



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ
Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia
Departamento Control de Vectores

**Actividad insecticida de aceites esenciales sobre los vectores
de importancia médica *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y
Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae),
La Habana 2012-2017**



**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Ing. Maureen Isabel Leyva Silva, MSc

**La Habana
2019**

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ
Centro de Investigaciones Diagnóstico y Referencia
Departamento Control de Vectores

Título:

**Actividad insecticida de aceites esenciales sobre los vectores
de importancia médica *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y
Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae),
La Habana 2012-2017**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Ing. Maureen Isabel Leyva Silva, MSc

**Tutores: Lic. María del Carmen Marquetti Fernández, Dr. C.
Lic. Oriela Pino Pérez, Dr. C.**

**La Habana
2019**

Al Dr Israel García Ávila,
Padre de la Entomología Médica en Cuba
Para mí, una persona que respeté, por su entrega, seriedad y jovialidad.

A mi hijo Ovidio, quien ha sufrido durante todos estos años, mi estrés y mi
incapacidad como madre de tolerar su condición

AGRADECIMIENTOS

En este fragmento de papel quiero plasmar mis sentimientos, sin tener que conservar un lenguaje científico, escueto y sofisticado.

Quizás para algunos este período de tiempo que se vive durante el doctorado, “es un camino para ser mejores como científicos, es la puerta que se abre a muchos caminos”. Para mí, es ver por primera vez una puerta después de muchos años.

Quizás nadie entienda lo que significa hacer este viaje comenzando desde técnico, abriéndote un camino, ganándote un espacio casi imperceptible. Cuando alguien se pregunte que es estudiar mientras trabajas que venga y me pregunte.

En mi vida hay personas, que muy en el fondo, más que un mero agradecimiento, les debo mucho y cuando digo esto, les debo, gran parte de mi bienestar, felicidad y buenos recuerdos. Algunas ya traspasaron las barreras de la vida (tía Blanca, padrino Roberto, Consuelo) y otras por lejanía, no pueden estar aquí, personas que en la distancia me sirven para mis catarsis en tiempos de desolación.

Primero quiero agradecer a todos los que me han rodeado por espacio de estos 24 años de trabajo.

Quiero comenzar por Mary, porque más que mi tutora, toda la vida, ha sido mi amiga, mi hermana y aunque ella no ha querido ser una madre adolescente, para mí, ha sido mi madre profesional, ha reído cada logro y llorado cada fracaso, a ella le debo todo lo que soy, el impulso y apoyo a mi carrera profesional, el conocimiento que tengo, mi formación y el haber llegado hasta aquí hoy.

No menos importante y aunque es más corto el tiempo de conocernos no puedo dejar de agradecer a mi otra tutora Oriela por sus criterios y enseñanzas, su revisión y porque a pesar de ser una persona con decenas de responsabilidades, abría sus sentidos para aprender de mosquitos y enseñarme de aceites, me ofreció su casa en CATALINA de GÜINES, (yo pensé que lo más lejos que había ido era Guanajay) nos hicimos amigas y la comunicación entre las dos ha fluido maravillosamente. Por todo esto seguimos trabajando, que a veces piensenlo, no se logra!!!!. A su esposo e hijo, quienes muy adecuadamente colaboran en el hogar, para que ella pueda ocuparse de sus múltiples alumnos, incluyéndome a mí. A su hermano quien amablemente nos permite hablar por teléfono largo tiempo cuando no podemos vernos personalmente. A las muchachitas del CENSA por siempre ser tan afables, sonrientes y amables.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio Mayda y Domingo, por todos estos años juntos. Fuimos un grupo muy cerrado durante mucho tiempo y han vivido junto conmigo cada paso de mi vida personal y laboral. Ya transité

de nenita a ingeniera y ahorita quizás ya no tenga ni quien me nombre, casi estoy a punto de ser “mi misma”, con tantas jubilaciones. A Domi un gracias muy especial, por ser el jefe y la persona que es, por nunca frenar, ni detener mi camino, aun cuando era técnico.

A Taco y a Lucy, por ser mis amigos más fieles en la distancia a quienes extraño a montón y a ti mi amiga, por ser mi paño de lágrimas, por prestar tus ojos para leer mis correos cuando me desdoble y desplomo mi dolor e inconformidad, gracias.

A Leydis por ser mi amiga también en la distancia, especialmente por sus revisiones, por su estadística y por brindarme la oportunidad de tener en mis manos, la totalidad de la bibliografía que me era imposible acceder (\$), con una inmediatez extraordinaria, gracias mil, por ser mi salvavidas. A su mamá María de los Ángeles por sus consejos pedagógicos y palabras esperanzadoras para con mi hijo.

A Nane por ser mi prima, mi sustento espiritual, algunas veces un hombro donde llorar y porque sin su ayuda no hubiese podido sentarme frente a una PC en mi casa y dedicarle algunas horas al documento cuando el tiempo lo permitía.

A Zule, Jorgito, los contemporáneos más verdaderos, más especiales, que no cambian, ni se destiñen en el tiempo, a Ariamys y Jorge Anaya por ser voluntarios para la repelencia, a Cantillo por ayudarme con los bioensayos preliminares con ratas, Annia por su amabilidad, por aclararme las dudas, a Ñiqui por sus consejos, sugerencias y la estadística. A Isra que con el infinito amor y caballerosidad heredada de su padre, le arranca una sonrisa a uno, aun cuando no exista fuente de alimentación para los *Culex* y tus colonias de mosquitos estén en picada. A la inquieta madre de Hugo, que siempre sacó tiempo para aclararme dudas de materias que no entiendo.

Agradecer a mis dos oponentes de la predefensa Hilda y Lianet por sus extensos y enriquecedores señalamientos para que este documento tuviera un final feliz. A todas las personas de otros centros; Felipe Quintana, Payroll, Scull. A Carlos Granados porque durante su visita al departamento me brindó su ayuda y gran parte de su biblioteca digital. A mis alumnos; a Edilfredo Ávila de la Universidad de Granma por el deseo de trabajar con mosquitos y aceites, a mi otra alumna Gisel quien amó su tesis hasta que se dió cuenta que los viejos amores superan los nuevos (que no se malinterprete la ecología le ganó al control).

Agradecer también al centro Antidoping por los análisis de las muestras ya que sin su ayuda, a través de la mediación de mi tutora, no hubiese sido posible tener en tiempo los perfiles químicos de los aceites.

A Andy y Daniel por ser mis médicos auxiliares cuando el barco se me está hundiendo.

A las Dras Nereyda Cantelar, Dra Alina Llop, Dra Clara Savón por sus sugerencias en los exámenes de especialidad, a Maribel por su orientaciones, a Marelys y a Olguita por su ayuda en la paginación del documento.

A amigos como Lucy Provedo, Hilario Maestre, Yanela García, que aunque lejos, a través de sus emails siempre han estado preocupados por mi hijo y la salud de mi madre. A Lazarita, a Tony y al padre Gaby por su constante preocupación cada sábado antes de misa.

A mis padres que todavía luchan contra la muerte.

A mi esposo porque a pesar de los pronósticos, está y sigue ahí, batallando y juntos buscando, lo mejor para nuestro hijo. A mis suegros porque sin sus manos derechas e izquierdas, sin su apoyo, sin el amor infinito por su nieto, no sé qué hubiese sido de mí.

A mi asignatura pendiente: mi hijo, de quien tengo que aprender, tantas cosas y no aprendo; la libertad, el desenfado, la verdad, el vivir el hoy, y por sobre todo, siempre hacer lo que uno desea y sueña sin importar las consecuencias.

A Dios, porque aunque en los últimos tiempos nos hemos alejado, todos sabemos, que los buenos amigos, aún en la distancia, siempre se perdonan y regresan simplemente con un llamado,

A todos mis otros compañeros, amigos, familia, a los que he olvidado mencionar, a todos muchas gracias.

SÍNTESIS

Los aceites esenciales de *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch, *Citrus aurantium* L., *Curcuma longa* L., *Curcuma aureginosa*, *Eucalyptus globulus* Labill *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake, *Ocimum basilicum* L., *Piper aduncum subsp ossanum*(C. DC.) Saralegui, aceite de trementina (AT) y aceite de trementina modificado (ATM) evidenciaron significativa actividad larvicida con concentraciones letales medias (CL₅₀) inferiores a 100 mg/L en las poblaciones evaluadas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*. Los aceites de *M. quinquenervia*, *C. aurantium* y ATM provocaron un efecto inhibitor de la emergencia de los adultos de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*, lo que sugiere que la aplicación de la CL₉₀ en el estado de larva, logra un control efectivo de las poblaciones de mosquitos adultos. Se observó una disminución de α -esterasas, β -esterasas, P450 monooxigenasas y un aumento no significativo de la actividad Glutation transferasa en larvas de la población SMP2011 (*Ae. aegypti*) expuestas a ATM, aspecto que sugiere que estas enzimas detoxificadoras no están relacionadas con los valores superiores de CL₅₀ y CL₉₀ de la población SMP 2011 en relación a las cepa susceptible. La actividad adulticida de los aceites evaluados, excepto para *C.aurantium* se demostró por las metodologías de las botellas y papeles impregnados. Se informa por primera vez para la región de las Américas, la actividad adulticida de los aceites de *B. graveolens*, *C. longa*, *C. aeruginosa*, *P. aduncum subsp ossanum* y *O. basilicum* sobre las especies de mosquitos evaluadas. La formulación de aceite de *M. quinquenervia* al 20 % en dipropilenglicol (M20D) como repelente manifestó mayor tiempo de protección (4,5 horas) que ambas formulaciones de *C. aurantium* las que oscilaron entre 1,5-2,5 horas. Se informa repelencia a la ovipuesta de los aceites evaluados lo que favorece su utilización en recipientes donde pueda ocurrir la oviposición de estos vectores.

GLOSARIO

Ache: acetilcolinesterasa

AT : Aceite de trementina sin tratamiento fotoquímico

ATM: Aceite de trementina con tratamiento fotoquímico

CDC: Centers for Disease Control and Prevention por sus siglas en inglés Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades por sus siglas en español

CENPALAB: Centro para la Producción de Animales de Laboratorio, Bejucal, Mayabeque, Cuba.

CENSA: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

CG-EM: Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masa

CL₅₀ y CL₉₀: Concentraciones letales de la sustancia que provocan el 50 y 90 % de mortalidad de los organismos tratados la población respectivamente

DEET: dietil toluamida

DENV-1: Virus dengue 1

DENV-2 : Virus dengue 2

DENV-3 : Virus dengue 3

DENV-4 : Virus dengue 4

DMSO: Dimetil sulfóxido

EST: α y β carboxilesterasas

FR: factor de resistencia

GABA: Gamma amino-butyrac acid por sus siglas en inglés, ácido gamma-aminobutírico por sus siglas en español

GST: Glutathion-S-transferasa

HJ: Hormona juvenil

IFAL: Instituto de Farmacia y Alimentos

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

MFO: Mixed Function Oxidases por sus siglas en inglés, también conocida como Monooxigenasas dependiente de Citocromo P450

M15A (*M. quinquenervia* al 15 % +aceite mineral

M20A (*M. quinquenervia* al 20 %+ aceite mineral
M15D (*M. quinquenervia* al 15 %+dipropilenglicol
M20D (*M. quinquenervia* al 20 %+dipropilenglicol
OIBS: Órgano de Integración para el Bienestar Social
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPS: Organización Panamericana de la Salud
PP: porcentaje de protección
PMD: 3.8-diolparamentano
RSI: Reglamento Sanitario Internacional
RO: receptores olfatorios
ROs: receptores olfatorios específicos
RGN: receptor gestatorio neuronal
SMP2011: población San Miguel del Padrón 2011
TD: tiempo diagnóstico
TRPA1: (transient receptor potential ankyrin 1 por sus siglas en inglés ,potencial receptor transitorio de anquirina 1, por su siglas en español)
TMBZ: tetrametilbenzidina
TD₅₀ y TD₉₀: Tiempo de letales que provocan el derribo del 50 y 90 % de la población respectivamente
WSMol (lectina soluble en agua obtenida de *Moringa oleifera*
30PI formulación del aceite de *Citrus aurantium* al 30 % en propilenglicol
30PII formulación del aceite de *Citrus aurantium* al 30 % en propilenglicol + vainillina

ÍNDICE

	pág
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1 Aspectos ecológicos de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	9
1.2 El papel de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> como vectores de enfermedades de importancia médica	11
1.3 Control de vectores	13
1.3.1 Lucha antivectorial	13
1.3.2 Problemas medioambientales ocasionados por el uso de plaguicidas	15
1.4 Utilización de plantas en el control de plagas	16
1.4.1 Reseña histórica sobre el control de plagas utilizando plantas	16
1.4.2 Aceites esenciales: aspectos generales y composición química	18
1.4.2.1 Consideraciones sobre toxicidad vegetal	19
1.4.3 Modo de acción insecticida de plantas	21
1.4.3.1 Mecanismos de acción en insectos de los aceites esenciales y sus constituyentes.	24
1.4.4 Consideraciones sobre la evaluación de actividad insecticida de plantas sobre mosquitos	27
2.MATERIALES Y MÉTODOS	30
Tipo de estudio	30
Población y muestra	30
Cría y mantenimiento de las poblaciones de mosquitos en el insectario	31
Aceites esenciales utilizados en el estudio	32
Reactivos utilizados en los estudios de laboratorio	36
2. Determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales	36

sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	
2.1 Determinación de la actividad larvicida de los aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	36
2.2 Determinación de la influencia de las CL ₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	37
2.3 Determinación de la actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de <i>Aedes aegypti</i> más resistente a insecticidas y posterior a la exposición a la CL ₉₀ de un aceite esencial seleccionado dentro de los promisorios	38
2.4 Determinación de la actividad adulticida de aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	41
2.4.1 Determinación de la actividad adulticida mediante botellas impregnadas con soluciones de aceites esenciales	42
2.4.2 Determinación de la actividad adulticida mediante papeles impregnados con soluciones de aceites esenciales	43
2.5 Determinación de la actividad ovicida y repelencia a la oviposición en las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales	43
2.5.1 Determinación de la actividad ovicida de soluciones de aceites esenciales sobre las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	43
2.5.2 Determinación de la repelencia a la oviposición en las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales	44
2.6 Determinación de la actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i>	45
Consideraciones éticas	46
	3.RESULTADOS
3. Actividad insecticida de los aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	48
3.1 Actividad larvicida de aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Cx. quinquefasciatus</i>	48
3.2 Influencia de las CL ₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	50
3.2.1 Influencia de las CL ₉₀ de ATM en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	50
3.2.2 Influencia de las CL ₉₀ de <i>Melaleuca quinquenervia</i> en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	52

3.2.3 Influencia de la CL ₉₀ de <i>Citrus aurantium</i> en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	54
3.3. Actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de <i>Aedes aegypti</i> SMP 2011 y Rockefeller expuestas a la CL ₉₀ de ATM	56
3.4. Actividad adulticida de aceites esenciales sobre <i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> y <i>Cx. quinquefasciatus</i> mediante las metodologías de las botellas y papeles impregnados	57
3.5. Actividad ovicida y repelente a la oviposición de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales	59
3.5.1 Actividad ovicida de aceites esenciales sobre huevos de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	59
3.5.2. Repelencia a la oviposición de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales.	60
3.6. Actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales contra <i>Aedes aegypti</i> utilizando voluntarios humanos	61
4. DISCUSIÓN	63
4.1. Actividad larvicida de aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	63
4.2. Influencia de las CL ₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	77
4.2.1 Influencia de las CL ₉₀ de ATM en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	78
4.2.2. Influencia de las CL ₉₀ de <i>Melaleuca quinquenervia</i> en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	80
4.2.3 Influencia de la CL ₉₀ de <i>C. aurantium</i> en el desarrollo de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	80
4.3 Actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de <i>Aedes aegypti</i> SMP 2011 y Rockefeller expuesta a la CL ₉₀ de ATM	81
4.4. Actividad adulticida de aceites esenciales sobre <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i> mediante las metodologías botellas y papeles impregnados	84
4.5. Actividad ovicida y repelente a la oviposición de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales	89
4.5.1. Actividad ovicida de soluciones de aceites esenciales sobre huevos de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	89
4.5.2 Repelencia a la oviposición de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> ante soluciones de aceites esenciales	90

4.6 Actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales contra <i>Aedes aegypti</i> utilizando voluntarios humanos	93
Consideraciones generales	96
5. CONCLUSIONES	98
6. RECOMENDACIONES	100
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Las crisis generan oportunidades y los cambios por lo general son vistos como adversidades, pero estos son bendiciones

INTRODUCCIÓN

Dentro de la fauna entomológica, los mosquitos, constituyen uno de los grupos de mayor importancia médica por su papel preponderante en la transmisión de enfermedades al hombre (WHO, 2017) y a los animales (O'Meara, 1992; de Carvalho *et al.*, 2013). Entre las enfermedades transmitidas por estos insectos se encuentran las arbovirosis como la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental (Shepard *et al.*, 2011), chikungunya (Corrales, 2015) y zika (Fauci y Morens, 2016) y dengue (PAHO, 2016), las que han incrementado su incidencia en los últimos años, (PAHO, 2017).

El dengue constituye una virosis endémica en más de 100 países distribuidos en África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (OMS, 2009). A nivel mundial, es la arbovirosis más común, con un 40% de la población expuesta en zonas de transmisión. Según estimación de la Organización Mundial de la Salud se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año, de los cuales 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (Bhatt *et al.*, 2013; WHO 2016).

La propagación de este virus se atribuye a la expansión geográfica de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), el mosquito más importante implicado en la transmisión de los cuatro serotipos del dengue que afectan a numerosos países en las Américas (OPS,

2016). Hace algunos años, *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) se consideró como un vector de menor importancia en la transmisión del virus del dengue en áreas donde ambas especies son simpátricas (Chan, 1985). Investigaciones realizadas años después se detectó la presencia de *Ae. albopictus* naturalmente infectado con DENV-1 y DENV-2 en el Valle del Cauca, (Méndez *et al.*, 2006) y en Medellín Colombia con DENV-2 (Gómez-Palacio *et al.*, 2017), en Ceará, Brasil por DENV-2 y DENV-3 (Martins *et al.*, 2012), por lo que su participación en la dinámica de transmisión del dengue a los humanos no puede descartarse.

En Cuba, la epidemia de dengue ocurrida por el arribo del DENV-2 en 1981, totalizó 344 203 casos notificados, de los cuales 10 312 fueron graves, con 158 defunciones (Guzmán *et al.*, 1988). En el año 2000, se reportó la circulación del DENV-3 y DENV-4 en La Habana (Guzmán y Kourí 2002). Posteriormente, en 2006 ocurrió un incremento de la transmisión (OPS, 2006), detectándose casos de dengue en 8 provincias del país (Camagüey, Ciego de Ávila, Cienfuegos, La Habana (antes de la división en Artemisa/Mayabeque), Guantánamo, Villa Clara, Las Tunas y la Ciudad de La Habana, donde se aislaron los serotipos 3 y 4. A pesar de los esfuerzos para controlar la transmisión del dengue en Cuba, durante la última década se detectó la co-circulación de diferentes serotipos en el país (Díaz 2014). Del 2014 al 2016, aunque los datos reflejan una disminución en el tiempo (OPS, 2016), la incidencia de la enfermedad es aún elevada en nuestro país.

Chikungunya constituye otra virosis de importancia médica transmitida por *Ae. aegypti*. En el 2014, las autoridades sanitarias de Cuba confirmaron 13 casos de fiebre por chikungunya, todos ellos en personas provenientes de países con incidencia de esta enfermedad o países endémicos (OPS, 2014), sin ningún caso nuevo hasta el momento.

Zika, ha sido el virus de más rápida introducción y propagación en la región de las Américas. El primer caso confirmado de transmisión local de este virus en Cuba

ocurrió en la semana epidemiológica 11 de 2016. La Oficina Cubana para el Registro Sanitario Internacional (RSI) informó a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) de 21 casos de esta enfermedad importados en ese mismo año (OPS, 2016), para el año 2017, este virus se propagó a varios municipios del país (OPS, 2017).

El virus del Nilo occidental desde su introducción en 1999 en los Estados Unidos, se propagó y estableció desde Canadá hasta Venezuela relacionándose los sitios de aparición de los brotes con las principales rutas de las aves migratorias (OMS, 2011). En Cuba el primer caso en humano y equinos de este virus, se documentó en el año 2005 (Pupo-Antúnez *et al* .,2006). Hasta el año 2018, no se informaron casos confirmados de este virus.

Otra virosis de importancia médica y de nueva reemergencia en las Américas lo constituye la fiebre amarilla. Entre enero de 2017 y noviembre de 2018, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa y Perú informaron casos de esta enfermedad (OPS, 2018).

La no existencia de una vacuna efectiva para el combate de estas enfermedades arbovirales excepto para la fiebre amarilla, hace que la disminución de su incidencia sea a través del combate de los vectores utilizando como primera opción los plaguicidas sintéticos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca, dentro de sus Estrategias para el Control de Vectores 2017-2030, el importante papel de la implicación de la comunidad y el estudio de las nuevas herramientas de control, sin desechar la utilización de plaguicidas en los picos epidémicos (WHO, 2016).

El Programa Nacional de Control de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en nuestro país, desde sus inicios en el año 1981, tiene establecido la vigilancia regular y destrucción de los criaderos, además de la utilización de los insecticidas químicos. En muchos casos, esto se complementa con otros métodos de control como; el

físico, el biológico, las campañas educativas y la participación de la comunidad (DNVLA, 2012). A partir de la década de los 90 se produjo la reinfestación y expansión de *Ae. aegypti* en varias provincias del país. El déficit en algunos servicios públicos básicos, como el abasto de agua y la recolección de desechos sólidos y el deterioro en las actividades de saneamiento ambiental ocasionó el aumento del número de criaderos en esta década (Marquetti, 2006), situación que se mantiene a intervalos (Castillo *et al.*, 2014).

El control de vectores a nivel mundial, se enfrenta a cambios en las poblaciones de mosquitos como resultado de la exposición directa o indirecta a plaguicidas (WHO, 2017). En Cuba, este fenómeno, no es diferente. Se reportó con anterioridad resistencia a varios grupos de insecticidas sintéticos en condiciones de laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2009, 2010), un aumento de la longevidad en *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Súarez *et al.*, 1999, 2002) y por consiguiente la inferencia de que individuos mas longevos poseen mayor capacidad vectorial debido a su mayor oportunidad de picada (Súarez *et al.*, 2002). Estos estudios de laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2009, 2010, 2016; Bisset *et al.*, 2011, 2016) aunque informan resistencia, las evaluaciones efectuadas en condiciones de campo muestran que la mayoría de los plaguicidas utilizados, aún presentan efectividad contra *Ae. aegypti* (Bisset *et al.*, 2011; Montada *et al.*, 2012, 2013).

No obstante la búsqueda incesante de nuevas formas de control, es de vital importancia para los programas integrados de plagas.

Las plantas, por sus antecedentes en el combate de insectos, constituyen una alternativa, que pretende retomarse e insertarse dentro de las nuevas políticas de control; por su actividad biológica sobre numerosas especies de mosquitos (Pitarokili *et al.*, 2011; Noletto *et al.*, 2013, 2015) y porque en muchos casos demuestran ser una fuente promisoriosa y sostenible ecológicamente para el control de plagas (Masetti, 2016; Preedy, 2016).

Dentro de los productos de origen botánico, los aceites esenciales actúan como ovicidas, larvicidas, adulticidas y reguladores del crecimiento sobre varias especies de insectos (Isman, 2016). Estos compuestos tienen una utilidad demostrada y/o potencial, ya sea como aditivos de alimentos, fármacos o plaguicidas de origen natural y con mayor aceptación por su probada eficacia y baja inocuidad al medio ambiente (Isman, 2016).

Nuestro país posee una extensa y variada flora, de la cual Roig (1965) destacó diversas especies vegetales biosintetizadoras de sustancias con actividad plaguicida. Algunas se han estudiado desde el punto de vista químico y como fuente de fitosanitarios potenciales, sobre plagas agrícolas Sánchez *et al.*, (2012); Infante *et al.*, (2013); Duarte *et al.*, (2013) aunque no lo suficiente (Pino *et al.*, 2013). En menor cuantía se comprobó en vectores de importancia médica como *Blatella germanica* (Linnaeus 1767) y *Musca domestica* (Linnaeus 1758), (Leyva *et al.*, 2007^{a,b} 2008). En la caracterización estructural de muchas de estas plantas se identifican una gran variedad de compuestos, que potencialmente se responsabilizan con actividad bioplaguicida en insectos (Lucía *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2010^{a,b}; Barbosa *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos queda implícito que es necesario continuar, ampliar y profundizar las investigaciones con aceites esenciales para el control de vectores de importancia médica. Debido a esto nos trazamos la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPOTESIS

Los aceites esenciales de algunas plantas cubanas, constituyen una fuente de materia prima para la producción de formulados botánicos con utilidad en el control de mosquitos de importancia médica.

Para corroborar esta hipótesis nos trazamos los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL: Determinar las potencialidades como insecticida de diez aceites esenciales sobre *Ae.aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* como contribución a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de vectores de importancia médica

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la actividad larvicida de diez aceites esenciales sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*.
- Determinar la influencia de la Concentración Letal 90 (CL₉₀) de los aceites esenciales más promisorios, en el desarrollo de larvas de *Ae.aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. albopictus*
- Evaluar la actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de *Ae. aegypti* más resistente a insecticidas y expuesta a la (CL₉₀) del aceite esencial con valores mas altos y homogéneos de Factores de Resistencia (FR).
- Determinar la actividad adulticida de aceites esenciales sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* mediante las metodologías de botellas y papeles impregnados.
- Evaluar la actividad ovicida y repelente a la oviposición de aceites esenciales utilizados sobre *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.
- Evaluar la actividad repelente sobre piel humana de formulados de aceites esenciales sobre *Ae. aegypti*.

Importancia teórica

La tesis traza la estrategia de trabajo para la evaluación de productos naturales que podrían ser útiles en el control de vectores de importancia médica. Se aportan además, conocimientos básicos para continuar estudios con aceites esenciales de plantas cubanas, que al menos se infieran posean propiedades insecticidas por su composición estructural y que pudieran en un futuro formar parte de los expedientes de registros de nuevas formulaciones a base de productos naturales.

El estudio y obtención de candidatos con vista a la elaboración de formulados naturales para el control de vectores puede repercutir en el bienestar y la salud de la población, debido a que pueden ser mejor aceptados si estos parten de plantas conocidas y con actividad medicinal y/o condimenticias.

Importancia práctica

El aporte práctico de este estudio es que avala científicamente la posibilidad de explotar la bioactividad de aceites esenciales de plantas medicinales como candidatos naturales para el control de vectores. La introducción de alternativas naturales sustentables y biodegradables permite; reducir los gastos generados por el control y alternar el uso de insecticidas sintéticos.

Novedad científica

Estos estudios son los primeros que se realizan en el país para determinar la potencialidad como insecticidas de un grupo de aceites esenciales de plantas contra tres especies de mosquitos de importancia médica.

Se informa por primera vez para la región de las Américas la actividad adulticida de cinco aceites esenciales sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* mediante las metodologías de botellas y papeles impregnados. Los resultados de

este trabajo forman parte de 6 publicaciones (1 nacional y 5 internacionales, incluyendo un capítulo en un libro) (Anexo 1).

Parte de estos resultados fueron presentados por la autora en 24 eventos científicos nacionales e internacionales. Dentro de los más representativos se encuentran; el Fórum de Ciencia y Técnica del año 2014 (destacado provincial) y en la edición del 2017 (destacado municipal), en un Resultado Relevante Institucional del IPK en el año 2016 y en las ediciones de las jornadas de Maestros y Doctorandos 2017 y 2018 donde fueron premiados (Anexo 2).

Estos resultados permitieron ser la tutora principal de una tesina de técnico medio, de una tesis de diploma con la Universidad de la Habana y cotutora de una tesis de diploma con la Universidad de Granma en el año 2017, así como la asesorar una tesis de Maestría conjunta con el Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Publicaciones de la autora, han sido citadas por diferentes autores en revistas extranjeras (Anexo 3), lo que confirma la novedad de la propuesta.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

No se equivoca el hombre que ensaya por distintos caminos, alcanzar sus metas, solo lo hace aquel, que por temor a equivocarse no defiende sus ideas...

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos ecológicos de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

Enfermedades virales reemergentes de gran importancia médica como dengue, chikungunya, fiebre amarilla, zika, son transmitidas por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. (Shepard *et al.*, 2011; Corrales, 2015; Fauci y Morens, 2016). Otras como las encefalitis equinas del este y el virus del Nilo occidental son transmitidas por *Cx. quinquefasciatus*. La posibilidad de transmisión y expansión de estas enfermedades se debe a diversos factores entre los que se encuentra la ecología de estos vectores. *Ae. aegypti* es una especie de mosquito cuyo origen se ubica en la región etíope. Trabajos taxonómicos realizados en el año 2004 reubicaron esta especie en el género *Stegomyia* por lo que actualmente se conoce como *Stegomyia (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 (Reineri *et al.*, 2004). En Cuba, al igual que en el resto del planeta se le continúa llamando *Aedes aegypti* ya que esta nomenclatura no se ha generalizado entre el personal implicado dentro de los programas de manejo y control de esta especie, por lo que decidimos seguir utilizando la nomenclatura anterior.

Este mosquito se encuentra sobre todo en los sitios urbanizados de Cuba (Marquetti *et al.*, 2008, 2009, 2010). Una característica que distingue *Ae. aegypti* es su habilidad

para desarrollar su fase acuática en un gran número de recipientes, que son generados por la actividad humana, lo que le garantiza una disponibilidad permanente de criaderos potenciales (Marquetti *et al.*, 2009, 2010).

Estudios realizados en Cuba describen más de 50 tipos diferentes de depósitos utilizados por *Ae. aegypti* para su oviposición (Marquetti *et al.*, 2006). En años posteriores se encontró un aumento del tipos de depósito utilizado para su cría (Marquetti *et al.*, 2009, 2010; Peraza *et al.*, 2015). La presencia en el ecosistema urbano, de este mosquito en depósitos artificiales y tanques bajos se debe primeramente a la insuficiente recogida de desechos, a los bajos niveles de implicación de la comunidad en el reordenamiento del medio y a la inestable frecuencia en el abasto de agua. En el caso particular de los tanques receptores de agua, el deterioro y el mal tapado de los mismos por el uso de tapas inadecuadas o por ausencia de las mismas, constituye una vía de entrada a las hembras para realizar la oviposición contribuyendo a la presencia permanente del mosquito (Marquetti *et al.*, 2007).

Reineri *et al.*, (2004) ubicaron también *Ae. albopictus* en el género *Stegomyia* y se le conoce actualmente como *Stegomyia (Stegomyia) albopicta Skuse (1894)*. Al igual que *Ae. aegypti* seguiremos utilizando la nomenclatura anterior. La presencia de esta especie en Cuba se detectó por primera vez en 1995 (González y Marro, 1999). A pesar de las medidas de control empleadas, paulatinamente se dispersó a varias regiones del país (Castillo *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2014). Esta especie posee la habilidad para colonizar nuevos ambientes y muestra una alta adaptabilidad a recipientes que le sirven como sitios de cría en hábitats domésticos y peri domésticos, por lo que se le ha encontrado compartiendo estos recursos con *Ae. aegypti* (Marquetti *et al.*, 2012).

Culex (Culex) quinquefasciatus Say (1823) es una especie cosmopolita, con gran potencial diseminador de su descendencia y predominantemente doméstico. Suele

compartir nicho con *Ae. aegypti* y en etapas de control intensivo ocurre un reemplazo interespecífico (Bisset *et al.*, 1985; Castillo *et al.*, 2014) cuando disminuyen las poblaciones del vector del dengue. De esta forma se convierte de forma indirecta en el blanco de acciones de control lo que ha provocado un incremento de su resistencia y tolerancia fisiológica a los insecticidas.

1.2 El papel de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* como vectores de enfermedades de importancia médica

Ae. aegypti es un eficaz vector de diversas arbovirosis. Su mayor importancia epidemiológica está ligada a su papel como transmisor de fiebre amarilla y dengue (Pérez-Vigueras 1956; OPS, 2016) y en los últimos años se incorpora su rol como vector de Zika (OPS, 2016).

La reinvasión de la mayor parte de la América Tropical por *Ae. aegypti*, la falta de medidas eficaces para combatir los mosquitos, la creciente urbanización y el aumento de los viajes dieron lugar a la hiperendemicidad dengue y el aumento de la incidencia de esta enfermedad (Kourí *et al.*, 2006). A pesar de que los virus del dengue circulan en la región desde hace más de treinta años (Anderson *et al.*, 1956, Russell *et al.*, 1966) la enfermedad hemorrágica no se manifestó hasta 1981 en Cuba, motivada por el arribo de DENV-2 (Guzmán 1988). Después de 15 años sin transmisión, en enero de 1997 se detectó un brote por virus DENV-2 en el municipio de Santiago de Cuba y en junio de 2001 un brote por DENV-3 en La Habana (Guzmán *et al.*, 2012). En años posteriores ocurrieron sucesivos brotes, en nuestro país (OPS, 2016) aunque los datos muestran una disminución de los casos, la incidencia de la enfermedad es aún elevada en nuestro país.

Ae. aegypti también se ha asociado con la transmisión de Zika. Luego de su introducción en el país en el año 2016, durante el 2017, este virus se propagó a varios municipios del país (OPS, 2017).

Ae. albopictus es susceptible a la infección de 26 arbovirus diferentes y es capaz de transmitir al menos 24 de ellos. Hasta el momento se encontró susceptible a la infección oral y capacidad de transmitir por picadura de arbovirus como: dengue, encefalitis equina del este, potosí, chikungunya, la Crosse, orungo, fiebre del valle de Rift, encefalitis San Luis, nilo occidental, fiebre amarilla entre otros (Gerhardt *et al.*, 2001; Turell *et al.*, 2001; Holick *et al.*, 2002; Sardelis *et al.*, 2002). Además es vector de *Dirofilaria immitis* (Leydis) y *Dirofilaria repens* (Railliet & Henry) (Cancrini *et al.*, 2007).

En Asia se le considera responsable de mantener el ciclo selvático del dengue y se ha implicado en algunas epidemias concretas de esta enfermedad (Gratz, 2004). En Europa en el año 2010 se informó el primer caso de dengue autóctono en Francia (La Ruche *et al.*, 2010) y pocos días después en Croacia (Schmidt-Chanasit *et al.*, 2010). Se vinculó con los brotes de chikungunya en Isla Reunión, República Francesa (Pialoux *et al.*, 2007) en el año 2003 y en el brote del año 2007 en el norte de Italia (Seyler, 2008) y en España (Sánchez-Seco *et al.*, 2009), relacionando los sucesivos brotes, con la invasión y expansión acaecida de *Ae. albopictus* desde principio de los años 2000 en estos países.

Cx. quinquefasciatus es el principal vector de las encefalitis equina del este, del oeste y equina venezolana (Mesa *et al.*, 2005). El virus del Nilo occidental, también es transmitido por mosquitos pertenecientes al complejo *Culex* (Dohm *et al.*, 2002). Estos contraen la infección al picar aves infectadas con este virus, transmitiéndolo de la misma forma a personas u otros animales como los equinos (Huhn *et al.*, 2003). En 1999, el virus del Nilo occidental que circuló en Túnez e Israel fue importado a Nueva York donde produjo un brote epidémico que se propagó por

todo el territorio de los Estados Unidos. La epidemia en ese país (1999-2010) puso de manifiesto que los sitios donde se producen los brotes se encuentran a lo largo de las principales rutas de las aves migratorias. Desde su introducción en 1999 en los Estados Unidos, se propagó y estableció desde Canadá hasta Argentina (OMS, 2011; Kramer, 2015). En Cuba el primer caso en humano y equinos de este virus, se documentó en el año 2005 (Pupo-Antúnez *et al.*, 2006). En estudios más recientes en dos localidades de La Sierpe, Sancti Spiritus Cuba, de 304 muestras de suero humano evaluadas, el 0,65% mostró positividad a este virus y 20,4% de las aves estudiadas evidenciaron también la presencia del virus (Pupo-Antúnez *et al.*, 2018). *Cx. quinquefasciatus* se encuentra implicado también en la transmisión de las filarias *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) y *D. immitis* (Leydis) (Ludlam *et al.*, 1970, Brito *et al.*, 1999) parasitosis responsables de la filariasis en humanos y caninos respectivamente.

1.3. Control de vectores.

1.3.1 Lucha antivectorial.

El control de vectores requiere un conocimiento exhaustivo de aspectos bioecológicos de las especies responsables de la transmisión, comportamiento, preferencias alimenticias, horario de picada entre otras (Marquetti *et al.*, 2009).

Durante los últimos 40 años, el control de mosquitos se realiza principalmente por métodos químicos. La aplicación de insecticidas adulticidas, por el Programa Nacional de Control de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* tanto en tratamientos intra como extra domiciliarios provee de una reducción rápida de las poblaciones de mosquitos. Esta medida es transitoria y solo es sostenible si se aplica unido a la utilización de temefos (Abate) como larvicida, además de eliminar o destruir todo

recipiente que la especie utilice para su oviposición y no sea “abatizable” (Bisset *et al.*, 2011; DNVLA, 2012).

La aplicación de dosis subletales debidos a factores operacionales o de insecticidas ineficaces en dosis incrementadas y reiterativas, es en gran medida algunas de las causas de la resistencia encontrada en mosquitos. Este aspecto genera grandes pérdidas a cualquier campaña de control debido a las grandes cifras que se erogan por el concepto de nuevas compras de insecticidas en si, además de combustible, equipamiento y pago de salario a trabajadores (Baly *et al.*, 2011, 2012).

En la última década del siglo pasado, en el departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) se realizaron investigaciones en condiciones de laboratorio, con vistas a determinar los niveles de susceptibilidad y/o resistencia de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* a los insecticidas en uso por el Programa de Control (Bisset *et al.*, 1990; Aguilera *et al.*, 1995; Bisset *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000). El primer informe en Cuba de resistencia a temefos en *Ae. aegypti* se realizó en 1997 (Rodríguez *et al.*, 1999). La resistencia se relacionó con un incremento de la actividad de enzimas esterasas A4. En estudios posteriores se demostró resistencia cruzada a piretroides y organofosforados inducida por selección con temefos en poblaciones de *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2002), resistencia cruzada a piretroides inducida por selección con malatión (Rodríguez *et al.*, 2003) y resistencia a piretroides inducida por selección con deltametrina (Rodríguez *et al.*, 2005).

En el 2001, en estudios con una población de *Ae. aegypti* del municipio Playa, La Habana a pesar de la presión de selección ejercida en etapa intensiva, la población se mantuvo susceptible a cipermetrina, lambadacialotrina y a clorpirifos (Montada *et al.*, 2005). Posteriormente en este mismo municipio se detectó alta resistencia en *Ae. aegypti* para fenitrotion, temefos y propoxur; moderada resistencia a fenitrotion y

susceptibilidad al clorpirifos, malatión y pirimifos metil en condiciones de laboratorio (Bisset *et al.*, 2004).

Como parte de un estudio realizado en el municipio Santiago de Cuba, las larvas mostraron ser susceptible a los insecticidas lambdacialotrina, clorpirifos y cipermetrina; mientras que en el estadio adulto, resultaron ser susceptibles al insecticida clorpirifos y moderadamente resistente a los insecticidas lambdacialotrina y cipermetrina (Montada *et al.*, 2007). Sin embargo, en larvas del mismo municipio, colectadas durante el año 2009 al compararlas con los estudios realizados en 1997; se encontró susceptibilidad a malatión, pirimifos metil y fenitrotión; moderada resistencia a fenitrotión y alta resistencia a temefos y clorpirifos, por lo que se manifestó un incremento de la resistencia a tres insecticidas en el período 1997-2009 (Rodríguez *et al.*, 2010). En poblaciones de *Ae. aegypti* de los 15 municipios de La Habana colectadas durante el 2008 se obtuvo un 100% de mortalidad con clorpirifos y cipermetrina seguido de lambdacialotrina con un 98% de mortalidad en los adultos evaluados (Bisset *et al.*, 2011).

