceae, *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson y *Lippia origanoides* H.B.K. de la familia Verbenaceae, más un décimo aceite esencial compuesto de una mezcla igual de *L. alba* con *L. origanoides*.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales fueron proporcionados por el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM de la UIS, en Bucaramanga, Santander, Colombia.

1.2 CRIANZA, MANUTENCIÓN Y REPRODUCCIÓN DE COLONIAS DE *A. aegypti*

Se cultivó una colonia de la cepa Rockefeller, mantenida en las instalaciones del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP), en el parque tecnológico Guatiguará, Piedecuesta, Santander en un insectario a $25 \pm 5^\circ$ C, humedad relativa de 70 ± 5 % y fotoperiodo (12:12), mediante el uso de iluminación artificial. Los adultos se mantuvieron en jaulas de cría de 50 x 50 x 50 cm y se alimentaron con solución de miel al 10%, para la estimulación de la ovoposición, a las hembras se les suministro sangre por exposición del antebrazo durante 15 o 20 minutos. Se colocaron recipientes plásticos de 50 mL cubiertos internamente con papel filtro y se les añadió agua libre de cloro para estimular la ovoposición en dichos recipientes. Para eclosionar los huevos, se sumergieron los papeles filtros con los huevos depositados en vasos plásticos con aprox. 500 mL de agua libre de cloro, a los que previamente se les había añadido 0,5 mg de comida para peces, para estimular la eclosión y se dejaron durante 24 h. Las larvas eclosionadas se mantuvieron en bandejas plásticas de 30 cm de largo, 15 cm de ancho y 10 cm de alto con una capacidad de 3000 mL y se alimentaron con alimento básico para peces diluido en agua libre de cloro y las pupas se recolectaron diariamente en vasos de plástico con aprox. 20 mL y se colocaban en el interior de las jaulas de adultos hasta que todas maduraran.

1.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA Y DOSIS DIAGNOSTICAS

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹¹, se evaluaron las concentraciones de 1000, 300 y 30 ppm de los aceites esenciales, por cada concentración del aceite se hicieron 4 réplicas y un control, en las réplicas y en el control se colocaron 5 larvas en estadio L3-L4 en vasos plásticos de 200 mL y se añadía 100 mL de volumen incluyendo la concentración del aceite esencial, en el control se aplicaba el mismo volumen pero en DMSO al 0,5%. Se hicieron lecturas de mortalidad a las 24 y a las 48 horas luego de la exposición. Este experimento ayudo a determinar la actividad insecticida y proporcionó los parámetros para definir las concentraciones que nos permitieran mortalidades entre el 2 y el 98% para cada aceite esencial. Se repitió el procedimiento 3 veces, se corrigió la mortalidad con la fórmula de Abbott cuando se hizo el registro de larvas muertas.

1.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DETERMINANDO CONCENTRACIONES LETALES

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹², se usaron múltiples concentraciones de cada aceite de acuerdo a los límites establecidos con el experimento anterior, se hacían 4 réplicas y un control, metodología exactamente igual al procedimiento anterior pero usando 10 larvas en cada replica y en el control. Se hicieron lecturas de mortalidad a las 24 y a las 48 horas luego de la exposición. Se repitió este procedimiento tres veces, los resultados fueron analizados estadísticamente usando análisis probability unit o análisis Probit¹³, para definir las concentraciones letales de 50 y 95.

¹¹ WHO. Prevention and Control Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Comprehensive Guidelines WHO Regional Publication, SEARO, No 29. Geneva: World Health Organization. 1999

¹² Ibid

¹³ FINNEY D.J. Probit analysis. Cambridge University Press, 3rd edn. 1971 174 p.

1.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVICIDA

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹⁴, se evaluaron las concentraciones de 100 y 200 ppm, por cada concentración se hicieron cuatro réplicas y un control, mediante estereoscopio se seleccionaron 10 huevos por cada replica y control se colocaron en papel filtro y se expusieron a las concentración, en el caso del control se usó DMSO 0,5%, después de un día de exposición los papeles filtros con los huevos se colocaron en vasos plásticos de 200 mL con 100 mL de agua y alimento para peces para estimular la eclosión, la lectura del número de larvas eclosionadas se realizó 24 h después.

1.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PUPICIDA

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹⁵, se evaluaron las concentraciones de 100, 200, 250, 310 y 390 ppm, por cada concentración se hicieron 4 réplicas y un control, se seleccionaron 5 pupas de un día de emergidas, se colocaron en vasos plásticos de 100 mL y se aplicó un volumen final de 40 mL de la concentración por replica, en el control se usó DMSO al 0,5%, se realizaron lecturas de mortalidad a las 24 y 48 h, este experimento se realizó tres veces.

1.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADULTICIDA

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹⁶, se evaluaron las concentraciones de 30, 300 y 1000 ppm de los aceites esenciales con mayor efecto insecticida de los resultados de la evaluación de la actividad insecticida y

¹⁴ WHO. Global Insecticide Use for Vector-borne Disease Control. Geneva: World Health Organization. 2009

¹⁵ Ibid

¹⁶ Ibid

dosis diagnosticas, por cada concentración se realizaron 4 réplicas y un control, se seleccionaron 10 mosquitos de uno a dos días de emergidos, se colocaron en botellas Wheaton con tapa de rosca con capacidad de 250 ml previamente impregnados con 1 mL de volumen final de la concentración de cada aceite y puestos a secar durante un día, para el control se aplicó acetona GT, la lectura de mortalidad se hizo luego de las 24 h de exposición de los mosquitos. Se repitió el experimento tres veces.

1.8 EVALUACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO¹⁷, Se evaluaron los dos compuestos mayoritarios del aceite esencial con mayor efecto larvicida que es el *C. flexuosus*, estos compuestos son el citral con presencia en el aceite esencial del 78,9% y el acetato de geranilo con presencia del 4,6% según otras fuentes^{18 19}^{20 21} y para el presente trabajo se avaluaron los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales usados en este estudio usando cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) bajo dirección del CINTROP y se obtuvieron en el aceite esencial de *C. flexuosus* un porcentaje de citral del 65,7% al unir los porcentajes del neral y el geranial que son los compuestos que forman el citral y el acetato de geranilo en un porcentaje del 10%. Se evaluaron las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 y 90 ppm que son las concentraciones que se usaron para evaluar las concentraciones letales en este aceite esencial. Se realizaron 4

¹⁷ Ibid

¹⁸ GUPTA M.P.. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda. Bogotá. 1995. pp. 559-560.

¹⁹ ACOSTA DE LA LUZ L.L. y RODRÍGUEZ FERRADA C.A. AGRINFOR.. Plantas medicinales: bases para su producción sostenible. Impresiones MINAG, La Habana, Cuba. 203 2006 pp. 91-92.

²⁰ FERNÁNDEZ-POLA J. Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias.. Ediciones Omega. Barcelona, 1996 pp.32-35, 218-221.

²¹ RODRÍGUEZ QUINTANILLA Raúl, RUIZ NOVA Carlos, ARIAS MOYANO Ginna, CASTRO SALAZAR Hans, MARTÍNEZ JAIRO y STASHENKO Elena. Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2012 11(1).

réplicas y un control para cada concentración, se usaron 10 larvas L3-L4 se colocaron en vasos plásticos de 200 mL y un volumen final de 100 mL con la concentración, para el control se usó DMSO al 0,5%. Se hicieron las lecturas de mortalidad transcurridas las 24 y 48 h de exposición.

1.9 EVALUACIÓN DEL EFECTO RESIDUAL

Se realizó siguiendo los protocolos estándar de la WHO²², se evaluaron los dos aceites esenciales con mayor efecto larvicida, *C. flexuosos* y *C. sinensis*, se usó la concentración letal del 99%, realizando 4 réplicas y un control por aceite esencial usando DMSO al 0,5%, se seleccionaron 10 larvas L3-L4 que se colocaron en vasos plásticos de 200 mL y se le aplicó un volumen final de 100 mL con la concentración letal del 99%, las larvas fueron removidas diariamente con papel filtro registrando la mortalidad y añadiendo el nuevo lote de larvas diario hasta que la mortalidad decayó al 0.

²² WHO. Global Insecticide Use for Vector-borne Disease Control. Geneva: World Health Organization. 2009

2. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE:

- Crianza, mantenimiento y reproducción de colonias de *A. aegypti*
- Preparación, elaboración y evaluación de experimentos de determinación insecticida
- Preparación, elaboración y evaluación de experimentos sobre actividad ovicida
- Preparación, elaboración y evaluación de experimentos sobre actividad larvicida y pupicida
- Preparación, elaboración y evaluación de experimentos de determinación adulticida
- Preparación, elaboración y evaluación del efecto residual en larvas
- Preparación, elaboración y evaluación de compuestos mayoritarios
- Manejo del programa estadístico Probit

La metodología de cada una de estas competencias se explicaron en materiales y métodos, el análisis probit se realizó en el análisis de la actividad larvicida, estas metodologías fueron modificadas de las planteadas en el anteproyecto debido a las necesidades y recursos de esta investigación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA

Como se observa en la tabla 1, en las concentraciones de 1000 y 300 ppm en todos los aceites esenciales hubo una mortalidad del 100%, lo que permite inferir que todos los aceites esenciales tienen potencial insecticida al comparar con el control de cada tratamiento. También los resultados permiten establecer las concentraciones para evaluar cada aceite esencial de acuerdo a los resultados obtenidos con la concentración de 30 ppm, y establecer que *C. flexuosus* muestra un mayor potencial frente a los otros aceites, seguido de *E. citriodora* y *C. sinensis*.

Tabla 1. Dosis diagnosticas para evaluar la actividad insecticida

Aceite esencial	Concentración (ppm)	% Mortalidad	% mortalidad control
<i>Lippia alba</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	0 ± 0	0
<i>Lippia origanoides</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	0 ± 0	0
<i>Eucalyptus citriodora</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	40 ± 23,30	0
<i>Cymbopogon citratus</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	0 ± 0	0

Aceite esencial	Concentración (ppm)	% Mortalidad	% mortalidad control
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	73,33 ± 2,56	0
<i>Citrus sinensis</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	40 ± 2,56	0
<i>Cananga odorata</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	0 ± 0	0
<i>Swinglea glutinosa</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	33,33 ± 11,8	0
<i>Tagetes lucida</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	0 ± 0	0
Mezcla de <i>L.alba</i> y <i>L. origanoides</i>	1000	100 ± 0	0
	300	100 ± 0	0
	30	20 ± 2,56	0

3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DETERMINANDO CONCENTRACIONES LETALES

En la tabla 2 observamos que el aceite esencial con mayor actividad larvicida es *C. flexuosus* con LC₅₀ de 17,16 a las 24 h y de 14,67 a las 48 h y una LC₉₅ de 49,9 a las 24 h y de 55,59 a las 48 h; seguido de *C. sinensis* con una LC₅₀ de 20,61 a

las 24 h y de 18,84 a las 48 h y una LC₉₅ de 99 a las 24 h y de 102,12 a las 48 h. El aceite esencial que mostro menor efectividad fue *C. citratus* con un LC₅₀ de 123,3 y 94,3 ppm a las 24 y 48 horas respectivamente y LC₉₅ de 242,6 y 163 ppm a las 24 y 48 horas respectivamente. La mezcla de *L. alba* y *L. origanoides* mostró más baja LC₅₀ que cuando se evaluaron separadamente los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides*.