A pesar de la variabilidad de los resultados en cuanto a los estudios de susceptibilidad y/o resistencia en condiciones de laboratorio, a través de los años se continúa la aplicación de insecticidas. El uso sostenido del control químico se justifica debido a la eficacia de las formulaciones comerciales (Montada *et al.*, 2012, 2013, Rodríguez *et al.*, 2016, Bisset *et al.*, 2016) y la disminución de las poblaciones de mosquitos posterior a la aplicación de insecticidas y por tanto la incidencia de las enfermedades.

1.3.2 Problemas medioambientales ocasionados por el uso de plaguicidas.

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas por su falta de especificidad afectan el medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos

eslabones de la cadena alimenticia, suelo y agua, sin restarle importancia a la destrucción de la fauna acompañante e integrante del ecosistema que ve afectado su normal comportamiento (Pastor, 2002; Soares y Porto, 2012). La sucesión y el reemplazo de especies, resistencia y cambios de conducta de los vectores (Súarez *et al.*, 1998, 2002) y la eliminación de agentes de control biológico natural, son ejemplos del daño ecológico que trae consigo el uso de los plaguicidas (Aliferis *et al.*, 2011)

Lamentablemente, la reducción del uso de los plaguicidas no es un objetivo fácil de lograr a pesar de los daños que provoca. El manejo de las plagas es un problema complejo, en el cual participan un conjunto de factores sociales, políticos, económicos, científicos y personales que interactúan entre sí y hacen difícil modificar el sistema (Bisset *et al.*, 2002).

Como consecuencia de estos factores en los últimos años se experimenta un creciente interés en la utilización de productos naturales para el control de plagas de insectos, como una alternativa a los insecticidas de amplio espectro lo que hace indispensable que la comunidad científica se enfoque en explorar, investigar, evaluar y utilizar la tecnología en aras de producir alternativas biológicas inocuas y sustentables (Cardero, 2011).

1.4 Utilización de plantas en el control de plagas.

1.4.1 Reseña histórica sobre el control de plagas utilizando plantas.

Las plantas poseen gran importancia para el hombre, ya que nos proveen a través del proceso de fotosíntesis, el oxígeno que respiramos y constituyen fuentes de alimento y medicinas. Una característica de las plantas, quizás menos explorada es su utilización como insecticidas a través de los tiempos por diferentes culturas (Ware y Whitacre 2004).

Wadley *et al.*, (2011) en estudios arqueológicos, encontró la evidencia más antigua de un colchón hecho de *Cryptocarya woodii* (Engl.) que se infiere fue utilizado para dormir y a la vez repeler los insectos. Históricamente, el polvo presente en el suelo fue utilizado como repelente de insectos por algunos pueblos primitivos, probablemente, copiando el comportamiento de mamíferos y aves, que regularmente toman "baños de polvo" para deshacerse de insectos y ácaros (Ebeling, 1961). Los primeros casos documentados sobre el empleo de Polvos Inertes datan de alrededor del año 2000 A.C. y se refieren al control de plagas con tierra de diatomeas (Diatomita) en China (Allen, 1972). En el antiguo Egipto (1500 A.C.), se utilizó carbonato sódico y cenizas para el control de plagas en granos almacenados (Panagiotakopulu *et al.*, 1995). Alrededor del 1000 A.C. historiadores reflejan en sus escritos la quema de azufre como fumigante. Plinio el Viejo, registró en su Historia Natural la mayoría de los primeros usos de insecticidas como fueron; extractos de pimienta, agua jabonosa, aguacal, vinagre, trementina, aceite de pescado, salmuera, cenizas, azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno y lejía entre otras (Ware y Whitacre, 2004).

En la época del imperio romano se utilizaban extractos y plantas pulverizadas como insecticidas. Existen antecedentes de que en el año 400 A.C., en Persia, para el control de piojos se espolvoreó la cabeza de los niños con el polvo obtenido de flores secas de *Tanacetum cinerariaefolium* ((Trevir.)Sch.Bip). del cual posteriormente se originaron los insecticidas piretroides sintéticos (Silva, 2002).

En el siglo XVII, se demostró que la nicotina, obtenida de hojas de tabaco, producía un efecto letal para algunos escarabajos plaga de una especie de ciruelo (Silva, 2002). Posteriormente, se identificó a la nicotina como un alcaloide que imita a la acetilcolina (ACh) en la unión neuromuscular de los mamíferos, dando como resultado contracciones, convulsiones y muerte en los insectos (Ware y Whitacre, 2004).

El Verde de París o Verde-París es el nombre del acetoarsenito de cobre. Inicialmente se comercializó como un mero pigmento para tintas, debido al color verde intenso que presentaba. En 1867, el Verde de París comenzó a emplearse como pesticida, siendo el principal insecticida empleado en Estados Unidos, para combatir el escarabajo de la papa (Mann, 2013).

En 1850 se introdujo la rotenona obtenida de las raíces de *Enterolobium contortisiliquum* ((Vell.) Morong) de la familia Fabaceae, ampliamente utilizada por indígenas como ornamento y en la fabricación de canoas y otros utensilios (Silva, 2002). La rotenona o los rotenoides actúan por ingestión y por contacto en insectos provocando falla de las funciones respiratorias (Ware y Whitacre, 2004).

Con posterioridad se utilizaron plantas como *Schoenocaulon officinale* (Schlencht. & Cham). y *Myrocarpus frondosus* (L.) DC) para ejercer acción repelente. *Azadirachta indica* (A.Juss.) y *Quaisa amara* (L) se utilizaron también como controladoras de insectos (Silva, 2002; Ware y Whitacre, 2004).

1.4.2 Aceites esenciales: aspectos generales y composición química de los mismos

Los aceites esenciales son el resultado de una mezcla de sustancias orgánicas almacenadas dentro de glándulas secretoras, cavidades, células epidérmicas o tricomas glandulares de la planta que se extraen por medio de algún proceso de destilación (Hyldgaard *et al.*, 2012). Pueden obtenerse de la raíz como es el caso de *Curcuma aromatica* (Salisb), del tallo *Cedrus sp*, de la corteza *Cinnamomun zeylanicum* (Blume), de las hojas *Eucalyptus citriodora* ((Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson), de las flores *Matricaria recutita* (L.), de los frutos *Citrus aurantium* (L.) Osbeck; de las semillas como *Pimpinella anisum* (L.), así como de la totalidad de la planta (*Rosmarinus officinalis* (L.)) (Preedy, 2016). Generalmente se evaporan al contacto

con el aire, por lo que también son conocidos como aceites volátiles y le confieren los olores y sabores características de las plantas (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Dentro de la composición química de los aceites esenciales se destacan un gran número de compuestos llamados metabolitos secundarios. Estos se clasifican en mono y sesquiterpenos (Ej: 1,8 cineol, limoneno, timol, 4-terpineol). Posteriormente con la identificación de otros compuestos como alil e isoalifenoles, esta definición cambió. No obstante la mayoría de las esencias descritas reflejan una composición totalitaria dividida en mono y sesquiterpenos hidrocarbonados y oxigenados (Chamorro *et al.*, 2012). Las esencias que continen derivados del alil o isoalilfenol (trans-anetol, eugenol, estragol) son más escasas por lo que esta clasificación es muy selectiva. Existen otros compuestos que pueden estar presentes en las esencias como lactonas y glicósidos derivados de sesquiterpenos las cuales pueden transformarse en compuestos volátiles en dependencia del método de extracción (Ríos, 2016). Muchos de estos compuestos no intervienen en las funciones vitales de la planta, pero son sintetizados para la interacción de las plantas con su entorno (Cavoski *et al.*, 2011). Se vinculan estrechamente con la actividad defensiva y protectora de las plantas (Croteau *et al.*, 2000; Schmidt, 2010). La síntesis puede ser inducida y mejorada por condiciones de estrés biológicos, tales como heridas o infección (Wink, 2006; Dayan *et al.*, 2009). Si la planta detecta que está siendo atacada por insectos, modifica rápidamente su metabolismo induciendo una cascada de señales que terminan en la síntesis de diversos compuestos defensivos. Estos compuestos, entre otros factores, hacen a algunas plantas candidatas para ser utilizadas en el control de plagas.

1.4.2.1 Consideraciones sobre toxicidad vegetal.

Un tóxico es una sustancia ajena a un organismo, capaz de producir efectos nocivos sobre él. El concepto actual de toxicidad tiene un carácter relativo: cualquier sustancia puede tener efectos tóxicos por encima de cierto umbral de concentración en contacto con cualquier organismo. El considerar a los productos de origen vegetal como productos inocuos solo por ser naturales y no sintetizados, se incurre en un error conceptual. La toxicidad de una molécula se debe a la naturaleza de su estructura química, su dosis y no a su origen (Silva, 2002).

Lo que es tóxico en materia vegetal para un insecto, no necesariamente, lo es al ser humano, pero lo que es tóxico al ser humano, por ser una dosis mucho mayor, si lo es para el insecto. El análisis de todo el contexto medioambiental es importante.

Si bien se considera la posibilidad de incluir las plantas como alternativas de control vectorial, es importante incorporar en nuestro pensamiento, la idea que su bipotencialidad, en este caso, sería como insecticida y no terapéutico. La estrecha relación de los vectores y el hombre, hace necesario tener en cuenta, que estos compuestos o sus formulados, pudieran añadirse en aguas de consumo humano, inhalarse mediante espirales repelentes, potes fumígenos o aplicarse en repelentes para la piel. Es importante que los aceites y sus formulados estén elaborados en dosis adecuadas, de acuerdo a su propósito para que estos no causen daños al ser humano.

Ejemplos de plantas que pueden ser tóxicas al ser humano, por ingestión, aún siendo medicinales, son citados por Mahan y Scout (2000) y Larson *et al.*, (2010). Estos autores plantean que el uso excesivo (> 15 g/día) de *Panax ginseng* (C AMey (Ginseng)) puede causar hipertensión, efectos estrogénicos, hemorragia vaginal, insomnio, erupciones cutáneas y diarrea. El jengibre (*Zingiber officinale* (Roscoe)) a las dosis altas (más de 6 gramos de polvo de jengibre desecado) aumentan la exfoliación de las células epiteliales del estómago con dolor gástrico y formación de úlcera. La atropina presente en *Mandragora autumnales* (Bertol) en caso de altas

dosis provoca depresión del sistema nervioso central, coma y parálisis bulbar (Cano *et al.*, 2009).

En todos los ejemplos que se pudiesen mencionar, las fracciones responsables de estos síntomas, son metabolitos secundarios. Sin embargo, todo extracto, aceite esencial y/o aislamiento puede encontrar su propósito (medicinal o insecticida) con la dosis correcta, ejemplo de esto es el efecto gastroprotector del 1,8 cineol (Rocha *et al.*, 2015) o los resultados prometedores del 4-terpineol contra infestaciones oculares de *Demodex folliculorum* (Acari: Demodecidae) en personas de avanzada edad (Tighe *et al.*, 2013).

Los candidatos con que se pretendan elaborar formulados para el control larval en aguas de consumo humano, deben realizarse estudios toxicológicos con el propósito de evaluar los efectos dañinos que se deriven de su aplicación (Da Silva *et al.*, 2016). También se deben efectuar bioensayos ecotoxicológicos por los efectos de estas sustancias, en el ambiente natural de cría de los mosquitos, especialmente en poblaciones, comunidades y ecosistemas acuáticos (Iannacone, 2002, Fontes *et al.*, 2012)

1.4.3 Modo de acción insecticida de plantas.

Larvicida: La mayoría de las plantas, que se infieren, tengan actividad insecticida contra mosquitos al menos presentan, actividad larvicida (Noletto *et al.*, 2013, 2015; Ebadollahi, 2013).

Según Cantrell *et al.*, (2010) un compuesto larvicida actúa por ingestión a través del tracto gastrointestinal y por absorción a través de la cutícula o el tracto respiratorio. Una vez en el interior de la larva, el tóxico alcanza el sitio de acción causando un efecto sistémico por difusión en los diferentes tejidos (Souza *et al.*, 2012). En algunos casos, la intoxicación neurotóxica en los insectos inducida por

las plantas, es similar a la producida por los insecticidas organofosforados y carbamatos, mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa (Zarrad *et al.*, 2015).

Adulticida: En los insectos adultos, los análogos de metabolitos secundarios interactúan con una serie de enzimas vitales que participan directamente en la síntesis y almacenamiento de neurotransmisores, comprometiendo la activación de receptores y liberación de enzimas responsables de las señales de transducción (Wink, 2006). Los insectos mueren debido al efecto neurotóxico producido, donde predominan los síntomas de hiperactividad e hiperexcitabilidad (Enan, 2001).

Repelente: La utilización de plantas con actividad repelente es básicamente la más antigua de las prácticas plaguicidas. Con el surgimiento de las moléculas sintéticas, la mayoría de los formulados repelentes se producen con dietil toluamida (DEET). Algunos estudios, unos con mayor profundidad que otros, documentan los mecanismos que intervienen en la repelencia de mosquitos con esta molécula. En este contexto se describe que el DEET basa su efecto repelente, en *Ae. aegypti*, mediante el bloqueo de los receptores olfatorios (RO) (Ditzen *et al.*, 2008) para sustancias atrayentes como el CO₂ y el ácido láctico (Davis *et al.*, 1976), por lo que se produce un desorden de los mensajes recibidos por las células neurosecretoras provocando la desorientación del insecto y así la disociación de la picada (Dickens *et al.*, 2013). Xia *et al.*, (2008) plantean que los receptores olfatorios específicos (ROs) se activan selectivamente, según sea el caso y Lee *et al.*, (2010) plantean la intervención de receptores gustativos. Estudios realizados a nivel de células de los sensilios en el labellum de *Ae. aegypti* demostraron la presencia de un receptor gustatorio neuronal (RGN) que responde a la disuasión de DEET y otros repelentes incluyendo Picaridin, IR3535 y citronelal (Sanford *et al.*, 2013). La conclusión es que a pesar de la profundidad de los estudios, en los mecanismos de acción de los repelentes sintéticos, intervienen diversos factores fisiológicos de las especies de artrópodos estudiadas y que los estudios deben seguir profundizándose.

La búsqueda de plantas con actividad repelente es uno de los acápites de mayor interés en la actualidad (Isman 2016). En cuanto a los mecanismos de acción implicados en la actividad repelente de formulados botánicos, los estudios son de escasa representatividad. Se pueden mencionar las evaluaciones realizadas por Kwon *et al.*, (2010) con *Anopheles gambiae* (Giles, 1902) y *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830). Ellos plantean que la repelencia producida por citronela, mediante dos vías moleculares: el co-receptor olfativo Orco y los canales TRPA1 (por sus siglas en inglés; potencial receptor transitorio de anquirina 1, PTRPA1 por sus siglas en español).

El 3.8-diolparamentano (PMD) obtenido de *Corymbia citriodora* ((Hook.)K.D. Hill & L.A.S.Johnson) (Barasa *et al.*, 2002) es el ejemplo material de que una especie vegetal puede ser utilizada para la producción de repelentes. Los resultados muestran que este formulado tiene su efecto muy similar al DEET (Carroll *et al.*, 2006; Zielinski-Gutiérrez *et al.*, 2010; Colucci *et al.*, 2018). La comprensión del modo de acción de los repelentes de insectos y cómo estos productos químicos interactúan, nos permitirá diseñar potentes formulaciones botánicas dirigidas a interferir con la señalización sensorial de insectos.

Reguladora del desarrollo: Otro aspecto descrito en la literatura plantea la existencia de plantas con actividad reguladora de crecimiento en insectos. Los procesos de muda y metamorfosis en los insectos están regulados por 2 hormonas efectoras: la 20-hidroxiecdisona (ecdisona) y la hormona juvenil (HJ). La ecdisona inicia y coordina cada muda y regula cambios que ocurren durante la metamorfosis. La hormona juvenil previene los cambios en expresión génica inducidos por la ecdisona, cambios que son necesarios para que tenga lugar el tránsito en las larvas de mosquitos por los cuatro estadios larvales. Esta hormona, impide que la larva se desarrolle antes de tiempo y permite que ocurran las mudas necesarias para el crecimiento. Si durante la etapa de desarrollo se aumenta

artificialmente los niveles de la hormona, la emergencia del imago o adulto se ve interrumpida (Frederik, 1994). En el último estadio larval, la producción de hormona juvenil, se inhibe. Esta respuesta estimula la síntesis de ecdisona que, en ausencia de niveles altos de hormona juvenil, induce a las células a desarrollar la pupa (Frederik, 1994).

Algunos metabolitos de plantas provocan un desequilibrio hormonal en los insectos, impidiendo su desarrollo normal al igual que los inhibidores del crecimiento sintéticos. Dicho desequilibrio genera mudas prematuras o tardías y la muerte de los individuos que no emergen de las pupas (Céspedes *et al.*, 2004, Burgueño-Tapia *et al.*, 2008, Hincapié *et al.*, 2011). Especies enmarcadas en los géneros *Pteridium*, *Polypodium* y *Osmunda* constituyen fuentes de ecdisteroides. Algunos como la ciasterona y ecdisterona pueden ser aislados de las hojas y raíces de *Ajuga remota* (Benth), (William, 1970). La azadirachtina es un limonoide de los más estudiados para el control de plagas de la agricultura. Se encuentra presente en diferentes especies de Meliáceas tales como *Azadirachta indica* (A.Juss) y *Melia azederach* (L) y actúa como regulador del crecimiento y esterilizante (Zanno *et al.*, 1975).

1.4.3.1 Mecanismos de acción en insectos de los aceites esenciales y sus constituyentes.

Independientemente del modo en que pueden actuar los aceites esenciales como insecticidas, se ha demostrado en estudios realizados, que en el insecto, el efecto tóxico de los mismos y sus constituyentes se produce al interactuar con varios blancos moleculares (Rattan *et al.*, 2010; Blenau *et al.*, 2014). Los modos de acción de fitoquímicos responden a mecanismos de acción presentes en los insectos como:

a) la inhibición de la acetilcolinesterasa (Zarrad *et al.*, 2015; Jankowska *et al.*, 2018)

b) la inhibición del canal de cloro del sistema GABA (Priestley *et al.*, 2003; Bloomquist *et al.*, 2008; Jankowska *et al.*, 2018)

c) afectación de los receptores octopaminérgicos (Enan 2005 ^{a,b} Jankowska *et al.*, 2018)

La inhibición de Acetil colinesterasa (AChE) en insectos causa acumulación del neurotransmisor acetil colina en la sinapsis neuro-muscular, quedando la membrana post-sináptica en un estado de permanente estimulación y como resultado causa una descoordinación del sistema neuromuscular con ataxia pudiendo causar eventualmente la muerte del insecto (Aygun *et al.*, 2002; Houghton *et al.*, 2006). Alcaloides aislados de *Haloxylon salicornicum* (Moq.) Bunge ex Boiss y *Stemona japonica* (Blume) Miquel, se conocen como fuertes agonistas de los receptores nicotínicos de acetil colina (Tang *et al.*, 2008). Los flavonoides karanjacromeno, pongaroteno, pongamol y ácido oleico presentes en *Millettia pinnata* (L.)(Fabaceae) fueron potentes inhibidores de AChE en *Ae. aegypti* (Perumalsamy *et al.*, 2015)

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) tiene funciones tanto inhibitorias como excitatorias en insectos, mediando la activación muscular en las sinapsis entre los nervios y las células musculares (Bloomquist, 2003). Los receptores GABA_A, forman parte de un complejo de canal iónico regulado por ligandos y los receptores metabotrópicos GABA_B que se acoplan a proteínas G que abren o cierran los canales iónicos por medio de proteínas G intermediarias. Cuando el flujo neto de iones cloruro es hacia el exterior, su función es excitatoria/despolarizante (diferencia de voltaje menos negativa). Si el flujo neto es hacia el interior de la célula, GABA funge como inhibidor/hiperpolarizante (diferencia de voltaje más negativa). Portero *et al.*, (2012) plantea que la actividad antialimenticia en insectos del sesquiterpenoide silfine es atribuible a su acción a

nivel de los receptores GABA. Tong y Coast (2010) en trabajos realizados con timol, pulegona y carvacrol evidenciaron su actividad moduladora alostérica positiva de los receptores GABA en insectos y la tuyaona como modulador alostérico negativo (Bloomquist, 2008).

La octopamina está presente en el sistema nervioso de todos los insectos. Actúa como neurohormona, neurotransmisor y neuromodulador (Enan 2005^a) Es más abundante en el sistema nervioso de los insectos que la norepinefrina, sugiriendo una función similar a la epinefrina y norepinefrina en los vertebrados. Varios estudios señalan que constituyentes como el eugenol o el timol actúan por bloqueo de los receptores octopaminérgicos y/o potenciando los receptores en cascada de la tiramina (Enan, 2005^{a,b}). La cocaína debe su actividad insecticida a la potenciación de la neurotransmisión octopaminérgica (Nathanson *et al.*, 1993), al igual que el ácido linoleico (Perumalsamy *et al.*, 2015). Utilizando acoplamiento molecular se demostró que el carvacrol, el eugenol y el eucaliptol son capaces de interactuar en el sitio de unión del receptor oamb de la octopamina en *Ae. aegypti* (Khanikor *et al.*, 2013). Debido a la falta de receptores de octopamina en los vertebrados, el sistema octopaminérgico representa un objetivo para el control de insectos, lo que haría que estos compuestos resulten relativamente no tóxicos para los mamíferos.

Estudios más recientes informan un sitio de acción a nivel de los tubos de Malpighi (estructura del sistema excretor de los insectos), a través de los canales rectificadores de K. La inhibición de estos canales con moléculas pequeñas, inhibe la secreción de K⁺ y fluidos transepiteliales en los túbulos de Malpighi, lo que provoca una alteración del K⁺ de la hemolinfa y la homeostasis de los líquidos en hembras adultas, causando un daño en el sistema excretor que impide la desintoxicación de desechos metabólicos y xenobióticos en la hemolinfa (Piermarini *et al.*, 2017)

1.4.4 Consideraciones sobre la evaluación de actividad insecticida de plantas sobre mosquitos

A nivel global sobre la década del 40 del siglo pasado se describieron aproximadamente 1 200 especies de plantas con valor insecticida (Roark *et al.*, 1947). Sukumar *et al.*, (1991) notificó alrededor de 344 especies vegetales con actividad específica sobre larvas de mosquitos. En trabajos realizados por Shalan *et al.*, (2005) se describió una amplia información, que incluye la actividad larvicida, ovicida, reguladora del crecimiento de sustancias de origen botánico, el efecto de mezclas de aceites, acción residual de los mismos y su toxicidad en organismos no diana de control. Ghosh *et al.*, (2012) referenció 150 plantas con actividad insecticida sobre diferentes especies de mosquito y clasificó los efectos por estadio larvario utilizado, informó valores de concentraciones letales y tipos de disolventes empleados. Noieto y Fernández (2013) reunieron información sobre 269 especies de plantas con actividad larvicida de las cuales más del 60 % poseen una $CL_{50} < 100$ mg/L. Andrade-Ochoa *et al.*, 2017 en revisión realizada especificaron la actividad biológica de 81 aceites esenciales y 68 de sus componentes sobre las larvas de tres géneros de mosquitos.

Todas estas investigaciones abarcan estudios generales y algunos muy particulares en diferentes regiones del planeta. La evaluación de plantas como alternativa de control vectorial en nuestro continente es escasa (Leyva *et al.*, 2017) Es un camino largo y para algunos puede no ser atractivo. No siempre existen los incentivos necesarios para la investigación e introducción de resultados y los recursos financieros suelen ser escasos. Los grandes brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por vectores ocurren en países pobres o en vías de desarrollo. Para el control químico principalmente se destina un determinado financiamiento que nunca es monto considerable como para poder adquirir las nuevas, mejoradas y

perfeccionadas formulaciones de insecticidas, por lo que se recurre a las antiguas y baratas trayendo como consecuencia problemas medioambientales y de resistencia. Los decisores deberán pensar en cómo invertir en el estudio e inserción de nuevas alternativas de control que a la larga garanticen la sostenibilidad de este proceso. Una posibilidad es el estudio y explotación de los recursos vegetales que se encuentra dentro de cada ecosistema sin conllevar a la deforestación u otros fenómenos ambientales (ONU, 1987). Esto pudiera proporcionarles a las personas que habitan en países pobres o en vías de desarrollo un medio natural y accesible de control y en algunos casos, hasta fuentes de empleo si se implican en la producción de formulados naturales.

Los estudios referentes a la búsqueda, identificación y caracterización de plantas con vista a su biopotencialidad antivectorial son insuficientes. Vargas *et al.*, (2012) resaltó la preocupación de que, de los 358 artículos consultados, solo 24 correspondían a autores latinoamericanos. América es el segundo continente más grande del planeta, con 35 países. América del Sur abarca una gran variedad de regiones biogeográficas, donde la mayor extensión es en selvas y bosques lluviosos, los que poseen una inmensa y rica flora prácticamente sin explotar. Existen más de 30 especies de plantas invasivas y nocivas con peligro para los ecosistemas en donde se encuentran establecidas (Oviedo *et al.*, 2015) las que pudiesen estudiarse para valorar su utilización para el control de plagas.

No es menos cierto que existen factores que afectan negativamente. El principal conflicto en la introducción de resultados en cuanto a la actividad larvicida e inhibidora del desarrollo de plantas radica, en la dificultad en añadir formulaciones de aceites o sus extractos en todo tipo de sitios de cría de mosquitos, sin cambiar la textura, el sabor del agua o sin afectar a la fauna acompañante en el caso de criaderos naturales. Ejemplos de estudios alentadores se realizaron por De Lima Santos *et al.*, (2013) y Cordeiro *et al.*, (2013) al evaluar una lectina obtenida de

Moringa oleífera(Lam), soluble en agua, atrayente a la oviposición y con acción ovicida.

En cuanto a la actividad adulticida se han estudiado unas pocas plantas. Los estudios más avanzados consideran la utilización de la microencapsulación de aceites para la impregnación de tejidos y como repelentes para la piel (Krimmer *et al.*, 2016). Microencapsulados de citronela evidenciaron una mayor perdurabilidad que con soluciones etanólicas del aceite esencial (Specos *et al.*, 2010; Solomon *et al.*, 2013). Investigaciones realizadas por Sakulkua *et al.*, (2013) con aceite encapsulado preparado a diferentes cantidades de surfactante y glicerol, mostraron que se liberó mas lentamente el aceite, a partir de altas cantidades de glicerol que con bajas cantidades, lo que resultó en un tiempo de protección prolongado y sostenido contra mosquitos.

Evaluaciones de suma importancia y que escasean en este tipo de trabajo, son los bioensayos de toxicidad en modelos de animales y en organismos no objeto de control (Iannacone, 2002; Souza *et al.*, 2011; Fontes *et al.*, 2012). Los estudios casi siempre, se encuentran realizados con formulados botánicos de interés medicinal y no como complementos de estudios de actividad insecticida de plantas.

No es posible pensar que los productos naturales reemplacen completamente a los insecticidas sintéticos, los cuales son necesarios, para disminuir las poblaciones de vectores en momentos de brotes o epidemias. Los estudios más completos sobre plantas permitiran contar con alternativas naturales dentro de las estrategias del control por medio de la inclusión de los más activos y sostenibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

El fracaso está, cuando eliges no seguir probando alternativas...

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El estudio realizado es experimental, en condiciones de laboratorio.

Horizonte temporal: El estudio abarca un periodo de 6 años, desde el 1ro de enero de 2012 al 31 de diciembre de 2017.

Población y muestra

Para el estudio se utilizaron tres especies de mosquito: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*.

Para *Ae. aegypti* se utilizó:

- **cepa Rockefeller:** cepa de referencia susceptible a insecticidas, suministrada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), San Juan, Puerto Rico, 1996.
- **población San Miguel del Padrón 2011 (SMP2011):** colectada en los estados de larva y pupa (27 individuos), en lavadero conteniendo temefos, municipio San Miguel del Padrón, área de salud Bernardo Ponce, La Habana, Cuba, en el año 2011, durante una etapa intensiva de control vectorial.

- **población Marianao 2013:** colectada en los estados de larva y pupa, (35 individuos) en tanque bajo conteniendo temefos, municipio Marianao, área de salud Finlay, La Habana, Cuba, en el año 2013 durante una etapa intensiva de control vectorial.

Para *Ae. albopictus*

- **población Fraga 2012:** colectada en estado de larva y pupa en larvitrapa (dispositivo de vigilancia) del reparto Juan de Dios Fraga, área de salud Pulido Humaran La Lisa, La Habana, Cuba año 2012.

Para *Cx. quinquefasciatus*

- **población Baraca 2014:** especie colectada en estado de larva y pupa (≈ 150 individuos) en zanja del municipio La Lisa, área de salud Pulido Humaran, La Habana, Cuba, año 2014.

El estado de susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas se evaluó utilizando las metodologías de la WHO, (2005) como paso previo al comienzo de los bioensayos con aceites esenciales (Anexo 4).

Cría y mantenimiento de las poblaciones de mosquitos en el insectario

Las poblaciones de mosquitos utilizadas se criaron en el insectario del Departamento de Control de Vectores del IPK siguiendo la metodología descrita en el Manual de Indicaciones Técnicas del Insectario (Pérez *et al.*, 2004). La temperatura de los locales durante el período de estudio se mantuvo en $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y la humedad relativa de $75\% \pm 2$ y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Los mosquitos adultos se mantuvieron en jaulas cúbicas de 60 cm, forradas de tela doble para impedir el escape de individuos a través de los orificios. La alimentación en el estado adulto para los machos consistió en; azúcar en granos.

Para las hembras se colocó ratones BalB/c de 6 a 10 semanas de edad con un peso entre 18 y 22 gramos procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Los ratones se ubicaron en cepos individuales dentro de las jaulas durante dos horas, dos veces a la semana. Para la recogida de huevos, en el caso de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, en cada jaula se colocó un recipiente con agua con una tira de papel en su borde interior que garantizó la posterior recolección de los huevos y en el caso de *Cx. quinquefasciatus* solamente un recipiente con agua

Las tiras con huevos se colocaron en bandejas sobre una superficie húmeda durante 24 horas, para garantizar el correcto desarrollo de la embriogénesis. Al retirarse de las bandejas, las tiras de huevos se dejaron secar y se almacenaron durante cortos períodos de tiempo (no menos de 3 meses) para su posterior utilización.

Para garantizar la eclosión de los huevos, las tiras conteniendo los mismos, se colocaron en cubetas plásticas (35 x 25 x 15 cm) con un volumen de 2 L de agua declorinada a 26°C. Las larvas emergidas se alimentaron con harina de pescado 1g/L, que contiene mayoritariamente aminoácidos esenciales y bajas cantidades de iones calcio, fosfato, carbohidratos y lípidos, producida por CENPALAB.

Aceites esenciales utilizados en el estudio.

Los criterios que se tomaron en cuenta para la selección de las plantas fueron los siguientes:

- especies botánicas pertenecientes a géneros y/o familias reconocidas como productoras de aceite esencial
- con antecedentes de haber sido evaluadas como fuente de sustancias con actividad insecticida

- poseer un uso complementario (arómicas, condimenticia y/o medicinal) que conllevaría a la mejor aceptación de formulados naturales por parte de la población
- y/o especies cuyo uso, como materia prima para la obtención de productos naturales pudiera ser sostenible en nuestro contexto, criterio que incluye especies silvestres abundantes, taxones no categorizados como amenazados por su estado de conservación y/o plantas que sean o puedan ser cultivables.

Para el estudio se seleccionaron los aceites esenciales de las siguientes plantas:

- Aceite de trementina (AT) se obtuvo por destilación de la resina de *Pinus tropicalis* (Morelet) (nombre común: pino) Lote: 2-03-09-002. La resina de pino en forma bruta (500 g–5,0 Kg), se colectó en los pinares de la Estación Forestal de Viñales, Alturas Serpentinatas, Cajalbana, Pinar del Río. La resina se almacenó a temperatura ambiente (25-30°C) protegida de la luz solar hasta el comienzo del proceso de destilación según NC 581:2008.
- Aceite de trementina modificado con tratamiento fotoquímico (ATM): Se obtuvo por tratamiento de fotoisomerización del AT, recién destilado Lote: 2-03-09-001. El AT se sometió en presencia de luz solar ambiental durante 2-3 horas en condiciones catalíticas heterógenas ácidas (pentóxido de divanadio, V₂O₅, pentóxido de diniobio, Nb₂O₅ agitación (> 600 rpm). (Informe final de proyecto, 2011)
- *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch. (Burseraceae) Nombre común: sazafrás. Se recolectó en La Lisa, La Habana, año 2014. Se tomó como referencia la herborización realizada por Monzote *et al.*, (2012), por ser muestra, de la misma fuente.

- *Citrus aurantium* L. (Rutaceae), nombre común: naranja dulce. El aceite se obtuvo de forma industrial en el Combinado Citrícola Victoria de Girón, Jagüey Grande, Matanzas (Lote 13700, año 2016).
- *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) nombre vulgar: cúrcuma. Se recolectó en canteros pertenecientes al Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, año 2016. Se herborizó un ejemplar representativo que se depositó en el Departamento de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma con la identificación UDG H 012.
- *Curcuma aeruginosa* (Roxb) (Zingiberaceae) nombre común: Flor de abril Se recolectó en la Sierra Maestra, municipio Bartolomé Masó en el año 2017. Se herborizó un ejemplar representativo que se depositó en Jardín Botánico de Cupaniyu, Granma con la identificación VO: 3012.
- *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae) Nombre común: eucalipto. Se recolectó, entre los meses de noviembre y diciembre del año 2014 en el IFAL. Se herborizó un ejemplar representativo que se depositó en el Instituto de Ecología y Sistemática HB 88667.
- *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (Myrtaceae) nombre común: melaleuca. Se recolectó en la Laguna del Tesoro, Ciénaga del Zapata, año 2011. Se herborizó un ejemplar representativo que se depositó en el Instituto de Ecología y Sistemática con la identificación HB 42678.
- *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), nombre común: albahaca. Se recolectó, entre los meses de diciembre del año 2014 en el IFAL. Se herborizó un ejemplar representativo que se depositó en el Jardín Botánico Nacional HFC-087057.

- *Piper aduncum* subsp *ossanum* (C. DC.). Saralegui (Piperaceae) nombre común: platanillo. Fue colectado, entre los meses de septiembre del año 2013 en la provincia Artemisa. Se herborizó un ejemplar representativo que fue depositado en el Jardín Botánico Nacional HFC-87641.

La información botánica más amplia de estas plantas se presenta en el Anexo 5.

Los aceites esenciales de *B. graveolens*, *E. globulus*, *O. basilicum* y *P. aduncum* subsp *ossanum* fueron suministrados por el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana (IFAL). Todos estos aceites se extrajeron por hidrodestilación de las hojas según lo establecido en la norma cubana ISO 65-71: 84.

El aceite esencial de *M. quinquenervia* fue proporcionado por el Órgano de Integración para el Bienestar Social (OIBS). El aceite se extrajo por el método de destilación por arrastre con vapor de las hojas según lo establecido en la norma ISO 65-71: 84.

Los aceites de *C. longa* y *C. aeruginosa* se extrajeron por el mismo método a partir de las raíces y fueron proporcionados por el Centro de Estudio de Química Aplicada, de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Granma.

El aceite de *C. aurantium*, obtenido por expresión, a partir del pericarpio de la fruta según lo establecido en la norma ISO 65-71: 84 y fue suministrado por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Los aceites esenciales se mantuvieron a 4°C hasta la preparación de las soluciones para los bioensayos correspondientes. La composición química (Anexo 6) se determinó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890 con un inyector del tipo “split splitless” (relación de split 20:1) acoplado con un espectrómetro de masas de la serie Agilent 05973 (ambos provenientes de la firma Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Se utilizó una columna capilar SPB-5 (L=15m; DI=0,25mm;

f=0,10µm) con una inyección de 2 µl. La temperatura del horno se programó a 60°C (2 min isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 100 °C a razón de 4 °C.min⁻¹ y otra rampa de 10 °C.min⁻¹ desde 100 °C hasta 250 °C, donde finalmente permaneció durante 5 min isotérmicos. Se utilizó Helio como gas portador con un flujo constante de 1,0 ml/min. El espectrómetro de masas trabajó en modo scan de adquisición a 70eV. Se utilizó un analizador cuadrupolar a 150 °C de temperatura del cuadrupolo, el detector trabajó en un rango de masas de hasta 800 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 280 °C y 230 °C, respectivamente. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275 y el Atlas Registry of Mass Spectra Data (Anexo 6).

Reactivos utilizados en los estudios de laboratorio

Los reactivos utilizados de forma general fueron; acetona y metanol EMSURE®, Etanol absoluto EMPROVE®, H₂O₂, todos provenientes de la firma comercial Merck, Alemania. El 1cloro-2,4-dinitrobenceno, α-naftilacetato y β-naftilacetato, de de la firma comercial Sigma, USA.

2. Determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales sobre *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

2.1. Determinación de la actividad larvicida de los aceites esenciales sobre *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

Para la evaluación de la actividad larvicida de los aceites esenciales utilizados en el estudio se utilizó la metodología de la OMS (WHO, 2005). De cada aceite se prepararon diferentes concentraciones etanólicas de manera que al añadir 1 mL en 99 mL de agua declorinada, se lograron concentraciones finales que oscilaron entre

8 y 150 mg/ L. Por cada concentración evaluada, se utilizaron 125 larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano distribuidas en un control y cuatro réplicas a razón de 25 larvas por recipiente. Se utilizó como control positivo temefos grado técnico y como control negativo 1ml de etanol en 99 mL de agua. Trancurridas 24 horas de añadir las concentraciones se determinó la mortalidad. Se tomó como criterio de mortalidad; la ausencia de nado, incapacidad para flotar, movimientos muy lentos o la inmovilidad de las larvas ante el estímulo de un alfiler entomológico. Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) se calcularon utilizando la prueba Probit del programa estadístico SPSS (versión 11 para Windows), teniendo en cuenta el número de individuos muertos por concentración.

Según criterios de Kiran *et al.*, (2006) se consideraron los aceites con actividad larvicida en los que se evidenció CL₅₀<100 mg/L. Como criterio de similitud entre CL₅₀ se tuvo en cuenta el solapamiento de los límites de confiabilidad.

2.2 Determinación de la influencia de las CL₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

Para la selección de los aceites bioactivos más promisorios se tomaron en cuenta varios aspectos; aceites con CL₅₀< 50 mg/L, respuesta homogénea de los mismos en todas las poblaciones y sostenibilidad en nuestro contexto. Para evaluar la actividad inhibidora del desarrollo se utilizó la metodología de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2005).

Se utilizaron 2700 larvas de tercer estadio por especie de mosquito, distribuidas en 18 recipientes a razón de 150 larvas por depósito. De cada aceite seleccionado, se preparó una solución madre. Se añadió 5 mL de dichas soluciones en 495 mL de

agua de clorinada a 25°C, exponiendo las poblaciones a sus respectivas CL_{90} calculada con cada aceite. Las larvas fueron expuestas durante 24 horas. Fueron consideradas muertas y desechadas, las que evidenciaron ausencia de nado, incapacidad para flotar, movimientos muy lentos o inmovilidad ante el estímulo de un alfiler entomológico. Las sobrevivientes se mantuvieron en el agua de exposición hasta alcanzar el estado de pupa. Para su alimentación se le añadió 0,05 g de harina de pescado. La mortalidad de larvas y pupas se registró diariamente. Las pupas sobrevivientes se separaron por sexo en tubos de cristal independientes taponeados con algodón hasta la emergencia o muerte de los adultos. Como controles negativos se utilizaron 150 larvas expuestas a 5 mL de etanol en 495 mL de agua de clorinada de cada población. Como controles positivos larvas de las tres especies fueron sometidas a las formulaciones comerciales de Sumilarv 0,5G (piriproxifen juvenoide) producido por la firma comercial japonesa Sumitomo y Mosquiron MR G2 (novaluron ecdisoide) producido por la firma comercial israelita Makhteshim Agan Ind. Ltd, ambos a 100 mg/L dosis máxima sugerida por los fabricantes. Se calculó el porcentaje de inhibición de la emergencia (IE%) según metodología (WHO, 2005):

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

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

Se comprobó la distribución normal de los datos por Shapiro Wilk y para la comparación de la mortalidad diaria en todos los estadios se utilizó un ANOVA Multifactorial considerando diferencia estadísticamente significativa para una $p < 0,05$ utilizando el programa Statistica versión 7.

2.3 Determinación de la actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de *Aedes aegypti* más resistente a insecticidas y posterior a la

exposición a la CL₉₀ de un aceite esencial seleccionado dentro de los promisorios

El estado de susceptibilidad ante insecticidas sintéticos en la fase de larva, se comprobó en las poblaciones SMP2011, Mariana 2013 y la cepa Rockefeller. De esta manera se determinó los factores de resistencia (FR) para ambas poblaciones con respecto a la cepa de referencia (Anexo 4).

$$FR_{50} = \frac{CL_{50} \text{ en población problema}}{CL_{50} \text{ en cepa Rockefeller}} \quad FR_{99} = \frac{CL_{99} \text{ en población problema}}{CL_{99} \text{ en cepa Rockefeller}}$$

La población con factores de resistencia más elevados se escogió como la más resistente a insecticidas.

Para realizar la determinación de la actividad de enzimas detoxificadoras, se partió de los aceites seleccionados en el acápite 2.2. Con la población seleccionada se calcularon los FR₅₀ y FR₉₀ para cada aceite con respecto a la cepa Rockefeller de igual forma que para los insecticidas sintéticos. Se eligió el aceite con los factores de resistencia más elevados para la población escogida.

Larvas de esta población de *Ae. aegypti* se expusieron a la CL₉₀ del aceite seleccionado. Se utilizaron, como control larvas de ambas poblaciones que no fueron expuestas al aceite y a las que solamente se aplicó 1 mL de etanol. La mortalidad se determinó a las 24 horas; las larvas sobrevivientes se lavaron con abundante agua destilada y posteriormente, se colocaron en un volumen de 500 mL de agua por 24 horas más.

Preparación de la muestra. Para cada ensayo de actividad enzimática se seleccionó una muestra aleatoria de 200 individuos sobrevivientes de cada población; larvas no expuestas o control y larvas sobrevivientes a la exposición al aceite. Se colocaron, individualmente, en placas de 96 pocillos para la realización de las pruebas bioquímicas. Se maceraron en 50 µL de Na₂PO₄ (0,01 mol/L, pH= 7,5) con

el empleo de un homogenizador de placas sobre una bolsa de hielo. Se completó a un volumen de 300 μL de tampón fosfato. Se determinó la actividad de las siguientes enzimas:

Citocromo P450 mono-oxigenasas (MFO). Para la determinación de la actividad de las enzimas citocromo P450 mono-oxigenasas se utilizó la metodología descrita por Brogdon *et al.*, (1998) y modificada por French *et al.*, (2013). Se utilizaron 80 μL de macerado, 200 μL de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ) a una concentración de 12 mmol/L, y 25 μL de H_2O_2 (3%). Se utilizó como control negativo una mezcla de Na_2PO_4 , TMBZ y H_2O_2 . La reacción transcurrió durante 10 min a 25°C para garantizar que no hubiera variaciones entre los valores de actividad enzimática (French *et al.*, 2013). La absorbancia se midió a 620nm, a 25°C, en un espectrofotómetro cinético (Versa Max, EE.UU). La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\xi} \times \frac{V_{ensayo}}{V_{muestra}} \times V_{total}$$

Donde la actividad enzimática es expresada en NmolTMBZ/min Abs/t: variación de absorbancia en el tiempo; ξ : coeficiente de extinción molecular del sustrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMBZ), $5,9 \times 10^4$ L/mol/cm; V_{ensayo} : volumen utilizado en el ensayo; $V_{muestra}$: volumen de homogenato utilizado el ensayo; V_{total} : volumen del homogenato

Glutation-S-transferasas (GST). Para la determinación de la actividad de las enzimas Glutation-s-transferasas se utilizó la metodología descrita por Rodríguez *et al.*, (2001). De cada una de las muestras se tomó 20 μL y se añadieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Seguidamente se añadieron 200 μL del sustrato [mezcla: 1 mL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (50 mmol/L) diluido en metanol y 20 mL de glutatión reducido (20 mmol/L) diluido en tampón fosfato]. La reacción se dejó transcurrir durante 3 min a 25 °C para garantizar que no hubiera variaciones

entre los valores de actividad enzimática. La absorbancia se leyó a 340nm, a 25°C, en un espectrofotómetro cinético. La actividad enzimática se determinó mediante los valores de densidad óptica a esta longitud de onda. Esta se calculó según la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{DO \times l}{t \times k} \times \frac{V_{mezcla}}{V_{muestra}}$$

Donde la actividad enzimática es expresada en mM de sustrato transformado/ml/min; k coeficiente de extinción (9,6 mM⁻¹/cm), DO densidad óptica medida a 340 nm, V mezcla (Volumen de la mezcla) 20 µL y V muestra (Volumen de la muestra) 220 µL.

α y β carboxilesterasas (EST). Para la determinación de la actividad de las enzimas α y β carboxilesterasas se utilizó la metodología descrita por Rodríguez *et al.*, 2001. De cada una de las muestras maceradas se tomaron 20 µL y se añadieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Seguidamente, se añadieron 200 µL de α o β naftil acetato (diluido 1:100 a partir de una solución madre de α o β-naftil acetato 70 mmol/L). Se dejó transcurrir la reacción durante 10 min para garantizar que no hubiera variaciones entre los valores de actividad enzimática. Posteriormente, se añadieron 40 µL del colorante Fast Blue B Salt (0,03g en 10 mL de la mezcla H₂O y SDS 5 %, 3:7 (v/v)). La absorbancia se calculó a 570 nm, a 25°C, en un espectrofotómetro cinético.

La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \left[\left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t} \right)_{control} - \left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t} \right)_{muestra} \right] \frac{1}{\epsilon} \times \frac{V_{ensayo}}{V_{muestra}} dil$$

Donde la actividad enzimática es expresada en µmol de sustrato transformado/min mL); V ensayo: volumen total del ensayo (mL); V muestra: volumen de muestra utilizado en el ensayo (mL); ξ: Tangente de curva patrón de α y β-naftol acetato

Se analizó la distribución normal de los datos mediante Shapiro-Wilk. La diferencia estadísticamente significativa para una $p < 0,05$ de los valores de actividad enzimática en los grupos en estudio se determinó mediante Mann Whitney (Statistica versión 7).

2.4 Determinación de la actividad adulticida de aceites esenciales sobre *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

2.4.1 Determinación de la actividad adulticida mediante botellas impregnadas con soluciones de aceites esenciales

Los bioensayos se realizaron siguiendo el protocolo de las botellas impregnadas (CDC, 2010), modificado por la utilización de botellas de vidrio de 250 mL de capacidad con tapa esmerilada (Rodríguez *et al.*, 2017). El tiempo diagnóstico (TD) se estableció para 30 minutos según metodología CDC, (2010). Se aplicó 1 mL de las soluciones de los aceites a diferentes concentraciones a cada botella y se rotó hasta la total evaporación del disolvente. El control se impregnó con un 1mL de acetona. Las botellas se cubrieron con papel de aluminio culminada la impregnación y se taparon transcurridas 24 horas. Se utilizó un control y cuatro réplicas por concentración a evaluar.

Para los bioensayos se colocaron 15 hembras de uno a tres días de edad en cada botella, comenzando por el control. Durante 1 hora los individuos se observaron y contabilizó el número de derribados cada 5 minutos. Transcurrido 60 minutos, se consideraron muertos aquellos mosquitos que no pudieron volar cuando se movió la botella con suavidad o los que se mantuvieron inmóviles en el fondo de la botella.

Con los valores del número de individuos derribados cada 5 minutos, a la dosis mínima de cada aceite que provocó el 100 % de derribo a los 30 minutos se calcularon, los tiempos de derribo que provocaron el 50 y el 90 % de derribo (TD₅₀

y TD₉₀) para cada población. Estos parámetros se obtuvieron mediante la prueba Probit del programa estadístico SPSS (versión 11 para Windows)

2.4.2 Determinación de la actividad adulticida mediante papeles impregnados con soluciones de aceites esenciales

Para la realización de los bioensayos se impregnaron papeles de filtro (12x15cm) con soluciones cetónicas a igual concentración que las utilizadas con las botellas. Se impregnó con 2 mL de solución, de forma manual utilizando una pipeta volumétrica de 1 mL. A cada tubo se le colocaron en su interior 20 hembras de 3 días de edad, sin alimentar, comenzando por el control. Cada concentración tuvo un control y cuatro réplicas por población utilizada en el estudio. Se expusieron por un periodo de 1 hora según metodología WHO, (2016). Al final del período de exposición, los mosquitos adultos se transfirieron a tubos de reposo y mantenidos en posición vertical por 24 horas. Los tiempos de derribo que provocaron el 50 y el 90 % de derribo (TD₅₀ y TD₉₀) para cada población se calcularon con el número de individuos derribados cada 5 minutos, a la dosis mínima de cada aceite que provocó el 100 % de derribo a los 30 minutos. Estos parámetros se calcularon mediante la prueba Probit del programa estadístico SPSS (versión 11 para Windows)

Como controles positivos para ambos bioensayos se utilizaron papeles impregnados con malation al 5% por ser la dosis diagnóstico más alta que describen los informes de la OMS.

2.5 Determinación de la actividad ovicida y repelencia a la oviposición en las poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites esenciales

2.5.1 Determinación de la actividad ovicida de soluciones de aceites esenciales sobre las poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

La determinación de la actividad ovicida se realizó siguiendo metodología de Prajapathi *et al.*, (2005). Se utilizaron huevos de una semana de ovipositados, cada tira contenía como promedio 300 huevos, previamente observados bajo el estereoscopio para confirmar la presencia de embrión. Las tiras con huevos se expusieron a la CL₉₀ (1 mL en 99 mL de agua declorinada) de cada aceite por 24 horas. Se utilizó un control, el cual consistió en exponer las tiras de huevos a 1 mL de etanol en 99 mL de agua declorinada. Por cada aceite se utilizó 1 control y tres réplicas. Posteriormente las tiras con huevos se extrajeron del medio, se colocaron a secar en una bandeja a 25 °C y se procedió a contar el total de huevos eclosionados bajo un estereoscopio.

Para la distribución normal de los datos se utilizó el test Shapiro Wilk y un ANOVA Multifactorial ($p < 0,05$). Se utilizó el programa Statistica versión 7.

2.5.2 Determinación de la repelencia a la oviposición en las poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites esenciales

Para determinar la repelencia a la oviposición ante soluciones de aceites se utilizaron 3 réplicas por cada población y por cada aceite. En cada jaula se colocaron 25 hembras y 25 machos, tres recipientes conteniendo 500 mL de agua declorinada, 500 mL de agua declorinada con 20 larvas de segundo estadio para simular criadero y otro recipiente conteniendo 1 mL de solución de aceite en 499 mL de agua declorinada. Se les suministró alimentación con ratones Balb/C por 3 horas 2 veces en la semana. A los recipientes se le colocó una tira de papel para recoger la ovipuesta. Las tiras de huevos se extrajeron y se ubicaron sobre una superficie húmeda en bandejas durante 24 horas para permitir el correcto

desarrollo de la embriogénesis y luego fueron puestas a secar a 25 °C sobre una bandeja. Posteriormente, se colocaron en agua de clorinada con 0,1 g de harina de pescado para favorecer la eclosión. A las 24 horas, bajo un estereoscopio se registró el total de huevos puestos como fecundidad y la fracción de huevos eclosionados como fertilidad. Se aplicó la prueba "T de Student" para comparar la media de los huevos puestos y eclosionados para cada especie ($p < 0,05$), utilizando Statistica 7.0.

2.6 Determinación de la actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales sobre *Aedes aegypti*

Para el estudio se seleccionaron los aceites esenciales que fueron escogidos en el acápite 2.2, con vistas a evaluar la más completa actividad insecticida y su posible uso en todas las fases del ciclo biológico del mosquito.

El efecto de las formulaciones de aceites esenciales sobre la conducta de *Ae. aegypti* se determinó utilizando la metodología WHO, (2009). Las formulaciones utilizadas para los bioensayos de repelencia se elaboraron en el OIBS y el CENSA. Se prepararon formulaciones al 8, 10, 15, 20% (8A, 10A, 15A, 20A) utilizando aceite mineral como disolvente y en dipropilenglicol al 8, 10, 15, 20% (8D, 10D, 15D, 20D). También se prepararon al 30 % en propilenglicol; 30PI y 30PII. En el formulado 30 PII se añadió vainillina con vista a evaluar su efecto potenciador.

Para los bioensayos, las manos de cada voluntario se cubrieron con guantes de goma. Se trató un antebrazo con 1 mL de formulación y el otro antebrazo con 1mL de la formulación control. Como control positivo (C+) se utilizó Punto Verde repelente con DEET (dietil toluamida) al 20 % y el repelente natural comercial; Bug Shield (3,8 diol paramentano) y como control negativo (C-) los disolventes utilizados en cada formulación. Cada antebrazo fue expuesto 3 minutos cada 30 minutos (WHO, 2009). Las picaduras de cada mano de los voluntarios se

cuantificaron y el porcentaje de protección (PP) se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$PP = \frac{Nc - Nt}{Nc} \times 100$$

Donde:

Nc=número de picaduras en el brazo control en determinado período de tiempo, Nt=número de picaduras en la brazo tratado en el mismo período (Rueda *et al.*, 1998; Frances & Wirtz 2005). Para Nc se tuvo en cuenta el placebo o disolvente

Se tomó en cuenta el criterio de tiempo de protección al primer tiempo después de aplicado el tratamiento, donde se observa una picada seguida de otra confirmatoria en el mismo período o en el período de exposición siguiente.

Para el análisis de la distribución normal de los datos se utilizó Shapiro Wilk. Se utilizó un ANOVA Multifactorial para el análisis del número de picadas por voluntarios y por tratamientos considerando diferencia estadísticamente significativa para una $p < 0,05$

Consideraciones éticas

El documento de tesis estuvo aprobado por el comité de Ética Institucional y el estudio experimental estuvo avalado por un Proyecto Asociado a Programa (Anexo 7). Durante todo el proceso experimental se tuvieron en cuenta las normas éticas y científicas para realizar estudios biomédicos.

La colecta de plantas se realizó por personal con experiencia en la labor y con los cuidados requeridos para no destruir la biomasa vegetal, ni afectar otras especies animal o vegetal del entorno. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante destilación siguiendo las normas ISO 65-71:84 en los laboratorios de las instituciones asociadas en este proyecto donde se estudian sus propiedades medicinales y/o plaguicidas.

Para la alimentación de mosquitos se utilizaron ratones de la línea BalB/C. Los animales se mantuvieron bajo las condiciones sanitarias convencionales en régimen de 12 horas luz-12 oscuridad. Recibieron como alimento dieta comercial pelletizada EMO (Alyco®, CENPALAB) con su correspondiente certificado de calidad. El agua suministrada fue de calidad apta para consumo humano siguiendo las normas éticas para el uso de animales de experimentación.

Los bioensayos para evaluar la actividad insecticida de plantas se realizaron según metodologías de la OMS, en locales designados para estos objetivos, los que se encuentran diseñados para no permitir el escape de vectores. El material biológico sobrante fue eliminado mediante calor (100°C) o por congelación por espacio de 2 horas a -70 °C.

En el caso de los bioensayos para determinar la actividad repelente se utilizaron los aceites esenciales que presentaron estudios previos de toxicidad en humanos. Las evaluaciones se realizaron en condiciones de laboratorio. La participación de los sujetos partió del principio de voluntariedad, con pleno conocimiento de los objetivos y particularidades del estudio además de la firma del consentimiento informado (Anexo 7).

RESULTADOS

Al final del camino, el hombre no será premiado por lo que encuentre, sino por aquello que haya buscado honestamente...

3. RESULTADOS

3. Actividad insecticida de los aceites esenciales sobre *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

3.1 Actividad larvicida de aceites esenciales sobre *Ae.aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de la actividad larvicida de 10 aceites esenciales sobre las especies *Ae.aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*. Las diferentes concentraciones evaluadas provocaron entre un 10 y 100 % de mortalidad, lográndose calcular, las CL₅₀ y CL₉₀, pendientes de la recta de regresión (b) y sus respectivos χ^2 . Todos los aceites evaluados evidenciaron una actividad larvicida significativa, al presentar CL₅₀ inferiores a 100 mg/L sobre las cinco poblaciones de las tres especies de mosquitos estudiadas, a excepción del aceite de *C. aeruginosa* sobre la población Mariano 2013 que sobrepasó este valor ligeramente (126 mg/L).

Sobre *Ae. aegypti*, para la cepa Rockefeller (Tabla 1) todas las CL₅₀ calculadas presentaron valores inferiores a 50 mg/L, excepto para *C. aeruginosa*. En la población SMP2011, con los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, *C. longa* y aceite de Trementina (AT), se obtuvieron valores de CL₅₀ superiores al valor señalado

Tabla 1. Valores de concentraciones letales y otros parámetros calculados posterior a la exposición de los aceites esenciales en estudio sobre la cepa Rockefeller y las poblaciones SMP 2011 y Mariano 2013 (*Aedes aegypti*)

Aceites	Rockefeller				SMP2011				Marianao 2013			
	b ±DE	CL ₅₀ (LC)	CL ₉₀ (LC)	χ ² (p)	b ±DE	CL ₅₀ (LC)	CL ₉₀ (LC)	χ ² (p)	b ±DE	CL ₅₀ (LC)	CL ₉₀ (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	2,9 (1,1)	10,1 (9,2-18,3)	27,4 (9,2-33,7)	2,17 (0,0)	2,5 (0,44)	15,0 (9,8-18,7)	48,7 (41,2-65,3)	0,8 (0,65)	4,3 (0,39)	32,5 (29,6-37,5)	64,3 (60,1-66,3)	5,4 (0,00)
<i>Ocimum basilicum</i>	4,7 (0,35)	46,9 (23,0-71,7)	87,6 (60,7-95,7)	31 (0,000)	3,8 (0,30)	46,9 (17,0-82,3)	101,4 (64,7-230,8)	32,6 (0,00)	4,3 (0,32)	47,5 (22,7-74,6)	93,3 (63,1-70,1)	30,5 (0,000)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	12,8 (1,0)	47,2 (45,0-48,4)	59,2 (56,4-62,8)	1,0 (0,40)	13,9 (2,11)	47,8 (45,6-52,6)	60,8 (58,3-66,5)	7,4 (0,97)	12,6 (0,26)	47,1 (18,7-90,2)	140 (75,5-155,3)	20,4 (0,000)
<i>Eucalyptus globulus</i>	5,5 (0,52)	27,6 (23,6-30,6)	81,8 (86,2-92,2)	10,2 (0,17)	5,1 (0,73)	10,35 (9,7-29,5)	18,4 (16,1-26,4)	0,6 (0,07)	5,2 (0,36)	13,1 (12,1-13,9)	15,5 (14,7-17,2)	18,5 (0,001)
<i>Piper aduncum</i> subsp. <i>ossanum</i>	5,1 (0,67)	35,3 (30,2-39,5)	63,5 (60,4-75,5)	2,8 (0,41)	3,5 (0,45)	60,2 (49,4-76,1)	117,7 (88,7-231,9)	9,4 (0,024)	5,0 (0,60)	36,0 (30,9-40,1)	64,8 (59,8-71,6)	0,8 (0,08)
<i>Citrus aurantium</i>	8,6 (1,0)	13,5 (12,2-14,7)	19,5 (18,5-21,5)	0,5 (0,090)	15,1 (1,1)	14,7 (13,7-15,7)	17,9 (16,7-20,6)	8,9 (0,0)	8,1 (1,0)	15,5 (14,9-16,1)	22,3 (20,4-25,6)	1,3 (0,050)
<i>Curcuma longa</i>	6,6 (0,95)	25,3 (22,3-26,4)	39,6 (36,2-44,2)	3,0 (0,021)	5,9 (0,59)	60,1 (56,3-65,2)	99,4 (93,7-110,2)	3,3 (0,80)	5,5 (0,63)	46,4 (40,2-66,3)	86,4 (81,7-92,9)	5,2 (0,97)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	11,4 (0,81)	53,2 (51,0-54,2)	68,1 (66,5-71,7)	4,9 (0,42)	5,2 (0,09)	41,4 (28,2-49,4)	71,6 (68,4-78,6)	1,2 (0,53)	4,9 (0,65)	126,1 (106,2-220,4)	230,1 (158,9-398,6)	6,1 (0,10)
<i>Aceite de trementina</i>	12,1 (1,00)	21,5 (20,3-22,6)	27,8 (25,4-29,3)	2,8 (0,76)	5,4 (0,79)	70,4 (65,3-75,8)	120,7 (114,8-125,9)	0,5 (0,09)	4,4 (0,48)	58,5 (53,9-63,5)	114,2 (99,3-140,2)	0,5 (0,09)
<i>Aceite de trementina modificado</i>	6,3 (0,62)	23,6 (24,5-28,9)	38,2 (34,1-43,5)	3,1 (0,79)	5,3 (0,87)	57,6 (53,-61,2)	99,7 (93,2-110,5)	9,5 (0,46)	4,7 (0,60)	81,3 (74,7-91,1)	152,0 (126,7-204,2)	2,6 (0,045)
Temefos	2,15 (0,46)	0,00535 (0,00500-0,00550)	0,0162 (0,0158-0,0175)	1,5(0,23)	1,44 (0,17)	0,024 (0,020-0,032)	0,18 (0,17-0,20)	3,91 (0,72)	2,55 (0,1)	0,018 (0,015-0,020)	0,256 (0,23-0,28)	1,8 (0,24)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE(desviación estándar) CL₅₀ y CL₉₀ (concentraciones de la sustancia tóxica que provocan el 50 y el 90 por ciento de mortalidad respectivamente expresada en mg/L) ; LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

Tabla 2. Valores de concentraciones letales y otros parámetros calculados posterior a la exposición de los aceites esenciales en estudio sobre las poblaciones *Ae. albopictus* (Fraga 2012) y *Cx. quinquefasciatus* (Baraca2014).

Aceites	<i>Ae.albopictus</i> (Fraga 2012)				<i>Cx. quinquefasciatus</i> (Baraca 2014)			
	b ±DE	CL ₅₀ (LC)	CL ₉₀ (LC)	χ ² (p)	b ±DE	CL ₅₀ (LC)	CL ₉₀ (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	4,84 (0,54)	31,8 (18,5-38,1)	58,5 (46,5-171,3)	11,4 (0,010)	5,55 (0,43)	31,5 (23,9-38,2)	53,7 (43,2-93,6)	13,54 (0,004)
<i>Ocimum basilicum</i>	2,83 (0,27)	9,5 (4,1-13,9)	27,0 (17,8-30,5)	12,7 (0,005)	6,17 (0,46)	31,4 (25,2-37,1)	50,7 (42,0-76,9)	11,81 (0,008)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	4,92 (0,73)	49,5 (43,7-54,5)	89,4 (84,3-94,2)	4,1 (0,87)	4,39 (0,44)	66,0 (60,3-68,2)	120 (95,2-130,2)	5,20 (0,902)
<i>Eucalyptus globulus</i>	8,57 (0,88)	91,2 (42,6-108,7)	128,7 (108,6-3283)	7,5 (0,023)	4,19 (0,32)	20,9 (14,8-26,6)	42,4 (32,2-76,8)	11,85 (0,008)
<i>Piper aduncum</i> subsp. <i>ossanum</i>	8,22 (0,61)	57,3 (55,2-63,1)	82,3 (76,2-84,3)	2,5 (0,002)	7,99 (0,59)	59,5 (53,1-66,8)	86,0 (74,8-113,9)	8,36 (0,039)
<i>Citrus aurantium</i>	5,42 (0,44)	30,5 (21,9-40,9)	52,5 (39,8-143,1)	18, (0,00)	8,07 (0,83)	14,2 (3,3-17,3)	20,4 (16,9-33,5)	25,01 (0,00)
<i>Curcuma longa</i>	7,63 (0,80)	49,2 (43,2-54,1)	72,2 (69,2-75,2)	2,9 (0,77)	5,48 (0,46)	46,2 (33,6-58,5)	79,0 (61,4-160,3)	16,54 (0,001)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	6,82 (0,08)	40,2 (35,6-44,3)	70,1 (67,3-72,1)	12,4 (0,001)	5,17 (0,42)	43,1 (28,5-56,4)	76,5 (57,8-120,8)	19,63 (0,00)
Aceite de trementina	4,88 (0,65)	49,2 (44,5-53,2)	90,1 (88,2-93,2)	0,3 (0,17)	3,93 (0,34)	46,3 (42,3-49,5)	98,3 (93,2-100,1)	14,3 (0,002)
Aceite de trementina modificado	9,33 (1,9)	44,3 (40,2-52,3)	61,2 (55,2-63,4)	8,5 (0,98)	3,88 (0,39)	43,1 (39,2-45,6)	92,4 (87,7-96,3)	4,24 (0,12)
Temefos	4,92 (0,73)	0,020 (0,016-0,023)	0,042 (0,035-0,050)	5,20 (0,902)	4,39 (0,44)	0,017 (0,014-0,023)	0,035 (0,029-0,041)	4,1 (0,87)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) CL₅₀ y CL₉₀ (concentraciones de la sustancia tóxica que provocan el 50 y el 90 por ciento de mortalidad respectivamente expresada en mg/L); LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

anteriormente, así como, para la población Marianao 2013 con el aceite de *C. aeruginosa* y ambos aceites de trementina.

Citrus aurantium, *E. globulus* y *B. graveolens* resultaron ser las plantas con mayor actividad sobre las larvas de las poblaciones estudiadas de *Ae. aegypti*. El aceite de *C. aurantium* evidenció tener la más alta actividad larvicida con los valores de CL_{50} más bajos y homogéneos para las tres poblaciones de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller (13,5 mg/L), SMP2011 (14,7 mg/L) y Marianao 2013 (15,5 mg/L)). La mayor sensibilidad al aceite de *E. globulus* se evidenció para las poblaciones de SMP2011 (10,3 mg/L) y Marianao 2013 (13,1 mg/L). Por su parte, frente al aceite de *B. graveolens* resultaron ser más sensibles la cepa Rockefeller (10,1 mg/L) y la población Marianao 2013 (15,0 mg/L) que la población SMP2011 (32,5 mg/L). Por su parte *M. quinquenervia*, presentó concentraciones similares (47,2; 47,8; 47,1 mg/L) para Rockefeller, SMP2011, Marianao 2013 respectivamente. De forma general las CL_{50} calculadas en la mayoría de los aceites para las poblaciones Marianao 2013 y SMP 2011 fueron muy similares al compararlos con la cepa Rockefeller. Esto nos permite inferir que la pérdida de susceptibilidad a los insecticidas de estas poblaciones dado por sus FR entre 5 y 10 (Anexo 4) no ejerce una fuerte influencia en la respuesta insecticida de estos aceites.

Aedes albopictus (Tabla 2) mostró alta sensibilidad al aceite de *O. basilicum* (9,5 mg/L), que no se destacó entre los aceites de mayor actividad larvicida sobre *Ae. aegypti*; mientras que, para *Cx. quinquefasciatus* la respuesta a este aceite se triplicó (31,4 mg/L). *Culex quinquefasciatus* presentó la mayor sensibilidad con los aceites de *C. aurantium* y *E. globulus* 14,9 mg/L y 20,9 mg/L respectivamente. El aceite de *C. aurantium* evidenció una actividad larvicida superior sobre *Ae. aegypti* comparado

con *Ae. albopictus*. El valor de la CL₅₀ de la población Fraga 2012 fue el doble que los valores obtenidos para Rockefeller, SMP2011 y Mariana2013.

3.2 Influencia de las CL₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

Melaleuca quinquenervia y *C. aurantium* fueron aceites con CL₅₀ <50 mg/L que mostraron similares niveles de toxicidad entre poblaciones. El ATM, se incluyó por haber sido modificado por la fotosensibilidad de los aceites esenciales. Los tres aceites seleccionados se producen en Cuba, son cultivables o de elevada abundancia y su uso para el desarrollo de nuevos insecticidas podrá ser sostenible en nuestro contexto.

3.2.1 Influencia de las CL₉₀ de ATM en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

En las figuras 1 A, B, C, D se muestran las curvas de supervivencias obtenidas para las cuatro poblaciones de mosquitos en estudio luego de ser expuestas a las CL₉₀ de ATM. En todas las poblaciones, el número de individuos vivos disminuye respecto al valor inicial de sobrevivientes según transcurren los días del experimento. Se observó diferencia significativa, al comparar las mortalidades obtenidas entre el control y los individuos expuestos de las poblaciones Rockefeller (F(9,19)=2792,8); SMP2011 (F(9,19)=3357,5); Fraga 2012 (F(9,19)=5912,5) y Baraca 2014 (F(9,19)=3814,9) p=0,00001.

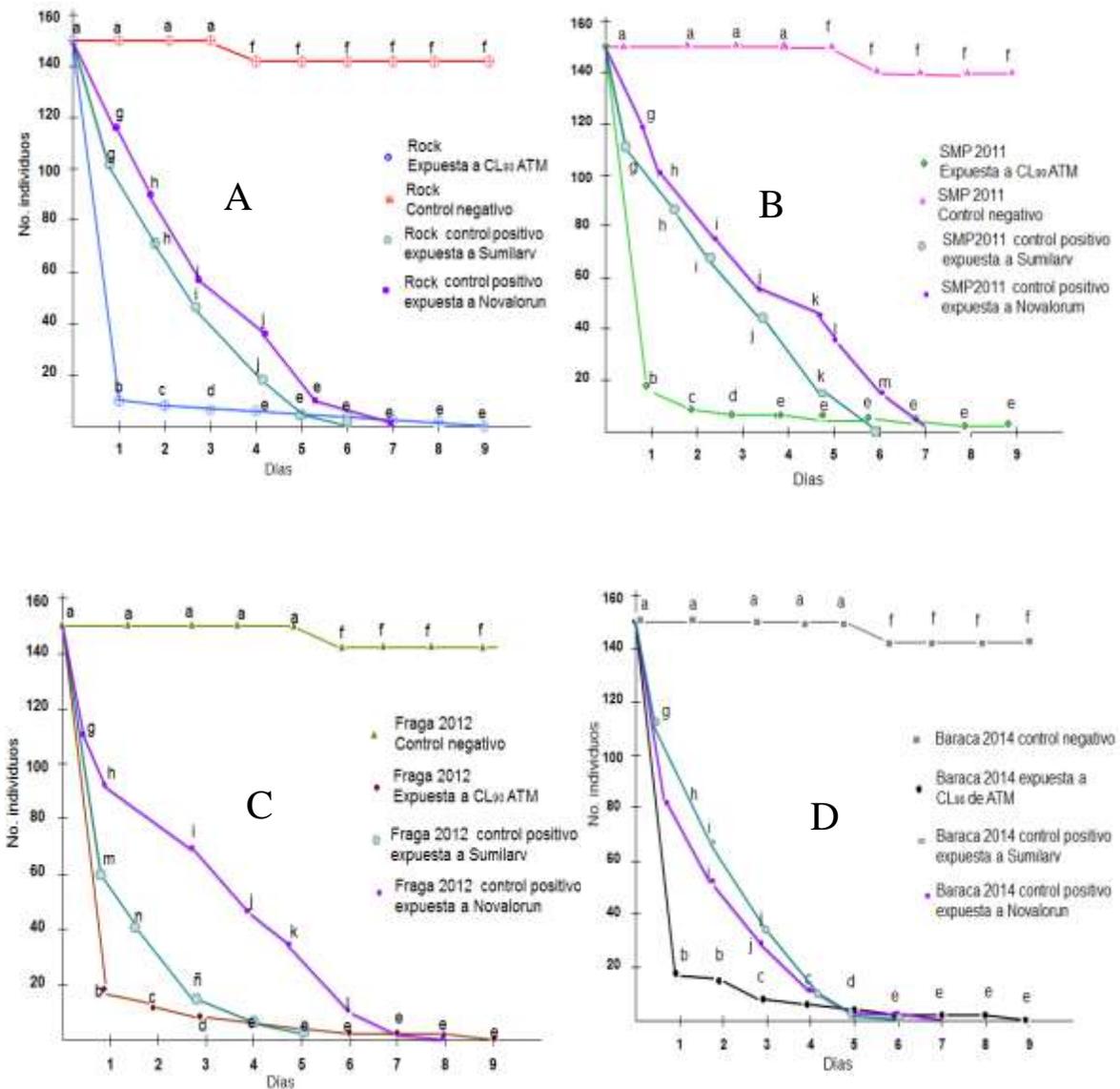


Figura 1. Curvas de sobrevivencia (basada en No. Total de individuos vivos) obtenida luego de exponer a la CL₉₀ de ATM en las poblaciones Rockefeller (A) (F(9,19)=2792,8); SMP 2011 (B) (F(9,19)=3357,5) (*Ae. aegypti*), Fraga 2012 (C) (F(9,19)=5912,5) (*Ae. albopictus*) y Baraca 2014 (D) (*Cx. quinquefasciatus*) (F(9,19)=3814,9) p=0,0000. Gráfico obtenido posterior al análisis estadístico mediante un Anova Multifactorial(p>0,05). Letras iguales no ofrecen diferencias significativas.

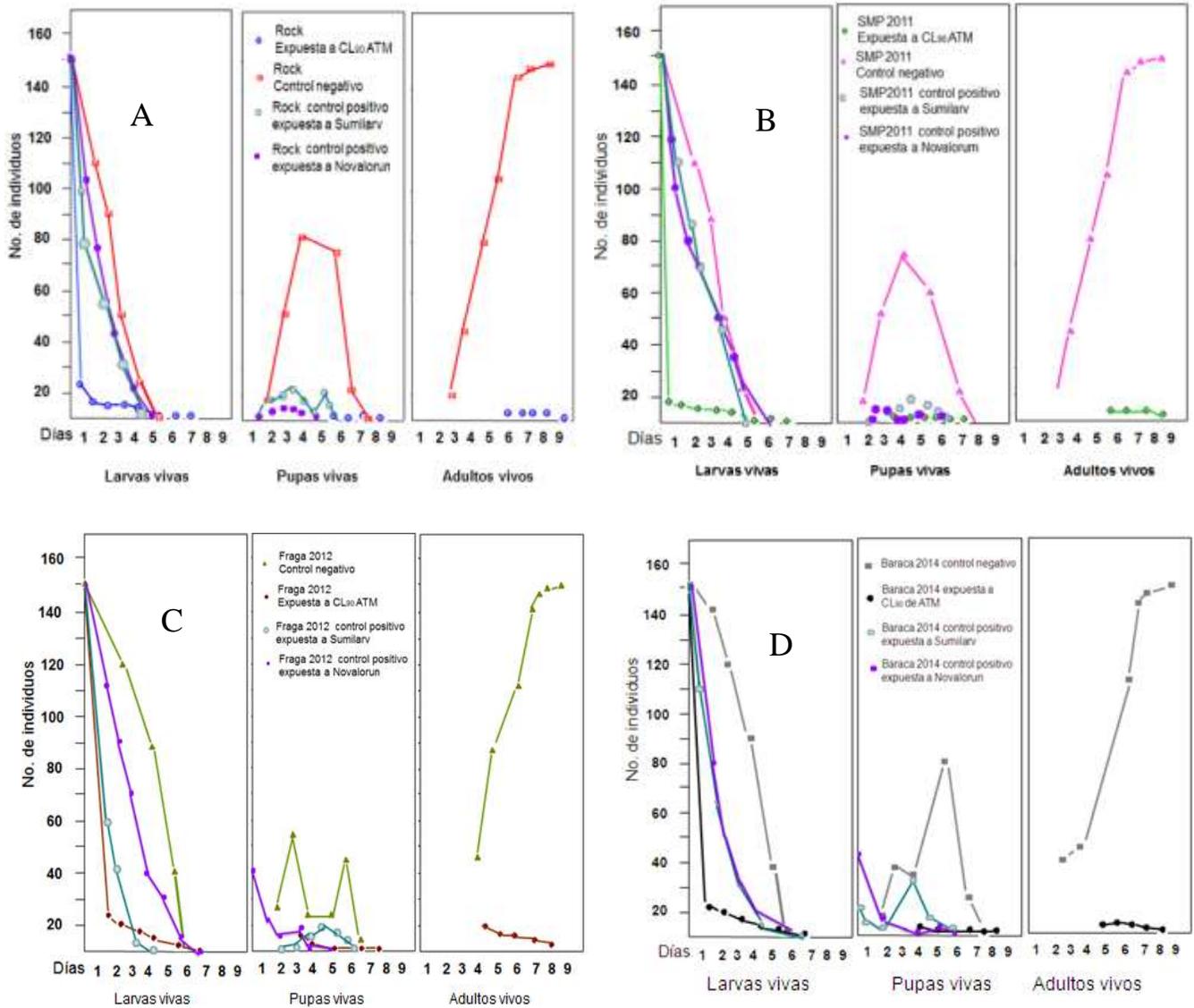


Figura 2. Supervivencia obtenida por estadio luego de exponer a la CL₉₀ de ATM en la cepa Rockefeller y las poblaciones SMP2011 (*Ae. aegypti*), Fraga 2012 (*Ae. albopictus*) y Baraca 2014 (*Cx. quinquefasciatus*) ($F(73,15)=2326,2$ $p=0,0000$). Gráfico obtenido posterior al análisis estadístico mediante Anova Multifactorial ($p>0,05$).

Además de los efectos letales en el estado larval provocados por la exposición de las larvas al ATM, las pupas desarrolladas a partir de las larvas expuestas fueron afectadas y el número de adultos que emergieron fue inferior al del control no tratado. De forma general la mortalidad fue mucho más elevada en la fase larval dada por la escasa sobrevivencia de los individuos en este estado (Fig. 2). En la fase pupal y en la fase adulta de cada población se observó escasa sobrevivencia ($F(73,15)=2326,2$ $p=0,00001$).

No se encontró diferencias en el comportamiento entre los controles negativos de las poblaciones de Rockefeller y SMP2011 (*Ae. aegypti*). Los individuos de estas poblaciones se comportaron muy similar, sobre todo en la formación de pupas y adultos, alcanzando el pico máximo al tercer día, posterior al experimento (Fig. 2 A, B). Sin embargo, en la población Fraga 2012 (*Ae. albopictus*) la formación de pupas en el control fue más baja y paulatina (Fig 2C).

En el caso de *Cx quinquefasciatus* la mortalidad obtenida en la fase de larva fue dos veces mayor con respecto a la fase de pupa al inicio del estudio ($F(42,89)=6,25$; $p=0,00001$). La formación de pupas se desplazó hacia el cuarto y quinto día lo que evidencia que el ciclo biológico de esta especie es más lento (Fig 2D).

De forma general en la Tabla 3 se muestra, que la exposición a la CL₉₀ de ATM en de las poblaciones de mosquitos en estudio, inhibió la emergencia de los adultos, en porcentajes similares a los inhibidores comerciales.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la emergencia de las poblaciones de mosquitos expuestas a la CL₉₀ ATM.

Poblaciones	% IE ATM/ Control negativo	% IE ATM/ Sumilarv	%IE ATM/ Novalorun
Rockefeller	97,98	100	100
SMP 2011	99,0	100	100
Fraga 2012	98,19	100	100
Baraca 2014	97,19	100	100

En los individuos muertos se observaron anomalías morfológicas; las larvas y pupas murieron distendidas y con evidencia de necrosis y los adultos con tarsos adheridos a la exuvia (Fig. 3)

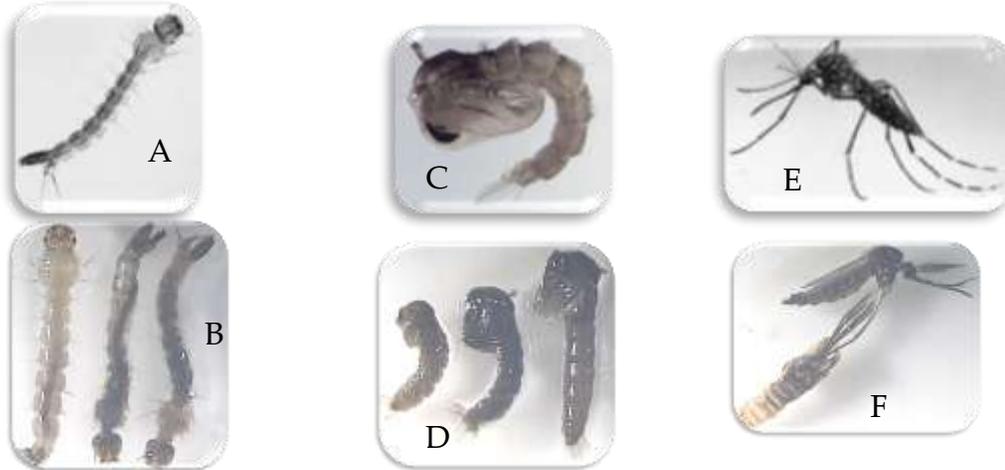


Figura 3. Anomalías morfológicas observadas en los individuos muertos de *Ae. aegypti* al ser expuestos a los aceites de ATM; A, C, E; Larvas, pupas y adulto control; B,D larvas y pupas muertas con necrosis respectivamente, F: adulto muerto con tarsos adheridos a la exuvia.