Originalmente Kumar y Dutta (1987) y Osmani y Sighamony (1980) reportaron actividad insecticida sobre mosquitos por parte del *C. flexuosus*; incluso el LC₅₀ estimado por Kumar y Dutta (1987) fue más alto que el de este estudio, siendo de 91,4 ppm en *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Díptera: Culicidae). En el trabajo de Manimaran et al. (2012) se observó actividad insecticida prometedora ya que hubo una mortalidad del 84% en la concentración de 1000 ppm de este aceite esencial sobre *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Díptera: Culicidae). Tennyson et al. (2013) observo una LC₅₀ 8 veces más alta (138.36 ppm) para *A. aegypti* que la observada en este estudio.

Cuando se compara las concentraciones letales obtenidas del aceite esencial de *C. sinensis* en el estudio con los trabajos anteriores, las de este estudio son mucho más bajas. Ramar et al. (2013) observo una LC₁₀₀ de 500 ppm, Tennyson et al. (2013) observo una LC₅₀ de 85,93 ppm, Warikoo et al. (2012) observo una LC₅₀ de 446,83 ppm y Murugan et al. (2012) observo una LC₅₀ de 891,61 en larvas de *A. aegypti*. Cavalcanti et al. (2004) reporto un LC₅₀ de 538 ppm para *C. sinensis* en Brasil, esta es al menos 26 veces más alta que la encontrada en este estudio. Mientras que Amusan et al. (2005) reportó que el *C. sinensis* de Nigeria es más efectivo que el de Colombia, una explicación para esto es que en el trabajo de Amusan et al. (2005) se evaluó el extracto de la cascara de la fruta y en este trabajo se evaluó el aceite esencial de las hojas.

Es el primer reporte de la actividad larvica sobre *A. aegypti* del aceite esencial de *T. lucida* contribuyendo con la información de una nueva planta que sirve como modelo de estudio y puede ser usada en la lucha contra este vector. Otros miembros de este género ya han mostrado actividad biocida como *T. minuta* L. y *T. erectes* L. (Asteraceae) en *A. aegypti* y *A. stephensi* como mostró Shaalan et al. (2005).

Este estudio indica una actividad insecticida promisorio del aceite esencial de *E. citriodora* ya que se reporta un LC50 menor de 100 ppm, contrario a los otros trabajos que se han realizado con esta planta, como el de trabajo de Makhaik et al. (2005) en el que el LC50 fue de 1,5 % (15000 ppm) a los 60 minutos. El resultado de Amer y Melhorn (2006) por otro lado apoya el resultado del presente estudio al haber una mortalidad del 76,7% a los 50 ppm, siendo similar.

C. citratus fue el aceite esencial menos efectivo, pero al compararlo con el LC50 hallado por Cardenas *et al.* (2013) en la ciudad de Bogota, este fue del 1,07% (10700 ppm). A pesar de ser del mismo género *C. citratus* mostró actividad insecticida contraria a *C. flexuosus* que fue el aceite esencial más promisorio. La diferencia entre aceites esenciales del mismo género, familia o especie es debido al hecho que contienen diversos compuestos actuando en el insectos en diferentes vías y estos compuestos pueden estar en diferentes proporciones dependiendo de la forma de cosecha, condiciones climáticas y los componentes del sustrato donde crecen.

Cuando se mezclaron los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides* el efecto larvica fue potencializado, debido a las diferentes formas de acción de los componentes de estas plantas que actúan en el mosquito desempeñando un rol sinérgico de estos aceites esenciales sobre los principales componentes de estos aceites esenciales.

Tabla 2. Evaluación de la actividad larvica evaluando las LC50 y LC95

Aceites esenciales	Concentración Letal					
	24h			48 h		
	LC ₅₀	LC ₉₅	X2	LC ₅₀	LC ₉₅	X2
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	17,16 (13,78-21,37)	49,9 (30,92-80,66)	3,08	14,67 (10,13-21,23)	55,59 (22,75-183,45)	0,99
<i>Citrus sinensis</i>	20,61 (16,49-23,82)	99,0 (91,30-402,53)	2,22	18,84 (14,03-22,22)	102,12 (68,19-254,49)	3,87
mezcla de <i>L. alba</i> y <i>L. origanoides</i>	40,13 (37,76-43,26)	79,77 (68,63-99,23)	6,36	37,55 (30,90-45,74)	62,48 (38,29-110,55)	6,51
<i>Lippia alba</i>	44,26 (4,58-47,01)	99,61 (89,24-114,70)	7,40	42,79 (40,35-45,27)	89,05 (10,05-142,32)	1,65
<i>Cananga odorata</i>	52,96 (49,91-55,79)	101,52 (93,29-113,47)	5,8	45,92 (43,55-48,13)	74,71 (70,11-80,94)	0,91
<i>Lippia origanoides</i>	53,37 (50,60-56,60)	93,05 (83,57-107,86)	3,41	38,06 (33,41-41,98)	112,2 (94,81-196,05)	0,93
<i>Swingle glutinosa</i>	65,71 (61,64-70,46)	151,01 (131,01-182,72)	2,3	59,23 (55,20-63,76)	148,73 (128,16-181,36)	3,47
<i>Tagetes lucida</i>	66,27 (63,7-68,7)	95,13 (89,52-103,49)	2,98	64,86 (62,24-67,32)	93,92 (100,72-123,45)	1,4
<i>Eucaliptus citriodora</i>	71,22 (63,91-81,62)	288 (208,53-479,27)	2,66	52,51 (44,49-62,50)	312,34 (225,40-660,13)	2,86
<i>Cymbopogon citratus</i>	123,30 (114,17-138,60)	242,69 (195,97-363,81)	0,96	94,31 (89,33-99,30)	163,0 (147,22-192,23)	3,08

3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVICIDA

Los resultados de la actividad ovicida no permitieron comparar la mortalidad debido a que el control no fue informativo en ninguno de los diez aceites en las concentraciones de 100 y 200 ppm posiblemente porque el material biológico no estaba en condiciones óptimas debido a que el tiempo de almacenamiento de los huevos fue muy prolongado. Según los resultados obtenidos los aceites esenciales con mayor efecto ovicida son: *S. glutinosa*, *C. odorata*, *T. lucida* y la mezcla de *L. alba* y *L. origanoides*; al obtener mortalidades del 100% en las concentraciones de 100 y 200 ppm (Tabla 3).

Al comparar con el trabajo de Rajkumar y Jebanesan 2004 en que se evaluó la actividad ovicida de *Solanum trilobatum* frente a *Culex quinquefasciatus*, la mortalidad ovicida en las concentraciones de 100 y 200 ppm estuvieron entre 0 y 70% y 8 y 78% respectivamente y en la actividad ovicida de *S. trilobatum* frente a *C. tritaeniorhynchus* entre 0 y 59 % y 4 y 77% respectivamente para las mismas concentraciones; y al compararlo con el trabajo de Samidurai et al 2009 en el que se evaluó la actividad ovicida de *Pemphis acidula* al usar 3 métodos de extracción diferentes usando metanol, benceno o acetona frente a *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, para la extracción usando metanol frente a *A. aegypti* las concentraciones de 150 y 200, ppm tuvieron mortalidad ovicida del 0 y el 8% respectivamente, para la extracción usando benceno la mortalidad ovicida para las mismas concentraciones fueron del 0% en ambas y para la extracción usando acetona la mortalidad ovicida para las mismas concentraciones fueron del 0% en ambas; los resultados de nuestros aceites esenciales con mayor actividad ovicida: *S. glutinosa*, *C. odorata*, *T. lucida* y la mezcla de *L. alba* y *L. origanoides*; con estos dos estudios observamos que los aceites esenciales evaluados en este estudio presentaron mayor actividad ovicida.

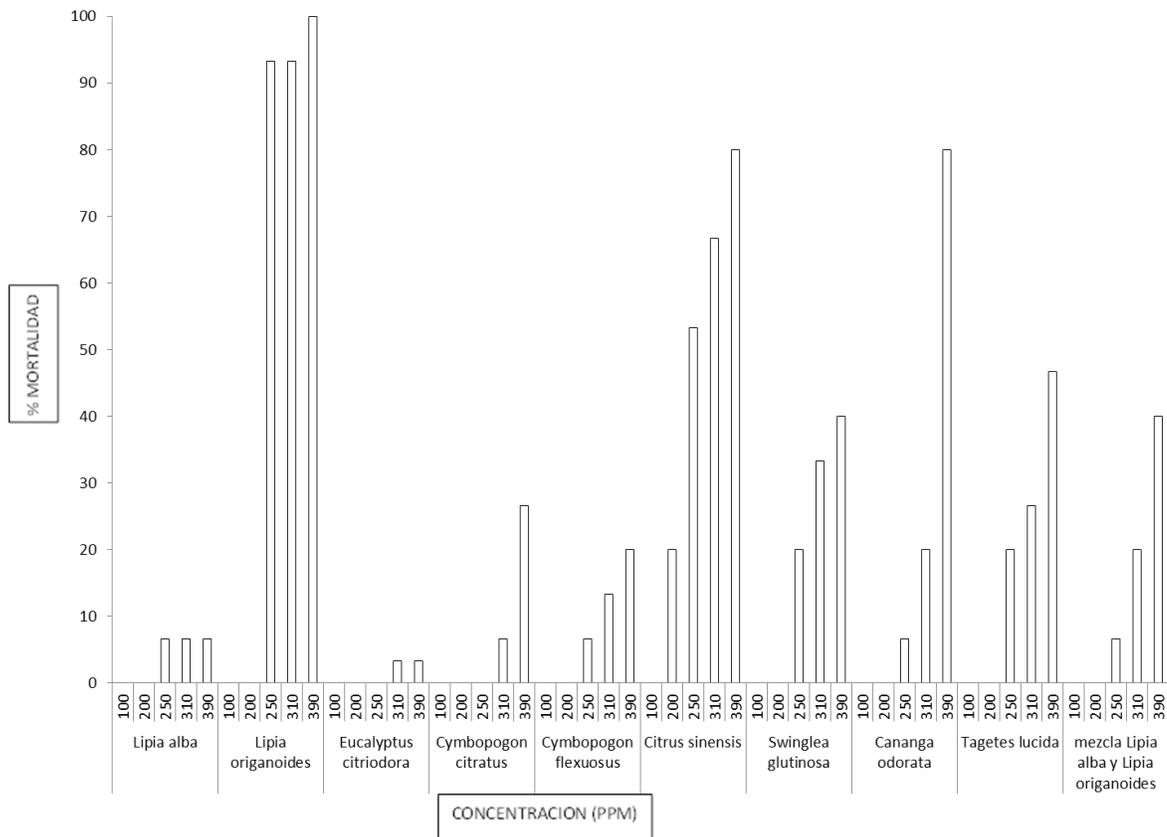
Tabla 3. Evaluación de la actividad ovidica en las concentraciones de 100 y 200 ppm, reflejando el número de huevos eclosionados en cada replica y en el control.