3.2.2. Influencia de las CL₉₀ de *Melaleuca quinquenervia* en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

En las figuras 4 A, B, C, D se muestran las curvas de supervivencias para las 4 poblaciones de mosquitos en estudio luego de ser expuestas a las CL₉₀ de *M. quinquenervia*. Se observa diferencia significativa, al comparar las mortalidades obtenidas entre el control y los individuos expuestos de las poblaciones Rockefeller (F(7,15)=2759,8); Mariano 2013 (F(7,15)=2915,5); Fraga 2012 (F(7,15)=3932,2) y Baraca 2014 (F(7,15)=2535,5) p=0,00001.

Al analizar la mortalidad en los estadios inmaduros, el porcentaje de sobrevivencia obtenida difieren entre larvas y pupas y entre la fase de pupa y la adulta por especies de mosquitos F (45,11)=1101,5 p=0,00001 (Fig. 4). La mortalidad fue mucho

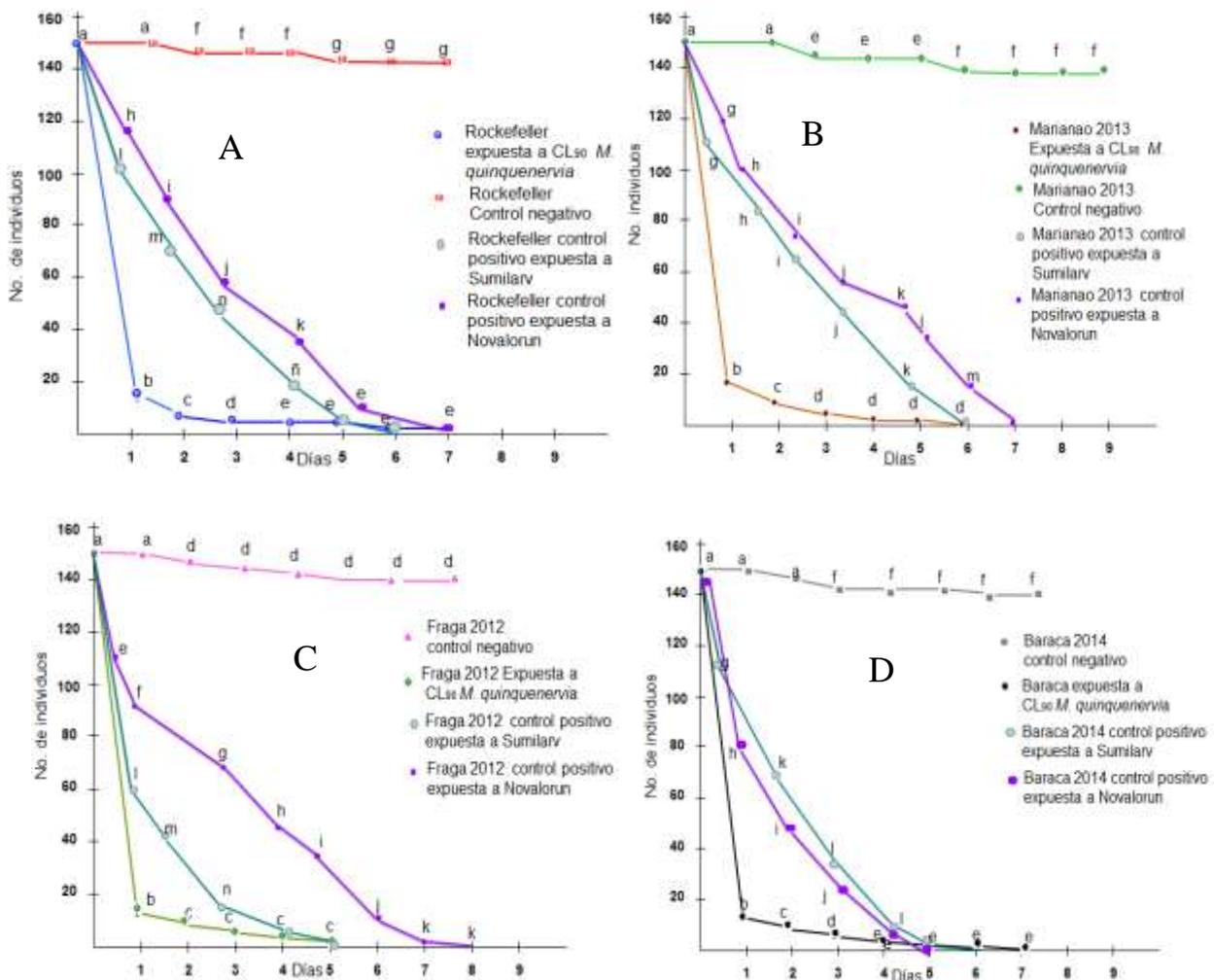


Figura 4. Curvas de sobrevivencia (basada en No. Total de individuos vivos) obtenida luego de exponer a la CL₉₀ de *M. quinquenervia* la cepa Rockefeller(A) (F(7,15)=2759,8) y las poblaciones Mariano 2013(B) (F(7,15)=2915,5); Fraga 2012 (C)(F(7,15)=3932,2) y Baraca 2014(D) (F(7,15)=2535,5) p=0,00001 Gráfico obtenido posterior al análisis estadístico mediante un Anova Multifactorial(p>0,05). Letras iguales no ofrecen diferencias significativas.

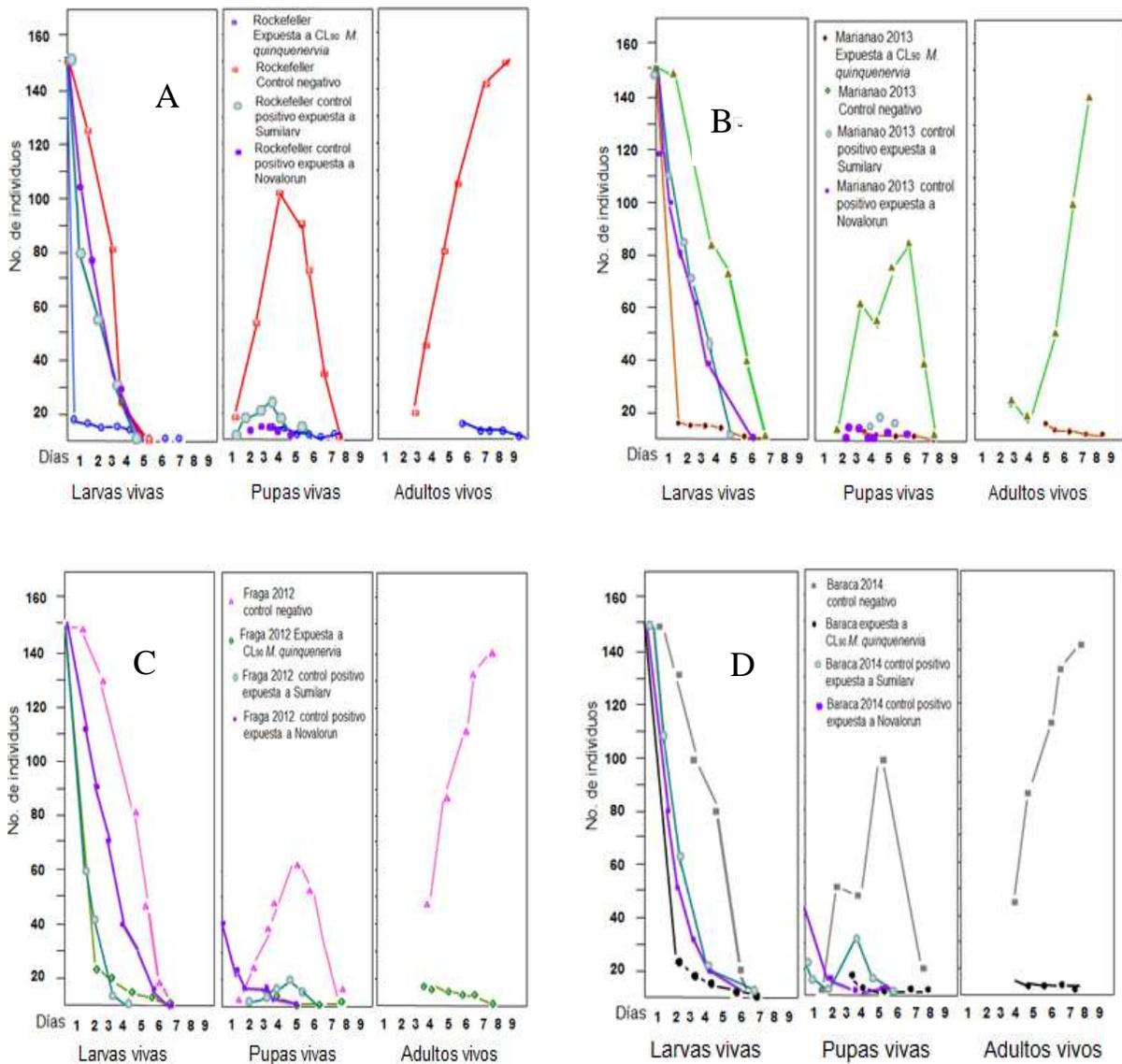


Figura 5. Supervivencia obtenida por estadio luego de exponer a la CL₉₀ de *M. quinquefasciatus* en la cepa Rockefeller y las poblaciones Mariano 2013 (*Ae. aegypti*), Fraga 2012 (*Ae. albopictus*) y Baraca 2014 (*Cx. quinquefasciatus*) $F(45,11)=1101,5$ $p=0,00001$. Gráfico obtenido posterior al análisis estadístico mediante Anova Multifactorial ($p>0,05$).

más elevada en la fase larval con respecto a la fase pupal y a la fase adulta de cada población. El mayor efecto letal se produjo en larvas de *Ae. albopictus* (F(12,13)=11,90 p=0,00001) con la consiguiente baja formación de pupas seguido de *Cx. quinquefasciatus* (F(12,13)=4,29 p=0,000001) y *Ae. aegypti* (F (14,15)=8,19 p=0,00001 (Fig 5 C, D).

En la Tabla 4 se muestra que la exposición a las CL₉₀ de *M. quinquenervia* de las poblaciones de mosquitos en estudio, inhibió la emergencia de los adultos, en porcentajes similares a los inhibidores comerciales. El 4 % de los individuos de *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* que emergieron fueron adultos machos.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la emergencia de las poblaciones de mosquitos expuestas a la CL₉₀ de *Melaleuca quinquenervia*

Poblaciones	% IE <i>M. quinquenervia</i> Control negativo	% IE <i>M. quinquenervia</i> Sumilarv	%IE <i>M. quinquenervia</i> Novalorun
Rockefeller	98,39	100	100
Marianao 2013	98,48	100	100
Fraga 2012	95,48	100	100
Baraca 2014	95,99	100	100

Anomalías morfológicas en los individuos muertos de *Ae. aegypti* se observaron al ser expuestos a los aceites de *M. quinquenervia* principalmente en el proceso de metamorfosis o transición de larva a pupa. En la figura 6C se observan pupa a medio transformar con estructuras respiratorias sin desprenderse cabeza y exuvia de larva de cuarto estadio. En la figura 6 D se observa la muerte de la pupa con estructuras fuera del pupario.

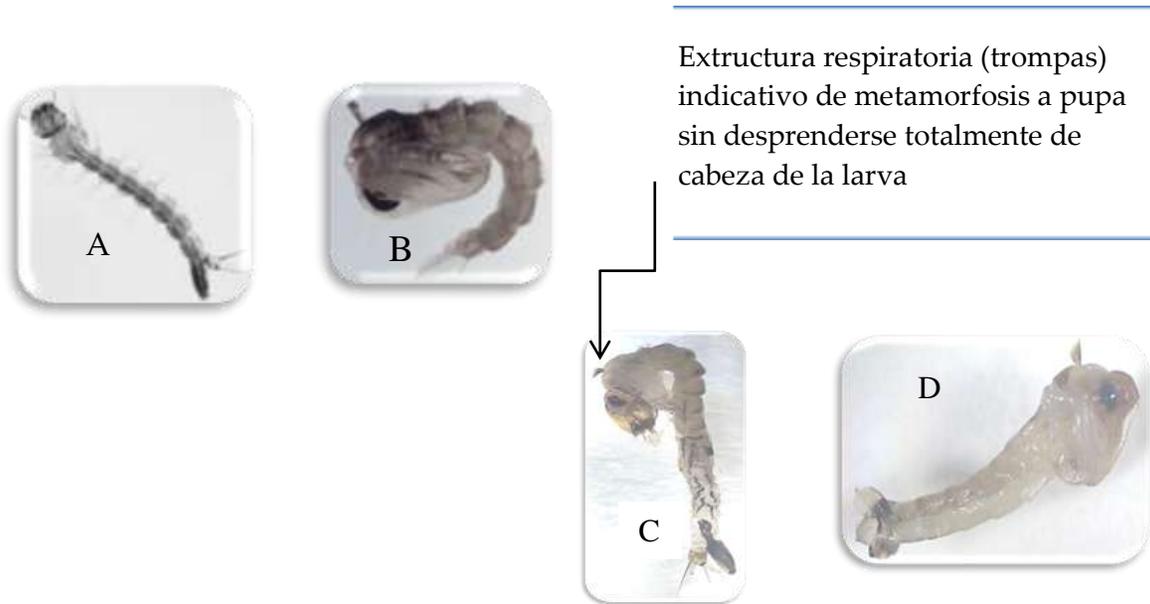


Figura 6. Anomalías morfológicas observadas en pupas de *Aedes aegypti* con aceite de *M. quinquenervia*: A, B ; larva y pupa control respectivamente C: larva muerta en proceso de metamorfosis a pupa, D prepupa

3.2.3 Influencia de la CL₉₀ de *Citrus aurantium* en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*.

Al someter larvas de las poblaciones de Rockefeller y Mariana 2013 (*Ae. aegypti*) a las CL₉₀ calculadas para el aceite de *C. aurantium*, se evidenció que la mortalidad ocurre de forma drástica los primeros días, al igual que con los aceites anteriores para luego estabilizarse en el tiempo (Fig 7 A, B). Con la concentración utilizada, la mortalidad entre poblaciones evaluadas se comportó de forma similar, aunque con diferencias entre el control y los expuestos ($F(33,15)=57,72$ $p=0,00001$). El mayor efecto letal ocurre en la fase de larva, seguido del estado de pupa y adulto. Se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la mortalidad obtenida por estado en cada población (Fig. 7 C, D) (Mariana 2013; $F(2,32)=120,7$ $p=0,0001$); Rockefeller ($F(2,10)=548,10$ $p=0,00001$)).

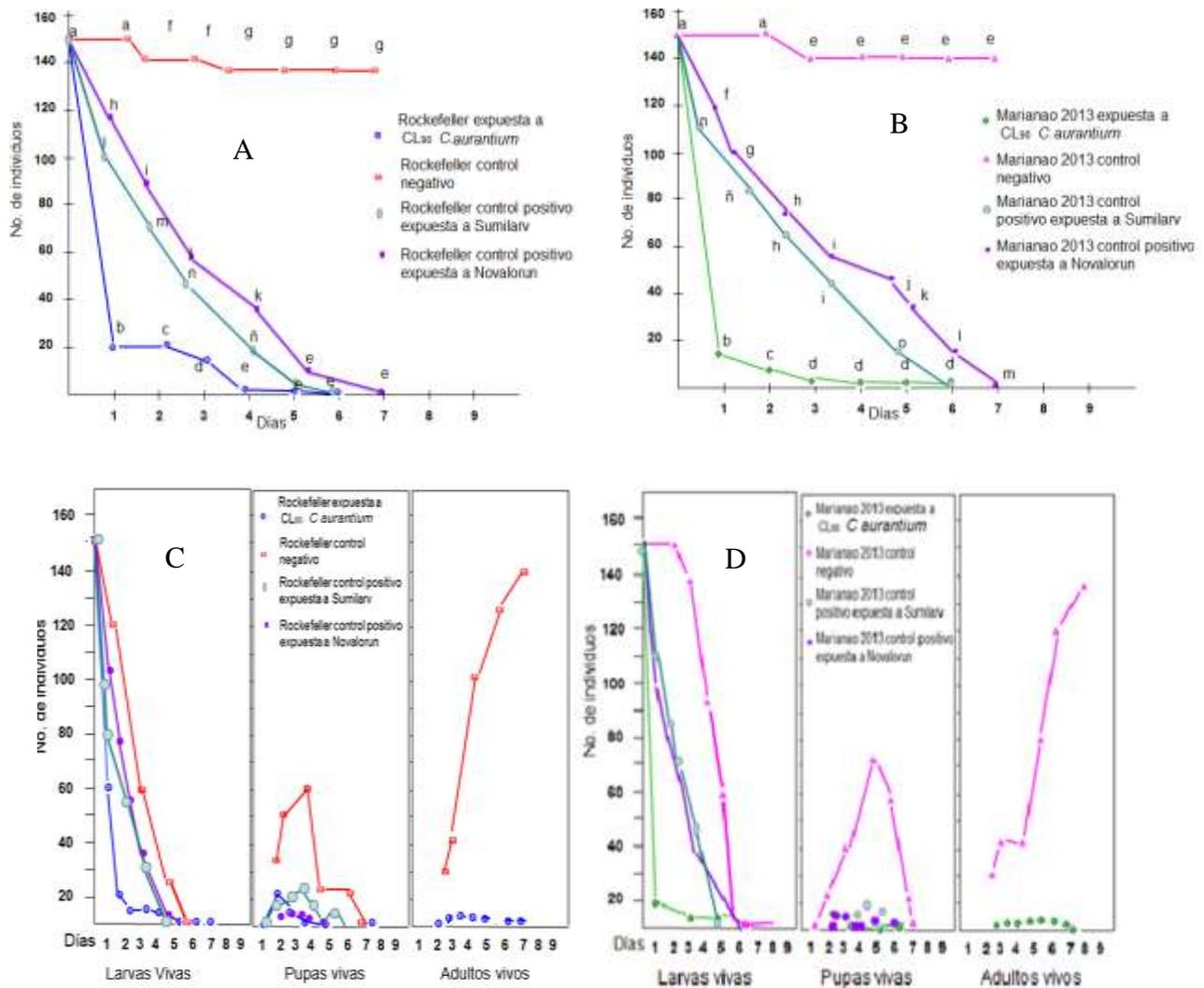


Figura 7. Curvas de sobrevivencia (A y B (basada en No. Total de individuos vivos) ($F(33,15)=57,72$ $p=0,00001$) y sobrevivencia obtenida por estadio (C y D) luego de exponer a la CL₉₀ de *C. aurantium* la cepa Rockefeller ($F(2,10)=548,10$ $p=0,00001$) y la población Mariano 2013; ($F(2,32)=120,7$ (*Ae. aegypti*), $p=0,0001$)). Gráfico obtenido posterior al análisis estadístico mediante Anova Multifactorial ($p>0,05$).

La inhibición de la emergencia se comportó de forma análoga en ambas poblaciones, ya que se inhibió la emergencia de los adultos, en porcentajes similares a los inhibidores comerciales.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la emergencia por población expuesta al aceite de *Citrus aurantium*

Poblaciones	% IE <i>C.aurantium</i> / Control negativo	% IE <i>C. aurantium</i> / Sumilarv	%IE <i>C. aurantium</i> / Novalorun
Rockefeller	99,6	100	100
Marianao 2013	100	100	100

La muerte de las larvas ocurrió durante la transformación de larvas a pupas, en ocasiones resultando un estado de prepupa. La mayor mortalidad en esta fase correspondió a individuos adheridos a sus exuvias o a medio emerger. En la Figura 8, se observan ejemplos de individuos muertos en los tres estados.

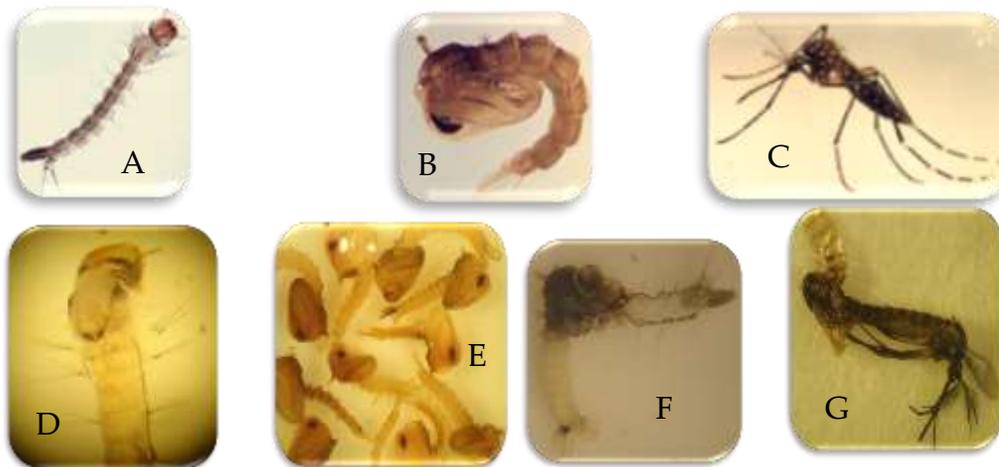


Figura 8. Anomalías morfológicas observadas en los individuos muertos de *Ae. aegypti* al ser expuestos a *C. aurantium*; A, B, C larva, pupa y adulto control, D: larva muerta en proceso de ecdisis a pupa, E :pupas muertas distendidas, F:pupa decolorada con necrosis y con exuvia de larva adherida, G: macho con tarsos adheridos a la exuvia

3.3 Actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de las poblaciones de *Aedes aegypti* SMP 2011 y Rockefeller expuestas a la CL₉₀ de ATM

La actividad de las enzimas evaluadas, fue más elevada en la población SMP2011 que en la cepa Rockefeller, al comparar tanto entre los controles de estas poblaciones como entre los individuos tratados con ATM (Fig. 8 y 9); excepto para P450 monoxigenasas.

En la población SMP2011 la actividad de carboxilesterasas (α y β) disminuyó en los sobrevivientes a la exposición a ATM con respecto al control. En la cepa Rockefeller en los individuos expuestos, disminuyó la actividad de α -carboxilesterasa, mientras que β -carboxilesterasa se incrementó ligera aunque no significativamente en los expuestos con respecto al control (Fig. 9).

Para citocromo P450 monooxigenasas, se encontró en la población SMP2011 una disminución drástica en los individuos sobrevivientes a la exposición al ATM; con valores similares a los observados en la cepa Rockefeller, tanto para los individuos expuestos como no expuestos, los que no muestran una diferencia significativa (Fig. 10). La actividad de GST se incrementó ligera aunque no significativamente ($U=2005$; $p=0,168$) en las larvas expuestas con respecto al control en la población SMP 2011, mientras que ocurrió lo contrario en la cepa Rockefeller. De forma general, en los individuos sobrevivientes a la exposición al ATM se observó una disminución de las enzimas de acción metabólica con excepción de glutathione-S-transferasa (GST) que evidenció un incremento no significativo de su actividad en la población SMP2011.

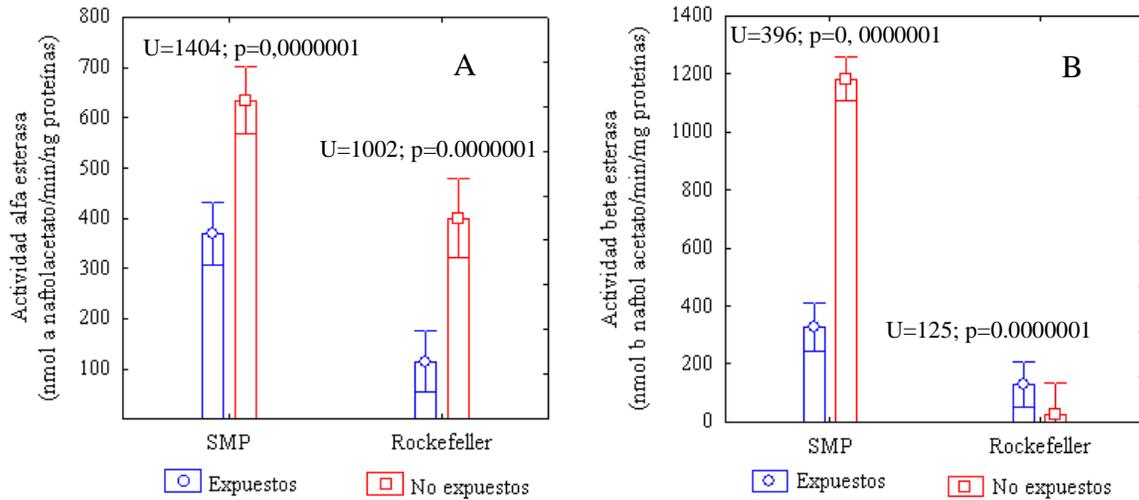


Figura 9. Actividad α esterasa (A) y β esterasa (B) determinada para cada cepa en el estado de larva. A: SMP (U=1404; p=0,0000001); Rockefeller (U=1002; p=0.0000001); B: SMP (U=396; p=0, 0000001); Rockefeller (U=125; p=0.0000001)) utilizando el programa estadístico STATISTICA 7 (p<0,05). Las barras representan los intervalos de confianza.

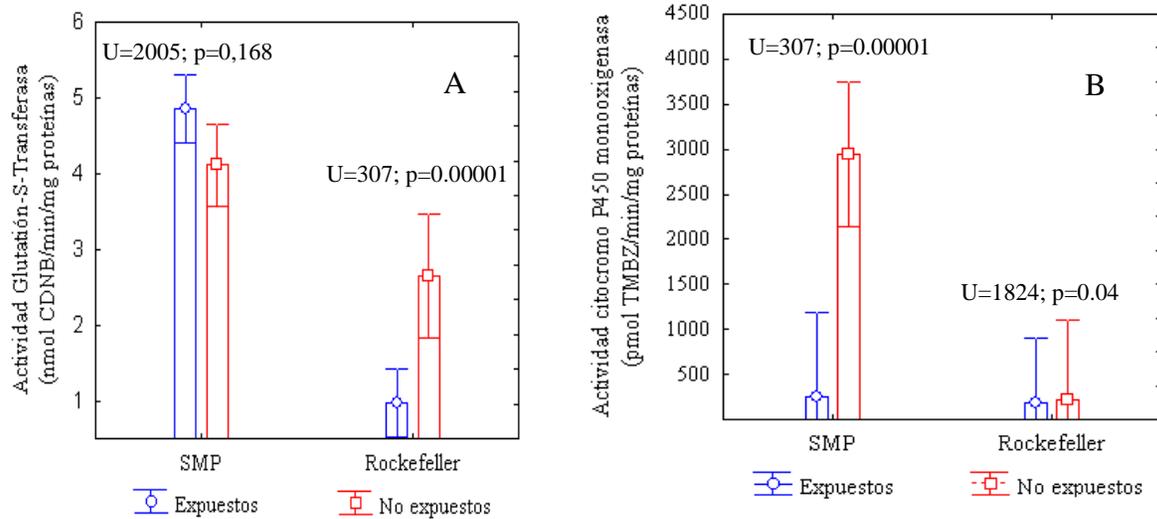


Figura10. Actividad glutation-s-transferasa (A) y actividad citocromo P450 monooxigenasas (B) determinadas para cada cepa en el estado de larva. A: SMP (U=2005; p=0,168); Rockefeller (U=307; p=0.00001); B: SMP (U=279; p=0,0000001); Rockefeller (U=1824; p=0.04)) gráfico obtenido mediante programa estadístico STATISTICA 7 (p<0,05). Las barras representan los intervalos de confianza

3.4. Actividad adulticida de aceites esenciales sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* mediante las metodologías de las botellas y papeles impregnados

En las Tablas 6-10 se muestran los resultados obtenidos para las poblaciones *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*, en botellas y papeles.

Para la cepa Rockefeller, *E. globulus* mostró la mayor actividad adulticida con la dosis de 10 mg/mL seguido de *P. aduncum* subsp. *ossanum* con 30 mg/mL, utilizando botellas impregnadas. *Bursera graveolens*, *O. basilicum*, *M. quinquenervia*, AT y ATM lograron el 100 % de derribo a los 30 minutos con 40 mg/mL y ambas curcumas a 50 mg/mL (Tabla 6). *Citrus aurantium* no provocó derribo ni mortalidad de ninguno de los individuos expuestos durante una hora con ambos métodos utilizados. Los papeles impregnados con AT y ATM mantuvieron actividad adulticida a la misma dosis que con botellas, al igual que ambas curcumas. Sin embargo, para *P. aduncum* subsp. *ossanum*, *E. globulus*, *B. graveolens* y *O. basilicum* se incrementó la dosis a 50 mg/mL y en el caso de *M. quinquenervia* a 60 mg/mL.

La actividad adulticida con la población SMP2011 difiere de los resultados con Rockefeller, para los aceites de *E. globulus*, *O. basilicum*, *M. quinquenervia* se logró con 40 mg/mL, seguido de *C. longa*, *C. aeruginosa*, *B. graveolens* con 50 mg/mL, sin embargo, para *P. aduncum* subsp. *ossanum*, AT y ATM se incrementó a 60 mg/mL (Tabla 7). En el caso de los papeles impregnados se observó un incremento en la dosis (50 mg/mL) para *O. basilicum* y 60 mg/mL para los aceites de *E. globulus* y *M. quinquenervia*. Para el resto de los aceites las dosis se mantienen iguales en ambas metodologías.

Para Mariana 2013 (*Ae. aegypti*) (Tabla 8) *E. globulus* presentó al igual que las anteriores poblaciones, la menor dosis adulticida al utilizar la metodología de las

Tabla 6. Tiempos letales obtenidos y otros parámetros calculados posteriores a la exposición, utilizando botellas y papeles impregnados, con los aceites esenciales en estudio sobre *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller).

Aceites	Rockefeller									
	Botellas impregnadas					Papeles impregnados				
	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (h) (LC)	TD ₉₀ (h) (LC)	χ ² (p)	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (h) (LC)	TD ₉₀ (h) (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	40	4,31 (0,40)	0,21 (0,15-0,27)	0,43 (0,33-0,82)	15,14 (0,004)	50	4,27 (0,30)	0,32 (0,31-0,35)	0,57 (0,48-0,64)	3,90 (0,41)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	5,11 (0,46)	0,20 (0,18-0,21)	0,36 (0,32-0,40)	5,87 (0,21)	50	3,89 (0,21)	0,18 (0,10-0,25)	0,53 (0,36-1,37)	23,59 (0,00)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	40	3,86 (0,35)	0,21 (0,15-0,28)	0,47 (0,34-0,99)	15,66 (0,004)	60	2,86 (0,26)	0,17 (0,12-0,22)	0,50 (0,12-0,22)	11,97 (0,035)
<i>Eucalyptus globulus</i>	10	4,95 (0,45)	0,18 (0,14-0,22)	0,34 (0,28-0,46)	8,79 (0,006)	50	3,27 (0,40)	0,23 (0,12-0,29)	0,56 (0,41-1,52)	12,2 (0,016)
<i>Piper aduncum</i> subsp <i>ossanum</i>	30	4,59 (0,41)	0,15 (0,14-0,17)	0,29 (0,26-0,34)	3,90 (0,41)	50	2,34 (0,25)	0,10 (0,036-0,15)	0,37 (0,25-1,07)	15,0 (0,005)
<i>Curcuma longa</i>	50	4,33 (0,32)	0,35 (0,30-0,39)	0,55 (0,48-0,70)	7,63 (0,010)	50	3,35 (0,23)	0,39 (0,33-0,45)	0,60 (0,51-0,84)	17,07 (0,002)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,21 (0,22)	0,35 (0,26-0,42)	0,53 (0,44-0,91)	21,9 (0,000)	50	4,01 (0,22)	0,34 (0,28-0,38)	0,58 (0,49-0,79)	10,75 (0,002)
Aceite de trementina	40	2,37 (0,28)	0,13 (0,007-0,17)	0,45 (0,32-0,93)	7,34 (0,11)	40	3,87 (0,65)	0,13 (0,08-0,17)	0,41 (0,30-0,70)	12,02 (0,3)
Aceite de trementina modificado	40	2,60 (0,26)	0,13 (0,08-0,17)	0,41 (0,30-0,70)	12,02 (0,3)	40	3,95 (0,45)	0,13 (0,09-0,17)	0,45 (0,32-,93)	7,34 (0,11)
Malation						5%	5,64 (0,70)	0,50 (0,43-0,56)	0,41 (0,38-0,47)	1,76(0,41)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) TD₅₀ y TD₉₀ (Tiempos que provocan el 50 y el 90 por ciento de derribo (h)) respectivamente LC (límite de confiabilidad 95%); χ² chi cuadrado y su probabilidad

Con *Citrus aurantium* no se obtuvo derribo a la concentración máxima permisible de 60 mg/mL

Malation se utilizó como control positivo

Tabla 7. Tiempos letales obtenidos y otros parámetros calculados posteriores a la exposición, utilizando botellas y papeles impregnados, de los aceites esenciales en estudio sobre *Ae.aegypti* (población SMP2011).

Aceites	SMP2011									
	Botellas impregnadas					Papeles impregnados				
	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (h) (LC)	TD ₉₀ (h) (LC)	χ ² (p)	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (h) (LC)	TD ₉₀ (h) (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	50	2,10 (0,28)	0,10 (0,002-0,15)	0,41 (0,26-1,84)	11,9 (0,018)	50	3,44 (0,16)	0,25 (0,17-0,28)	0,56 (0,48-0,60)	11,0 (0,010)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	5,30 (0,53)	0,29 (0,23-0,35)	0,51 (0,40-0,92)	13,43 (0,009)	50	4,5 (0,21)	0,22 (0,15-0,29)	0,61 (0,43-1,08)	18,74 (0,002)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	40	4,36 (0,63)	0,07 (0,02-0,14)	0,36 (0,32-0,43)	3,24 (0,51)	60	2,99 (0,28)	0,22 (0,16-0,28)	0,59 (0,44-1,1)	14,3 (0,014)
<i>Eucalyptus globulus</i>	40	5,15 (0,60)	0,16 (0,13-0,20)	0,41 (0,37-0,47)	6,05 (0,19)	60	5,54 (0,49)	0,28 (0,21-0,35)	0,49 (0,39-0,86)	18,3 (0,001)
<i>Piper aduncum</i> subsp <i>ossanum</i>	60	4,87 (0,59)	0,16 (0,01-0,23)	0,42 (0,33-0,68)	11,18 (0,025)	60	4,23 (0,27)	0,32 (0,26-0,38)	0,49 (0,41-0,76)	8,0 (0,044)
<i>Curcuma longa</i>	50	4,25 (0,32)	0,41 (0,38-0,43)	0,66 (0,59-0,76)	2,64 (0,0045)	50	4,13 (0,15)	0,48 (0,45-0,51)	0,90 (0,79-1,09)	11,48 (0,008)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,15 (0,29)	0,43 (0,41-0,46)	0,75 (0,68-0,88)	2,89 (0,0075)	50	4,60 (0,25)	0,40 (0,38-0,42)	0,66 (0,61-0,74)	3,33 (0,005)
Aceite de trementina	60	2,22 (0,35)	0,05 (0,031-0,007)	0,21 (0,17-0,26)	4,8 (0,30)	60	3,34 (0,17)	0,13 (0,08-0,17)	0,41 (0,30-0,70)	12,02 (0,03)
Aceite de trementina modificado	60	4,32 (0,33)	0,13 (0,08-0,17)	0,41 (0,30-0,70)	12,02 (0,03)	60	4,12 (0,19)	0,09 (0,10-0,15)	0,21 (0,17-0,26)	4,8 (0,30)
Malation						5%	4,75 (0,39)	1,50 (1,40-1,59)	2,80 (2,76-2,86)	0,027 (0,98)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) TD₅₀ y TD₉₀ (Tiempos que provocan el 50 y el 90 por ciento de derribo (h)) respectivamente LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

Con *Citrus aurantium* no se obtuvo derribo a la concentración máxima permisible de 60 mg/mL

Malation se utilizó como control positivo

Tabla 8. Tiempos letales obtenidos y otros parámetros calculados posteriores a la exposición, utilizando botellas y papeles impregnados, de los aceites esenciales en estudio sobre *Ae. aegypti* (población Marianaño 2013)

Aceites	Marianaño 2013									
	Botellas impregnadas					Papeles impregnados				
	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	40	4,96 (0,45)	0,20 (0,18-0,22)	0,36 (0,33-0,41)	6,41 (0,16)	50	4,21 (0,25)	0,28 (0,25-0,32)	0,47 (0,40-0,53)	9,87 (0,15)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	4,80 (0,45)	0,24 (0,19-0,28)	0,44 (0,36-0,68)	10,32 (0,040)	50	3,01 (0,31)	0,24 (0,18-0,29)	0,59 (0,40-1,85)	13,95 (0,016)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	50	4,00 (0,36)	0,22 (0,17-0,27)	0,46 (0,36-0,74)	9,9 (0,041)	60	2,85 (0,27)	0,21 (0,16-0,28)	0,60 (0,45-1,03)	10,90 (0,053)
<i>Eucalyptus globulus</i>	20	4,78 (0,44)	0,20 (0,15-0,25)	0,38 (0,31-0,59)	11,54 (0,21)	60	7,04 (0,57)	0,27 (0,21-0,33)	0,41 (0,34-0,68)	13,6 (0,003)
<i>Piper aduncum</i> subsp <i>ossanum</i>	60	3,65 (0,34)	0,19 (0,15-0,23)	0,43 (0,34-0,65)	7,67 (0,10)	60	1,48 (0,38)	0,026 (0,003-0,53)	0,19 (0,13-0,30)	0,13 (0,93)
<i>Curcuma longa</i>	50	4,35 (0,28)	0,39 (0,31-0,47)	0,68 (0,55-1,22)	13,99 (0,007)	50	2,89 (0,30)	0,43 (0,35-0,52)	0,70 (0,57-1,29)	21,29 (0,000)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,48 (0,21)	0,45 (0,43-0,48)	0,76 (0,69-0,88)	2,80 (0,0059)	50	4,04 (0,36)	0,37 (0,32-0,42)	0,57 (0,49-0,76)	13,94 (0,007)
Aceite de trementina	60	3,89 (0,18)	0,08 (0,03-0,13)	0,35 (0,25-0,79)	7,28 (0,12)	60	4,10 (0,27)	0,10 (0,05-0,16)	0,43 (0,25-1,42)	9,89 (0,042)
Aceite de trementina modificado	60	2,12 (0,28)	0,10 (0,03-0,15)	0,43 (0,28-1,40)	9,89 (0,042)	60	2,87 (0,15)	0,08 (0,05-0,17)	0,35 (0,22-0,80)	6,28 (0,16)
Malation						5%	5,94 (0,47)	1,60 (1,50-1,68)	2,63 (2,58-2,7)	1,21 (0,54)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) TD₅₀ y TD₉₀ (Tiempos que provocan el 50 y el 90 por ciento de derribo (h) respectivamente) LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

Con *Citrus aurantium* no se obtuvo derribo a la concentración máxima permisible de 60 mg/mL

Malation se utilizó como control positivo

botellas (20 mg/mL). En orden decreciente de susceptibilidad, los aceites más efectivos fueron *O. basilicum* y *B. graveolens* con 40 mg/mL, *M. quinquenervia*, *C. longa* y *C. aeruginosa* con 50 mg/mL y *P. aduncum* subsp. *ossanum*, AT, ATM con 60 mg/mL. Utilizando los papeles impregnados, para los aceites de *E. globulus*, *M. quinquenervia*, *O. basilicum* y *B. graveolens* se evidenció un aumento de la dosis de aceite para derribar el 100 % de los adultos de esta población.

En cuanto a la actividad adulticida sobre las poblaciones de *Ae. aegypti* utilizando ambos métodos, se observó un incremento de las dosis de *E. globulus*, *P. aduncum* subsp. *ossanum*, AT y ATM en SMP 2011 y Marianao 2013 con respecto a Rockefeller. Con las botellas impregnadas, los aceites de *O. basilicum*, *C. longa* y *C. aeruginosa* mantuvieron una respuesta homogénea en las tres poblaciones de *Ae. aegypti*. Con los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, AT y ATM se observa una respuesta similar en SMP2011 y Marianao 2013. *Melaleuca quinquenervia* y *E. globulus* son los aceites que presentan mayor variabilidad en su respuesta adulticida en estas poblaciones.

Para *Ae. albopictus* (Tabla 9) los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, *E. globulus*, *O. basilicum*, *B. graveolens* mostraron actividad adulticida a la dosis de 40 mg/mL con botellas impregnadas, seguidos de *C. longa*, *C. aeruginosa*, *M. quinquenervia* con 50 mg/mL y ambos aceites de trementina con 60 mg/mL. En el caso de los papeles impregnados, *O. basilicum*, *B. graveolens*, *C. longa*, *C. aeruginosa* manifestaron actividad adulticida a 50 mg/mL y el resto de los aceites a 60 mg/mL.

De forma general, se observó un incremento de la dosis en papeles impregnados con respecto a las botellas para lograr el 100% de derribo de los individuos expuestos, excepto en *C. longa*, *C. aeruginosa*, AT y ATM, los que lograron la misma actividad con igual dosis.

Tabla 9. Tiempos letales obtenidos y otros parámetros calculados posteriores a la exposición, utilizando botellas y papeles impregnados, de los aceites esenciales en estudio sobre *Ae. albopictus* (población Fraga 2012)

Aceites	Fraga 2012									
	Botellas impregnadas					Papeles impregnados				
	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	40	4,28 (0,39)	0,19 (0,13-0,25)	0,39 (0,30-0,70)	14,99 (0,000)	50	4,46 (0,26)	0,21 (0,18-0,30)	0,42 (0,38-0,49)	6,34 (0,01)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	4,57 (0,31)	0,29 (0,18-0,31)	0,41 (0,36-0,49)	7,80 (0,21)	50	4,12 (0,13)	0,23 (0,20-0,38)	0,56 (0,50-0,64)	8,34 (0,005)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	50	2,13 (0,28)	0,11 (0,008-0,18)	0,44 (0,26-0,68)	18,4 (0,001)	60	4,21 (0,18)	0,28 (0,21-0,35)	0,49 (0,38-0,72)	14,3 (0,001)
<i>Eucalyptus globulus</i>	40	4,79 (0,44)	0,20 (0,15-0,24)	0,37 (0,30-0,55)	10,8 (0,029)	60	4,43 (0,18)	0,21 (0,16-0,30)	0,60 (0,45-0,80)	14,3 (0,003)
<i>Piper aduncum</i> subsp <i>ossanum</i>	40	3,81 (0,35)	0,19 (0,17-0,21)	0,41 (0,36-0,49)	5,80 (0,21)	60	4,67 (0,12)	0,24 (0,21-0,30)	0,39 (0,34-0,60)	10,6 (0,00)
<i>Curcuma longa</i>	50	5,11 (0,31)	0,34 (0,32-0,37)	0,67 (0,59-0,79)	6,89 (0,022)	50	4,56 (0,23)	0,28 (0,20-0,39)	0,49 (0,39-0,86)	18,3 (0,001)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,87 (0,20)	0,33 (0,20-0,36)	0,55 (0,68-0,88)	7,89 (0,005)	50	4,12 (0,32)	0,30 (0,036-0,15)	0,37 (0,25-1,07)	15,0 (0,005)
Aceite de trementina	60	2,14 (0,34)	0,13 (0,08-0,17)	0,42 (0,32-0,68)	9,06 (0,10)	60	3,3 (0,37)	0,10 (0,08-0,12)	0,21 (0,17-0,27)	4,31 (0,36)
Aceite de trementina modificado	60	3,97 (0,11)	0,054 (0,030-0,070)	0,21 (0,17-0,27)	4,31 (0,36)	60	2,50 (0,26)	0,13 (0,08-0,17)	0,42 (0,32-0,68)	9,06 (0,10)
Malation						5%	3,0 (0,31)	1,52 (1,48-1,58)	4,05 (4,0-4,1)	0,12 (0,9)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) TD₅₀ y TD₉₀ (Tiempos que provocan el 50 y el 90 por ciento de derribo (h) respectivamente) LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

Con *Citrus aurantium* no se obtuvo derribo a la concentración máxima permisible de 60 mg/mL

Malation se utilizó como control positivo

Tabla 10. Tiempos letales obtenidos y otros parámetros calculados posteriores a la exposición, utilizando botellas y papeles impregnados, de los aceites esenciales en estudio sobre *Cx. quinquefasciatus* (población Baraca 2014).

Aceites	Baraca 2014									
	Botellas impregnadas					Papeles impregnados				
	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)	Dosis (mg/mL)	b ±DE	TD ₅₀ (LC)	TD ₉₀ (LC)	χ ² (p)
<i>Bursera graveolens</i>	50	4,32 (0,24)	0,23 (0,16-0,28)	0,46 (0,36-0,75)	8,8 (0,001)	60	4,19 (0,13)	0,17 (0,15-0,25)	0,48 (0,39-0,55)	8,90 (0,034)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	3,2 (0,12)	0,23 (0,20-0,36)	0,55 (0,68-0,88)	6,89 (0,005)	50	4,05 (0,32)	0,22 (0,17-0,28)	0,54 (0,42-0,86)	12,36 (0,003)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	30	3,12 (0,31)	0,16 (0,11-0,21)	0,43 (0,32-0,76)	8,8 (0,64)	60	4,87 (0,40)	0,30 (0,27-0,33)	0,66 (0,58-0,79)	7,66 (0,017)
<i>Eucalyptus globulus</i>	40	4,1 (0,17)	0,21 (0,18-0,26)	0,40 (0,36-0,48)	10,02 (0,000)	60	4,65 (0,34)	0,28 (0,26-0,30)	0,52 (0,47-0,59)	10,0 (0,098)
<i>Piper aduncum</i> subsp <i>ossanum</i>	60	4,35 (0,18)	0,17 (0,12-0,19)	0,40 (0,32-0,68)	8,06 (0,10)	60	4,25 (0,25)	0,34 (0,32-0,37)	0,67 (0,59-0,79)	6,89 (0,022)
<i>Curcuma longa</i>	50	4,56 (0,25)	0,26 (0,3-0,43)	0,49 (0,39-0,50)	6,13 (0,093)	50	4,32 (0,26)	0,27 (0,24-0,30)	0,70 (0,59-0,87)	4,04 (0,05)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,23 (0,18)	0,34 (0,29-0,38)	0,64 (0,36-0,68)	10,32 (0,040)	50	4,89 (0,18)	0,25 (0,20-0,31)	0,55 (0,43-0,87)	14,47 (0,013)
Aceite de trementina	60	2,36 (0,29)	0,11 (0,09-0,14)	0,40 (0,33-0,53)	3,88 (0,42)	60	3,12 (0,28)	0,11 (0,09-0,13)	0,36 (0,31-0,46)	6,55 (0,16)
Aceite de trementina modificado	60	2,59 (0,30)	0,11 (0,09-0,13)	0,36 (0,31-0,46)	6,55 (0,16)	60	3,81 (0,21)	0,11 (0,09-0,14)	0,40 (0,33-0,53)	3,88 (0,42)
Malation						5%	4,03 (0,35)	1,96 (1,89-2,03)	4,09 (4,0-4,11)	0,12 (0,9)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b (pendiente); DE (desviación estándar) TD₅₀ y TD₉₀ (Tiempos que provocan el 50 y el 90 por ciento de derribo (h) respectivamente) LC (límite de confiabilidad 95%); χ² (chi cuadrado y su probabilidad)

Con *Citrus aurantium* no se obtuvo derribo a la concentración máxima permisible de 60 mg/mL

Malation se utilizó como control positivo

Los estudios con *Cx. quinquefasciatus* (Tabla 10), mostraron que el aceite de *M. quinquenervia* es el de mayor actividad pues solo requirió el uso de 30 mg/mL para lograr el 100 % de derribo a los 30 minutos con el método de las botellas impregnadas. Los aceites de *E. globulus* y *O. basilicum* requirieron 40 mg/mL, *B. graveolens*, *C. longa*, *C. aeruginosa* 50 mg/mL, *P. aduncu* subsp *ossanum*, AT y ATM con 60 mg/mL. Con papeles impregnados los aceites de *O. basilicum*, *C. longa*, *C. aeruginosa* evidenciaron actividad adulticida a 50 mg/mL y el resto de los aceites a 60 mg/mL. Para *M. quinquenervia* se observó un incremento del doble de la concentración (60 mg/mL) en papeles para lograr el mismo efecto que con botellas y para los aceites *B. graveolens*, *O. basilicum* y *E. globulus* se evidenció un incremento de 10 mg en las dosis con respecto a las botellas.

En todas las poblaciones estudiadas los aceites de *C. longa*, *C. aeruginosa*, AT y ATM, presentaron actividad adulticida a las mismas dosis tanto en botellas como en papeles, por lo que se evidenció un comportamiento bastante homogéneo de las tres especies de mosquito ante estos aceites, excepto la cepa Rockefeller con los dos últimos aceites los cuales fueron tóxicos a menor dosis.

3.5. Actividad ovicida y repelente a la oviposición de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites esenciales

3.5.1 Actividad ovicida de aceites esenciales sobre huevos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Al someter huevos de las tres poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* a las CL₉₀ obtenida en el acápite 2.1 de seis aceites esenciales, se encontró diferencia significativa en cuanto al porcentaje de eclosión de los controles con respecto a los expuestos, excepto en la población SMP2011 con *E. globulus* (Fig. 11). Aunque la

eclosión fue superior al 50 %, ninguna larva sobrevivió a las concentraciones expuestas.

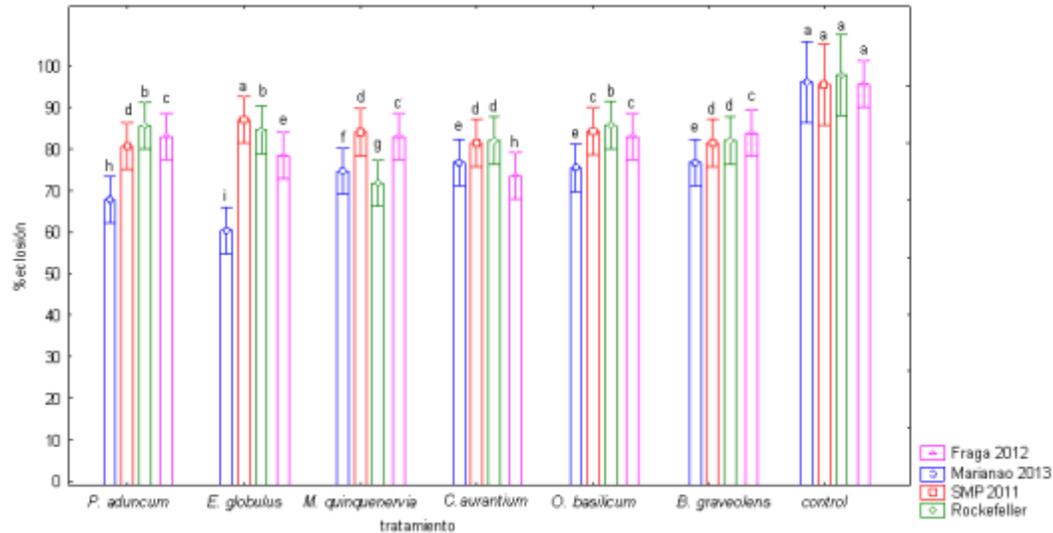


Figura 11. Actividad ovicida de aceites esenciales sobre huevos de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller, poblaciones SMP2011 , Marianao 2013) y *Ae. albopictus* (Fraga 2012) $F(10,30)=4,27$ $p=0,00094$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.5.2 Repelencia a la oviposición de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites esenciales.

En el estudio realizado se encontró diferencia significativa en cuanto a la oviposición en las soluciones de los diferentes aceites esenciales ($F=,06625$, $p=1,0000$). Las poblaciones utilizadas prefirieron la puesta de huevos en agua declorinada y en agua declorinada que contenía larvas, antes que colocar la ovipuesta en soluciones de los aceites esenciales (Fig. 12). *Citrus aurantium* y *P. aduncum* subsp. *ossanum* provocaron total repelencia a la ovipuesta por parte de las hembras de ambas especies de *Aedes*. La oviposición en los tratamientos con el resto de los aceites ocurrió con una tendencia creciente con los aceites de *B. graveolens*, *O. basilicum*, *E. globulus* y *M. quinquenervia* pero a porcentajes muy bajos

en su mayoría menores del 8 %. La eclosión de los huevos fue alta y en correspondencia con la ovipuesta en todos los casos.

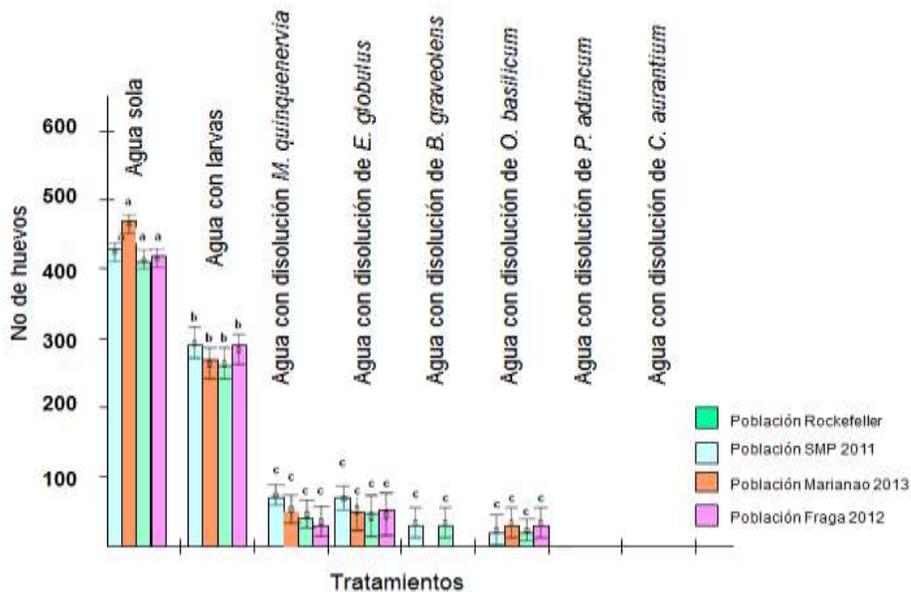


Figura 12 Repelencia a la oviposición ante diferentes soluciones de aceites sobre huevos de *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller, poblaciones SMP 2011, Mariano 2013) y *Ae. albopictus* (Fraga 2012) utilizadas en estudio. $F(21,184)=0,66$ $p=1,0000$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

3.6 Actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales contra *Aedes aegypti* utilizando voluntarios humanos

Al evaluar la actividad repelente de los formulados del aceite esencial de *M. quinquenervia*, el mayor porcentaje de protección se logró con el aceite al 20 % en dipropilenglicol en ambas poblaciones (Fig 13 A y B).

El efecto combinado de concentración del ingrediente activo y solvente, en los tiempos de protección medios con los formulados de *M. quinquenervia* observados mostraron diferencias ligeramente significativas $p=0.049^*$ con la población Rockefeller. Existió diferencia entre los solventes, independientemente de la concentración, el solvente dipropilenglicol mostró mejores resultados que el aceite

mineral y una tendencia positiva con respecto al tiempo de protección y el aumento de la concentración.

Al comparar las dos soluciones que contenían aceite de *C. aurantium* (30PI; 30PII) y los repelentes comerciales; Bug Shield y Punto Verde estos proporcionaron mayor protección, alcanzando valores de 7,5 horas. Las soluciones conteniendo *C. aurantium* solo protegieron por espacio de 0,5 y 1,5 horas respectivamente en ambas poblaciones (Fig.13 A y B). En la medida que transcurrió el tiempo las soluciones del aceite de *C. aurantium* perdieron efectividad rápidamente con respecto a los formulados comerciales utilizados como control, sin mostrar diferencias en el comportamiento por población estudiada.

Los tiempos de protección de las formulaciones a base de aceite mineral y dipropilenglicol de *M. quinquenervia* resultaron bajos si se comparan con Punto Verde y Bug Shield (Fig 13 A y B). La formulación de M10A se comportó de forma similar que la solución 30PI y la solución M8D con similares tiempos de protección en la población Rockefeller. Mientras en la solución 30PI tuvo resultados similares con M15A en la población Mariano 2013.

Cuando se compararon las formulaciones evaluadas utilizando el número de picadas contra el tiempo de protección, se produjo una relación inversamente proporcional entre estos dos parámetros (Fig. 14). En el caso de los formulados a base de *C. aurantium* 30PI no proporcionó protección, ni disuadió la picada, mientras que 30PII durante el tiempo utilizado protegió y produjo un efecto disociador de las picadas, por lo que se puede plantear que la vainillina potenció, aunque no lo suficiente al aceite de *C. aurantium* en su efecto repelente. De los candidatos evaluados, solo M20D, evidenció propiedades repelentes mientras que ambas soluciones de *C. aurantium*, M15A y M20A no presentaron esta propiedad.

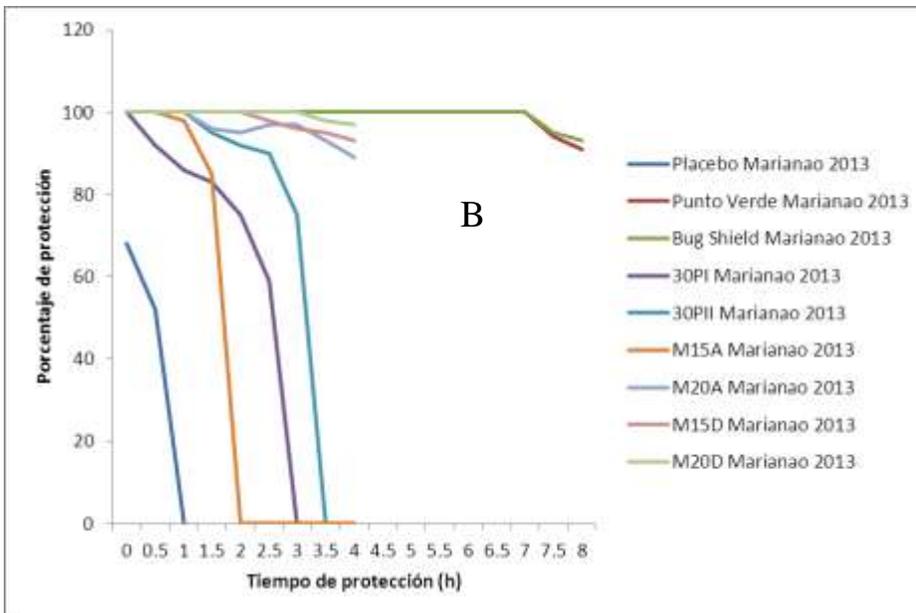
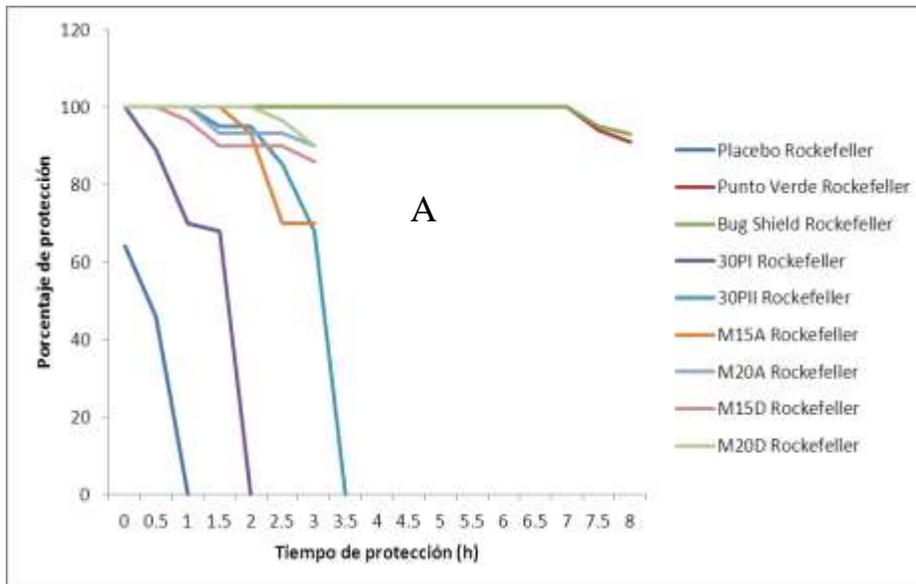


Figura 13. Porcentaje de protección en función del tiempo de protección (h) de formulados de *C. aurantium* (30PI, 30PII) y *M. quinquenervia* (M15A, M20A, M15D, M20D) en voluntarios humanos utilizando la cepa Rockefeller (A) y la población Mariano 2013 (B).

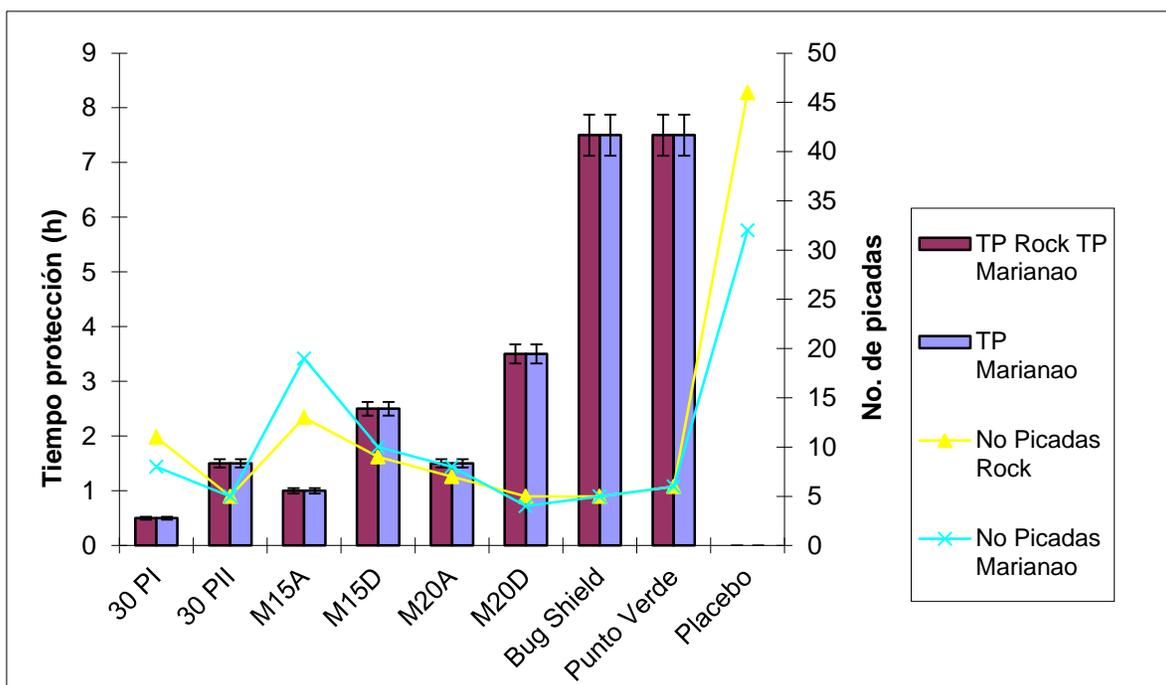


Figura 14. Tiempo de protección (TP) de las formulaciones 30PI, 30PII, M15A, M15D, M20A, M20D, Bug Shield, Punto verde y Placebo) en función del número de picadas en voluntarios humanos utilizando la cepa Rockefeller y la población Mariano 2013 (*Ae. aegypti*)

DISCUSIÓN

Nuestro desafío consiste, en convertir nuestros sueños en los baluartes que defenderemos para manejar las opiniones ajenas desfavorables...

4. DISCUSIÓN

4.1. Actividad larvicida de aceites esenciales sobre *Ae.aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*

Los países de la región de las Américas son afectados anualmente por arbovirosis y parasitosis donde los insectos juegan un papel importante en la transmisión (OPS, 2016). El estudio e introducción de nuevas, y no tan nuevas alternativas de control vectorial, representan una necesidad para disminuir la incidencia de estas enfermedades.

Las plantas ancestralmente se utilizaron por el hombre para el combate de plagas. Determinados aceites esenciales exhiben, una variada actividad insecticida, en las que se incluye: actividad larvicida, inhibidora del crecimiento, de la alimentación y repelentes sobre insectos adultos (Lambrano *et al.*, 2015). Esta capacidad, unido a que algunos presentan baja toxicidad en mamíferos (Herrera *et al.*, 2015) los hace excelentes candidatos como insecticidas ecológicamente promisorios y ecosostenibles.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no tiene establecido un criterio estándar para la determinación y clasificación de la actividad larvicida de productos naturales, debido a la variabilidad de quimiotipos y de compuestos dentro de una misma especie vegetal. Diversos autores enmarcan la

bioactividad teniendo en cuenta los valores de concentraciones letales medias. Komalamisra *et al.*, (2005) planteó que los productos con $CL_{50} < 50$ mg/L son activos, si la CL_{50} se encuentra entre 50 mg/L $< CL_{50} < 100$ mg/L son moderadamente activos, 100 mg/L $< CL_{50} < 750$ mg/L son efectivos, y $CL_{50} > 750$ mg/L son inactivos; mientras que, Kiran *et al.* (2006) consideró que compuestos con $LC_{50} < 100$ mg/L exhiben un significativo efecto larvicida. Teniendo en cuenta este último criterio de clasificación y los resultados obtenidos, todos los aceites esenciales de plantas medicinales cubanas evaluados en este estudio evidenciaron un efecto larvicida significativo, excepto *C. aeruginosa* para la población Marianao 2013 (*Ae. aegypti*). Estos niveles de actividad indican un punto de partida para profundizar en su estudio.

Citrus aurantium presentó los valores más bajos y homogéneos de CL_{50} en todas las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas (13,5 mg/L Rockefeller; 14,7 mg/L SMP2011; 15,5 mg/L Marianao 2013). Esta especie al igual que *Citrus limon* (L.) Osbeck, *Citrus paradise*, Macfad ha sido investigada por su actividad insecticida (Melliou *et al.*, 2009; Michaelakis *et al.*, 2009). En Colombia, Smith *et al.*, (2014) evaluaron el aceite de *C. aurantium* en larvas de la población Rockefeller calculando una $CL_{50} = 20,61$ mg/L (16,5-23,8 mg/L). En Brasil, Araujo *et al.*, (2016) obtuvieron valores de $CL_{50} = 11,9$ mg/L (11,7- 12,2mg/L) con esta misma cepa y con tres poblaciones de campo CL_{50} que oscilaron entre 15,0 (14,7-15,5mg/L); 13,7 mg/L (13,4-14,0 mg/L) y 16,3 mg/L (15,5–17,1 mg/L), por lo que estos resultados para *Ae aegypti* son similares a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, extractos etanólicos de *C. sinensis* evaluados por Murugan *et al.*, (2012) mostraron valores de CL_{50} (342,45 mg/L (307,4–382,6 mg/L) para *Ae. aegypti*; lo que indica que este aceite esencial es el producto natural con mayor potencialidad como larvicida para el control de esta especie de mosquito. La composición del aceite cubano utilizado en este estudio responde a una

abundancia relativa del 97,5 % para limoneno (Anexo 6), resultado similar a los obtenidos en otros análisis de la esencia de *C.aurantium*. Entre ellos, los realizados por Högnadóttir & Rouseff (2003), que informaron limoneno en un 94,5% en el aceite de *C.aurantium* de Estados Unidos. Lin *et al.*, (2010) y Giatropoulos *et al.*, (2012), destacaron también este monoterpeno como el metabolito con mayor presencia en los aceites de Taiwan y Grecia respectivamente. Smith *et al.*, (2014) en su estudio, identificaron a este compuesto en un 71,3% para el aceite colombiano. Mientras que Traboulsi *et al.*, (2005) demostraron la presencia de limoneno en un 40% y el linalol en un 16% en un aceite libanés. La actividad larvicida sobre *Ae. aegypti* del limoneno, se informó anteriormente (Park *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014). La variabilidad en las concentraciones letales calculadas en otros estudios podría atribuirse a las diferencias en la abundancia de este compuesto dentro del aceite (Smith *et al.*, 2014), aunque la contribución de otros constituyentes también pueden incidir en la acción larvicida.

La concentración letal de *C.aurantium* para la población de *Ae. albopictus* Fraga 2012 fue similar (30,5 mg/L) a la evidenciada en los estudios de Giatropoulos *et al.*, (2012) los que evaluaron los aceites de *C.aurantium*, *C. limon* y *C. paradisi* sobre esta especie y encontraron alta actividad larvicida con valores de CL₅₀ de 28,7; 25,0 y 37,0 mg/L, respectivamente. Estudios realizados por Morales-Saldaña *et al.*, (2007) con *C. paradisi* demuestran una diferencia en la respuesta tóxica de este aceite entre las larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*; ambas especies se mostraron susceptibles al aceite esencial de toronja pero fue más tóxico a *Ae. aegypti* (47,3 mg/L) que a *Ae. albopictus* (98,9 mg/L). En nuestro estudio ocurrió de forma similar donde la concentración de aceite requerida para provocar el 50 % de mortalidad fue dos veces mayor en *Ae. albopictus* (Fraga 2012) que en la cepa Rockfeller y las poblaciones de *Ae. aegypti* SMP

2011 y Mariano 2013. Los resultados del presente trabajo para *C. aurantium* confirman la menor susceptibilidad de *Ae. albopictus* para este aceite en comparación con *Ae. aegypti*.

En la literatura consultada no existen antecedentes sobre la acción larvicida del aceite esencial *C. aurantium* sobre *Cx. quinquefasciatus*. En este estudio, la CL₅₀ calculada resulta inferior (14,2 mg/L) a los trabajos encontrados evaluando *Culex sp.* Traboulsi *et al.*, (2005) observaron la acción tóxica del aceite de *C. aurantium* sobre *Culex pipiens molestus* (CL₅₀=60 mg/L (49,9–72,1mg/L)) y similares resultados obtuvieron Michaelakis *et al.*,(2009) sobre *Cx. pipiens* (CL₅₀=51,5 mg/L (48,9–54,4mg/L)). Murugan *et al.*, (2012) evaluaron extractos etanólicos de *C. aurantium* sobre *Cx. quinquefasciatus* e informaron CL₅₀ muy superiores a nuestros resultados (385,3 mg/L (346,3–436,4 mg/L)). Por lo que se reafirma que la respuesta tóxica puede variar por compuestos dentro del aceite y por especie de mosquito evaluada.

Otra de las especies con alta actividad demostrada en este estudio fue *B. graveolens* la que se destacó en el estudio por las bajos valores de CL₅₀ sobre la cepa Rockefeller (10,1 mg/L) y la población SMP2011 (15,0 mg/L) de *Ae. aegypti*. Actualmente, *Bursera* es un género con alrededor de 120 especies distribuidas desde el sur de Estados Unidos al norte de Sudamérica (Martínez-Habibe *et al.*, 2013). En el siglo pasado, este género fue señalado en la literatura por poseer propiedades insecticidas (Becerra & Venable, 1990; Becerra, 1994).

Por primera vez es informada la actividad larvicida del aceite de *B. graveolens* sobre mosquitos, en la región de las Américas según la literatura examinada. El aceite esencial de *B. graveolens*, a partir de la misma fuente utilizada en la presente investigación, se caracterizó por la presencia de limoneno (26,5 %), β -elemeno (14,1 %), (E)- β ocimeno (13,0 %) y mentofurano (5,1 %) (Monzote *et al.*, 2012). La composición química de la muestra evaluada en los ensayos de

actividad larvicida fue compleja y también se identificaron como los compuestos de mayor abundancia relativa el limoneno (21,8 %) y el β -elemeno (12,5 %) (Anexo 6).

La actividad insecticida detectada en este estudio puede asociarse a la presencia de compuestos con acción insecticida informada anteriormente sobre mosquitos como el limoneno (Park *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014), y de otros componentes como el β -elemeno, presente en aceites con un efecto tóxico sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *Anopheles subpictus* (Govindarajan *et al.*, 2016) y/o a la acción aditiva o sinérgica de varios constituyentes de este aceite, como la pulegona y el 1,8-cineol (Tak y Isman, 2017).

El género *Eucalyptus* ubicado dentro de la familia de las Myrtaceae ha demostrado su actividad insecticida no solo sobre *Lutzomyia longipalpis*, *M. domestica*, *P. humanus capitis*, *Sitophilus zeamais*, *Tribolium confusum* (Karemu *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2015; Yones *et al.*, 2016); sino también sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Culex pipiens pallens* (Zhu *et al.*, 2006; Lucia *et al.*, 2012). La actividad larvicida de 15 especies de *Eucalyptus* fue evaluada utilizando como concentración final 40 mg/L sobre larvas de *Ae. aegypti* evidenciándose 100 % de mortalidad a las 24 horas para algunas especies de *Eucalyptus* (Lucia *et al.*, 2012)

La CL₅₀ calculada para *E. globulus* con la cepa Rockefeller (CL₅₀=27,6 mg/L) resultó inferior a la obtenida por Smith *et al.*, (2014) al evaluar la actividad larvicida de *Eucalyptus citriodora* con la misma cepa, donde obtuvo una CL₅₀=71,2 mg/L (63,9–81,6 mg/L). Yáñez *et al.*, (2010) evaluaron *E. globulus* sobre *Ae. aegypti* observando 100 % de mortalidad a 100 mg/L.

En los aceites del género *Eucalyptus*, dependiendo de las especies, el componente principal en el aceite puede ser 1,8 cineol, también conocido como eucaliptol (Preedy *et al.*, 2016). En este estudio (Anexo 6) el eucaliptol y el p-

cimeno representaron el 63,1 % del aceite, seguido por γ terpineno (16,7 %), 4-terpineol (6,6 %) y timol (1,4 %). El p-cimeno estuvo presente en un 7,7% (Ebani *et al.*, 2018) y un 5,1 % (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011) en aceites de *E. globulus* investigados en Italia y Marruecos, respectivamente. Yones *et al.*, (2016) identificaron 1,8 cineol (21,4 %), O-cymene (21,4 %) y 4-terpineol (3,9 %).

El 1,8-cineol ha evidenciado actividad biológica sobre varias especies de insectos. Este compuesto provocó inhibición de la acetilcolinesterasa en adultos de *Sitophilus oryzae* (Lee *et al.*, 2001; Abd El Galeil *et al.*, 2009) , causó toxicidad por contacto y mostró actividad antialimentaria sobre esta especie (Tripathy *et al.*, 2001). También presentó afectación de las funciones reproductivas sobre la fase adulta de plagas agrícolas (Lee *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2006; Koul *et al.*, 2007) y otras especies de importancia médica como *M. domestica* y *B. germanica* (Lee *et al.*, 2003) y *Pediculus humanus capitis* (Tolozza *et al.*, 2006).

Kim *et al.*, (2008) encontraron una significativa actividad larvicida y adulticida del 1,8 cineol, frente a *Cx. pipiens*. Autores como Waliwitiya *et al.*, (2009), Zahran y Abd El Galeil *et al.*, (2011) encontraron actividad larvicida sobre *Ae. aegypti* a dosis superiores de 500 mg/L. Silva *et al.*, (2008) calcularon una CL_{50} = 1381 mg/L para larvas de tercer instar de *Ae. aegypti*. Esto indica que de ser atribuible la actividad del aceite de eucalipto a este compuesto puede estar asociada a la existencia de un efecto sinérgico con otros componentes del aceite. Por otro lado Tak & Isman (2017) plantearon que el 1,8 cineol puede contribuir a la actividad de otros constituyentes de aceites esenciales propiciando su penetración al sitio de acción.

Estudios realizados por Giatropoulos *et al.*, (2018) con p-cimeno sobre *Ae. albopictus* calcularon una CL_{50} =19,4 mg/L (18,2-20,8 mg/L)). Este mismo compuesto y γ - terpineno a una concentración de 0.05 mg/L provocaron 100 % de mortalidad sobre *Ae. aegypti* (Park *et al.*, 2011). El timol se encuentra solo en

un 1,4 % en el aceite de eucalipto estudiado, pero su presencia pudiera contribuir a la actividad pues demostró toxicidad sobre larvas de tercero (27,3 mg/L (22 -34 mg/L)) y cuarto estadio (52,5 mg/L (32-90 mg/L)) de *Ae. aegypti* (Waliwitiya *et al.*, 2009) y sobre *Ae. albopictus* (12,9 mg/L (11,6-14,2 mg/L))(Giatropoulos *et al.*, 2018). Tomando en cuenta estos antecedentes, la acción tóxica del aceite de eucalipto evaluado pudiera ser el resultado del efecto de varios de los componentes presentes en el aceite.

Ocimum basilicum (albahaca) es una hierba aromática y el aceite esencial puede usarse fresco o seco como aditivo para el aroma en la comida, cosméticos, o farmacéuticos (Javanmardi *et al.*, 2002). Esta planta ha demostrado sus propiedades insecticida sobre *Callosobruchus maculatus* (Kéïta *et al.*, 2000), *Spodoptera littoralis* (Pavela, 2005), *Tetranychus urticae* y *Bemisia tabaci* (Aslan *et al.*, 2004). La actividad insecticida sobre *Cx. quinquefasciatus* fue probada por Pavela (2008^a) y sobre *Culex tritaeniorhynchus*, *Ae. albopictus* y *An. subpictus* por Govindarajan *et al.*, (2013). En este estudio se obtuvieron valores de CL₅₀ =9,8 mg/L para *An. subpictus*, seguido de *Ae. albopictus* (CL₅₀=12 mg/L (9,8–14,1 mg/L)) y *Cx. tritaeniorhynchus* (CL₅₀=14 mg/L). Los resultados obtenidos para la población Fraga 2012 (CL₅₀= 9,5 mg/L) confirman la actividad larvicida del aceite de *O. basilicum* sobre *Ae. albopictus*. Sin embargo, los estudios realizados por Giatropoulos *et al.*,(2018), muestran CL₅₀ muy superiores a las calculadas para esta especie de mosquito (107,7 mg/L (98,7-116,2 mg/L) en nuestro estudio.

Los aceites de *O. basilicum* se caracterizan por el predominio general de monoterpenos oxigenados y derivados fenilpropanoides, entre los componentes mayoritarios más comunes se encuentran el linalol, estragol (metilchavicol), anetol, eugenol y metil eugenol, variando por quimiotipo, condiciones edafoclimáticas, de cultivo extracción, entre otros factores (Preedy

et al., 2016). Los estudios realizados a *O. basilicum* en Nepal destacan el linalol (47,2 %), el estragol (31,7 %) y la pulegona (4,8 %); en Yemen, el aceite de esta planta presenta linalol (74,5 %), 1,8-cineol (7,4 %) y estragol (7,2 %) (Sharopov *et al.*, 2016). Giatropoulos *et al.*, (2018) informan como compuestos mayoritarios 1,8-cineol (7,2%), linalol (35,2, %), metilchavicol (16,3%), β -elemeno (3,5%), eugenol (2,5%) entre otros.

En la esencia de albahaca, evaluada en el presente trabajo (Anexo 6), se identificaron como componentes mayoritarios el estragol (50,8 %), linalol (30,3 %) y el 1,8-cineol (6,2 %). El aceite cubano tiene similitudes con los procedentes de Yemen y Nepal (Sharopov *et al.*, 2016) dadas por la presencia común de estos compuestos.

El estragol y el linalol poseen antecedentes de acción insecticida sobre larvas del mosquito *Cx. quinquefasciatus* (CL_{50} =14,0 mg/L, (11,7-16,4 mg/L) y CL_{50} =42,3 mg/L (35,6-49,2 mg/L) respectivamente) y *Ae. aegypti* (CL_{50} =12,7 mg/L, (10,1-15,3 mg/L) y CL_{50} = 38,6 mg/L, (30,4-47,0 mg/L) respectivamente) (Govindarajan, 2010). Sin embargo, en los estudios realizados por Giatropoulos *et al.*, (2018) la CL_{50} calculada para linalol sobre *Ae. albopictus* fue muy superior a los estudios precedentes (169,6 mg/L (157,7- 184,2 mg/L)). De igual forma, Sousa *et al.*, (2014) demostró que el estragol también es tóxico a *Anopheles atroparvus* (CL_{50} =56,1 mg/L (52,2–60,0 mg/mL)). La presencia de estos compuestos en el aceite estudiado pudiera asociarse a la actividad larvicida encontrada.