Aceite esencial	Concentración	% Mortalidad replicas	% Mortalidad control
<i>Lipia alba</i>	100	85±0,76	100
	200	88,5±1,52	90
<i>Lipia organoides</i>	100	55±1,52	100
	200	80±1,52	70
<i>Eucalyptus citriodora</i>	100	62,5±0,28	50
	200	42,5±0,36	50
<i>Cymbopogon citratus</i>	100	57,5±2,02	60
	200	52,5±2,36	70
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	100	77,5±0	90
	200	70±0,28	90
<i>Citrus sinensis</i>	100	100±0	100
	200	97,5±0	100
<i>Swingle glutinosa</i>	100	100±1,15	100
	200	100±1,15	100
<i>Cananga odorata</i>	100	100±1	100
	200	100±1,52	100
<i>Tagetes lucida</i>	100	100±0,28	100
	200	100±1	100
Mezcla <i>L. alba</i> y <i>L. organoides</i>	100	100±1,73	100
	200	100±1,15	100

3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PUPICIDA

El aceite esencial que mostro mayor actividad pupicida fue *L. origanoides* ya que en las concentraciones de 250 y 310 ppm la mortalidad fue del 93% y la concentración de 390 ppm tuvo una mortalidad del 100%, el segundo aceite esencial con mayor efecto pupicida fue *C. sinensis* que en las concentraciones de 200, 250, 310 y 390 ppm las mortalidades fueron de 20, 53, 66 y 80% respectivamente y el tercer aceite con mayor efecto pupicida fue *C. odorata* que en las concentraciones de 250, 310 y 390 ppm las mortalidades fueron de 6, 20 y 80% respectivamente. En el trabajo de Murugan et al 2012 en el que se evaluó el efecto pupicida del extracto de la cascara de naranja *C. sinensis* frente *A. stephensi*, *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus*, en concentraciones de 100 a 500 ppm, frente a *A. stephensi* los porcentajes de mortalidad fueron desde el 17 al 52% respectivamente; frente a *A. aegypti* los porcentajes de mortalidad fueron desde el 14 al 54 % respectivamente y frente a *C. quinquefasciatus* los porcentajes de mortalidad fueron desde el 11 al 49 % respectivamente; en el trabajo de Kovedan et al 2012 se evaluó la actividad pupicida del extracto de hojas de *Carica papaya* sobre *A. aegypti* en concentraciones de 100 a 500 ppm mostraron mortalidades desde el 14 al 67 %; demostrando estos trabajos que los resultados que se obtuvieron de los tres aceites con mayor efecto pupicida son más efectivos al compararlos y que el aceite esencial de *C. sinensis* de este estudio es más efectivo contra huevos de *A. aegypti* que el evaluado por Murugan et al 2012.

Figura 1. Evaluación de la actividad pupicida en las concentraciones de 100, 200, 250, 310 y 390 ppm

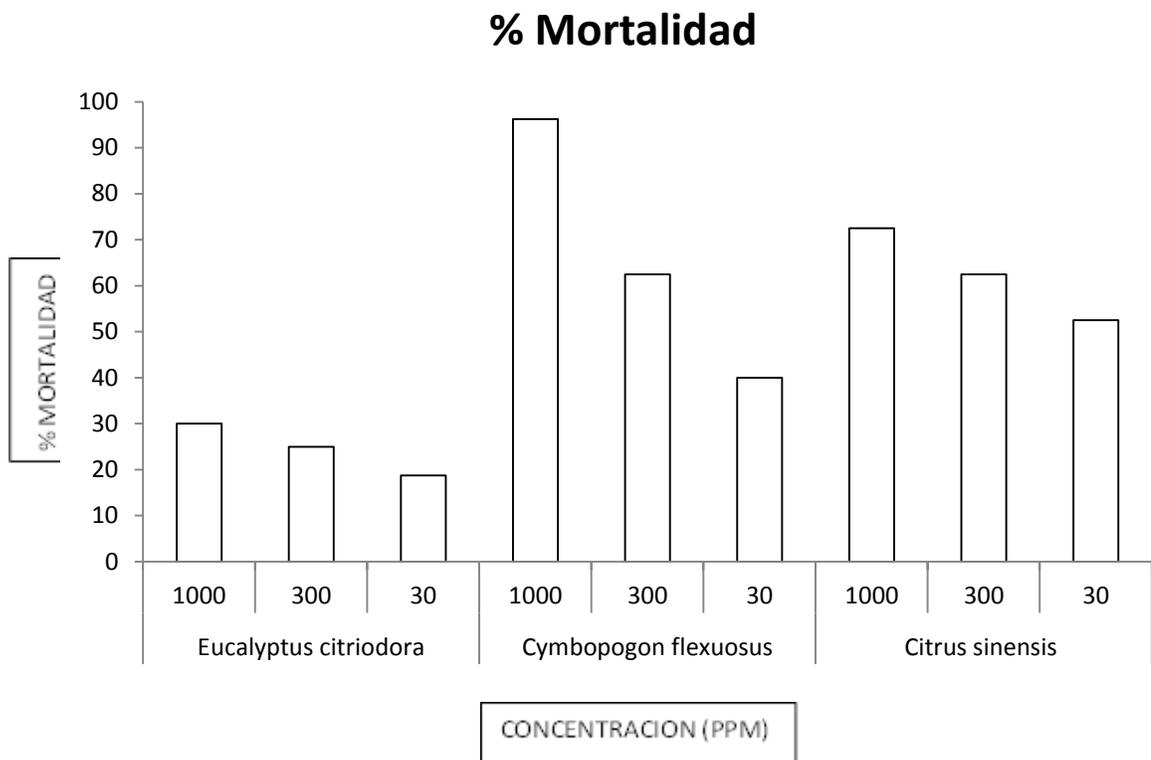


3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADULTICIDA

C. flexuosus mostró mayor actividad adulticida con el porcentaje de mortalidad a los 1000 ppm de 96%, a los 300 ppm de 62% y a los 30 ppm de 40%, luego le sigue *C. sinensis* que en las concentraciones de 1000, 300 y 30 ppm la mortalidades fueron de 72, 62 y 52% respectivamente y en última instancia el aceite esencial de *E. citriodora* en las concentraciones de 1000, 300 y 30 ppm la mortalidades fueron de 30, 25 y 18% respectivamente (Figura 2). En el trabajo de Murugan *et al* 2012 en el que también se evaluó el efecto adulticida del extracto de la cascara de naranja *C. sinensis* frente *A. stephensi*, *A. aegypti* y *C.*

quinquefasciatus, en las concentraciones de 180, 260, 340, 420 y 500 ppm frente a *A. stephensi* los porcentajes de mortalidad fueron 24, 50, 67 82 y 95 % respectivamente; las mismas concentraciones frente a *A. aegypti* los porcentajes de mortalidad fueron 21, 47, 62, 76 y 91 % respectivamente y las mismas concentraciones frente a *C. quinquefasciatus* los porcentajes de mortalidad fueron 17, 37, 55, 72 y 86 % respectivamente, que comparado con los resultados de las concentraciones de 300 ppm y 30 ppm de *C. flexuosus* y *C. sinensis* se observa una mayor eficacia y que el aceite esencial de *C. sinensis* de este estudio es más efectivo contra huevos de *A. aegypti* que el evaluado por Murugan et al 2012.

Figura 2. Evaluación de la actividad aduictida en las concentraciones de 1000, 300 y 30 ppm



3.6 EVALUACIÓN DE COMPUESTOS MAYORITARIOS

En la evaluación de los compuestos mayoritarios de *C. flexuosus*, el citral mostró en las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 ppm una mortalidad del 0% y en la concentración de 90 ppm mortalidad del 5% (Figura 3) lo que evidencia que este compuesto no tiene mayor actividad insecticida. Mientras que el acetato de geranilo demostró una actividad insecticida muy eficaz teniendo las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39 y 50 unas mortalidades de 0, 0, 2,5 , 2,5 , 7,5 , 25 y 80% respectivamente (Figura 4), pero no se le puede atribuir todo la actividad insecticida debido al bajo porcentaje en el que se encuentra dentro del aceite esencial.