Melaleuca quinquenervia constituye una especie perteneciente a las Myrtaceae. En cuanto a la actividad insecticida contra mosquitos Amer *et al.*, (2006) obtuvo actividad larvicida sobre *Ae. aegypti*, *An. stephensi* y *Cx. quinquefasciatus* con *M. leucadendron* y *M. quinquenervia*. Resultados similares se obtuvieron en los trabajos de Park *et al.*, (2011) con *Ae. aegypti* al utilizar *M. quinquenervia*. No se

encontraron antecedentes de la acción de este aceite sobre las larvas de *Ae. albopictus*.

Trilles *et al.*, (2006); Silva *et al.*, (2007); Wheeler *et al.*, (2007) demostraron la presencia de los monoterpenos y sesquiterpenos como el 1,8 cineol y viridiflorol en el aceite de *M. quinquenervia*. Morales-Rico *et al.*, (2014), describieron estos metabolitos, junto al α -pineno, α -terpineol y limoneno. Diversos autores encontraron en *M. quinquenervia* otros metabolitos como E-nerolidol y linalol a los que también pudiera atribuirse la actividad insecticida (Lee *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2013; Tipping *et al.*, 2016).

Especies del género *Piper*, las más representativas de las Piperaceae, se utilizaron durante siglos en la medicina popular tradicional (Parmar *et al.*, 1997, Oliveira *et al.*, 2013, Picard *et al.*, 2014). La piperina fue la primera amida aislada de *P. nigrum* (pimienta negra) (Ahmad *et al.*, 2012, Qiu *et al.*, 2014) y algunas otras amidas bioactivas fueron estudiadas química y farmacológicamente (Parmar *et al.*, 1998, Ahmad *et al.*, 2012, Bezerra *et al.*, 2013).

Este género se ha estudiado ampliamente en cuanto a su actividad insecticida sobre mosquitos (Kumar *et al.*, 2010; Madhu *et al.*, 2011). *Piper nigrum*, *P. hispidum*, *P. reticulatum*, *P. tuberculatum*, *P. guineense*, *P. aduncum* y *Ottonia anisum* presentan una actividad insecticida significativa contra mosquitos y otros insectos (Scott *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2017).

Según Turchen *et al.*, (2016), *P. aduncum* presentó actividad ovicida, pupicida y adulticida sobre *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). Los valores de CL₅₀ obtenidos en el presente estudio (35,3; 60,2; 36,0 mg/L para el aceite *P. aduncum* subsp. *ossanum* sobre las poblaciones de *Ae. aegypti*, Rockefeller, SMP 2011 y Marianao 2013 respectivamente, son mucho menores que los obtenidos por Oliveira *et al.*, (2013) para el aceite esencial de esta especie en similares

condiciones e igual método ($CL_{50}=289,9$ mg/L). Sin embargo, Almeida *et al.*, (2009) obtuvieron una $CL_{50}=54,5$ mg/L (51,1-57,8 mg/L) para larvas de *Ae. aegypti* a las 24 horas de expuestas, que no difiere de los valores obtenidos para la población SMP2011 y fue superior a los de la cepa Rockefeller y la población Mariano 2013. En la mayoría de los trabajos sobre la especie, se le nombra sin especificar si se trata de una subespecie o variedad, el aceite estudiado es obtenido a partir de *P. aduncum* subsp. *ossanum*, una subespecie endémica en Cuba occidental (Saralegui, 2004).

La variación en los resultados puede estar relacionada por factores entre los que se incluyen la composición química de los aceites. Aunque la mayoría de las investigaciones relacionadas con la composición química del aceite esencial de *P. aduncum* coinciden con la presencia mayoritaria de dilapiol, este fenilpropanoide no se identificó, entre los componentes con mayor abundancia relativa en el aceite evaluado. En Colombia, *P. aduncum* revela 25,8% de dilapiol, además de 1,8-cineol (20%) y α -pineno (Bottia *et al.*, 2007) y en Ecuador además de α y β pineno, 1,8 cineol, 4- terpineol, el 10,3 % corresponde a E-ocimeno y el 42,9% de dilapiol (Guerrini *et al.*, 2009). Almeida *et al.*, (2009) plantea como componente mayoritario el dilapiol (86,9 %). El análisis realizado por Oliveira *et al.*, (2013) arrojó 1,8-cineol, (53,9 %), además, de α -pineno (12,7%), β -pineno (8,5%) y trans-ocimeno (5,7%). En Cuba, *P. aduncum* subsp *ossanum* muestra en su composición canfeno, alcanfor, piperitona y el viridiflorol (Pino *et al.*, 2011). En estudios posteriores realizados por Gutiérrez *et al.*, (2016) confirma la presencia de canfeno (5,4-7,4%), alcanfor (9,4-13,9%), piperitona (19,0-20,0%) y viridiflorol (13-18,8%). En nuestro estudio, los valores son similares a los obtenidos por investigadores cubanos (Anexo 6). Es probable que las causas de las diferencias en su composición química estén asociadas a factores genéticos y ambientales que conlleven a variaciones en la

biosíntesis de metabolitos secundarios en esta subespecie y consecuentemente incidan en la actividad larvicida.

El género *Curcuma* contiene más de 70 especies pertenecientes a la familia Zingiberaceae. De *C. aeruginosa* se ha descrito la actividad antiparasítica contra *Plasmodium falciparum* (Mohd Abd Razak *et al.*, 2014), antiinflamatoria (Hossain *et al.*, 2015) y antibacteriana de *C. longa* contra *Staphylococcus aureus* (Torres *et al.*, 2014).

El potencial bioactivo de los aceites de cúrcuma y los extractos crudos de estas plantas contra los mosquitos y sus larvas también ha sido previamente informado (Tawatsin *et al.*, 2001; Pitasawat *et al.*, 2003). Champakaew *et al.*, (2007) evaluaron el aceite de *C. zedoaria* en larvas de *Ae. aegypti* obteniendo una $CL_{50}=33,4$ mg/L. Zhu *et al.*, (2008) comprobaron la actividad insecticida de extractos etanólicos y el aceite esencial de *C. longa* sobre *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens*. Singha & Chandra, (2011) mostraron que extractos de esta planta fueron efectivos a bajas concentraciones sobre larvas de *Anopheles stephensi* y *Cx. quinquefasciatus*. Por su parte Ali *et al.*, (2015) informaron para *Ae. aegypti* una CL_{50} para el aceite esencial del rizoma igual a 12,7 mg/L (10,7-14,9 mg/L), sin embargo, Kalaivani *et al.*, (2012) obtuvieron una CL_{50} muy superior (115,6 mg/L) al evaluar *C. longa* en larvas de *Ae. aegypti*. Todas las concentraciones mencionadas se encuentran en un intervalo similar a los obtenidos en el presente estudio (25,3 mg/L- 60,1 mg/L), aunque la población Mariano 2013 expresó valores ligeramente elevados para *C. aureginosa*.

Análisis fitoquímicos de *C. longa* revelaron la presencia de difenilheptanos, monoterpenos, sesquiterpenos, siendo la curcumina el metabolito predominante y el más activo (ISI Database, 2005; DNP, 2001). Awasthi & Dixit (2009) plantearon en su estudio que los componentes mayoritarios del rizoma de *C. longa* lo constituyeron ar-turmerona (31,7%), α -turmerona (12,9 %) y β -

turmerona (12,0%) y Ali *et al.*, 2015 informan ar-turmenona (36,9%) como componente principal del aceite de los rizomas de *C.longa*. Rathaur *et al.*, (2012) plantearon otros componentes como el α -felandreno y zengibereno con un 25%. Los compuestos mayoritarios que se encuentran en el aceite esencial utilizado en nuestro estudio son α -turmerona (7,0%) y β -turmerona (42,2 %)(Anexo 6).

Algunos estudios describen dos compuestos fundamentales en *C. aureginosa*; la curzerona y 1,8-cineol, seguido de otros metabolitos distribuidos en menor cuantía como alcanfor, furano-germenona, curcumenol, isocurcumenol, zedoarol (Jirovetz *et al.*, 2000). En el presente estudio, el compuesto mayoritario que se encuentran en el aceite esencial del rizoma es la epicurzerona (95,5 %) (Anexo 6).

Sagnou *et al.*, (2012) evaluaron 6 curcuminoides sobre *Cx. pipiens* presentes en *C. longa*, demostrando que la curcumina era la responsable de la actividad larvicida encontrada. Ali *et al.*, (2015) calcularon para ar-turmenona una $CL_{50}=2,5$ mg/L (2,2-2,8 mg/L) y para curcumina $CL_{50}= 49,3$ mg/L (43,2–57.2 mg/L) sobre *Ae. aegypti*.

El aceite de trementina (AT) es obtenido al destilar la resina de especies de *Pinus*. Se le atribuyen propiedades como antiséptico, descongestionante, expectorante, aromático, detergente y desinfectante (Wren, 1994). Rumiantsev (1961) y Kumarasinghe *et al.*, (2002) evaluaron el aceite de trementina para el control de moscas y Schubert *et al.*, (2017) contra la picada de *Ixodes ricinus*. Lucia *et al.*, (2007), evaluaron este aceite en larvas de *Ae. aegypti* y obtuvieron una $CL_{50} =14,7$ mg/L la cual fue menor que las calculadas en el presente estudio (21,5; 70,4; 58,5 mg/L para Rockefeller, SMP2011, Mariano 2013 respectivamente). Posteriormente, los autores estudiaron de forma conjunta α y β -pineno como componentes mayoritarios, enfatizando el papel insecticida

de ambos metabolitos. Las concentraciones calculadas en el presente estudio ($CL_{50}=29$ mg/L) fueron similares a las obtenidas por Fazal *et al.*, (2013).

Los valores calculados de CL_{50} para ATM (23,6; 57,6; 81,3 mg/L para Rockefeller, SMP2011, Marianao 2013, respectivamente) fueron más elevados que los obtenidos para AT, esto corrobora que la alta actividad insecticida del aceite de trementina (AT) encontrada en estos ensayos se debió a la presencia de α -pineno y β -pineno y no a otras estructuras que se obtuvieran por fotoisomerización, aunque los nuevos compuestos demostraron también actividad insecticida.

El AT suele encontrarse enriquecido con α y β -pineno mientras que en menor cuantía pueden encontrarse, d-limoneno, α y β -terpineno, β -ocimeno, mirceno, canfeno, sabineno, terpinoleno (Wren, 1994). El AT utilizado en el presente estudio estuvo constituido mayoritariamente por α -pineno, β -pineno y canfeno. Durante el proceso de fotoisomerización (ATM), los componentes mayoritarios se transformaron a derivados de funciones oxigenadas de verbenona y pulegona.

α -pineno y β -pineno manifestaron actividad fumigante sobre adultos de *T. castaneum* (Lee *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010), *Lycoriella mali* (Choi *et al.*, 2006), *P. humanus capitis* (Tolozza *et al.*, 2006), *B. germanica*, *P. americana* y *P. fuliginosa* (Yoon *et al.*, 2009), *Sitophilus zeamais*, *Anisopteromalus calandrae* (Suthisut *et al.*, 2011) y repelente contra *T. castaneum* y *S. zeamais* (Wang *et al.*, 2009).

En los estudios realizados por Giatropoulos *et al.*, (2012), con una población de *Ae. albopictus*, las CL_{50} calculadas para α y β - pineno fueron superiores cuando las compararon con las CL_{50} obtenidos con los tres aceites de cítricos de donde se aislaron. Este resultado demostró el papel sinérgico de los componentes dentro de una esencia.

Los aceites esenciales contienen muchos compuestos diferentes, que pueden interactuar de forma aditiva, sinérgica e incluso antagónica, aumentando, disminuyendo o dando como resultado ningún cambio en la actividad larvicida de los aceites evaluados, cuando se compara con el ingrediente activo mayoritario purificado (Wekesa *et al.*, 2011; Noletto *et al.*, 2013; Koutsaviti *et al.*, 2014; Pavela *et al.*, 2015; Masetti *et al.*, 2016).

En el presente estudio no se evaluaron compuestos aislados para correlacionar la presencia de los compuestos mayoritarios con la actividad insecticida comprobada de estos aceites contra mosquitos, pero hemos justificado con investigaciones realizadas por otros autores en cuanto a la bioactividad demostrada de compuestos mayoritarios. No obstante estudios con sustancias que se encuentran de forma minoritarias detectadas en los aceites de las plantas evaluados en este estudio también sustentan bioactividad plaguicida tales como:

- **4 terpineol** Evidenció actividad larvicida y adulticida contra *S. oryzae* (Lee *et al.*, 2001) fumigante contra *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Anisopteromalus calandrae* y *Trichogramma deion* (Suthisut *et al.*, 2011). Causó toxicidad por contacto contra adultos de *Bovicola ocellatus* (Talbert & Wall, 2011).
- **Mirceno** Presentó actividad fumigante contra *S. oryzae* y *T. castaneum* (Abd El Galeil *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).
- **Verbenona** Presentó actividad fumigante contra *S.oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis*, *M. domestica* y *B. germanica* (Lee *et al.*, 2003).
- **Eugenol** Causó inhibición de acetilcolinesterasa en adultos de *S. oryzae* (Lee *et al.*, 2001); repelente contra *P. humanus capitis* (Tolozza *et al.*, 2006), larvicida y disuasivo a la oviposición contra *Ae. aegypti* (Waliwitiya *et*

al., 2009), además de causar toxicidad por contacto contra *Bovicola ocellatus* (Talbert *et al.*, 2011).

- **p-Cimeno, timol, carvacrol** actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (Santos *et al.*, 2010^a; Govindarajan *et al.*, 2013).
- **Geranial y neral** Presentó actividad repelente contra *Cx. pipiens* (Michaelakis *et al.*, 2014).
- **Rotundifolona** Evidenció actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (Cardoso *et al.*, 2014).

De forma general los aceites evaluados evidenciaron una significativa actividad larvicida para las tres especies de mosquito; *C. aurantium* *M. quinquenervia*, ATM, *O basilicum* presentaron la respuesta más homogénea para *Ae. aegypti*. El aceite de *C. aurantium* es el mejor candidato como larvicida para el control de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* y *O basilicum* se destacó como el más activo sobre *Ae. albopictus*. La actividad larvicida encontrada es atribuible a la variada composición química de los aceites y a la posible existencia de múltiples modos de acción. Estudios posteriores con compuestos o fracciones semipurificadas podrán aportar más información sobre los constituyentes con efecto sobre las larvas de las especies estudiadas.

4.2 Influencia de las CL₉₀ de los aceites esenciales más promisorios en el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*

El efecto letal que pueden generar los compuestos presentes en los aceites esenciales ha sido descrito para algunos insectos como *Cx. quinquefasciatus* (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004), *B. germanica* (Karr & Coats, 1992; Leyva *et al.*, 2007^b) y *M. domestica* (Palacios *et al.*, 2009). Estos metabolitos secundarios pueden

presentar actividad reguladora del crecimiento o inhibidora del desarrollo. En este caso se les suele conocer como “disruptores endocrinos” y son estructuralmente similares a hormonas. Diversos autores plantean la influencia de los metabolitos secundarios en el desequilibrio entre la ecdisona y hormona juvenil generando mudas prematuras o tardías y la muerte de los individuos (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008, Hincapie *et al.*, 2011; Céspedes *et al.*, 2004,2013).

Dicho efecto se refleja también en un retraso del desarrollo del insecto, baja fecundidad y fertilidad, alargamiento de cada una de las fases de su ciclo de vida e incluso muerte por no completar su desarrollo y/o no poder desprenderse de la exuvia (Prophiro *et al.*, 2012). Como punto en común se encontró una mayor cantidad de machos que de hembras en los adultos sobrevivientes, los cuales no fueron significativos para continuar estudios de sobrevivencia. Este resultado está relacionado con el desarrollo biológico lento de un sexo u otro. Los machos emergen más rápidamente, por lo que el tiempo transcurrido dentro de un medio tóxico es menor con respecto a las hembras que demoran más en emerger (Clements, 1992). De esto se deriva que la mayor mortalidad pupal ocurrió en las pupas hembras.

4.2.1 Influencia de las CL₉₀ de ATM en el desarrollo de larvas de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*

En nuestro estudio por los resultados obtenidos, podemos inferir que el aceite de trementina modificado, se comportó como un regulador del crecimiento, primeramente, provocó mortalidad larval, pupal y luego los adultos quedaron adheridos a las exuvias logrando así más de un 97 % de inhibición de la emergencia en las poblaciones en estudio.

La fotoizomerización del aceite de trementina transforma los componentes mayoritarios en derivados de pulegona y verbenona. Gunderson *et al.*, (1985)

encontró que al administrar diariamente pulegona en la dieta de *Spodoptera eridania* (Cramer, 1784) (Lepidoptera: Noctuidae) causó actividad anti-alimentaria logrando afectación en el peso, la fecundidad y viabilidad de sus huevos.

En larvas de *Ae. aegypti* la pulegona mostró actividad larvicida, repelente e inhibidora de la oviposición (Waliwitiya *et al.*, 2009), mientras Fettig *et al.*, (2012), en un estudio con *Pinus ponderosa*, encontró actividad repelente de verbenona contra *Dendroctonus brevicomis* (Coleoptera:Curculionidae).

En *Ae. albopictus* se encontró una respuesta ligeramente más marcada que con *Ae. aegypti* aunque el comportamiento fue similar . Según los estudios de la ecología de *Ae. albopictus*, esta especie utiliza huecos de árboles y axilas de plantas para su cría (González-Broche, 2006). Esto hace que en su medio natural pueda exponerse a metabolitos secundarios a muy baja concentración provenientes de plantas en descomposición y esto se traduzca en una respuesta tolerante y adaptativa a las sustancias tóxicas producidas por la planta como lo hacen otras especies de insectos.

El alto porcentaje de inhibición de la emergencia en los sobrevivientes puede estar relacionado con el desequilibrio hormonal que provocan algunos terpenos, como se mencionó con anterioridad (Zahran y Abd El Galeil 2011; Napoleao *et al.*, 2012; Céspedes *et al.*, 2013). Existen enzimas que además de intervenir en la detoxificación de los insecticidas sintéticos cumplen un rol importante en procesos como la reproducción, digestión y muda (Lassiter *et al.*, 1995; Shanmugavelu *et al.*, 2000). Un desequilibrio en la funcionalidad de las mismas pudiera justificar la actividad larvicida y pupicida atribuida a este aceite.

4.2.2 Influencia de las CL₉₀ de *M. quinquenervia* en el desarrollo de larvas de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. albopictus*

En el caso del aceite de *M. quinquenervia* la exposición a dosis subletales acumulativas tiene un efecto tóxico en los individuos expuestos, lo que se reflejó no solo en la alta mortalidad encontrada en este estado inmaduro, sino también en los cambios morfológicos encontrados en los demás estados (pupas muertas o deformes y en la inhibición de la emergencia de los individuos machos que quedaron adheridos a las exuvias). Al igual que el ATM se obtuvo muy bajo número de individuos adultos, ocurriendo una desproporción en el sexo. No se encontraron estudios específicos sobre esta familia de plantas sobre mosquitos, que permitan justificar los resultados. *Melaleuca quinquenervia* produce quimiotipos distintos, basados principalmente en la proporción de los monoterpenos y sesquiterpenos. El 1.8 cineol, el α -pineno, β -pineno, α -terpineol, limoneno se encuentran presentes en cantidades superiores al 1% según Morales-Rico *et al.*, (2014). A estos metabolitos se les atribuye actividad antialimentaria (Tripathy *et al.*, 2001) y afectación de las funciones reproductivas contra insectos (Koul *et al.*, 2007), por lo que los resultados encontrados pudieran ser atribuidos a la presencia de estos compuestos.

4.2.3 Influencia de la CL₉₀ de *C. aurantium* en el desarrollo de larvas de *Ae. aegypti*.

El aceite de *C. aurantium*, mostró un efecto inhibitor del crecimiento sobre la cepa Rockefeller y Mariano 2013 (*Ae. aegypti*). Este aceite esencial se evaluó sobre el nematodo *Haemonchus contortus* provocando una reducción significativa de su peso corporal (Squires *et al.*, 2010; Gainza *et al.*, 2015).

Giatropoulos *et al.*, (2012) evaluaron la actividad del aceite de *C. aurantium* sobre larvas de *Ae. albopictus* informando una reducción en el número de pupas a partir de las larvas tratadas, pupas deformes, así como individuos muertos adheridos a las exuvias.

Según Zahran y Abd El Galeil (2011) los monoterpenos geraniol, mentol y limoneno revelaron elevada toxicidad sobre *Cx. pipiens*. Además, estos autores plantean que las continuas exposiciones de esta especie de mosquito a dosis subletales de limoneno y cuminaldehído afectaron el desarrollo de la misma. Se informó una alta mortalidad larval, baja formación de pupas, fuerte efecto en el desarrollo de los insectos y una drástica reducción de la emergencia de los adultos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio corroboran los de estas investigaciones, al someter las poblaciones de Rockefeller y Marianao 2013 a una dosis subletal de *C. aurantium*.

En los estudios realizados de forma general, se obtuvo alta inhibición de la emergencia, lo que se concluye que muy pocos individuos lograron emerger de las pupas. Teniendo en cuenta estas referencias, la utilización de dosis subletales de aceites esenciales puede provocar una influencia negativa en el desarrollo de las larvas contribuyendo también a un control efectivo de las poblaciones de mosquitos.

4.3 Actividad de enzimas detoxificadoras en larvas de la población de *Aedes aegypti* SMP 2011 y Rockefeller expuesta a la CL₉₀ de ATM

En los resultados del presente trabajo, los principales sistemas enzimáticos responsables de la resistencia metabólica en los insectos, se encontraron sobreexpresados en la población SMP 2011 con respecto a la cepa Rockefeller, sin embargo, cuando se expusieron las larvas a ATM, todas las enzimas

mostraron inhibición de su actividad en ambas poblaciones excepto para GST que incrementó ligeramente aunque no de forma significativa.

El efecto neurotóxico de los aceites esenciales y sus constituyentes se produce mediante la modulación de la actividad biológica de sus blancos moleculares, los cuales incluyen algunos canales iónicos (IRAC, 2012) y a los receptores de tiramina, octopamina, GABA_A y acetilcolina (Rattan 2010; Napoleao *et al.*, 2012; Jankowska *et al.*, 2018).

Una variedad de esterasas, oxidasas y un grupo de transferasas, median la detoxificación de aleloquímicos tóxicos en los insectos, mediante su transformación enzimática (Rattan *et al.*, 2010; Farag *et al.*, 2016). Estudios realizados con diversos aceites esenciales han demostrado el papel de estos como inhibidor de acetil colinesterasa (Ingkaninan *et al.*, 2003). Limoneno, 1,8-cineol y fenchona (Abd El Galeil *et al.*, 2009), al igual que el carvacrol, α -pineno y β -pineno son metabolitos que inhibieron la actividad de acetil colinesterasa en larvas de *Ae. albopictus* (Seo *et al.*, 2015).

Los estudios realizados evaluando el efecto de los aceites sobre la actividad de las enzimas detoxificadoras difieren entre sí, lo cual pudiera estar relacionado con el tipo de aceite empleado en cada caso particular. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Vasantha-Srinivasan *et al.*, (2017) al enfrentar poblaciones de *Ae. aegypti* a especie de las *Piperaceae*. En su estudio el autor encontró disminución de la actividad enzimática de α y β -esterasas y P450 monoxigenasa y un incremento de GST. Sin embargo, Cordeiro *et al.*, (2013) al enfrentar una cepa resistente a organofosforados y la cepa susceptible Rockefeller a WSMol (lectina soluble en agua obtenida de *Moringa oleifera*), encontró estimulación de α -esterasa en la cepa susceptible mientras que en la cepa resistente no se evidenciaron cambios significativos para esta enzima luego de ser expuesta a WSMol. De manera similar, al evaluar la actividad de

esterasas en larvas de *Ae. aegypti* expuestas a un extracto de *Sapindus emarginatus*, encontraron una reducción de la actividad β -esterasa, mientras que no se encontró ninguna variación en cuanto a la actividad de α -esterasa (Koodalingam *et al.*, 2011).

El incremento de la actividad de GST en nuestro estudio no fue significativo. En larvas de *Ae. aegypti* resistentes expuestas a aceites esenciales, se ha analizado, como un mecanismo de detoxificación (Tripathy *et al.*, 2011). Sin embargo, Che-Mendoza *et al.*, (2009) plantearon que niveles elevados de esta enzima es un indicador de resistencia secundaria ante niveles elevados de esterasas y P450 monooxigenasas lo que no coincide con nuestros resultados. Las enzimas GST no solo tienen como función mediar la detoxificación de xenobióticos (Koou *et al.*, 2014), también constituye uno de los mecanismos protectores frente al estrés oxidativo que se genera por la exposición a tóxicos (Vontas *et al.*, 2001; Zelck *et al.*, 2004). El incremento de la actividad GST en nuestros resultados, pudiera analizarse entonces como un mecanismo protector frente al ATM y justificaría en parte el ligero incremento de la CL₅₀ de SMP2011 con respecto a la cepa Rockefeller, aunque para estudios posteriores no debe descartarse los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2012) donde plantea la recuperación, 48 horas posterior a la exposición con insecticidas, de enzimas detoxificadoras inhibidas.

Un efecto colateral de los aceites esenciales sobre la actividad detoxificadora es que el desequilibrio en algunas de estas enzimas puede producir un desbalance hormonal, que se traduce en deterioro del crecimiento y finalmente la inducción de la muerte del insecto (Macedo *et al.*, 2007; Napoleao *et al.*, 2012). Esto justificaría el efecto pupicida y adulticida encontrada en el acápite 3.2 con este aceite.

Cordeiro *et al.*, (2013) en sus resultados plantea que una posible utilización de WSMol sería en poblaciones en las que no se detecten niveles considerables de GST. En nuestro caso este pudiese ser uno de los empleos del ATM, pero ante el uso sostenido de temefos en el país esta utilización no es factible, podríamos crear poblaciones con incrementos de esta enzima, lo cual podría dar al traste con cualquier aplicación insecticida en caso de etapa intensiva. Sin embargo, pudiera emplearse el ATM como un sinergista para potenciar el efecto tóxico de otros insecticidas sintéticos (Waliwitiya *et al.*, 2012).

Este acercamiento inicial a la actividad de enzimas detoxificadoras posterior a la exposición de un aceite, nos muestra el importante rol que estas enzimas pueden desempeñar en pos o en detrimento de una opción de control de este tipo. Diversos metabolitos pueden compartir sitios y mecanismos de acción con los insecticidas sintéticos (Vasanth-Srinivasan *et al.*, 2017), por lo que deben realizarse estudios a profundidad, aún cuando infiramos poseer un candidato promisorio y ecosostenible. Estudios no solo con poblaciones colectadas en terreno, sino también con poblaciones de referencia resistente a diferentes insecticidas e inclusive presionar por varias generaciones con una dosis subletal para constatar la actividad metabólica de este aceite en dichas poblaciones.

4.4 Actividad adulticida de aceites esenciales mediante las metodologías botellas y papeles impregnados sobre *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. albopictus*.

En el presente estudio, las concentraciones letales que permitieron determinar la actividad adulticida, fueron mayores que las calculadas para larvas, lo que se relaciona directamente con las diferencias fisiológicas entre ambos estadios.

La biorespuesta ante fitoquímicos puede diferir entre larvas y adultos debido a que el insecto adulto es fisiológicamente más fuerte (Clements, 1992).

Para las poblaciones de terreno de *Ae. aegypti*, algunos de los aceites como los de *E. globulus*, *P. aduncum* subsp. *ossanum*, *M. quinquenervia*, presentaron dosis de derribo superiores a las obtenidas en la cepa Rockefeller. Esto pudiera deberse a que las poblaciones de terreno estudiadas se colectaron en un período de alta aplicación de plaguicidas y evidenciaron una respuesta moderada a algunos grupos de insecticidas (Anexo 4) y en consecuencia podría causar el incremento de las dosis de los aceites .

El fenómeno de respuesta cruzada de insecticidas sintéticos y botánicos se ha descrito en algunos trabajos (Tripathy *et al.*, 2011; Cordeiro *et al.*, 2013). Debido a esto, la posible implicación de los mecanismos de acción metabólica sobre la actividad plaguicida de los aceites esenciales debe estudiarse con más detalle ante la posibilidad de selección y uso de los candidatos más promisorios para el control vectorial. Los trabajos en los que se utiliza el método de las botellas impregnadas (metodología CDC) para evaluar la actividad adulticida de aceites esenciales contra mosquitos son escasos (Da Silva *et al.* , 2012; El Zayyat *et al.*, 2017). Los artículos que evalúan este tipo de actividad utilizando esencias o extractos de plantas, son realizados mediante la impregnación de papeles pero la mayoría sin una metodología uniforme (Kamaraj *et al.*, 2010; Govindarajan *et al.*, 2012; Elango *et al.*, 2012; Cárdenas *et al.*, 2013). Existe variabilidad en cuanto a volumen utilizado para la impregnación, disolvente, tamaño de papel, inclusive el modo de expresar las concentraciones. Debido a esto, se dificulta comparar resultados en cuanto a actividad adulticida.

Al evaluar el aceite de *E. globulus*, se obtuvieron altos porcentajes de mortalidad lo que está en correspondencia con los resultados obtenidos en los estudios que se han realizado con esta especie vegetal. Para este aceite se

describió toxicidad por contacto sobre adultos de *B. ocellatus* (Talbert *et al.*, 2011), *Lutzomyia longipalpis* (Maciel *et al.*, 2010); *P. humanus* (Yang *et al.*, 2004) y actividad repelente contra adultos de *B. germanica*, *P. americana* (Yoon *et al.*, 2009) y *Zabrotes subfasciatus* (Franca *et al.*, 2012). Otros autores encontraron actividad adulticida contra *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* y *An. stephensi* (Zhu *et al.*, 2006; Amer & Mehlhorn, 2006 b; Lucia *et al.*, 2007; 2008; 2009; Park *et al.*, 2011).

Del género *Melaleuca*, Ko *et al.*, (2009) realizaron estudios utilizando *M. leucadendron* y *M. quinquenervia* en los cuales se evidenció actividad insecticida por contacto contra *S. zeamais* y *T. castaneum*. Pavela *et al.*, (2008^b) estudiaron la actividad fumigante y por contacto contra adultos de *M. domestica*. Nondenot *et al.*, (2010) encontró también este tipo de actividad sobre *Callosobruchus maculatus*. Otros autores informaron actividad adulticida en hembras de *Ae. aegypti* (Noosidum *et al.*, 2008; Bakar *et al.*, 2012) y *Ae. albopictus* en aerosoles al 5 % de esta planta (Bakar *et al.*, 2012). La acción adulticida del aceite cubano sobre las poblaciones evaluadas confirman estos resultados precedentes.

En la literatura consultada no se encontraron estudios que describan la actividad adulticida de *O. basilicum*, *C. longa*, *C. aeruginosa* y *B. graveolens* sobre mosquitos en la región de las Américas. Solamente, se informan los resultados de dos investigaciones en las que se sugiere la utilización de este último aceite en dos formulaciones como repelente (Vacacela, 2012; Torres, 2012). Los resultados obtenidos son novedosos para estas plantas y aumenta el conocimiento sobre estas como fuente de sustancias con acción plaguicida.

Entre los aceites evaluados, el aceite de *P. aduncum* subsp. *ossanum* no se destacó por su efecto letal sobre los adultos de las especies estudiadas, aunque si se evidenció que por el método de las botellas la dosis de derribo fue 20 mg menor en la cepa Rockefeller para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

Misni *et al.*, (2011) observaron que el aceite de *P. aduncum* formulado (10%) con keroseno y aplicado en forma de aerosol provocó 74,8% y 72,4% de derribo en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, respectivamente, transcurridos 20 minutos. El análisis de estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo utilizando dos métodos evaluación (botellas y papel) indicaron que la forma de aplicación o exposición puede influir en la actividad adulticida de este aceite. También, debe considerarse la posible incidencia en los resultados de la formulación. La composición química del aceite cubano es diferente a la de los aceites de *P. aduncum* más estudiados y por ende otro elemento a tomar en cuenta como causa de las diferentes respuestas biológicas evidenciadas en los dos estudios. En el presente estudio, *C. aurantium* no manifestó actividad adulticida, resultado que difiere de los encontrados por Yang *et al.*, (2005) al evaluar la acción fumigante del aceite de esta planta sobre *Cx. pipiens*. El aceite estudiado por estos autores fue extraído de las hojas y en su composición predominaron el citral y el α citral, mientras que el aceite cubano se obtuvo de la corteza de los frutos y fue rico en limoneno; estos cambios en la composición pudieran ser una de las causas de la menor susceptibilidad en los adultos evaluados. Según otros autores el monoterpeno limoneno reveló actividad adulticida sobre *Cx. pipiens*, aunque este efecto solo se manifestó a una dosis de 100 mg/L transcurridas 48 horas (Zahran y Abd El Galeil, 2011). Las discrepancias también pudieran atribuirse a diferencias entre las especies de mosquitos evaluadas.

La metodología de las botellas constituye un método sencillo y de fácil aplicabilidad en condiciones de laboratorio. En éste estudio, se aprecia, que las botellas impregnadas sobrepasan en sensibilidad a los papeles impregnados, debido a que las concentraciones calculadas para obtener los mismos

porcientos de derribo fueron menores con las botellas que con los papeles impregnados para varios aceites.

En las botellas, a pesar de mantenerse destapadas por 24 horas posterior a la impregnación, se aprecia, que luego de comenzar a exponer los adultos, se produce un efecto fumigante debido a la hermeticidad del recipiente. Estudios realizados por Campli *et al.*, (2012) con aceites esenciales como pediculicidas confirman esta hipótesis. El autor plantea que, debido al bajo peso molecular de los componentes de aceites esenciales, la acción tóxica de los mismos puede atribuirse al efecto combinado en la deposición directa de aceites esenciales en la cutícula junto con un efecto indirecto a través de la adsorción de los vapores. En el caso de los papeles, la superficie es porosa y absorbe con más facilidad la solución. Dentro de las capas de celulosa queda material insecticida, el cual permite, que la fase de vapor emerja de forma continua y gradual. Unido a este factor, podemos adicionar el hecho que los estuches no son herméticos favoreciendo el intercambio de los vapores.

Debido a esto, inferimos que la toxicidad de los aceites esenciales utilizando papeles impregnados se logra por la adsorción a través de los tarsos produciendo un efecto tóxico sistémico más lento, lo que hace que se necesite una mayor dosis para provocar el derribo total. En las botellas, la hermeticidad del dispositivo favorece la potenciación de efecto fumigante además del adsorbente, razón por la cual las dosis son más bajas para lograr el efecto adulticida.

La respuesta de los aceites esenciales en cuanto a la actividad adulticida puede estar relacionada y variar por la volatilidad de algunos componentes dentro de las esencias además de la metodología utilizada para la evaluación. Los mejores aceites fueron; *E. globulus*, *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *M. quinquenervia* , lo que puede estar relacionado con la variada composición

presentes en los mismos y la presencia de compuestos comunes como el 1,8 cineol. En cuanto a metodología; las botellas propician por las condiciones del dispositivo (hermeticidad) la acción fumigante más que con papeles. Las botellas presentan el inconveniente que solo pueden ser utilizadas una vez y al finalizar la exposición se dificulta la extracción de adultos debido a que se adhieren al fondo de la botella. Los papeles pueden ser utilizados en más ocasiones y ser conservados en refrigeración debidamente tapados. Para las botellas, el almacenamiento en similares condiciones, ocurre la condensación de agua en la superficie de las paredes y a temperatura ambiente puede ocurrir degradación de los compuestos. Teniendo en cuenta todos estos aspectos se sugiere que en estudios posteriores para evaluar actividad adulticida con aceites esenciales en mosquitos deban utilizarse la metodología de los papeles impregnados.

4.5. Actividad ovicida y repelente a la oviposición de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites

4.5.1 Actividad ovicida de soluciones de aceites esenciales sobre huevos de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Los huevos de mosquitos poseen una membrana exterior llamada corión que confiere protección al embrión, la que permite entre otras funciones el intercambio de gases y agua con el exterior a través de los aerópilos (Russell *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2007). La función principal de los compuestos ovicidas es traspasar esta barrera, interrumpir el desarrollo del embrión, perjudicar la supervivencia de la larva dentro del huevo o bloquear la eclosión del huevo (Govindarajan *et al.*, 2011).

Con *P. aduncum*, *B. graveolens* y *E. globulus*, no se encuentran trabajos que permitan comparar nuestros resultados. Estudios realizados por Warikoo *et al.*, (2011) y Valarmathy *et al.*, (2011) muestran que *O. basilicum* inhibió la eclosión de huevos de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* a diferentes dosis.

La mayoría de los estudios con aceites esenciales evaluando la actividad ovicida, plantean la bioactividad encontrada, pero no el mecanismo mediante el cual se provoca este efecto. Solamente los estudios realizados por Jarial *et al.*, (2001) demuestra el no desprendimiento del exocorión en los huevos luego de ser expuestos a extractos de *Allium sativum* lo que se tradujo en la no eclosión de los embriones. Otros estudios realizados por De Lima Santos *et al.*, (2013) proponen la interacción entre la lectina de *M. oleifera* con la quitina presente en los ovocitos y el corión de los huevos como modo de acción ovicida.

La dosis utilizada, con efecto larvicida demostrado para cada aceite, provocó un alto porcentaje de eclosión de los huevos expuestos y causó la muerte posterior de las larvas recién eclosionadas. Teniendo en cuenta los escasos estudios realizados sobre actividad ovicida podemos inferir, que las soluciones de aceites esenciales estudiadas fueron capaces de traspasar las barreras del corión provocando que las larvas emergieran, como un mecanismo de supervivencia ante la toxicidad interna de los huevos. No obstante, la misma condición que propició la emergencia, fue el mismo medio para el cual emergieron, lo que provocó como un efecto secundario la muerte de los individuos de primer estadio. Estudios a profundidad deberán realizarse posteriormente con dosis más bajas y su efecto en los embriones.

4.5.2 Repelencia a la oviposición de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ante soluciones de aceites esenciales

Algunos insecticidas sintéticos y naturales envían señales químicas, que son captadas por los insectos e influyen o no en la oviposición de los mosquitos (Olagbemiro *et al.*, 1999; Geetha *et al.*, 2003). Davis y Bowen (1994) demostraron que los mosquitos pueden detectar varias señales químicas por medio de receptores sensoriales presentes en sus antenas, lo que les permite seleccionar o rechazar el sitio de oviposición.

No siempre una disolución con una determinada actividad insecticida probada, puede ser correlacionada positivamente con otro tipo de actividad y en ocasiones los resultados pueden no ser similares con otros autores. En la presente investigación, el aceite de *C. aurantium* presentó alta actividad larvicida, pero no presentó actividad adulticida sin embargo, evidenció repelencia total a la ovipuesta por parte de hembras de *Ae. aegypti*. Kassir *et al.*, (1989) planteó que agua tratada con limoneno fue desfavorable para la oviposición de las hembras de *Cx. quinquefasciatus*. Resultados similares se encontraron por Araujo *et al.*, (2016) para *Ae. aegypti*.

En este estudio el aceite de *P. aduncum* subsp. *ossanum* mostró iguales resultados que *C. aurantium*. Tawatsin *et al.*, (2006) y Autran *et al.*, (2009) demostraron que el aceite esencial obtenido de *P. nigrum*, presentó un grado moderado de disociación a la oviposición (82 %) y *P. marginatum* aunque mostró efectividad como larvicida, no interfirió significativamente en la oviposición de *Ae. aegypti*.