Figura 3. Evaluación de la actividad larvicida del citral en las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 y 90 ppm

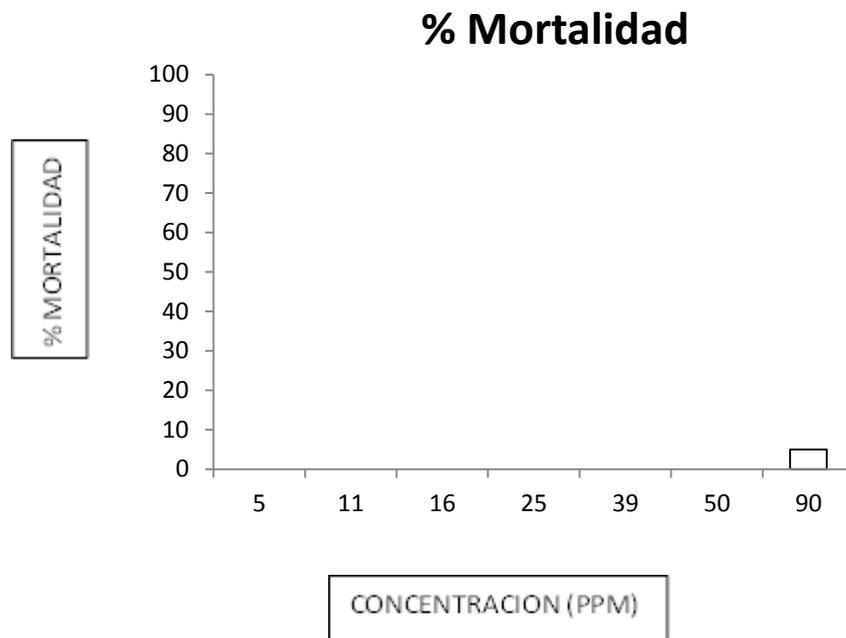
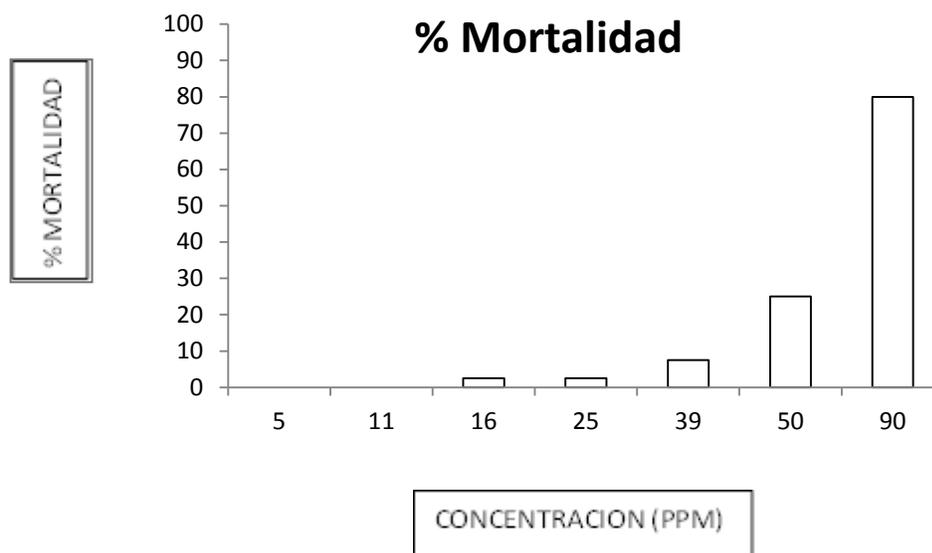


Figura 4. Evaluación de la actividad larvica del acetato de geranilo en las concentraciones de 5, 11, 16, 25, 39, 50 y 90 ppm



3.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO RESIDUAL

El aceite esencial de *C. sinensis* mantuvo una mortalidad del 100% hasta el día 2, el día 3 la mortalidad decayó al 23% y el día 4 la mortalidad fue del 0% (Figura 5), para el aceite esencial de *C. flexuosus* la mortalidad también se mantuvo hasta el día 2 del 100%, el día 3 decayó al 46% y el día 4 ya bajo al 0% (Figura 6), concluyendo que los dos aceites esenciales presentan un efecto residual muy bajo debido a los aceites esenciales están compuestos de volátiles que los caracteriza por tener una gran tensión de vapor y que su efecto sea de toxicidad fumigante por lo que su efecto residual es muy bajo^{23 24 25 26}.

²³ Rice, P.J. y. Coats J. R.. Insecticidal properties of several monoterpenoids to house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 87: 1172-1179. 1994

²⁴ Toloza A. C., Zygadlo J., Mougabure Cueto G., Biurrun F., Zerba E. y Picollo M.I.. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-

Figura 5. Evaluación del efecto residual de *C. sinesis*

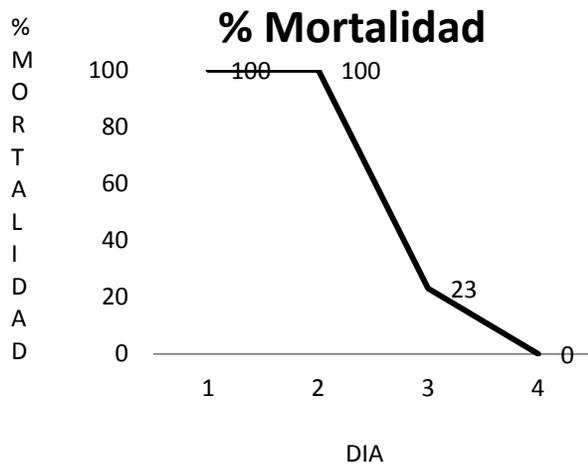
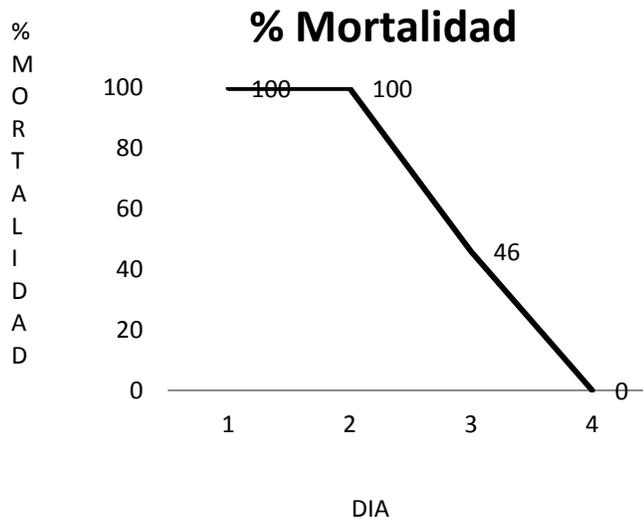


Figura 6. Evaluación del efecto residual de *C. flexuosus*



resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol. 43: 889-895. 2006

²⁵ Alzogaray Raul, Sfara V. y Zerba E. N. Fumigant Insecticidal Activity and Repellent Effect of Five Essential Oils and Seven Monoterpenes on First-Instar Nymphs of *Rhodnius prolixus*. J. Med. Entomol. 46(3): 511-515. 2009

²⁶ Fournet A., Rojas de Arias A., Charles B. y Bruneton J.. Chemical constituents of essential oils of *Muiia*, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. Journal of Ethnopharmacology 52 145-149. 1996

4. CONCLUSIONES

En conclusión tenemos que si bien *C. flexuosus* presenta el mayor efecto larvicida y adulticida de los aceites esenciales, *C. sinensis* presenta un eficaz efecto insecticida en todas las fases de *A. aegypti* (larvas, pupas y adultos) siguiendo muy de cerca en efectividad al *C. flexuosus*, por lo que sería interesante probar una mezcla de estos dos aceites esenciales para potencializar su acción biocida, el compuesto mayoritario acetato de geranilo en *C. flexuosus* podría ser un prometedor compuesto insecticida que debería ser evaluado con mayor profundidad ya que contribuye bastante en el efecto biocida de este aceite, si bien el efecto residual de los aceites esenciales evaluados fue muy bajo debido a que están compuestos de volátiles con gran tensión de vapor haciendo que su efecto sea de toxicidad fumigante y no residual.

BIBLIOGRAFIA

ABHAY J. KHANDAGLE, VRUSHALI S. TARE, KISHOR D. RAUT Y RASHMI A. MOREY . Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. Parasitol 2011 Res 109:339–343 doi 10.1007/s00436-011-2261-3.

ACIOLE S.D.G. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de mata atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertation, University of Lisbon. 2009

ACIOLE S.D.G., PICCOLI C.F., DUQUE JE, COSTA E.V, NAVARRO-SILVA M.A, MARQUES F.A, MAIA B.L.N., PINHEIRO M.L.B. y REBELO M.T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Colomb Entomol 2011 37:262–268.

ACOSTA DE LA LUZ L.L. y RODRÍGUEZ FERRADA C.A. AGRINFOR.. Plantas medicinales: bases para su producción sostenible. Impresiones MINAG, La Habana, Cuba. 203 2006 pp. 91-92.

ALARCÓN-ELBAL P.M. , DELACOUR S., PINAL R. , RUIZ-ARRONDO I., MUÑOZ A. , BENGUA M., RITJA R. y LUCIENTES J. Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 2010 69 (2): 140-148.

ALZOGARAY Raul , SFARA V. y ZERBA E. N. Fumigant Insecticidal Activity and Repellent Effect of Five Essential Oils and Seven Monoterpenes on First-Instar Nymphs of *Rhodnius prolixus*. J. Med. Entomol. 2009 46(3): 511-515.

AMER A. y MEHLHORN H.. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol Res. Doi: 10.1007/s00436-006-0182-3. 2006

AUTRAN E.S., NEVES I.A., SILVA C.S.B, SANTOS G.K.N., CÂMARA C.A.G. y NAVARRO D.M.A.. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresour Technol. doi:10. 1016/j.biortech.2008.10.055. 2009

CAVALCANTI E.S.B., MORAIS S.M., LIMA M.A.A. y SANTANA E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004 99:541–544.

CHANTRAINE J.M., LAURENT D., BALLIVIAN C., SAAVEDRA G., IBAÑEZ R. y VILASECA L.A.. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. Phytoterap Res 12:350–354. 1998

CHAPAGAIN, B.P., SAHARAN V. and WIESMAN ,. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. Bioresource Technology, 2008 99: 1165-1168.1165-1168.

CHOOCHOTE W., CHAITONG U., KAMSUK K., RAYYANACHANPICHAL E., JITPAKDI A., TIPPAWANGKOSOI P., CHAIYASIT D., CHAMPAKAEW D., TUETUN B. y PITASAWAT B. Adulticidal activity against *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) of three *Piper spp.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006 48(1):33-7.

CHOOCHOTE W, CHAIYASIT D, KANJANAPOTHI D, RATTANACHANPICHAI E, JITPAKDI A, TUETUN B. y PITASAWAT B. Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 30:302–309. 2006

CHUNG I.M., SEO S.H., KANG E.Y., PARK S.D., PARK W.H. y MOON H.I.. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Dendropanax morbifera* against *Aedes aegypti* L. Biochem Syst Ecol. doi:10.1016/j.bse.2009.06.004. 2009

COSTA J.G.M., RODRIGUES F.F.G. y ANGÉLICO E.C. . Chemical- biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Braz J Pharmacogn 15:304–309. 2005

DUA V.K., PANDEY A.C. y DASH A.P. . Adulticidal activity of essential oil of *Lantana camara* leaves against mosquitoes. Indian J. Med. Res., 131: 434-439. 2010

FEITOSA E.M.A., ARRIAGA A.M.C., SANTIAGO G.M.P., LEMOS T.L.G., OLIVEIRA M.C.F., VASCONCELOS J.N., LIMA J.Q., MALCHER G.T., NASCIMENTO R.F., Braz-FILHO R. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). J Braz Chem Soc 20:375–378. 2009

FERNÁNDEZ-POLA J.. Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias.. Ediciones Omega. Barcelona, 1996 pp.32-35, 218-221.

FINNEY D.J.. Probit analysis. Cambridge University Press, 3rd edn. 1971 174 p.

FOURNET A., ROJAS DE ARIAS A., CHARLES B. y BRUNETON J.. Chemical constituents of essential oils of Muiia, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology* 1996 52 145-149.

GÓIS R.W.S., SOUSA L.M., SANTIAGO G.M.P., ROMERO N.R., LEMOS T.L.G., ARRIAGA A.M.C., BRAZ FILHO R.. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of pacharin from *Bauhinia acuruana*. *Parasitol Res.* doi:10.1007/s00436-013-3407-2. 2013

GOVINDARAJAN M., SIVAKUMAR R., RAJESWARI M., YOGALAKSHMI K.. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol Res.* doi:10.1007/s00436-011-2731-7. 2012

GUARIDO Milehna. Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. 2009

GUPTA M.P. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda. Bogotá. 1995pp. 559-560.

JOSIANE S. PROPHIRO, MARIO A. NAVARRO DA SILVA, LUIZ A. KANIS, BRUNA M. DA SILVA, JONNY E. DUQUE-LUNA Y ONILDA S. DA SILVA.. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-011-2547-5. 2011

KALAIVANI K., SENTHIL-NATHAN S., MURUGESAN A.G.. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-011-2623-x. 2012

KOVENDAN KALIMUTHU, MURUGAN KADARKARAI, VINCENT SAVARIAR Y BARNARD DONALD R. . Efficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) against *Culex quinquefasciatus* Say. (Diptera: Culicidae). JBiopest, 5 (supplementary): 170-176. 2012

KULKARNI R.R., PAWAR P.V., JOSEPH M.P., AKULWAD A.K., SEN A. y JOSHI S.P.. Lavandula gibsoni and Plectranthus mollis essential oils:chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J Pest Sci. doi:10. 1007/s10340-013-0502-1. 2013

KUO P.M., CHU F.H., CHANG S.T., HSIAO W.F. y WANG S.Y.. Insecticidal activity of essential oil from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. Holzforschung. doi:10.1515/HF.2007.087. 2007

LEYVA M., MARQUETTI M.C., TACORONTE J.E., SCULL R., TIOMNO O., MESA A., y MONTADA D. Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Rev Biomed 20:5–13. 2009

LIMA M.A.A., OLIVEIRA F.F.M., y GOMES G.A.. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Afr J Biotechnol 10:11716–11720. 2011

LIMA G.P.G., SOUZA T.M., FREIRE G.P., FARIAS D.F., CUNHA A.P., RICARDO N.M.P., MORAIS S.M. y CARVALHO A.F.U.. Further insecticidal activities of

essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-013-3351-1. 2013

LUCIA A., LICASTRO S., ZERBA E. y MASUH H. Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. Entomol Exp Appl. doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x. 2008

MAGALHÃES L.A.M., LIMA M.P., MARQUES M.O.M., FACANALI R., PINTO A.C.S. y TADEI W.P.. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. Molecules. doi:10.3390/molecules15085734. 2010

MANZOOR F., SAMREEN K.B. Y PARVEEN Z.. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae (Diptera: Culicidae). J Anim Plant Sci 23:420–424. 2013

MASSEBO F., TADESSE M., BEKELE T., BALKEW M. Y GEBRE-MICHAEL T.. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. Afr J Biotechnol 8:4183–4188. 2009

MATHUR S.. Prospects of using herbal products in the control of mosquito vectors. Bull Indian Council Med Res. 33(1)1-10. 2003

MURUGAN KADARKARAI, KUMAR PALANISAMY MAHESH, KOVENDAN KALIMUTHU, AMERASAN DURAISAMY, JAYAPAL SUBRMANIAM Y HWANG JIANG-SHIOU.. Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res doi 10.1007/s00436-012-3021-8. 2012

PATHAK N., MITTAL P.K., SINGH O.P., SAGAR D.V. Y VASUDEVAN P.. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). Int Pest Control 42:53–55. 2000

PERUMALSAMY H., KIM N.J. Y AHN A.J.. Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 46:1420–1423. 2009

PERUMALSAMY H., CHANG K.S., PARK C. y AHN Y.J.. Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. J Agric Food Chem. doi:10.1021/jf102193k. 2010

PITASAWAT B., CHAMPAKAEW D. Y CHOOCHOTE W. . Aromatic plant- derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. Fitoterapia. doi:10.1016/j.fitote.2007.01.003. 2007

RAJKUMAR S. Y JEBANESAN A.. Ovicidal activity of *Solanum trilobatum* L. (Solanaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus* Say and *Culex tritaeniorhynchus* Giles (Diptera: Culicidae). International Journal of Tropical Insect Science Vol. 24, No. 4, pp. 340–342. 2004

RICE, P.J. Y COATS J. R.. Insecticidal properties of several monoterpenoids to house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 87: 1172–1179. 1994

RODRÍGUEZ QUINTANILLA Raúl, RUIZ NOVA Carlos, ARIAS MOYANO Ginna, CASTRO SALAZAR Hans, MARTÍNEZ Jairo y STASHENKO Elena. Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2012 11(1).

ROHANI, A., NAZNI W.A., NGO L.V., IBRAHIM I. Y LEE H.L.. Adulticidal properties of the essential extracts of some Malaysian plants on vector mosquitoes. Tropical Biomedicine, 1997 14: 5-9.

RUIZ C., CACHAY M., DOMÍNGUEZ M., VELÁSQUEZ C., ESPINOZA G., VENTOSILLA P. y ROJAS R. Chemical composition, antioxidant and mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. Planta Med. doi:10.1055/s-0031-1282361. 2011

SAMIDURAI K., JEBANESAN A., SARAVANAKUMAR A., GOVINDARAJAN M. Y PUSHPANATHAN T.. LARVICIDAL, Ovicidal and Repellent Activities of *Pemphis acidula* Forst. (Lythraceae) Against Filarial and Dengue Vector Mosquitoes. Academic Journal of Entomology 2009 2 (2): 62-66.

SANKARAN RAJKUMAR, ARULSAM Y JEBANESAN Y RAJARATHINAVELU NAGARAJAN.. Effect of leaf essential oil of *Coccinia indica* on egg hatchability and different larval instars of malarial mosquito *Anopheles stephensi*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011 948-951.

SANTOS R.P., NUNES E.P., NASCIMENTO R.F., SANTIAGO G.M.P., MENEZES G.H.A., SILVEIRA E.R. Y PESSOA O.D.L.. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the northeast of Brazil. J Braz Chem Soc 2006 17:1027–1030.

SOMBOON P., PRAPANTHADARA L.A. y SUWONKERD W. . Insecticides susceptibility test of *Anopheles minimus* S.L., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 2003 30: 184-194.

TENNYSON S., SAMRAJ D.A., JEYASUNDAR D. y CHALIEU K. . Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Middle-East J Sci Res. doi:10.5829/idosi.mejsr.2013.13.1.64107. 2013

THOMAS T.G., RAO S. Y LAL S.. Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. Jpn J Infect Dis 2004 57:176–177.

TOLOZA A. C., ZYGADLO J., MOUGABURE Cueto G., BIURRUN F., ZERBA E. y PICOLLO M.I.. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol. 2006 43: 889–895.

Torres M.C.M., Assunção J.C. y Santiago G.M.P. 2008. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. Chem Biodivers 5:2724–2728.

WEINZIERL R. y HENN T.. Alternatives in insect management: Biological and biorational approaches. North Central Regional Extension Publication 401. University of Illinois at Urbana-Champaign. 1992

WHO. Global Insecticide Use for Vector-borne Disease Control. Geneva: World Health Organization. 2009

WHO. Prevention and Control Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Comprehensive Guidelines WHO Regional Publication, SEARO, No 29. Geneva: World Health Organization. 1999

YANG Y.C., LEE S.G., LEE H.K., LEE M.K. y LEE H.S.. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. J. Agric. Food Chem., 2002 50: 3765-3767.

ZAIM, M. Y P. GUILLET. Alternatives insecticides: an urgent need. Trends in Parasitology 2002 18(4): 161-163.

ZHU J., ZENG X., O'NEAL M., SCHULTZ G., TUCKER B., COATS J., BARTHOLOMAY L. Y XUE R.D.. Mosquito larvicidal activity of botanical based mosquito repellents. J Am Mosq Control Assoc. Doi: 10.2987/8756971X%282008%2924%5B161%3AMLAOB M%5D.0.CO%3B2 2006

ZIMMERMAN R.. Control selectivo de vectores y el rol de Bti en el control de vectores. En Guía de Prácticas para la Producción de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. OPS/OMS/ROW/IMTA vH. 2001

ANEXOS

Este trabajo investigativo tuvo dos ponencias en el congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, siendo finalista con la ponencia titulada Aceites esenciales con actividad insecticida frente a larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al premio a trabajo de investigación nivel de pregrado.

Anexo A: Participación en el 40º congreso de SOCOLEN como autor



Anexo B: Participación en el 40º congreso de SOCOLEN como ponente



Se anexa el artículo que se publicó en base a los resultados de esta pasantía en la revista alemana parasitology resource.

Anexo C. Artículo publicado

Parasitol Res
DOI 10.1007/s00436-014-3917-6

ORIGINAL PAPER

Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Sharon Smith Vera · Diego Fernando Zambrano · Stelia Carolina Méndez-Sánchez
Fernando Rodríguez-Sanabria · Elena E. Stashenko · Jonny E. Duque Luna

Received: 18 March 2014 / Accepted: 11 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Insecticidal activity of the essential oils (EOs) isolated from *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa*, and *Cananga odorata* aromatic plants, grown in Colombia (Bucaramanga, Santander), and of a mixture of *L. alba* and *L. origanoides* EOs were evaluated on *Aedes (Stegomyia) aegypti* Rockefeller larvae. The EOs were extracted by microwave-assisted hydrodistillation and characterized by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The main components of the EOs were identified using their linear retention indices and mass spectra. The lethal concentrations (LCs) of the EOs were determined between the

third and fourth instar of *A. aegypti*. LC₅₀ was determined by probit analysis using mortality rates of bioassays. All essential oils tested showed insecticidal activity. The following values were obtained for *C. flexuosus* (LC₅₀=17.1 ppm); *C. sinensis* (LC₅₀=20.6 ppm); the mixture of *L. alba* and *L. origanoides* (LC₅₀=40.1 ppm); *L. alba* (LC₅₀=42.2 ppm); *C. odorata* (LC₅₀=52.9 ppm); *L. origanoides* (LC₅₀=53.3 ppm); *S. glutinosa* (LC₅₀=65.7 ppm); *T. lucida* (LC₅₀=66.2 ppm); *E. citriodora* (LC₅₀=71.2 ppm); and *C. citratus* (LC₅₀=123.3 ppm). The EO from *C. flexuosus*, with citral (geranial+neral) as main component, showed the highest larvicidal activity.