Otros aceites muestran una alta disociación de la oviposición como *C. longa* (94.7%) y *M. cajuputi* (87.9%) sobre *Ae. aegypti* (Tawatsin *et al.*, 2006). Warikoo *et al.*, (2011) encontró una relación directamente proporcional entre la concentración evaluada de *O. basilicum* y la repelencia efectiva de *Ae. aegypti* a

ovipositar. Del mismo modo, Castillo *et al.*, (2017) encontró en su estudio que hembras grávidas de *Ae. aegypti* manifestaron cierta repelencia a depositar sus huevos en los tratamientos con los aceites esenciales de *Lippia alba* ((Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson), *C. citriodora* y *Cananga odorata* ((Lam.) Hook.f. & Thomson), al compararlos con los controles.

Según Amer y Melhorn, (2006) *M. quinquenervia* produjo un efecto repelente y disociador de la picada, y en nuestros resultados protegió parcialmente el recipiente de oviposición. Este resultado coincide con los encontrados por Prabhu *et al.*, (2011) al evaluar el extracto hexánico de hojas de *M. oleifera* donde informaron repelencia a la picada de *An. stephensi*, mientras de De Lima-Santos *et al.*, (2013) encontraron una disociación moderada a la oviposición de la lectina aislada de esta planta contra *Ae. aegypti*.

Las variaciones en las respuestas repelentes pueden estar moduladas principalmente; por la composición química de los aceites y sus componentes mayoritarios además de la respuesta ante las señales químicas recibidas por los órganos sensoriales que puede variar según la especie de mosquito evaluada. La dosis utilizada puede ser efectiva en la protección a recipientes que estos vectores utilicen para su cría ya que disuade a las hembras de continuar la oviposición y en el caso que ocurra una ovipuesta en recipientes desprotegidos, en el momento de la aplicación será capaz de lograr la eclosión de los huevos y eliminar a las larvas recién emergidas. Con el conocimiento de la conducta de oviposición de los mosquitos y del modo de acción de los aceites esenciales provenientes de la flora cubana, podrían elaborarse formulados para disuadir la oviposición de estos insectos.

4.6 Actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales contra *Aedes aegypti* utilizando voluntarios humanos

Los repelentes de mosquitos son una forma efectiva de reducir los contactos vector-hospedero y así la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores. Podemos plantear que, en formulados de aceites para lograr un efecto repelente, influyen varios aspectos dentro de los que se destacan a) especie de planta y sus componentes mayoritarios, b) metodología evaluativa, c) ingredientes inertes del formulado, entre otros.

La actividad repelente de un aceite esencial esté relacionada con la especie vegetal evaluada, su composición química, las proporciones en las que están presentes sus componentes y las interacciones entre ellos (Koul *et al.*, 2013).

Existen familias de plantas que evidencian alta actividad repelente (Gillij *et al.*, 2008) dada por compuestos como α -pineno, limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor y timol (Nerio *et al.*, 2010), donde la presencia de los compuestos activos mayoritarios y minoritarios pueden generar efectos aditivos o sinérgicos dentro de las formulaciones (Regnault-Roger *et al.*, 2012; Koul *et al.*, 2013).

En el caso de las dos plantas que se evaluaron en nuestro estudio, la formulación de *M. quinquenervia* al 20 % en dipropilenglicol protegió por mayor tiempo que la formulación de *C. aurantium* al 30 % en propilenglicol potenciada.

Amer *et al.*, (2006^b) evaluaron la actividad repelente de *M. quinquenervia* sobre mosquitos con buenos resultados. En el caso del aceite cubano están presentes compuestos como el 1,8 cineol y limoneno que evidenciaron repelencia sobre adultos de *Pediculus humanus capitis* (Tolozza *et al.*, 2006) y el α -pineno sobre *B. germanica* y *P. americana* (Yoon *et al.*, 2009).

Otro aspecto que puede influir es la transpiración y la actividad metabólica derivada de las glándulas sudoríparas de los humanos. Zwiebel y Takken (2004) señalaron estos aspectos como uno de los factores que influyen en el comportamiento de la picada al humano y por tanto influyen en la protección o no de las formulaciones repelentes. Cuando se utilizan dispositivos para evaluar la repelencia, no se tienen en cuenta estos aspectos que están inherentes en los ensayos con voluntarios humanos como; la penetración percutánea, el CO₂, ácido láctico, y 1,3 octenol principalmente (Lupi *et al.*, 2013). Es posible que compuestos que manifiesten actividad repelente con dispositivos, en ensayos con voluntarios humanos no manifiesten tal actividad. Los ingredientes del formulado contribuyen también a mejorar la perdurabilidad de la formulación. En el presente estudio al ser evaluada otras formulaciones de *M. quinquenervia* (cremas, soluciones hidroalcohólicas) no ofrecieron valores significativos en cuanto a protección contra la picada (datos no publicados). A medida que se mejoraron los formulados, se favoreció un mejor efecto disociador de la picada. El dipropilenglicol, se plantea, es utilizado en diferentes formulaciones farmacéuticas, sólidas o semisólidas para acción tópica, por sus características aditivas e inocuas. Por su excelente solubilidad en agua, aceites e hidrocarburos, junto con su escaso olor, bajo potencial de irritación de la piel, baja toxicidad. Este compuesto por sus características, al parecer, es capaz de favorecer la persistencia y la biodisponibilidad de la mezcla multicomponente del aceite de *M. quinquenervia* sobre la piel. Con respecto a las formulaciones de *C. aurantium*, el propilenglicol, no ofreció esta capacidad a pesar del aceite estar en mayor porcentaje. Al parecer el limoneno, como compuesto en mayor proporción en *C. aurantium*, es más volátil que el conjunto de metabolitos del aceite de *M. quinquenervia*, y el propilenglicol no logra mantener este compuesto por tiempo

suficiente sobre la piel. No obstante, en la solución 30PII con la inclusión de vainillina en la formulación se observó un efecto potenciador con respecto a la solución 30PI, variación que se ha informado al utilizar esta sustancia (Tuetun *et al.*, 2005; Choochote *et al.*, 2007).

Phasomkusolsil y Soonwera (2011) evaluaron la protección de *C. citratus*, *C. nardus*, *C. odorata*, *C. aurantium*, *E. citriodora*, *O. basilicum* y *S. aromaticum* contra la picada de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *An. dirus* a tres concentraciones. A la dosis máxima evaluada 0,21 mg/cm² solo obtuvieron un 48 % de protección con *C. aurantium* contra *Ae. aegypti*, por lo que el aceite por si solo tuvo poco efecto repelente, lo que se relaciona con los resultados obtenidos para la formulación 30 PI. Sin embargo, en este mismo estudio para *Cx. quinquefasciatus* y *An. dirus* se obtuvo una protección mayor de 80% (Phasomkusolsil y Soonwera, 2011), por lo que la especie de mosquito evaluada también puede influenciar en el efecto observado (Rodríguez *et al.*, 2015).

El criterio sobre el tiempo de protección ideal de formulados naturales no está bien establecido. Algunos autores consideran tiempos bajos como efectivos debido a la amplia disponibilidad de las plantas en estudio, así como, su explotación. Choochote *et al.*, (2007) encontraron con *Zanthoxylum piperitum* ((L.) Benn. ex DC.), *Graveolens anethum* (L.) y *Kaempferia galanga* (L.) tiempos medios de protección 1; 0,5 y 0,25 h, respectivamente contra *Ae. aegypti*, los que se incrementaron significativamente con la incorporación de 10% vainillina y consideran promisorios los resultados. Sin embargo, Phasomkusolsil y Soonwera (2011) consideran que los tiempos de protección para formulados repelentes deben ser superiores a 2 horas.

Estos mismos autores (Phasomkusolsil & Soonwera 2011) sugieren que un tiempo largo de protección en combinación con un bajo porcentaje de

picadura, indica que el aceite es eficiente para repeler mosquitos y disociar la picada. Si el tiempo de protección es corto y el índice de picadas es bajo, el aceite actúa más como un disociador de la alimentación que como un repelente, como sucede con la formulación 30PII. A la inversa, si el tiempo de protección es largo y el índice de picada es alto, el aceite esencial se comporta más como repelente que como disociador de la alimentación (Castillo *et al.*, 2017). Según este planteamiento, en el presente estudio, 30PII se comportó más como disociador de la picada que como repelente, mientras que 30PI no manifestó ninguno de los dos comportamientos.

En este estudio el formulado de *M. quinquenervia* (M20D), protegió por mayor tiempo que el formulado de *C. aurantium* (30 PII). Aunque ambas formulaciones, se encuentran a diferentes porcentajes de aceite y solventes, pensamos que estudios posteriores utilizando otros solventes, inclusive una menor concentración de aceite, se puede obtener un mejor resultado con *C. aurantium* dado por los antecedentes de estudio del limoneno. Poco se conoce de los mecanismos que favorecen la disuasión de la picada utilizando formulados de aceites esenciales (Dickens *et al.*, 2013), por lo que este aspecto también debe estudiarse con mayor profundidad.

Consideraciones generales

La amplia disponibilidad de plantas aromáticas en nuestro país, comparado con los altos costos de los insecticidas químicos, hace que sea meritoria la búsqueda de aceites esenciales como alternativas viables a los plaguicidas convencionales. El presente estudio muestra limitaciones como toda investigación primaria. Podríamos citar que al realizarse en condiciones de laboratorio, no se presentan estudios de semicampo. No se contó con los

aislamientos de los metabolitos de mayor cuantía de cada aceite para corroborar la atribución o no de la actividad insecticida de los mismos. Estos estudios en un futuro podrían contribuir a una mejor comprensión de la actividad insecticida y su modo de acción sobre algunos blancos moleculares. En cuanto a la implicación de las enzimas detoxificadoras, no se efectuó el estudio en cepas de referencia resistente a insecticidas, lo que brindaría una información valiosa para el control, teniendo en cuenta la aplicación sucesiva de insecticidas en el combate de esta especie. La actividad repelente no se amplió a otros candidatos ni se realizó con más solventes que permitieran tener una mayor variedad de formulados y alargar el tiempo de protección. Sabemos, que la introducción de insecticidas vegetales debe enfrentar muchos inconvenientes entre los que se encuentran que una planta debe ser activa a bajas concentraciones (<50 mg/L), aunque existen autores que plantean, que se deben lograrse concentraciones muy inferiores a este indicativo (Masetti, 2016). La explotación deberá realizarse por debajo de su límite de renovación por lo que su utilización no debe ser limitada por su biodisponibilidad. Los candidatos no deben ser tóxicos al humano, ni proporcionar acumulación a lo largo de la cadena alimenticia (Isman, 2006; 2011; Chellapandian *et al.*, 2018). Una alternativa para los que resulten ecotóxicos en ambientes acuáticos, puede ser la utilización en aerosoles, pinturas, potes fumígenos, espirales etc. Estudios futuros deben incluir, plantas invasivas donde una forma de controlar su expansión sea su uso como bioplaguicidas (Muema *et al.*, 2017). El estudio integral de los mejores candidatos permitirá obtener formulados naturales que facilitarán un control efectivo contra especies vectoras de enfermedades tropicales de forma racional y sistémica, además de contribuir a la protección del medio ambiente.

CONCLUSIONES

Es triste pensar que la naturaleza habla y que el género humano no escucha.....

5. CONCLUSIONES

- Todos los aceites evaluados presentaron una significativa actividad larvicida sobre *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*; destacándose el aceite de *C. aurantium* por su elevado espectro de acción sobre estas especies de mosquito y los aceites de *B. graveolens*, *E. globulus*, *O. basilicum*, y *M. quinquenervia* con concentraciones letales medias significativamente bajas ($CL_{50} < 50 \text{mg/L}$) en las poblaciones de *Ae. aegypti*.
- Los aceites de *M. quinquenervia*, *C. aurantium* y ATM provocaron un efecto inhibitor de la emergencia de los adultos de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus*, lo que sugiere que la aplicación de la CL_{90} de estos aceites en el estadio larval logra un control efectivo de las poblaciones de mosquitos adultos.
- La disminución de α -esterasas, β -esterasas y P450 monooxigenasa unido al incremento no significativo de la actividad GST, sugiere que estas enzimas detoxificadoras no están relacionadas con los valores

superiores de CL₅₀ y CL₉₀ de la población SMP 2011 en relación a las cepa susceptible.

- *Eucalyptus globulus* fue el aceite que evidenció mayor actividad adulticida por ambas metodologías, seguido de los aceites de *C. longa*, *C. aeruginosa*, *P. aduncum* subsp *ossanum*, *O. basilicum* y *B. graveolens*, lo cual constituye para estas cinco plantas, el primer reporte de este tipo de actividad sobre *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. quinquefasciatus* en la región de las Américas.
- Las soluciones de aceites evaluadas mostraron una baja actividad ovicida (inferior al 50 %) a la dosis utilizada, sin embargo esta favoreció la muerte en pocas horas de las larvas emergidas.
- Las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* evidenciaron repelencia a la ovipuesta ante las soluciones de los aceites evaluados; por lo que estos podrían ser utilizados como principios activos de formulados que protejan determinados recipientes que estos vectores utilizan para su cría.
- La formulación de *M. quinquenervia* al 20% en dipropilenglicol (M20D) manifestó mayor efecto protector sobre piel humana que la formulación de *C. aurantium* 30PII, lo que convierte a esta planta en un candidato potencial para formulaciones repelentes.

RECOMENDACIONES

La libertad se alcanza con el conocimiento, el cual es generado en la adversidad....

6. RECOMENDACIONES

- Desarrollar investigaciones sobre ecotoxicidad con los aceites evaluados en especies de invertebrados que coexistan en ecosistemas acuáticos para descartar o no su uso como candidato para el control larval de mosquitos.
- Profundizar en los estudios de toxicidad necesarios con el aceite de *M. quinquenervia* para la producción de un formulado repelente.
- Profundizar en los estudios de enzimas detoxificadoras con aceites y compuestos de los mismos para esclarecer sitios de acción de futuros candidatos.
- Realizar estudios sobre actividad inhibidora del desarrollo y repelente con los aceites de *E. globulus*, *P. aduncun subsp ossanum* y *O. basilicum*.
- Continuar estudios futuros con plantas medicinales que cumplan los criterios de exóticas e invasivas en los ecosistemas botánicos como fuentes de posibles formulados bioplaguicidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Todo lo que das a otros, te lo estas dando a ti mismo

Referencias bibliográficas

- **Abd El Galeil SA, Mohamed MI, Badawey ME, El-Arami SA.** Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J Chem Ecol.* 2009; 35:518–25.
- **Aguilera L, Marquetti MC, Navarro A, Bisset J.** Effects of three organophosphorus insecticide in the reproductive potential of *Culex quinquefasciatus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; 90(3).
- **Ahmad N, Fazal H, Abbasi HB, Farooq S, Ali M, Khan M.** Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 2:S1945-S1953.
- **Ait-Ouazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, Pagán R, Conchello P.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric* 2011; 91: 2643–2651.
- **Ali A, Wang YH, Khan I.** Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, Ar-turmerone, and Curcuminoids against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera) *J. Med. Entomol.* 2015; 52(5): 979–986 .
- **Aliferis KA, Jabaji S.** Metabolomics - A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pest Bioch Physiol.* 2011; 100(2):105-117.
- **Allen F.** A natural earth that controls insects. *Org Gard Farm.* 1972; 19: 50-56.
- **Almeida RRP, Souto RNP, Bastos CN, Silva MHL, Maia JGS.** Chemical Variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem Biod.* 2009; 6: 1427-34.
- **Amer A, Mehlhorn H.** Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2006 a; 99: 466.
- **Amer A, Mehlhorn H.** Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes *Parasitol Res.* 2006 b; 99: 478-490.

- **Anderson CR, Downs WG, Hill AE.** Isolation of dengue virus from human being in Trinidad. *Science*. 1956; 124:224-25.
- **Andrade-Ochoa S, Sánchez-Torres L, Nevárez-Moorillón G, Camacho A, Noguera-Torres B.** Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomédica*. 2017; 37 (2): 224-43.
- **Araujo FDO, Ribeiro-Paes J, Telles de Deus J, Holanda Cavalcanti SC, de Souza Nunes R, Barreto Alves P, da Graça ML.** Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(7): 443-449.
- **Aslan I, Ozbek H, Calmasure O, Sahin F.** Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Ind Crops Prod*. 2004; 19: 167–173.
- **Autran ES, Neves IA, da Silva CSB, GKN, Santosa CAG, da Câmara D, Navarro MAF.** Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Biores Technol*. 2009; 100 (7): 2284–88.
- **Awasthi PK, Dixit SC.** Chemical Composition of *Curcuma longa* leaves and rhizome oil from the plains of Northern India. *J Young. Pharm*. 2009; 1(4): 312-316.
- **Aygun D, Doganay Z, Altintop L, Guven H, Onar M, Deniz, T, Sunter T.** Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. *J Tox Clin Tox*. 2002; 40: 903-10.
- **Bakar A, Sulaiman S, Omar B, Mat Ali R.** Evaluation of *Melaleuca cajuputi* (Family: Myrtaceae) essential oil in aerosol spray cans against dengue vectors in lowcost housing flats. *J Arthropod-Borne Dis*. 2012; 6(1):28–35.
- **Baly A, Toledo ME, Rodriguez K.** Costs of dengue prevention and incremental cost of dengue outbreak control in Guantanamo, Cuba. *Trop. Med. Int. Health*. 2012; 17: 123-132.
- **Baly A, Flessa S, Cote M.** The Cost of routine *Aedes aegypti* control and of insecticide-treated curtain implementation. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 84: 747-752.
- **Barasa SS, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A.** Repellent activities of stereoisomers of p-menthane-3,8-diols against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2002; 39: 736-41.
- **Barbosa JDF, Silva VB, Alves PB, Gumina G, Santos RLC, Sousa DP, Cavalcanti SCH.** Structure activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pes. Manag Sci*. 2012; doi:10.1002/ps.3331.
- **Barbosa LCA, Silva CJ, Teixeira RR, Meira RMS, Pinheiro AL.** Chemistry and biological activities of essential oils from *Melaleuca* L. species. *Agric Conspec Sci*. 2013; 78: 11–23.
- **Becerra JX, Venable DL.** Rapid terpene-bath and ‘squirt-gun’ defense in *Bursera schlechtendalii* and the counterploy of chrysomelid beetles” *Biotrop*. 1990; 22: 320-23.
- **Becerra JX.** “Squirt-gun defense defense in *Bursera* and the chrysomelid counterploy”. *Ecology*. 1994; 75: 1991-96.

- **Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotufo LV.** Overview of the therapeutic potential of pipartine (*Piper longum*). *Eur J Pharm.* S.2013; 48: 453-463.
- **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL.** et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496:504–507. Doi: 10.1038/nature12060.
- **Bisset JA, Navarro OA, Marquetti MC, Mendizabal ME, González BM.** Abundancia larval de mosquitos urbanos durante la campaña de erradicación del *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y dengue en Cuba (1981-1982). *Rev Cubana Med Trop.* 1985; 37:161-8.
- **Bisset JA, Rodríguez M, Díaz C, Marquetti MC, Ortiz E.** The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba. *Bull Entom Res.*1990; 80:245-250.
- **Bisset JA, Rodríguez M, Díaz C, Soca A.** Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de La Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 2000; 52(3):180-85
- **Bisset JA.** Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia *Rev Cubana Med Trop.* 2002; 54(3):202-219
- **Bisset JA, Rodríguez M, Fernández D, Pérez O.** Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev Cubana Med Trop.* 2004; 56:(1).
- **Bisset JA, Rodríguez M, Moya M, Ricardo Y, Montada D, Gato R, Pérez O.** Efectividad de formulaciones de insecticidas para el control de adultos de *Aedes aegypti* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.*2011; 63(2).
- **Bisset JA, Rodríguez MM, Hurtado D, Hernández H, Valdéz V, Fuentes I.** Resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en *Aedes aegypti* del municipio Boyeros en los años 2010 y 2012. *Rev Cubana Medicina Trop.* 2016; 68(1)
- **Blenau W, Rademacher E, Baumann A** Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? *Apidologie.* 2014; 43: 334–47.
- **Bloomquist JR.** Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Bioch Phy.* 2003; 54 (4): 145-156.
- **Bloomquist JR, Boina DR, Chow E, Carlier PR, Reina M, Gonzalez-Coloma A.** Mode of action of the plant-derived silphinenes on insect and mammalian GABA A receptor/chloride channel complex. *Pest Bioch Phy.* 2008; 91 (1): 17-23.
- **Bottia E, Díaz O, Mendivelso D, Martínez J, Stashenko E.** Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Sci Tech.* 2007; 13:913-18.
- **Brito AC, Fontes G, Rocha EMM, Rocha DAM, Regis L.** Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(4): 575-576.
- **Brogdon WG, Mcallister JC.** Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4:605-13.

- **Burgueño-Tapia E, Castillo L, González-Coloma A, Joseph-Nathan P.** Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *J Chem Ecol.* 2008; 34(6): 766-71.
- **Campelli D, Di Bartolomeo S, Delli P, Di Giulio M, Grande R, Nostro, Cellini L.** Activity of tea tree oil and nerolidol alone or in combination against *Pediculus capitis* (head lice) and its eggs. *Parasitol Res.* 2012; 111:1985–92.
- **Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R.** *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *J Med Entomol.* 2007;44:1064–6.
- **Cardero R.** Desarrollo Sostenible a partir de los enfoques de los problemas sociales de la ciencia y la tecnología, en Contribuciones a las Ciencias Sociales, octubre 2011. disponible en <http://www.eumed.net/rev/ccss/14/>
- **Cardoso Lima T, da Silva TK, Lima Silva F, Barbosa-Filho JM, Marques M, La Corte Santos R, de Holanda Cavalcanti S, de Sousa D.** Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere.* 2014; 104: 37–43.
- **Carroll SP, Loye J.** PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006; 22:507-514.
- **Cárdenas E, Riveros I, Lugo L.** Efecto insecticida de cuatro aceites esenciales sobre adultos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* en condiciones experimentales. *Entomot.* 2013; 28(1): 1-10.
- **Castillo RM, Pérez M, Mesa A, Silva I, Alfonso Y, Marquetti MC.** Presencia y sitios de cría de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) en la región oriental de Cuba. *Rev. Cubana Med Trop.* 2014; 66(1).
- **Castillo RM, Stashenko E, Duque JE.** Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. *J Amer Mosq Ctrol Assoc.* 2017; 33(1): 25–35.
- **Cano E, Cano A, Cano A.** Plantas prohibidas o restringidas por su toxicidad: Flora psicotrópica. *Bol Inst Est Gienn.* 2009; 200:73-123.
- **Cantrell CL, Pridgeon JW, Fronczek FR, Becnel JJ** Structure activity relationship studies on derivatives of eudesmanolides from *Inula helenium* as toxicants against *Aedes aegypti* larvae and adults. *Chem Biod.* 2010; 7:1681-97.
- **Cavoski I, Caboni P, Miano T.** Natural Pesticides and Future Perspectives. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and management.* 2011; 169-90. Available from: <http://www.intechopen.com/articles/>
- **CDC.** Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC Bottle Bioassay. In: BROGDON, G. & CHAN, B. H. (eds.) 2010;1 ed.: Centers for Disease Control and Prevention.
- **Céspedes CL, Torres P, Marín JC, Arciniegas A, Romo de Vivar A, Pérez-Castorena AL, Aranda E.** Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. *Phytoch.* 2004; 65(13): 1963-75.

- **Céspedes C, Molina SC, Muñoz E, Lamilla C, Alarcon J, Palacios SM, et al.** The insecticidal, moulting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. *Ind Crops Prod* 2013; 42: 78– 86.
- **Champakaew D, Choochote W, Pongpaibul Y, Chaithong U, Jitpakdi A, Tuetun B, Pitasawat B.** Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Parasitol Res.* 2007; 100: 729–37.
- **Chan KL.** Singapore's Dengue Haemorrhagic Fever Control Programme: A case study on the successful control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control. Inform. Center, Tokyo, Japan. *S East Asian Med.* 1985.
- **Chamorro ER, Zambón SN, Morales WG, Sequeira AF, Velasco GA.** Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography In: Salih, B., Çelikbıçak, Ö. (Eds.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications.* InTech, Rijeka. 2012 pp. 307–324
- **Chellappandian M, Vasantha-Srinivasana P, Senthil-Nathana S, Karthia S, Thanigaivela A, Ponsankara A, Kalaivanib K, Hunter WB** Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International* 2018;113:214–230.
- **Che-Mendoza A, Penilla RP, Rodríguez DA.** Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. *Afr. J. Biotechnol.* 2009; 8 (8):1386–1397.
- **Choi WS, Park BS, Lee YH, Jang DY, Yoon HY, Lee SE.** Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crop Protect.* 2006; 25:398–01.
- **Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P., Tuetun B., Champakaew D, Pitasawat B.** Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia.* 2007; 78(5):359–364.
- **Clements AN.** The biology of mosquitoes. London: Chapman & Hall. 1992. pp. 509
- **Colucci B, Müller P.** Evaluation of standard field and laboratory methods to compare protection times of the topical repellents PMD and DEET. *Scientific Reports.* 2018; 8:12578 | DOI:10.1038/s41598-018-30998-2
- **Cordeiro Agra-Neto A, Henrique Napoleão T, Viana Pontual E, Diniz de Lima Santos N, Andrade Luz L, Fontes de Oliveira CM, et al.** Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasito. Res.* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3640.
- **Corrales E, Troyo A, Calderón O.** Chikunguya: un virus que nos acecha. *Act Méd Costar.* 2015: ISSN001-6012/2015/57/1/7-15.
- **Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG.** Natural products (secondary metabolites) In Buchanan B, Gruissem W, Jones R. (eds). Amer. Society of Plant Physiologists. Maryland. USA. 1367 p. *Bioch Molec Biol Plants.* 2000; 24:1250-1318.
- **Da Silva AC, Lagos K, Maia FC, Souza da Silva L, Tadei W, Pohlit A.** Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against *Aedes aegypti* (Culicidae). *J Mosq Res.* 2012; 2 (1):1-7.

- **Da Silva K, da Cunha SL, de Souza IA, Dantas da Cruz CL, dos Santos R, de Carvalho M** Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus* *Parasitol Res* .2016; 115:3441–3448
- **Davis E.E, Sokolove PG.** Lactic acid-sensitive receptors on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J Comp Physiol*. 1976; 105: 43–54.
- **Davis EE & Bowen MF.** Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*. 1994. 10: 316-325.
- **Dayan FE, Cantrell ChL, Duke SO.** Natural products in crop protection. *Bio & Medl Chem*. 2009; 17:4022-4034.
- **De Carvalho G, Trindade R, Nascimento R, Salgueirosa C, Faustino M, Câmara L.** Evaluation of larval development of *Dirofilaria immitis* in different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* .*Open J Vet Med*. 2013; 3: 277-81.
- **De Lima Santos ND, Santana K, Napoleao TH, Novais Santos G, Breitenbach LC, Do Amaral DM et al .** Oviposition stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*.*Plos One*.2013; 7(9): e44840.
- **Díaz G.** Epidemiología molecular de los virus de Dengue en Cuba 2009-2014. Tesis para optar por el grado de Master en Virología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana 2014.
- **Dickens J, Bohbot JD.** Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pest Biochem Physiol*. 2013; 106: 149–55.
- **Ditzen MM, Pellegrino LB, Vosshall L.** Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*.2008; 319: 1838–42.
- **DNVLA.** Manual de Normas y Procedimientos técnicos. Para la Vigilancia y lucha antivectorial. 2012. Editorial Ciencias Médicas La Habana, Cuba.
- **DNP.** Dictionary of Natural Products. 2001. CD ROM, Chapman and Hall-CRC, USA.
- **Dohm DJ, Sardelis MR, Turell R.** Experimental vertical transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* (Díptera: Culicidae). *JMed Entomol*. 2002; 39 (4):640 -4.
- **Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso MC, Martínez B et al.** Efecto in vitro de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Rev Prot Veg*. 2013; 28(1): 54-9.
- **Ebadollahi A.** Essential oils isolated from myrtaceae family as natural insecticides. *Ann Rev Res Biol*. 2013; 3(3): 148-75.
- **Ebani VV, Najar B, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F, Nardoni S.** Chemical composition and in vitro antimicrobial efficacy of sixteen essential oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. *Vet. Sci*. 2018; 5: 62;
- **Ebeling W.** Physicochemical mechanism for the removal of insect wax by means of finely divided powders. *Hilgardia*. 1961; 30: 531-64.
- **Elango G, Rahuman A, Kamaraj C, Bagavan A, Zahir A.** Adult emergence inhibition and adulticidal activity of leaf crude extracts against Japanese encephalitis vector, *Culex quinquefascitus*. *J King Saud Univ Sc*. 2012; 24:73-80.

- **El Zayyat EA, Soliman M, Elleboundi M, Offa S.** Bioefficay of some Egyptian aromatic plants on *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) adults and larvae. *J Arthropod Borne Dis.* 2017;11(1):147-155.
- **Enan EE.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol.* 2001; 130:325–337.
- **Enan EE.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from american cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Arch Insect Bioch Physiol.* 2005 a; 59 (3), 161-71.
- **Enan EE.** Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005b; 35(4): 309-21.
- **Farag MA, Ezzat SM, Salama MM, Tadros MG, Serya RA.** Anti-acetylcholinesterase activity of essential oils and their major constituents from four *Ocimum* species. *Z. Nat C.* 2016; 71(11):393-402.
- **Fauci A S, Morens D M.** Zika virus in the Americas – yet another arbovirus threat. *N Eng J Med.* 2016; 37(4):601-04.
- **Fazal S, Manzoor F, Latif AA, Munir N, Pervaiz M.** Larvicidal activities of five essential oils against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Asian Journal of Chemistry.* 2013; 25(18):10212-10216.
- **Fettig CJ, McKelvey SR, Dabney CP, Huber PW, Lait CG, Fowler DL, Borden JH.** Efficacy of “Verbenone Plus” for Protecting Ponderosa Pine Trees and Stands from *Dendroctonus brevicomis* (Coleoptera: Urculionidae) Attack in British Columbia and California. *J Econ Entomol.* 2012; 105(5): 1668-80.
- **Fontes UR Jr, Ramos CS, SerafiniMR, Cavalcanti SCH, Alves PB, LimaGM, Andrade PHS, Bonjardim LR, Quintans LJ Jr, Araújo AAS.** Evaluation of the lethality of *Porophyllum ruderale* essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11:3169–72.
- **Franca SM, de Oliveira JV, Esteves Filho AB, de Oliveira CM.** Toxicity and repellency of essential oils to *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) in *Phaseolus vulgaris* L. *Acta Amaz.* 2012; 42(3):381–86.
- **Frances SP & Wirtz RA.** Repellents: past, present, and future. *J Am Mosq Control Assoc.* 2005; 21 (sp1): 1-3.
- **Frederik Nijhout H.** Insect Hormones. Princenton University.1994.
- **French L, Rodríguez MM, Bisset JA, Ricardo Y, Gutiérrez G, Fuentes I.** Actividad incrementada de las enzimas citocromo P450 monooxigenasas en cepas cubanas de *Aedes aegypti* de referencia, resistentes a insecticidas. *Rev Cubana Med Trop.* 2013; 65(3): 328-38.
- **Gainza YA, Ferreira L, Pino O, Dias M, Roque E, de Souza AC.** Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Ind Crops Prod.* 2015; 76:647–52.
- **Geetha I, Pailey P, Padmanaban V, Balaraman K.** Oviposition, response of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolite(s) of the fungus, *Trichoderma viridae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:223–26.

- **Gerhardt RR, Gottfried KL, Apperson CS, Davis BS Erwin PC, Smith AB et al.** First isolation of La Crosse virus from naturally infected *Aedes albopictus*. *Emerg Infect.Dis.* 2001; 7:807-11.
- **Ghosh A, Chowhury N, Chandra G.** Plants extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res.* 2012; 135(5): 581–98.
- **Giatropoulos A, Papachristos D, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou M, Emmanouel N, Michaelakis A.** Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitol Res.* 2012 DOI 10.1007/s00436-012-3074-8.
- **Giatropoulos A, Kimbaris A , Michaelakis A , Papachristos D, Polissiou MG , Nickolaos E.** Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. *Parasitol.Res.*2018; 117:1953–1964.
- **Gillij YG, Gleiser RM, Zygodlo JA.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Biores Techn.* 2008; (99): 2507–15.
- **Gómez-Palacio A, Suaza-Vasco J, Castaño S, et al.** Infección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia. *Biomédica* 2017; 37(Supl.2):135-42
- **González R, Marro E.** *Aedes albopictus* in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc.* 1999; 15:569-70.
- **González-Broche R.** Culícidos de Cuba. Instituto Cubano del Libro. La Habana: Editorial Científico Técnica; 2006.
- **Govindarajan M** Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* .2010;874-877.
- **Govindarajan M, Mathivanan T, Elumalai K, Krishnappa K, Anandan A.** Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J Trop Biom.* 2011;1(1):43-8.
- **Govindarajan M, Sivakumar R.** Adulticidal and repellent properties of indigenous plant extracts against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasitol Res.* 2012: 110: 1607-20.
- **Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Yogalakshmi K.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae) *Experim.Parasitol.* 2013; 134: 7–11.
- **Govindarajan M, Rajeswary M, Arivoli S.** Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: An eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors? *Parasitol. Res.* 2016; 115: 1807–1816.

- **Gratz NG.** Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol.* 2004; 18: 215- 27.
- **Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G Muzzoli M Andreotti E Tognolini M Maldonado ME Bruni R.** Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern Ecuador. *Environ Toxicol Pharm.* 2009; 27: 39–48.
- **Gunderson CA, Samuelian JH, Evans CK.** Effects of the mint monoterpene pulegone on *Spodoptera eridinan* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol.* 1985; 14:859-63.
- **Gutiérrez Y, Montes R, Scull R, Sanchez A, Cos P, Monzote L, Setzer WN.** Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chem Biod.* 2016; 13: 1715 –19.
- **Guzmán MG, Kourí G, Martínez E.** Fiebre hemorrágica del dengue con síndrome de choque en niños cubanos. *Bol of Sanit Panam.* 1988; 104(3): 235-43.
- **Guzmán MG, Kouri G.** Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases.* 2002;2(1):33-42.
- **Guzmán MG.** Treinta años después de la epidemia cubana de dengue hemorrágico en 1981. *Rev Cubana Med Trop.* 2012; 64(1).
- **Hemingway J, Perilla RP, Rodríguez AD, James BM, Edje W.** Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale trial in southern Mexico. *Pestic Sci.* 1997; 51:375-82
- **Herrera JM, Zunino MP, Dambolena JS, Pizzolitto RP, Ganán NA, Lucini EI, et al.** Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crops Prod.* 2015; 70: 435–42.
- **Hincapié CA, Monsalve Z, Parada K, Lamilla C, Alarcón J, Céspedes CL & Seigler D.** Insect growth regulatory activity of *Blechnum chilense*. *Nat Prod Comm.* 2011; 6(8): 1085-58.
- **Holick J, Kyle A, Ferraro W, Delaney RR, Iwaseczko M.** Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in south eastern Pennsylvania. *J Am Mosq Control. Assoc.* 2002; 18:131.
- **Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep.* 2006; 23:181-99.
- **Högnadóttir A, Rouseff RL.** Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *JChromatogr A.* 2003; 998:201–11.
- **Hossain CHF, Al-Amin M, Sayem A1, Hossain I, Tunan A, Hassan F, Kabir M, Nahar S.** Antinociceptive principle from *Curcuma aeruginosa*. *BMC Complement Alternat Med.* 2015; 15:191.
- **Huhn G, Sejvar J, Montgomery S, Dworkin M.** West Nile virus in the United States: An update on an emerging infectious disease. *American Family Physician, Research Library Core* 2003. pp 653.
- **Hyldgaard M, Mygind T., Meyer RL.** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 2012; 3, 12.

- **Iannacone J, Alvariño L, Mansilla J.** Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay* 2002; 6(1): 56-71.
- **Infante D, Martínez B, Sánchez Y, Pino O.** Efecto de aceites esenciales sobre cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels. *Rev Protec Veg.* 2013; 28(2):153-57.
- **Informe Final de Proyecto 2011.** Proyecto de Investigación Aplicada CIIQ-Quimefa: Aceite de Trementina, materia prima eco-sostenible para generación de derivados con alto valor agregado aplicables a la industria farmacéutica y agroquímica Código 02-03-09 CIIQ-MINBAS. 2011. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/TiomnoOlinka>
- **Inghaninan, K.; Temkitthawon, P.; Chuenchom, K.; Yuyaem, T.; Thongnoi, W.** Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnophl.* 2003; 89: 261–264.
- **IRAC.** Web site at www.iraconline.org. visited date March 5th, 2012
- **Isman MB.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol.* 2006; 51:45-66.
- **Isman MB, Paluch G.** Needles in the haystack: exploring chemical diversity of botanical insecticides. 2011 pp. 248-265. In: *Green Trends in Insect Control* (O. Lopez and J.G. Fernandez-Bolanos, eds.), Royal Society of Chemistry.
- **Isman MB.** Pesticides Based on Plant Essential Oils: Phytochemical and Practical Considerations CORNELL UNIV, 2016 | <http://pubs.acs.org> Publication Date (Web): August 25, 2016 | doi: 10.1021/bk-2016-1218.ch002
- **ISI Database ISI Web of Knowledge, Thompson-ISI, London.** 2005 Available on-line at: <http://portalt.wok.mimas.ac.uk/portal>
- **ISO International Standardization Organization. ISO 65-71.** Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).
- **Jankowska M , Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M.** Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review *Molecules* 2018; 23:34.
- **Jarjal MS.** Toxic Effect of Garlic Extracts on the Eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): A Scanning Electron Microscopic Study. *J Med. Entomol.* 2001; 38(3):446-450.
- **Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP, Vivanco JM.** Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 5878-83
- **Jirovetz L, Buchbauer G, Puschmann C, Shafi MP, Nambiar MKG.** Essential oil analysis of *Curcuma aeruginosa* Roxb leaves from South India. *J Essential Oil Res.* 2000; 12: 47-49.
- **Kalaivani K, Senthil-Nathan S, Murugesan AG.** Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012; 110, 1261–1268.
- **Kamaraj Ch, Rahuman A.** Larvicidal and adulticidal potential of medicinal plant extracts from south India against vectors *Asian. J. Trop. Med.* 2010; 3(12):948-53.