S. S. Vera · D. F. Zambrano · F. Rodríguez-Sanabria ·
J. E. Duque Luna

Center for Research on Tropical Diseases (Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales-CINTROP), Faculty of Health, School of Medicine, Department of Basic Sciences, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

F. Rodríguez-Sanabria · J. E. Duque Luna (✉)
Group for Research on Infectious and Metabolic Diseases (Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Metabólicas-GINEM), Faculty of Health, School of Medicine, Department of Basic Sciences, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
e-mail: jonedulu@uis.edu.co

S. C. Méndez-Sánchez
Group for Research in Biochemistry and Microbiology (Grupo de Investigación en Bioquímica Y Microbiología-GIBIM), School of Chemistry, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

E. E. Stashenko
Center for Research in Biomolecules (Centro de Investigación en Biomoléculas-CIBIMOL) and the National Research Center for the Agro-industrialization of Tropical Medicinal and Aromatic Plants (Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Plantas Aromáticas y Medicinales Tropicales-CENTVAM), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Keywords Essential oil · Larvicidal activity · Mosquito control · Geranial

Introduction

Dengue is the most important disease transmitted by arthropods in the world; more than 2.5 billion people are at risk of contracting the virus by sharing an area of spatial distribution with the vector *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L., 1762) (Guzman et al. 2010). Although this mosquito can also transmit other arboviral infections such as encephalitis, yellow fever, and hemorrhagic fevers, among others, none of these ailments compares to dengue when it comes to morbidity and mortality (Bhatt et al. 2013). A phenomenon of the problem faced with this vector is that the number of cases increases every year as a result of the simultaneous circulation of the four serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 (Laughlin et al. 2012; Simmons et al. 2012).

Since more than 50 million people are infected with dengue each year, and this leads to the death of a significant percentage of the people infected due to dengue complications, there are periodic health campaigns to find solutions for the

Published online: 30 April 2014

 Springer

problem. Nevertheless, these activities are carried out in accordance with the policies of the countries affected by the problem. However, in one way or another, they are all focused on the population decline of the vector. Actions involve environmental sanitation, removal of breeding areas, elimination of potential containers, and the application of chemical and biological insecticides (Duque et al. 2009; Guzman et al. 2010). Despite the efforts in environmental sanitation and vector control, it has been observed that what is being done does not have a significant impact on case reduction, which is why it is said that the problem remains unresolved (Guzman et al. 2010; Simmons et al. 2012).

A consensus among experts on the topic is that dengue will not be eliminated until the vaccine is created to act against the four serotypes of the dengue virus (Simmons et al. 2012). To this effect, the discovery of other alternatives for protecting from the mosquito is crucial, as is the discovery of new insecticides to replace the traditional organophosphates (or) and pyrethroids (Pr) that cause adverse effects on man and the environment. Particularly, since there are countless records that these insecticides have generated populations of *A. aegypti* resistant to these commercial products (Grisales et al. 2013; Harris et al. 2010; Lima et al. 2011).

Under this perspective, new molecules must be found to control insect pests that will replace synthetic insecticides. You could say that there is now a good source of information on products that have an effect on *A. aegypti*. Thanks to the studies of many researchers on the semiochemical manifestations of different plants in terms of their extracts and essential oils (EOs), we now have knowledge of insecticidal activity, growth inhibition, and repellent, antifeedant, and deterrent actions, among others (Bakkali et al. 2008; Isman 2006; Shaalan et al. 2005). In addition, there are a number of benefits that make the exploration of botanical insecticides for pest control attractive, such as low environmental persistence, little or no toxicity to mammals, and the different forms of action on the insect (Kishore et al. 2011; Mullai et al. 2008; Silva et al. 2008).

Although the use of plant-based products has been known for centuries, many of the studies that evaluate plants and their by-products applied on mosquitoes are no more than one hundred years old. That is because most of this research has been conducted on agricultural pests. However, current literature shows an increasing interest in discovering new plants with insecticidal action, which is reflected in at least 44 plant families with confirmed insecticidal activity, including an effect on the reduction of the dengue virus (Abd et al. 2013; Kishore et al. 2011; Neiro et al. 2010).

That is why we intend to contribute information about plants and majority compounds that have biocidal action on mosquitoes by evaluating the insecticidal effect of the EO of *Tagetes lucida* Cav (Asteraceae), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.

ex Britton & P. Wilson, *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), *Eucalyptus citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S. Johnson (Myrtaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud) Wats (Poaceae), *Citrus sinensis* Osbeck, *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. (Rutaceae), *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F & Thomson (Annonaceae), and a combination of *L. alba* and *L. origanoides* on larvae of *A. aegypti*.

Materials and methods

Colony of mosquitoes

To conduct the experiments on insecticidal action, *A. aegypti* mosquitoes Rockefeller colony were kept in breeding cages (40×40×40 cm) in an insectary at 25±5 °C, humidity of 70±5 %, and photoperiod (12:12). Female *A. aegypti* were permanently offered a sugary solution of honey at 10 %, and when larvae were needed for the experiments, they were fed by inserting the forearm of one of the researchers for 15 min with prior knowledge of the ethics committee as per CEINCI-UIS, Minutes No. 3 2013. Once the females were fed, they rested in the same cage allowing them to carry out oviposition in a container kept inside the cage lined internally with filter paper, which served as an oviposition substrate.

Obtaining the essential oils

All the plants used in the study were collected in the Department of Santander, Colombia. The material was identified up to the species level, and the exsiccatae were deposited in the National Herbarium (Table 1). The extraction of the essential oils, as well as the chemical composition thereof, was carried out based on the protocol reported by Stashenko et al. (2004). The essential oils were obtained by simple hydrodistillation (HD) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHd). HD was conducted in a round-bottomed flask (5 L) with 500 g of plant material and 4 L of water using an electric heater (boiling water) for 2 h. The oil was decanted from the condensate, previously saturated with NaCl, and dried with anhydrous sodium sulfate. For MWHd, the hydrodistillation unit was placed in a domestic microwave oven (2.45 GHz, 800 W) with a hole on the side through which an external glass condenser was connected to the round-bottomed flask containing the plant material (500 g) and water (0.2 L) inside the oven. The unit was operated for 30 min at maximum power, which caused the water to boil vigorously, maintaining the reflux thereof. The EO was accumulated in a Dean-Stark trap and was later decanted from the condensate and dried with anhydrous sodium sulfate.

Table 1 Yield of essential oil, place of collection of the plant, and registration number (voucher)

Scientific name	Common name	Voucher no.	Collected in	Yield % (P/P)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Lemon grass	531013	Bucaramanga	0.4
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalyptus	C-446	Bucaramanga	0.7
<i>Cananga odorata</i>	Ylang-Ylang	531012	Bucaramanga	0.4
<i>Swinglea glutinosa</i>	African lemon	521530	Bucaramanga	0.2
<i>Citrus sinensis</i>	Orange	C-455	Bucaramanga	0.2
<i>Tagetes lucida</i>	Winter tarragon	512074	Bucaramanga	0.4
<i>Lippia origanoides</i>	Wild oregano	517741	Bucaramanga	1.4
<i>Lippia alba</i>	Quick relief	512078	Bucaramanga	0.6
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemon grass	519986	Bucaramanga	0.5

Determination of major components

To establish the chemical composition of the essential oils, an Agilent Technologies 6890 Plus gas chromatograph equipped with an HP-5 MS capillary column (30 m×0.25 mm ID×0.25 μm, df) was used, along with a mass selective detector Agilent Technologies MSD 5973. An electron impact ionization system at 70 eV was used for detection by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Helium was the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The temperatures of the injector and the transfer line were set at 250 and 285 °C, respectively. Column temperature was initially set to 50 °C and then gradually increased up to 150 °C, at a speed of 3 °C per minute; it was maintained for 10 min and finally increased to 250 °C at 10 °C per minute. The diluted samples (1:20 v/v in CH₂Cl₂) were injected at 1 μL in splitless mode. The components were identified by comparing their relative retention times and mass spectra with those of standard compounds; data from NIST, Wiley, and ADAMS of the GC-MS system were used along with data from literature.

Determination of insecticidal activity

After feeding the female mosquitoes with blood for 3 days, the oviposition containers that were in the breeding cages were removed. To synchronize hatching, the filter paper was removed and left to dry for 3 days at room temperature for the embryos to mature; following this period, hatching was stimulated to obtain the larvae for the experiments. When they reached the larval stage, between the third and fourth instar, they were counted, separated, and transferred with Pasteur pipettes to plastic cups with 100 mL of the same water without chlorine, where a diagnostic assay (DA) was conducted, which determined the concentrations that cause mortality between 2 and 98 % in the larvae of *A. aegypti*. For the experiment DA, a total of 120 larvae distributed in three concentrations (1,000, 300, and 30 ppm) were used with four replicas each, along with control treatment without the evaluated oil and with DMSO at 0.5 %. Mortality was assessed by recording the larvae that were unable to reach the surface of

the water when the beaker of the experiment was tapped; they were considered dead (WHO 1981, 1992). Subsequently, five concentrations were established for each oil. In each, four replicas were conducted per concentration in addition to the control treatment, which was the same as that employed to determine those of the DA. Each completed experiment was repeated three times on different days. Larval mortality readings were taken at two times, one at 24 h and the other at 48 h. The results of mortality and survival of the bioassay were subjected to probit analysis (Finney 1971).

Results

The EO obtained by simple hydrodistillation of *T. lucida*, *L. alba*, *L. origanoides*, *E. citriodora*, *C. citratus*, *C. flexuosus*, *C. sinensis*, *S. glutinosa*, and *C. odorata* leaves had different yields of extraction. Among them, *L. origanoides* had the highest performance with 1.4 % of the EO, and the ones with the lowest yield were *S. glutinosa* and *C. sinensis*, with 0.2 % each. Of all the compounds identified, methyl chavicol was obtained with the highest percentage (92.1) while linalol was the least abundant (0.3 %); they are both components of EO *T. lucida* (Table 2).

The lowest concentration established in the experiments of mortality in larvae of *A. aegypti* was 5 ppm at 4.7 and 7.5 %, at 24 and 48 h, respectively, for *C. flexuosus*. The maximum concentration established was 132 ppm, at 24 and 48 h, at 100 % for *C. citratus*. The percentage of mortality of all EO evaluated showed insecticidal activity when compared with each of the control treatments (Table 3). Lethal concentrations are LC₅₀ 17.1 and LC₉₅ 49.9 and LC₅₀ 14.6 and LC₉₅ 55.5 at 24 and 48, respectively, indicating that the EO of *C. flexuosus* showed the most insecticidal activity, when compared to other oils. The mixture of *L. alba* and *L. origanoides* showed lower LC₅₀ than when the EO of *L. alba* and *L. origanoides* were evaluated separately (Table 4).

The major compounds identified from the AE of *C. flexuosus* were geranial, neral, geranyl acetate, geraniol, and *trans*-β-caryophyllene. On the other hand, the EO of *C. citratus* was less effective as it presented the highest LC

Table 2 Chemical composition of the essential oils

Metabolite	% of oil									
	<i>C. odorata</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. citratus</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>L. alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>S. glutinosa</i>	<i>T. lucida</i>	
Benzyl acetate	18.2									
Geranyl acetate		10.0								
Benzyl benzoate	12.3									
Methyl benzoate	10.0									
Bicyclosesquiphellandrene						9.0				
β -Bourbonene <i>trans</i> - β -caryophyllene	3.8	2.0				1.3	2.5	1.5		
Carvacrol							32.3			
Carvone						38.3				
<i>p</i> -cymene							12.0			
1,8-Cineol					3.4			3.0		
Citronellal					49.3					
Citronellol					13.0					
<i>p</i> -cresol methyl ether	8.4									
Geraniol		37.5	26.0							
Geraniol		9.0	2.9							
Germacrene D	7.8							8.1		
α -Humulene isopulegol					12.9		1.4			
Limonene				71.3		31.8		4.4		
Linalol	14.1		1.8	5.4	2.9					0.3
Methyl chavicol										92.1
β -Myrcene			20.2	5.0			2.8			5.9
Neral		28.2	29.0							
Nerol			3.0							
<i>Trans</i> - β -ocimene <i>n</i> -octanol				2.0						1.3
α -Pinene	1.5							12.0		
β -Pinene piperitenone					4.8	4.4		49.6		
Piperitone						2.6				
Sabinene				1.6				11.0		

of the entire study LC₅₀ 123.3 and 94.3 and LC₉₅ 242.6 and 163 ppm at 24 and 48 h, respectively: the compounds identified in this oil were limonene, β -myrcene, linalol, sabinene, γ -terpinene, and *n*-octanol.

Discussion

According to the results of this study, it can be concluded that all the plants collected in the city of Bucaramanga enabled us to obtain EO that showed high insecticidal activity against the *A. aegypti* mosquito. One explanation for this effect is the major compounds found in each of the oils that were extracted. To this effect, a contribution has been made to the knowledge of new molecules with insecticidal action, which can serve as a replacement for the traditional synthetic insecticides (Kishore et al. 2011).

In a strict order of effectiveness, *C. flexuosus* had the best larvicidal activity against *A. aegypti*, when compared with the other EOs evaluated. This confirmed that the plant provides insecticidal action against mosquitoes as was originally reported by Kumar and Dutta (1987) and Osmani and Sighamony (1980); even the estimated LC₅₀ are lower than those of Kumar and Dutta (1987) with LC₅₀ 91.4 ppm in *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera: Culicidae). In more recent publications, it was also noted that the plant has promising insecticidal activity, compared to the results of Manimaran et al. (2012) with an 84 % mortality at 1,000 ppm in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae). Tennyson et al. (2013) observed that LC₅₀ was eight times higher (138.36 ppm) for *A. aegypti* than that presented herein. The high level of insecticidal activity of the EO of *C. flexuosus* collected in Bucaramanga is possibly due to the higher concentration of the major compounds

Table 3 Mortality rate of each concentration of each EO evaluated in larvae of *A. aegypti* at 24 and 48 h

Essential oil	Concentration ^a (ppm)	Mortality rate ^b (% ±DS)	
		24 h	48 h
<i>Lippia alba</i>	23	3±1.1	6±2.9
	30	30±12	23±14
	48	60±16	60±17
	65	79±7.6	85±6.2
	90	91±4.0	95±2.1
	Control	0	0
<i>Lippia origanoides</i>	23	2.50±0.6	5±1.5
	32	9±3.1	14±3.5
	43	21±7.5	30±8.0
	58	78±3.5	78±5.0
	70	80±13	82±13
	Control	0	0
<i>Eucalyptus citriodora</i>	9	5±2.3	13±5.8
	23	11±4.2	30±14
	45	26±3.2	50±16
	70	50±7.6	50±19
	80	53±12	60±13
	97	72±17	80±17
Control	0	0	
<i>Cymbopogon citratus</i>	60	5±1.5	11±3.6
	95	29±4.7	45±7.0
	120	49±8.6	80±7.8
	128	81±9.3	89±4.5
	132	100±23	100±23
	Control	0	0
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	5	4±1.2	8±2.0
	11	16±1.2	17.500±0.001
	16	51±4.5	67±2.1
	25	77±4.9	84±3.5
	39	88±1.0	90±1.7
	Control	0	0
<i>Citrus sinensis</i>	12	10±4.6	14±6.4
	18	40±14	50±16
	23	60±10	58±9.5
	45	79±8.0	80±18
	53	100±23	100±23
	Control	0	0
<i>Cananga odorata</i>	32	2.5±0.58	2.5±0.58
	40	28±4.7	39±9.1
	65	70±16	86±9.1
	79	90±10	98±1.7
	90	91±6.4	99.2±0.58
	Control	0	0
<i>Swinglea glutinosa</i>	23	0.8±0.58	6±2.1
	34	9±2.5	10±3.1
	45	27±2.9	46±7.8

Table 3 (continued)

Essential oil	Concentration ^a (ppm)	Mortality rate ^b (% ±DS)	
		24 h	48 h
	70	49±6.0	72±6.5
	82	60±18	80±18
	90	70±20	80±20
	Control	0	0
	<i>Tagetes lucida</i>	32	0.0±0.0
54		21±5.1	23±5.6
65		41±9.5	50±12
82		80±19	80±19
95		100±23	100±23
Control	0	0	
<i>Lippia alba-L. origanoides</i> mixture	18	1.3±0.58	1.3±0.58
	23	13±6.3	20±3.6
	29	21±9.8	20±10
	37	30±14	40±14
	45	70±12	70±11
Control	0	0	

^a Each of the dilutions made with the solvent DMSO

^b Mortality rate and standard deviation of the replicates of each concentration evaluated

geranial, neral, and geranyl acetate found in the analysis by GC-MS. The difference between the LC₅₀ of the EOs can be attributed to the fact that the *C. flexuosus* Bucaramanga has different major compounds than the *C. flexuosus* of India (Citral a and Citral b), according to Makhik et al. (2005).

C. sinensis was the second EO in terms of larvicidal activity, as was *C. flexuosus*. When compared to similar studies, it is also noted that lower LCs were found. This was observed in a study in India conducted by Ramar et al. (2013) with a LC₁₀₀ of 500 ppm. Tennyson et al. (2013) reported with the LC₅₀ of 85.93 ppm, Warikoo et al. (2012), a LC₅₀ of 446.84 ppm, and Murugan et al. (2012) with a LC₅₀ of 891.63 ppm in larvae of *A. aegypti*.

The same effect was observed in reports of the same continent such as the case of *C. sinensis* of Brazil with a LC₅₀ of 538 ppm, at least 26 times higher than ours (Cavalcanti et al. 2004). In this case, the difference in action is not explained by place of origin, as both the Brazilian plant and the Colombian have the same limonene component (Brazil=98 %, Colombia=71.3 %). There may be a synergist effect in the other components of the EO of Bucaramanga that boosts the insecticide action. However, Amusan et al. (2005) showed that the *C. sinensis* of Nigeria was more effective than that of Colombia. This result can be attributed to the fact that in Nigeria, the extract from the peel of the fruit was evaluated, rather than the EO from the leaves as was the case in this study. Another explanation of this effect according to Amusan

Table 4 Larvicidal activity (in ppm) of the different EOs against larvae of *A. aegypti*

Essential oil	24 h			48 h		
	LC ₅₀	LC ₉₅	χ ²	LC ₅₀	LC ₉₅	χ ²
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	17.16 (13.78–21.37)	49.9 (30.92–80.66)	3.08	14.67 (10.13–21.23)	55.59 (22.75–183.45)	0.99
<i>Citrus sinensis</i>	20.61 (16.49–23.82)	99.07 (91.30–402.53)	2.22	18.84 (14.03–22.22)	102.12 (68.19–254.49)	3.87
<i>L. alba</i> and <i>L. origanoides</i> mixture	40.13 (37.76–43.26)	79.77 (68.63–99.23)	6.63	37.55 (30.90–45.74)	62.48 (38.29–110.55)	6.51
<i>Lippia alba</i>	44.26 (41.58–47.01)	99.61 (89.24–114.70)	7.40	42.79 (40.35–45.27)	89.05 (106.05–142.32)	1.65
<i>Cananga odorata</i>	52.96 (49.91–55.79)	101.52 (93.29–113.47)	5.8	45.92 (43.55–48.13)	74.71 (70.11–80.94)	0.91
<i>Lippia origanoides</i>	53.37 (50.60–56.60)	93.05 (83.57–107.86)	3.41	38.06 (33.41–41.98)	112.1 (94.81–196.05)	0.93
<i>Swinglea ghuifosa</i>	65.71 (61.64–70.46)	151.01 (131.01–182.72)	2.3	59.23 (55.20–63.76)	148.73 (128.16–181.36)	3.47
<i>Tagetes lucida</i>	66.27 (63.7–68.7)	95.13 (89.52–103.49)	2.98	64.86 (62.24–67.32)	93.92 (100.72–123.75)	1.4
<i>Eucalyptus citriodora</i>	71.22 (63.91–81.62)	288.0 (208.53–479.27)	2.66	52.51 (44.49–62.50)	312.34 (225.40–660.13)	2.86
<i>Cymbopogon citratus</i>	123.30 (114.17–138.60)	242.69 (195.97–363.81)	0.96	94.31 (89.33–99.30)	163.0 (147.22–192.23)	3.08

LC₅₀ is the lethal concentration that causes mortality to the 50 % exposed to treatment. LC₉₅ is the lethal concentration that causes mortality to the 95 % exposed to treatment. The confidence interval is given in parentheses. The statistical analysis was well adjusted to the probit model (Finney 1971)

χ² chi-square

et al. (2005) is that the major components of the African species were limonene and linalol. Another aspect that highlights the importance of this plant as a possible insecticide is the fact that in Asian countries, it has been registered as an adulticide in *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae). In Pakistan, a LC₅₀ of 22.3 % (223,000 ppm) was reported, in the Hinckley variety and 21.14 % (211,400 ppm) in the Cassa grandis variety. This confirms the potential that can be offered by this plant in mosquito control (Hafeez et al. 2010).

Unlike the EO of *C. flexuosus* and *C. sinensis*, the EO of *L. alba* has not been evaluated with the same intensity as an insecticide for mosquitoes. However, the LC obtained in this study indicate that the plant has strong biocidal action when compared to other EO and extracts from other medicinal and aromatic plants in several countries (Kishore et al. 2011; Gleiser et al. 2011). On the other hand, the EO of *L. alba*, *C. sinensis*, *C. odorata*, *L. origanoides*, and *E. citriodora* can provide protection against other mosquitoes of medical interest, other than *A. aegypti*, such as *C. quinquefasciatus* and *Anopheles dirus* Peyton & Harrison, 1978 (Diptera: Culicidae). This effect is significant, because it helps in the fight against the vector (Amer and Mehlhorn 2006b; Jaramillo et al. 2012; Phasomkusulsil and Soonwera 2011). To this effect, products that offer protection against mosquito bite should also be studied because up to now, there is no product that commercially equalizes N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) as an effective mosquito repellent (Isman 2006).

As for the EO of *T. lucida*, it may be the first record published on its action as a larvicide against *A. aegypti*. Therefore, information of a new plant has been contributed, whose EO serves as a model of study and can be used in the fight against the vector. Also, there is the hypothesis that its

effect may be attributed to its major compound, methyl chavicol, which was present in the sample at 92.1 %. It is no surprise that the EO had an insecticidal effect, as there are records of other species of the *Tagetes* genus with biocidal potential in insects such as *Tagetes minuta* L. and *Tagetes erectus* L. (Asteraceae) in *A. aegypti* and *A. stephensi* as shown by Shaalan et al. (2005).

E. citriodora has not been considered promising from the insecticidal standpoint in many studies, probably because it never showed low LC₅₀; however, in this study, the LC₅₀ of the EO were less than 100 ppm, which indicates that it is promising. This is clear in several studies such as Amer and Mehlhorn (2006a), where the larvae of *A. aegypti* had a 76.7 % mortality at 50 ppm. Basically, the study of Amer and Mehlhorn had LC similar to those presented herein, although the *E. citriodora* used by them was collected in Germany. On the other hand, *E. citriodora* from India resulted in a LC₅₀ of 1.5 % (15,000 ppm) at 60 min. For this specific case, the difference is not explained by the major compound, because the species in India and in Colombia have citronelal (Makhaik et al. 2005). Therefore, there should not be such large differences between the LCs. In this paper, the insecticidal activity of the compounds was not analyzed separately from the EO. Unfortunately, many papers do not include a chemical analysis of the components of the plants evaluated as insecticides, and this makes it more difficult to understand the differences shown between studies.

C. citratus was the least effective EO according to the data of the study, since its LC₅₀ were the highest when compared with the other EO analyzed. However, compared to a chemotype from the same country, *C. citratus* collected in the city of Bogotá by Cárdenas et al. (2013) shows that the LC in this study are significantly lower, as Cárdenas et al. (2013)

had a LC_{50} of 1.07 % (10,700 ppm). In addition, we do not know the chemical composition of the EO from Bogotá, because the major compounds presented are from another paper (Bassolé et al. 2011). In the case of *C. citratus*, it has been extensively researched in various arthropods, and based on its activity, it is considered an effective insecticide against other mosquitoes such as *Anopheles arabiensis* Patton, 1905 (Diptera: Culicidae) in extract LC_{50} 74.02 ppm. Moreover, it is a repellent (Karunamoorthi and Ilango 2010; Phasomkusolsil and Soonwera 2011).

In the results shown in this research, the insecticidal activity of *C. citratus* was contrary to *C. flexuosus*, although they are from the same genus. This difference is normally between EOs of plants from the same genus, family, or species, and it is due to the fact that they contain diverse compounds that can act on the insect in a different way. Similarly, the compounds can be found in different proportions, as a result of the conditions of production such as harvest date, storage time, climate, and soil factors (Bakkali et al. 2008).

When the EOs of *L. alba* + *L. origanoides* were mixed, the larvicidal effect was boosted. This effect was due to the different forms of action of the components of these plants that act on the mosquito. So far, the synergistic roles of the various EOs, in comparison with the action of one or two main components of the oil, are not understandable, as research is required in order to evaluate the action of the mixture, with only components and with variations in accordance with the concentrations of each compound. This is also the case because the insecticide effect can be modulated by the other minor components that may be in the EO.

Finally, and as a recommendation of study, few studies have analyzed EOs in relation to the mechanism of action. They have been shown to have a cytotoxic, mutagenic effect, they are generators of apoptosis, and they inhibit cellular respiration and other forms of action at the cellular level (Bakkali et al. 2008; Rattan 2010). This action should take the lead in creating new molecules to replace traditional insecticides.

Conclusions

The larvae of *A. aegypti* were susceptible to all the EOs evaluated in this study, in particular the essential oil of *C. flexuosus*. To this effect, they can be considered insecticides. The LCs of this study were low in most cases when compared with other studies that evaluate EOs against *A. aegypti*.

Acknowledgments This study was conducted thanks to the research support program of the “Vicerrectoría de Investigación of the Universidad Industrial de Santander for Project 5680” and the contributions of the “Patrimonio Autónomo, Fondo Nacional de Financiamiento para la

Ciencia, Francisco José de Caldas,” contract RC-0572-2012- Bio-Rad - CENIVAM. We would also like to thank Dr. German Eduardo Matiz of the University of Cartagena Colombia, for providing the Rockefeller strain.

References

- Abd SL, Yaakob H, Mohamed RZ (2013) Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med* 67:677–689
- Amer A, Mehlhorn H (2006a) Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res* 99:466–472
- Amer A, Mehlhorn H (2006b) Repellency effects of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitol Res* 99:478–490
- Amusan AA, Idowu AB, Arowolo FS (2005) Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hypis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Tanzan Health Res Bull* 7:174–178
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol* 46:446–475
- Bassolé IH, Lamien-Meda A, Bayala B, Obame LC, Ilboudo AJ, Franz C, Novak J, Nebié RC, Dicko MH (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine* 18:107–1074
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, Geroge DB, Jaenisch TJ, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507
- Cárdenas EC, Riveros IT, Lugo LV (2013) Efecto insecticida de cuatro aceites esenciales sobre adultos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* en condiciones experimentales. *Entomotropica* 28:1–10
- Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP (2004) Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:541–544
- Duque JEL, Navarro-Silva MA, Trejos ADY (2009) Simulando manejo de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y sus efectos en una epidemia de dengue. *Rev Colomb Entomol* 35:66–72
- Finney DJ (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, 3rd edn. 174 p
- Gleiser RM, Borino MA, Zygañlo JA (2011) Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 108:69–78
- Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Rason H, Lenhart A (2013) Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS Negl Trop Dis* 7:1–10
- Guzman MG, Hal-Stead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yolsan S, Peding RW (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Micro* S7-S16, doi:10.1038/nrmicro2460
- Hafeez F, Akram W, Suhail A, Khan MA (2010) Adulticidal action of ten citrus oils against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Pak J Agric Sci* 47:241–244
- Harris AF, Rajstaleka S, Rason H (2010) Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83:277–284
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45–66

- Jaramillo GIR, Logan JG, Loza-Reyes E, Stashenko E, Moores GD (2012) Repellents inhibit P450 enzymes in *Stegomyia (Aedes) aegypti*. PLoS ONE 7:e48698. doi:10.1371/journal.pone.0048698
- Karunamoorthi K, Ilango K (2010) Larvicidal activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Croton macrostachyus* Del. against *Anopheles arabiensis* Patton, a potent malaria vector. Eur Rev Med Pharmacol Sci 14:57–62
- Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V (2011) A review on natural products with mosquitocidal potentials. In: Tiwari VK (ed) Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry, Kerala Research Signpost 335–365
- Kumar A, Dutta GP (1987) Indigenous plant oils as larvicidal agent against *Anopheles stephensi* mosquitoes. Curr Sci 56:959–960
- Laughlin CA, Mores DM, Cassetti MC, Denis AC, Martin JL, Whitehead SS, Fauci AS (2012) Dengue research opportunities in the Americas. J Infect Dis 206:1121–1127
- Lima EP, Paiva ME, Araújo AP, Silva EVG, Silva UM, Oliveira LN, Santana AE, Barbosa CN, Neto CP, Goulart MO, Wilding CS, Ayres CFJ, Santos MAVM (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Parasit Vectors 4:1–12
- Makhaik M, Narayan SN, Tewary DK (2005) Evaluation of anti-mosquito properties of essential oils. J Sci Ind Res 64:129–133
- Manimaran A, Cruz MJ, Muñu C, Vicent S, Ignaciunthu S (2012) Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (Liston). Adv Biosci Biotechnol 3:855–862
- Mullai K, Jebunesan A, Pushpanathan T (2008) Effect of bioactive fractions of *Citrus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Parasitol Res 102: 951–955
- Murugan K, Kumar PM, Kovedan K, Amerasan D, Subramaniam J, Hwang JS (2012) Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. doi:10.1007/s00436-012-3021-8
- Néiro LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: a review. Bioresour Technol 101:372–378
- Osmani Z, Sighamony S (1980) Effects of certain essential oils on mortality and metamorphosis of *Aedes aegypti*. Pesticides 14:15–16
- Phasornkusolsil S, Soonwera M (2011) Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Asian Pac J Trop Biomed S113–S118
- Ramar M, Paulraj MG, Ignaciunthu S (2013) Preliminary screening of plant essential oils against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Afr J Biotechnol 12:6480–6483
- Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Prot 29:913–920
- Shaaan EAS, Canyon D, Faried MWY, Abdel-Wahab H, Mansour AH (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environ Int 31:149–166
- Silva WJ, Dória GA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SC (2008) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresour Technol 99:3251–3255
- Simmons CP, Farrar JJ, Vinh Chau V, Wills B (2012) Current concepts Dengue. N Engl J Med 366:1423–1432
- Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR (2004) Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J Chromatogr A 1025:93–103
- Tennysen S, Samraj DA, Jaysunder D, Chalieu K (2013) Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Middle East J Sci Res 13:64–68
- Warikoo R, Ray A, Sandhu JK, Samal R, Wahab N, Kumar S (2012) Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of *Citrus sinensis* against dengue vector *Aedes aegypti* L. Asian Pac J Trop Biomed 2:152–155
- (WHO)-World Health Organization (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva. 6 p
- (WHO)- World Health Organization (1992) Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. WHO Tech Rep Ser 818:1–62