- **Karemu CK, Ndung'u MW, Githua M.** Repellent effects of EOs from selected Eucalyptus species and their major constituents against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Int J Trop Insect Sci.* 2013; 33:188–194
- **Karr LL, Coats JR.** Effects of four monoterpenoids on growth and reproduction of the *Blatella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 1992; 85(2):424-9.
- **Kassir JT, Mohsen ZH, Mehdi NS** Toxic effects of limonene against *Culex quinquefasciatus* Say larvae and its interference with oviposition. *Anz Schidlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* 1989; 62:19–21.
- **Kéïta SM, Vincent C, Schmidt JP, Ramaswamy S, Bélanger A** Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res.* 2000; 36:355–64.
- **Khanikor B, Parida P, Yadav RNS, Bora D.** Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and docking studies. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3:6-12. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.30202>
- **Kim NJ, Byun SG, Cho JE, Chung K, Ahn YJ.** Larvicidal activity of *Kaempferia galangal* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. *Pest Manag Sci.* 2008; 64, 857–62.
- **Kim SI, Yoon JS, Jung JW, Hong KB, Ahn YJ, Kwon HW.** Toxicity and repellency of organum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. *J Asian Pacific Entomol.*2010; 13: 369–73.
- **Kiran SR, BhavaniK, Devi PS, Rao BRR, Reddy KJ** Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour Technol.*2006 doi:10.1016/
- **Ko K, Juntarajumnong W, Chandrapatya A.** Repellency, fumigant and contact toxicities of *Melaleuca cajuputi* Powell against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* Herbst. *Thai J Agri Sci.* 2009; 42(1):27–33.
- **Komalamisra N, Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Apiwathnasorn C.** Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *South Asian J TropMed Public Health.* 2005; 36:1412–22.
- **Koodalingam A, Mullainadhan P, Arumugam M.** Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae). *Acta Tropica.* 2011; 118: 27-36.
- **Koou S, Chong C, Vythilingam I, Lee C, Ng L.** Insecticide resistance and its underlying mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* adults (Diptera:Culicidae) in Singapore. *Parasit. Vectors* 2014; 7: 471.
- **Kourí G.** El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública.* 2006; 19:143-5.
- **Koul O, Singh G, Singh R, Singh J.** *Tribolium castaneum* exposed to anethole vapours at high temperature. *Biopestic Int.* 2007; 3:126–37.
- **Koul O, Singh R, Kaur B, Kanda D.** Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to

larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. Ind Crops Prod. 2013; 49: 428-36. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.032>

- **Koutsaviti K, Giatropoulus A, Piatrokili D, Paachristos D, Michaelakis A, Tzakou O.** Greek Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera :Culicidae). *Parasitol Res.* 2014 DOI 10.1007/s00436-014-4220-2
- **Kramer LD.** Invasive mosquitoes+ invasive viruses= a dangerous combination. 14th International Dengue Course 10-21 agosto 2015 disponible en <http://blue/bvs1/memorias/dengue2015/dengue2015-conf.htm>
- **Krimer V, Vastag Z, Radulovi L, Peri I.** Microencapsulation Technology and Essential Oil Pesticides for Food Plant Production. In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety; Preedy, V., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 123–9.
- **Kumarasinghe SP, Karunaweera ND, Ihalamulla RL, Arambewela LS, Dissanayake RD.** Larvicidal effects of mineral turpentine, low aromatic white spirits, aqueous extracts of *Cassia alata*, and aqueous extracts, ethanolic extracts and Essential oil of betel leaf (*Piper bettle*) on *Chrysomya megacephala*. *Int J Dermatol.* 2002; 41(12):877-80.
- **Kumar S ,Warikoo R, Wahab N.** Larvicidal potential of ethanolic extracts of dried fruits of three species of peppercorns against different instars of an indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2010; 107:901–907.
- **Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S.** Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (Family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Trop.* 2012, 212–18.
- **Kwon Y, Kim SH, Ronderos DS, Lee Y, Akitake B, Woodward OM, Guggino WB, Smith DP, Montell C.** *Drosophila* TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Curr Biol.* 2010; 20: 1672–78.
- **Lambrano RH, Castro NP, Gallardo KC, Stashenko E, Verbel JO.** Essential oils from plants of the genus *Cymbopogon* as natural insecticides to control stored product pests. *J Stored Prod Res.* 2015; 62: 81–3.
- **Larson RT, Lorch JM, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clarck GG, Lan Q.** The biological activity of α -mangostin, a larvicidal botanic mosquito sterol carrier protein-2 inhibitor. *J Med Entomol.* 2010; 47:249–257.
- **La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P et al.** First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(39):19676.
- **Lassiter MT, Apperson CS, Roe RM.** Juvenile hormone metabolism during the fourth stadium and pupal stage of the southern house mosquitoes *Culex quinquefasciatus* Say. *J Insect Physiol.* 1995; 41: 869-876.
- **Lee SE, Lee BH, Choi WS, Park BS, Kim JG, Campbell BC.** Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Pest Manag Sci.* 2001; 57:548–53.

- **Lee BH, Lee SE, Annis PC, Pratt SJ, Park BS, Tumaalii F.** Fumigant toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *J Asia Pacific Entomol.* 2002; 5(2):237–40.
- **Lee S, Peterson CJ, Coats JR.** Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J Stored Prod Res.* 2003; 39(1):77–85.
- **Lee YS, Kim J, Shin SC, Lee SG, Park IK.** Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour Fragr J.* 2008; 23:23–28.
- **Lee Y, Kim SH, Montell C.** Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron.* 2010; 67: 555–61.
- **Leyva M, Aguilera L, Tacoronte J, Montada D, Bello A, Marquetti MC.** Estudio de laboratorio del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) y su posible utilización para el control de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Rev. CNIC Cienc Biológ.* 2007a; 38(1):18-19.
- **Leyva M, Tacoronte J, Marquetti MC.** Composición química y efecto letal de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) en *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Rev Cubana Med Trop.* 2007b; 59 (2).
- **Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Montada D.** Actividad insecticida de tres aceites esenciales en *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Rev Cubana Med Trop.* 2008; 60(3).
- **Leyva M, French L, Pino O, Montada D, Morejón G, Castex M, Marquetti MC.** Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Americas. *Biomedica* 2017; 28(3)
- **Lin CM, Sheu SR, Hsu SC, Tsai YH.** Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control* 2010; 21:1710–1715.
- **Lucia A, Audino PG, Seccacini E, Licastro S, Zerba E, Masuh H.** Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J Amer Mosq Control Assoc.* 2007; 23: 299- 303.
- **Lucia A, Licastro S, Zerba E, Masuh H** Yield Chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomol Exp Appl.* 2008 doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x.
- **Lucia A, Licastro S, Zerba E , Gonzalez Audino P ,Masuh H.** Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. *Biores Technol.* 2009; 100: 6083–87.
- **Lucia A, Juan LW, Zerba EN, Harrand L, Marco M, Masuh HM.** Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of Eucalyptus essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *ParasitolRes;* 2012; 110(5): 1675-86.
- **Ludlam KW, Jachowski LA, Otto GF.** Potential vector of *Dirofilaria immitis*. *J Am Vet Med Assoc.* 1970; 157:1354-59.
- **Lupi E C, Hatz Schlagenhauf P.** The efficacy of repellents against *Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes* spp.—a literature reviews. *Travel Med. Infect.* 2013; 11: 374–411.

- **Macedo MLR, Freire MGM, Silva MBR, Coelho LCBB.** Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus*, and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp Biochem Physiol.* 2007; 146:486–98.
- **Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA.** Chemical composition of *Eucalyptus spp.* EOs and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Vet Parasitol.* 2010; 167:1–7.
- **Madhu S, Vijayan VA, Shaukath A.** Bioactivity guided isolation of mosquito larvicide from *Piper longum*. *Asian Pacific J Trop. Med.* 2011:112-16.
- **Mahan K, Scout S.** Nutrición y dietoterapia de Krause. Editorial McGraw-Hill Interamericana 2000. México.
- **Mann Ch.** 1493: Una nueva historia del mundo después de Colón. Editorial Katz, Buenos Aires Argentina 2013. Mastrangelo Stella (trad) 631 pp. ISBN 9789871566785.
- **Marquetti MC, Bisset J, Suárez S, Pérez O, Leyva M.** Bebederos de animales: depósitos a tener en cuenta por el programa de control de *Aedes aegypti* en áreas urbanas de Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2006; 58(1):40-3.
- **Marquetti MC, Bisset JA, Portillo R, Rodríguez MM, Leyva M.** Factores de riesgo de infestación pupal con *Aedes aegypti* dependientes de la comunidad en un municipio de Ciudad de la Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 2007; 59(1).
- **Marquetti MC, Bisset JA, Leyva M, García A, Rodríguez M.** Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2008; 60(1):62-7.
- **Marquetti MC, Leyva M, Bisset JA, García A.** Recipientes asociados a la infestación por *Aedes aegypti* en el municipio La Lisa. *Rev. Cubana. Med. Trop.* 2009; 61(3):232-8.
- **Marquetti MC, Carrazana M, Leyva M, Bisset JA.** Factores relacionados con la presencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en dos regiones de Cuba. *Rev. Cubana Med Trop.* 2010; 62(2):112-18.
- **Marquetti MC, Saint Jean MY, Fuster Callaba CA, Somarriba López L.** The first report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Haiti. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(2).
- **Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al.** Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.* 2012; 7:e41386.
- **Martínez-Habibe MC, Daly D, Pérez-Camacho J, Herrera-Oliver P.** A new species of *Bursera* (Burseraceae) from Cuba. *Brittonia.* 2013; 65(1): 62–65.
- **Marques AM, Velozo LS, Carvalho MA, Serdeiro MT, Honorio NA, Kaplan MA, Maleck M.** Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. *J Vect Borne.* 2017; 54: 61–68.
- **Masetti A.** The potential use of essential oils against mosquito larvae: a short review. *Bulletin of Insectology.* 2016; 69 (2): 307-310.

- **Melliou E, Michaelakis A, Koliopoulos G, Skaltsounis AL, Magiatis P.** High quality bergamot oil from Greece: chemical analysis using enantiomeric GC-MS and larvicidal activity against the West Nile virus vector. *Molecules*. 2009; 14:839–49.
- **Méndez F, Barreto M, Árias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al.** Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74:678-83.
- **Mesa F, Cardenas J, Villamil L.** Las encefalitis equinas en la salud pública. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. 2005 ISBN 958-701-598-3 disponible <http://www.paho.org/panaftosa>
- **Michaelakis A, Papachristos D, Kimbaris A, Koliopoulos G, Giatropoulos A, Polissiou MG.** Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2009; 105 (3):769–73.
- **Michaelakis A, Vidali PV, Papachristos DP, Pitsinos EM, Koliopoulos G, Couladouros EA, Polissiou MG, Kimbaris AC.** Bioefficacy of acyclic monoterpenes and their saturated derivatives against the West Nile vector *Culex pipiens*. *Chemosphere*. 2014; 96 :74–80.
- **Misni N, Othman H, Sulaiman S.** The effect of *Piper aduncum* Linn. (Family: Piperaceae) essential oil as aerosol spray against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse. *Tropical Biomedicina*. 2011; 28(2): 249–258.
- **Mohd Abd R, Afzan A, Ali R, Fasihah N, Wasiman M, Shiekh SH, Abdullah N, Ismail Z.** Effect of selected local medicinal plants on the asexual blood stage of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *BMC Complem Alternat Med*. 2014, 14:492.
- **Montada D, Castex M, Suárez S, Figueredo D, Leyva M.** Estado de la resistencia a insecticidas en adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio Playa, Ciudad de la Habana Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2005; 57 (2); 137-142.
- **Montada D, Calderón I, Leyva M, Figueredo D.** Niveles de susceptibilidad de una cepa de *Aedes aegypti* procedente de Santiago de Cuba ante los insecticidas lambda-dialotrina, cipermetrina y clorpirifos. *Rev Cubana Med Trop*. 2007; 59(1).
- **Montada D, Diéguez L, Llambias JJ, Bofill M, Codina A, Estévez S** Tratamiento con K-Othrine WG250 (deltametrina) en un área con alta infestación de *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop*. 2012; 64(3):330-334.
- **Montada D, Bisset D, Lazcano D, Castex M, Leyva M, San Blas O, González I.** Efectividad del Sipertrin en el control de *Aedes aegypti* en Santa Clara, Villa Clara. *Rev Cubana Med Trop*. 2013; 65(3).
- **Monzote L, Hill G M, Cuellar A, Scull R, Setzerb WN.** Chemical Composition and Anti-proliferative Properties of *Bursera graveolens* Essential Oil Natural Product Communications. 2012; 7(11).
- **Morales-Rico CL, Marrero-Delange David, González-Canavaciolo Víctor Luis, Quintana F, Camejo I.** Análisis multivariable de la composición química de aceite esencial de hojas de *Melaleuca quinquenervia* que crece en Cuba. *BLACMA*. 2014; 14 (5): 374 –384.

- **Morales-Saldaña J, Gómez N, Rovira J, Abrahams M.** Actividad larvicida de la toronja, *Citrus paradisi* (Rutaceae) sobre dos vectores del dengue. *Rev.Per.Biolog.* 2007; 14(2): 297-99.
- **Moreira MF, Santos AS, Marotta HR, Mansur JF, Ramos IB, et al.** A chitin-like component in *Aedes aegypti* egg shells, eggs and ovaries. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007; 37: 1249–61.
- **Muema JM, Bargul JL, Sospeter N, Onyango JO, Imbahale S.** Prospects for malaria control through manipulation of mosquito larval habitats and olfactory-mediated behavioural responses using plant-derived compounds. *Parasit Vectors.* 2017; 10:184
- **Murugan K , Kumar PM, Kovendan K , Amerasan D, Subrmaniam J, Hwang J.** Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2012; 111:1757–1769.
- **Nathanson JA, Hunnicutt EJ, Kantham L, Scavon C.** Cocaine as a naturally occurring insecticide. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1993; 90 (20), 9645e9648.
- **Napoleão TH, Pontual EV, Lima TA, Santos NDL, Sá RA, Coelho LCBB, Navarro DMAF, Paiva PMG.** Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol Res.* 2012; 110:609-16.
- **Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E.** Repellent activity of essential oils: A review. *Biores Technol.* 2010; 101:372–78.
- **Noleto Diaz C y Fernandez D.** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L (Díptera Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res.* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3687-6.
- **Noleto Dias C, Lima Alves LP, da Franca Rodrigues KA, Aranha Brito MC, dos Santos C, Mendonça do Amaral FM, dos Santos Monteiro O, de Aguiar Andrade EH, Soares Maia JG, Fernandes D.** Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from brazilian legal amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Hind Publish Corp Evid Based Complem Alternat Med.* 2015; Article ID 490765, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/490765>.
- **Noosidum A, Prabaripai A, Chareonviriyaphap T, Chandrapatya A.** Excito-repellency properties of essential oils from *Melaleuca leucadendron* L, *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon and *Litsea salicifolia* (Nees) on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *J Vect Ecol.* 2008; 33(2):305–12.
- **Nondenot ALR, Seri-Kouassi BP, Kouakou KH.** Insecticidal activity of essential oils from three aromatic plants on *Callosobruchus Maculatus* F. in Côte D'ivoire. *Eur J Sci Res.* 2010; 39(2):243–50.
- **OMS** Dengue y dengue hemorrágico. Nota descriptiva N-117. Revisión de mayo de 2008. WHO Media centre. OMS 2009.
- **OMS** Infección por el virus del Nilo Occidental. Nota descriptiva N°354 Julio de 2011.
- **Olagbemiro TO, Birkett MA, Mordue AJ, Pickett JA.** Production of (5-R, 6-S)-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the mosquito oviposition pheromone, from the seed oil of

the summer cypress plant, *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae). *J Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3411–15.

- **Oliveira G, Cardoso Lara C, Vieira T, Guimarães E, Figueiredo L, Martins E, Moreira D, Kaplan M.** Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *An Acad Bra Ciênc.* 2013; 85(4): ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690.
- **O'Meara GL, Evans JR, Gettman A.** Reduced mosquito production in cemetery vases with copper liners. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992; 8:419-420.
- **ONU.** Brundtland Report 1987 Disponible en <http://www.cfr.org/>
- **OPS.** Brote de dengue en Cuba, 2006. EER Noticias: Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de Las Américas. 2006;3(1).
- **OPS.** Reporte epidemiológico de chikungunya en Cuba. <http://temas.sld.cu/chikungunya/chikungunya+2014+Cuba> . Fecha de acceso 2014
- **OPS** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Fiebre amarilla, 7 de diciembre de 2018, Washington, D.C. OPS/OMS. 2018
- **PAHO.** Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Cuba. June 2016. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016.
- **PAHO.** Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Cuba. September 2017. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017.
- **Oviedo R, Gonzalez L.** Lista nacional de las plantas invasoras y potencialmente invasoras en la República de Cuba. *Bissea.* 2015; 9(2): 90pp.
- **Palacios S, Bertoni A, Rossi Y** Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). *Parasitol Res.* 2009; 106(1):207-12.
- **Panagiotakopulu E, Buckland PC, Day PM.** Natural insecticides and insect repellents in antiquity: A review of the evidence. *J Archaeol Sci.* 1995; 22: 705-710.
- **Park HM, Kim J, Chang KS, Kim BS, Yang YJ, Kim GH, et al.** Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna* and aqueous residue. *J Med Entomol.* 2011; 48(2):405–10.
- **Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja PA et al.** Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry.* 1997; 46:597-673.
- **Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, Wengel J et al.** Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry.* 1998; 49(4): 1069-1078.
- **Pastor S.** Biomonitorización citogenética de 4 poblaciones agrícolas expuestas a plaguicidas mediante el ensayo de micronucleos Tesis Doctoral Universidad autónoma de Barcelona, España. Departamento de genética y microbiología .2002.
- **Pavela R** Insecticidal activity of some essential oils against larva of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia.* 2005; 76:691–696.
- **Pavela R.** Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2008a; 102: 555.

- **Pavela R.** Insecticidal Properties of Several Essential Oils on the House Fly (*Musca domestica* L.). *Phytother Res.* 2008b; 22:274–78.
- **Pavela R.** Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitol Res.* 2015; 114:3835–3853.
- **Peraza I, Pérez M, Mendizábal ME, Valdés V, Leyva M, Marquetti MC.** Riqueza y distribución de especies de culícidos en la provincia La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2015; 67 (2).
- **Pérez M, Mendizábal ME, Peraza I, Molina RE, Marquetti MC.** Distribución espacial y temporal de los sitios de cría de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2014; 66(2): 252-62.
- **Pérez Viguera I.** Los ixódidos y culícidos de Cuba. Su historia natural y médica. Universidad de la Habana. 1956; 579pp.
- **Pérez O, Bisset JA, Leyva M, Rodríguez J, Fuentes O, García I, et al.** Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. Editorial Ciencias Médicas. Cuba. 2004.p 16-53. disponible en <http://blue/bvs1/monografias/manual.pdf>.
- **Pérez-Pacheco R, Rodríguez C Lara-Reyna J, Montes R, Ramírez G.** Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoo Mex.* 2004; 20(1): 141-52.
- **Perumalsamy H, Myung JJ, Jun-Ran K, Kadarkarai M, Young-Joon A.** Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Millettia pinnata* seed toward three mosquito species. *Parasit Vect.* 2015; 8:237.
- **Phasomkusolsil S, Soonwera M.** Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific J Trop Biom.* 2011; S113-18.
- **Pialoux G, Gaüzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M et al.** Chikunqunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 319–27.
- **Picard G, Valadeau C, Albán-Castillo J, Rojas R, Starr Jr, Callejas-Posada R, Bennett Sal, Arnason JT.** Assessment of in vitro pharmacological effect of neotropical piperaceae in GABA synergic bioassays in relation to plants traditionally used for folk illness by the Yanasha (Peru). *J Ethnopharmacol.* 2014; 155: 1500-07.
- **Piermarini P, Esquivel CJ, Denton J.** Malpighian tubules as novel targets for mosquito control. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14(2), 111; <https://doi.org/10.3390/ijerph14020111>.
- **Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa TM, Demedio J, Sanabria JL.** Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente a *Varroa destructor*. *Rev Prot Veg.* 2011; 26 (1).
- **Pino O, Sánchez Y, Rojas M.** Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends. *Rev Protec Veg.* 2013; 28(2).
- **Pitasawat B, Choochote W, Tuetum B, Tippawangkosol P, Kanjanapothi D, Jitpakdi A, Riyng D.** Repellency of aromatic turmeric *Curcuma aromatica* under laboratory and field conditions. *J Vect Ecol.* 2003; 28: 234–40.

- **Pitarokili D, Michaelakis A, Koliopoulos G, Giatropoulos A, Tzakou O.** Chemical composition, larvicidal evaluation, and adult repellency of endemic Greek Thymus essential oils against the mosquito vector of West Nile virus. *Parasitol Res.* 2011; 109(2):425-30.
- **Portero AG, González-Coloma A, Reina M, Díaz CE.** Plant defensive sesquiterpenoids from Senecios species with biopesticide potencial. *Pytochem Rev.* 2012; 11:391-403.
- **Prabhu K, Murugan K, Nareshkumar A, Ramasubramanian N, Bragadeeswaran S.** Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J Trop Biomed.* 2011; 1: 124–29.
- **Prajapathi V, Tripathi AK, Aggarwall KK, Kanuja SP.** Insecticidal repellent and oviposition-deterrente activity of selected essential oils against *An. stephensi*, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. *Bioresour Technol.* 2005; 96 (16): 1749-57.
- **Preedy** Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety Edited by Victor R. Preedy. ELSEVIER 2016.
- **Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Satelle DB.** Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British J Pharm.* 2003; 140:1363.
- **Prophiro J, Navarro da Silva M, Kanis LA, da Silva BM, Duque-Luna J E ,da Silva OS.** Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera sp.* in *Aedes aegypti*. *Parasitol Res.* 2012; 110:713–719.
- **Pupo-Antúnez M, Guzmán MG, Fernández R, Llop A, Dickinson FO, et al.** West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1022-1024.
- **Pupo-Antúnez M, Vázquez Y, Andonova M, Vázquez S, Morier L, et al.** Field Study: Searching for West Nile Virus in Cuba. *J Emerg Dis Virol.* 2018; 4(1)
- **Qiu S, Sun H, Zhang AX, Hong-Ying Y, Han Y, Wang XJ.** Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med* 2014; 12(6): 0401-0406.
- **Rathaur P, Waseem R, Ramteke PW, John S.** Turmeric: the golden specie of life. *Int J Pharm Sci Res.* 2012; 3:1987-94.
- **Rattan RS.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protect.* 2010; 29 913-20.
- **Reineri J, Harboch R, Kitching I.** Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae) based on morphological character of all life stages. *Zoo J Linn Soc.* 2004; 142:289-368
- **Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT.** Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu. Rev. Entomol.* 2012; 57: 405-24.
- **Ríos JL.** Essential oils: what they are and how the terms are used and defined. Chapter 1, In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety Edited by Victor R. Preedy. ELSEVIER 2016

- **Roark RC.** Some promising insecticidal plants. *Econ Bot.* 1947; 1:437–45.
- **Rocha Caldas GF, Rodrigo da Silva A, Valença Araújo A, Lopes Lafayette SS, Silva Albuquerque G, Costa Silva-Neto JA et al.** Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS One.* 2015; 10(8).
- **Rodríguez S D, Drake LL, Price DP, Hammond J, Hansen JH.** The efficacy of some commercially available insect repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Insect Sci.* 2015; 15(1): 140.
- **Rodríguez MM, Bisset JA, Milá L, Lauzán L, Soca A.** Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 1999; 51: 83-88.
- **Rodríguez M, Bisset J, Fernández DM, Soca A.** Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J Am Mosq Control Assoc.* 2000; 16:324-30.
- **Rodríguez M, Bisset J, Díaz C, Soca A.** Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutation-s-transferasa en *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop.* 2001; 53(1): 32-6.
- **Rodríguez M, Bisset J, Ruíz M, Soca A.** Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticidas induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol.* 2002; 39:882-8.
- **Rodríguez M, Bisset J, Díaz C, Soca A.** Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malatión. *Rev Cubana Med Trop.* 2003; 55(2):105-11.
- **Rodríguez M, Bisset J, De Armas Y, Ramos F.** Pyrethroid insecticida-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc.* 2005; 21:437-45.
- **Rodríguez MM, Bisset JA, Pérez O, Montada D, Moya M; Ricardo Y, Valdés V.** Estado de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en *Aedes aegypti* en el municipio Boyeros. *Rev Cubana Med Trop.* 2009; 61(2): 187-98.
- **Rodríguez MM, Bisset JA Ricardo Y, Pérez O, Montada D, Figueredo D, Fuentes I.** Resistencia a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997-2009. *Rev Cubana Med Trop.* 2010; 62(3): 217-23.
- **Rodríguez MM, Bisset JA, Hernández H, Ricardo Y, French L, Perez O,** Caracterización parcial de la actividad de esterasas en una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos. *Rev Cubana Med Trop.* 2012; 64(3):175-81.
- **Rodríguez MM, Bisset JA, Hurtado D, Montada D, Leyva M, Castex M, Hernández H, Fuentes I.** Estudio sobre la susceptibilidad a insecticidas en *Aedes aegypti* del Área de Salud Raúl Sánchez, Pinar del Río. *Rev Cubana Med Trop.* 2016; 68(2)
- **Rodríguez MM, Crespo A, Bisset JA, Hurtado D, Fuentes I.** Diagnostic doses of insecticides for adult *Aedes aegypti* to assess insecticide resistance in Cuba. *J Amer Mosq Control Assoc.* 2017;33:142-144
- **Roig JT.** Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tercera Edición Editora del Consejo Nacional de Universidades.1965:1142pp.

- **Rueda L, Patel K, Axtell R, Stinner R.** Temperature dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.*1990; 27 (5):892-98.
- **Rumiantsev I, Bagirov K, Askerov G.** On the use of oil of turpentine in control of flies. *Voen Med Zh.* 1961; 7:76-7.
- **Russo S, Cabrera N, Chludil H, Yaber-Grass M, Leicach S.** Insecticidal activity of young and mature leaves essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera:Tenebrionidae). *Chil J Agric Res* 2015; 75: 375–379.
- **Russell PK, Buenker EL, Cown JL, Ordoñez J.** Recovery of dengue viruses from patients during epidemic in Puerto Rico and East Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15(4): 573-579.
- **Russell BM, Kay BH, Shipton W.** Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the Northern Queensland dry season. *J Med Entomol.* 2001; 38: 441–45.
- **Sagnou M, Mitsopoulou KP, Koliopoulos G, Pelecanou M, Couladouros EA, Michaelakis A.** Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito. *Acta Trop.* 2012; 123:190– 95.
- **Sánchez-Seco MP, Negro AI, Puente S, Pinazo MJ, Shuffenecker I, Tenorio A et al.** Diagnóstico microbiológico del virus chikungunya importado en España (2006–2007): detección de casos en viajeros. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 457-461.
- **Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O** Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. *Rev Protección Veg.* 2012; 27(2).
- **Sanford JL, Shields VDC, Dickens JC.** Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-013-1021-x>
- **Santos SRL, Silva VB, Melo M, Barbosa JDF, Santos RLC, de Sousa DP, Cavalcanti SC.H.** Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. *Vect Borne Zoo Dis.* 2010a; 10(10).
- **Santo SRL, Mela MA, Cardoso AV, Santos RLC, Sousa DP, Cavalcanti SCH.** Structure activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* (L) *Chemosphere* 2010b; doi10.1016/j
- **Santos G, Dutra K, Lira C, Lima B, Napoleão Th, Paiva P, MaranhãoC, Brandão S, Navarro D.** Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. *Molecules.* 2014; 19: 16573-16587.
- **Saralegui BH.** Flora de la República de Cuba. Piperaceae. 2004; Fascículo 9(3):1-5.
- **Sardelis MR, Turell MJ, O'Guinn ML, Andre RG, Roberts DR.** Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc.* 2002; 18: 284-89.

- **Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schöneberg I, Günther S, Stark K, Frank C.** Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill.* 2010; 15(40):19677.
- **Schmidt E.** Production of Essential Oils. Chapter 4 Handbook of essential oils Science, Technology, and Applications. Taylor & Francis Group 2010. <http://www.taylorandfrancis.com>.
- **Schubert F, Palsson K, Santangelo E, Borg-Karlson AK.** Sulfate turpentine: a resource of tick repellent compounds *Exp Appl Acarol.* 2017; 72:291–302
- **Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR, Arnason JT.** A review of Piper spp. Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phyto Reviews.* 2008; 7(1): 65-75.
- **Seo SM, Jung CS, Kang J, Lee HR, Kim SW, Hyun J, Park IK.** Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus*. *Form Develop. J Agric Food Chem.* 2015; 63, 9977–86.
- **Seyler T, Rizzo C, Finarelli AC, Po C, Alessio P, Sambri V et al.** Autochthonous chikungunya virus transmission may have occurred in Bologna, Italy, during the summer 2007 outbreak. *Euro Surveill.* 2008; 13 (Suppl 3).
- **Shallan EAS, Canyonb D, Younesc MWF, Abdel-Wahaba H, Mansoura AH.** A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int.* 2005; 3:1149–66.
- **Shanmugavelu M, Baytan AR, Chesnut SJ, Bonning BC.** A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissues and pericardial cells of the tobacco horn worm *Manduca sexta* L. *J Biol Chem* 2000; 275 :1802-06.
- **Sharopov F, Satyal P, Nasser A, Awadh A, Pokharel S, Zhang H, Wink M, Muhammadsho A, Setzer WN** The Essential Oil Compositions of *Ocimum basilicum* from three different Regions: Nepal, Tajikistan, and Yemen *Chem. Biodiversity.* 2016, 13, 241–48.
- **Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH.** Economic impact of Dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 200-207.
- **Silva G.** Insecticidas vegetales. 2002. En: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/GSilvaSp.htm> (Consultado: 11-12-2006).
- **Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH** Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Biores Technol.* 2008;
- **Silva CJ.** Morfoanatomia foliar e composição química dos oleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca* L (Myrtaceae) cultivadas em Brasil. [Tese de Mestrado]. Universidad Federal de Viçosa, Brasil. 2007.
- **Singha S, Chandra G.** Mosquito larvicidal activity of some common spices and vegetable waste on *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific J Trop Med.* 2011; 288–93.
- **Smith Vera S, Zambrano DF, Méndez-Sanchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko E, Duque Luna JE.** Essential oils with insecticidal activity against larvae

of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2014 DOI 10.1007/ s00436-014-3917-6.

- **Soares WL, Porto MFS.** Pesticide use and economic impacts on health. *Rev Saúde Pú. 2012; 46:209-17.*
- **Solomon B, Sahle F, Gebre-Mariam T, Asres K, Neubert R.** Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 80:61–66.
- **Souza TM, Farias DF, Soares BM, Viana MP, Lima GPG, Machado LKA, Morais S M, Carvalho AFU.** Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Nontarget Animals. *J Med Entomol.* 2011; 48(4): 846-851.
- **Souza LGS, Almeida MCS, Monte FJQ, Santiago GMP, Braz-Filho R, Lemos TLG, Gomes CL, Nascimento RF.** Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. *Quim Nova* 2012; 35:2258–2262.
- **Sousa R M O. F, Rosa JS. Silva CA, Almeida M T M, Novo M.T, Cunha AC, Fernandes-Ferreira M.** Larvicidal, molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. *J Pest Sci* .2014. DOI 10.1007/s10340-014-0628-9.
- **Specos MM, Garcia JJ, Tornesello J, Marino P, Vecchia MD, Tesoriero MD, Hermida LG.** Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2010; 104: 653–658.
- **Squires JM, J.G. Foster, D.S. Lindsay, D.L. Caudell, A.M. Zajac.** Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and sheep. *Vet Parasitol.* 2010; 175: 103-08.
- **Súarez S, Montada D, Fuentes O, Castex M, Leyva M.** Efecto de la resistencia a los insecticidas sobre algunos parámetros demográficos de 3 cepas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Rev Cubana Med Trop* 1999; 50(2): 124-8.
- **Suárez S, Montada D, Castex M, Navarro A, Leyva M.** Efecto de las dosis subletales de temefos sobre la supervivencia, reproducción y crecimiento poblacional de *Aedes aegypti*. *Rev Lat Microb* .2002; 44(4).
- **Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR.** Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am MosqControl Assoc.* 1991; 7:210–37.
- **Sakulkua U, Nuchuchuaa O, Uawongyartb N, Puttipipatkachornc S, Soottitantawatd A, Ruktanonchaia U.** Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *Int J Pharm Nanotechnol.* 2013; 372: 105–111.
- **Suthisut D, Fields PG, Chandrapatya A.** Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *J Stored Prod Res* 2011; 47:222–30.
- **Talbert R, Wall R.** Toxicity of essential and non-essential oils against the chewing louse, *Bovicola (Werneckiella) ocellatus*. *Res Vet Sci.* 2011.

- **Tak JH, Isman MB.** Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Scientific Reports*. 2017; 7:42432.
- **Tang CP, Chen T, Velten R, Jeschke P, Ebbinghaus-Kintscher U, Geibel S, Ye Y.** Alkaloids from stems and leaves of *Stemona japonica* and their insecticidal activities. *J Nat Prod* 2008; 71 (1), 112e116.
- **Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara V, Techadamrongsin YJ.** Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J Vector Ecol*. 2001; 26: 76–82.
- **Tawatsin A.A., U. Thavara, P. Wongsinkongman, J. Bansidhi, T. Boonruad, P. Chavalittumrong, et al** Repellency of essential oils extracted from plants in Thailand against four mosquito vectors (Diptera: Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *S Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37: 915–31.
- **Tighe S, Gao Y-Y, Tseng SCG.** Terpinen-4-ol is the most active ingredient of tea tree oil to kill *Demodex mites*. *Trans Vis Sci Tech*. 2013; 2(7):2 <http://tvstjournal.org/doi/full/10.1167/tvst.2.7.2>, doi: 10.1167/tvst.2.7.2
- **Tipping PW, Martin MR, Pratt PD, Wheeler GS, Gettys LA.** Response of two chemotypes of *Melaleuca quinquenervia* (Myrtales: Myrtaceae) saplings to colonization by specialist herbivores. *Fla Entomol*. 2016; 99: 77–81.
- **Tolozá AC, Zygodlo J, Mougabure G, Biurrun F, Zerba E, Picollo MI.** Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J Med Entomol*. 2006; 43:889–95.
- **Tong F, Coats JR.** Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and ³⁶Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pest Biochem Physiol*. 2010; 98: 317–324.
- **Torres Armijos CK.** Diseño y desarrollo de una crema repelente a partir del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens*. Tesis para optar por el título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador 2012.
- **Torres E, Moreno R, Tamayo Y, Hermosilla R, Guillén Z.** Estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los rizomas de *Curcuma longa* L. *Rev. Quím Viva* 2014(2).
- **Traboulsi A, El-Haj S, Tueni M, Taoubi K, Abi Nader N, Mrad A.** Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci*. 2005; 61:597–604.
- **Trilles BL, Bombarda I, Bouraima-Madjebi S, Raharivelomanana P, Bianchi JP, Gaydou EM.** Occurrence of various chemotypes in niaouli (*Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake) essential oil from New Caledonia. *Flav Fragran J*. 2006; 21:677–682.
- **Tripathy AK, Prajapati V, Aggarwal K, Kumar S.** Toxicity, feeding deterrence and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Econ Entomol*. 2001; 94:979–83
- **Tripathy AK, Samanta L, Sachidananda D, Parida S, Marai n, Hazra RK, et al** .The mosquitocidal activity of methanolic extracts of *Lantana camara* Root and *Anacardium*

occidentale leaf: role of GST in insecticidal resistance. *J Med Entomol.* 2011; 48(2):291-295.

- **Tuetun D, Champakaew B, Pitasawat.** Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia.* 2005; 78(5): 359–364.
- **Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, O’Guinn ML.** Potential north American vectors of West Nile virus. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 951: 317-24.
- **Turchen LM, Piton LP, Dall’Oglio EL, Butnariu AR, Pereira MJ.** Toxicity of *Piper aduncum* (Piperaceae) essential oil against *Euschistus heros* (F.) and non-effect on egg parasitoids. *Neotrop Entomol.* 2016; 45(5):604-611.
- **Vacacela Ramón M.** Diseño y desarrollo d e una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie *Bursera graveolens*. Tesis para optar por el titulo de Bioquimico Farmaceutico .Universidad Tecnica Particular de Loja. Ecuador 2012.
- **Valarmathy D, Govindaraju M, Elumalai K.** Studies on Ovicidal activity of plant essential oil frommulation against the eggs of important vector mosquitoes, *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.) at laboratory condition. *Int J Curren Res.* 2011; 6 (33):378–81.
- **Vargas M.** An update on published literature (period 1992-2010) and botanical categories on plant essential oils with effects on mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bol Mal Salud Amb.* 2012; (2): 143-193.
- **Vasantha-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Ponsankar A, Thanigaivel A, Edwin E, Selin-Rani et al.** Comparative analysis of mosquito (Diptera: Culicidae): *Aedes aegypti* responses to the insecticide Temephos and plant derived essential oil derived from *Piper betle* L. *Ecotox Environ Safety* 2017; 139: 439–446.
- **Vontas JG, Small GJ, Hemingway J.** Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2001; 357: 65-72.
- **Wadley L, Stevers Ch, Bamford M et al.** Middle slone age bedding construction and settlement patterns of Sibudu South Africa. *Sience.* 2011; 334 (6061):1386-1391.
- **Warikoo R, Wahab N, Kumar S.** Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Parasitol Res.* 2011.
- **Ware GW, Whitacre DM.** The Pesticide Book.2004 6th Ed. 496 pp.Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.ISBN 1892829-11-8.
- **Waliwitiya R, Kennedy CJ, Lowenberg CA.** Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* 2009; 65:241–48.
- **Waliwitiya R, Nicholson RA, Kennedy CJ, Lowenberger CA** The synergistic effects of insecticidal essential oils and piperonyl butoxide on biotransformational enzyme activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2012; 49:614–623.
- **Wang JL, Li Y, Lei CL.** Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Nat Prod Res.* 2009; 23B:1080–88.

- **Wekesa I, Onek LA, Deng AL, Hasanali A, Othira JO.** Toxicity and repellent potency of *Hyptis spicigera* extracts on *Sitophilus zeamidis motschulsky* (Coleoptera: Curculionidae). *J Stored Prod Posth Res.* 2011; 2(6): 113-19.
- **WHO** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- **WHO.** Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4.
- **WHO** Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations Interim guidance for entomologists.2016 WHO/ZIKV/VC/16.1.
- **WHO** Zika Strategic Response Plan June 2016 WHO/ZIKV/SRF/16.3.
- **WHO.** World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever Fact Sheet Number 117. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> (2016).
- **WHO.** Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases was produced by WHO's Department of Control of Neglected Tropical Diseases. 2017: 278 pp. WHO/HTM/NTD/2017.01
- **Wheeler GS, Pratt PD, Giblin-Davis RM, Ordnung KM** .Intraespecific variation of *Melaleuca quinquinervia* leaf oils in its naturalized range in Florida, the Caribbean and Hawaii. *Biochem Syst Ecology.*2007; 35: 489-500.
- **William CM.** Hormonal interactions between plants and insects IN Sondheimer E and Simeone JB (eds) *Chemical Ecology.* 1970. Academic. Prees, New York pp 103-132.
- **Wink M.** Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites pp 1-17. In M Wink (ed). *Biochemistry of Plant Secondary metabolism.* Annual Plant Reviews. 2006. Sheffield Academic Press Ltd.London UK.374pp.
- **Wren RC.** Enciclopedia de medicina herbolaria y preparados botánicos. 3 ed. Trad. Edwin Moller. México, Grijalbo. 1994; (2) 706 pp.
- **Xia Y, Wang G, Buscariollo D, Pitts J ,Wenger RH, Zwiebel L,** The molecular basis of olfactory-based behavior in *Anopheles gambiae* larvae. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2008; 105: 6433–6438.
- **Yang YC, Choi HC, Choi WS, Clark JM, Ahn YJ.** Ovicidal and Adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Agric Food Chem.* 2004; 52:2507–11.
- **Yang P, Ma Y, Zheng S.** Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J Pestic Sci.* 2005; 30:84–89.
- **Yáñez X, Pérez O, Meza H.** Actividad larvicida del aceite esencial foliar de *Eucalyptus globulus* contra *Aedes aegypti* Linnaeus. *Bistua.* 2010; 8 (1):71-77.
- **Yoon C, Kang SH, Yang JO, Noh DJ, Indiragandhi P, Kim GH.** Repellent activity of citrus oils against the cockroaches *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* and *P. fuliginosa*. *J Pestic Sci.* 2009; 34(2):77–88.
- **Yones DA, Bakir HY, Bayoumi SAL.** Chemical composition and efficacy of some selected plant oils against *Pediculus humanus capitis* in vitro. *Parasitol. Res.* 2016; 115:3209–3218.

- **Zahran HEDM, Abd El Galeil SAM** Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Cx. pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *J Asia Pacific Entomol.* 2011; 14:46–51.
- **Zanno PR, Miura I Nakanishi K, ElderDL.** Structure of the insect phago repellent azadirachtin. *J Amer Chem Soc.* 1975; 97:1975-1977.
- **Zarrad K, Hamouda AB, Chaieb I, Laarif A, Jemâa JM.** Chemical composition, fumigant and anti-acetyl-cholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Ind Crops Prod.* 2015; 76:121-7.
- **Zelck UE, Janowsky VB.** Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS-induced changes in expression. *Parasitol.* 2004; 128: 493-501.
- **Zhu J, Zeng X, Ma Y, Liu T, Qian K, Han Y, Xue S, Tucker B, Schultz G, Coats J, RowleyW, Zhang A.** Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. *J AmerMosq Control Assoc.* 2006; 22: 515-22.
- **Zhu J, Zeng X, O'Neal M, Schultz G, Tucker B, Coats J, Bartholomay L, Xue R-D.** Mosquito larvicidal activity of botanical-based mosquito repellents. *J Amer Mosq Control Assoc.* 2008; 24: 161–168.
- **Zielinski-Gutierrez E, Raw R, Nasci S:** Protection against mosquitoes, ticks and other insects and arthropods. In CDC Health Information for International Travel (“The Yellow Book”).Atlanta: Centres for Disease Control and Prevention; 2010.
- **Zwiebel LJ, Takken W.** Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34: 645–652.

ANEXOS

ANEXO 1

PUBLICACIONES DE LA TESIS

- **Leyva M**, Tiomno O, Tacoronte JE, Marquetti MC, Montada D Essential Plant Oils and Insecticidal Activity in *Culex quinquefasciatus* Insecticides – Pest Engineering ISBN 978-953-307-895-3 Ed Intech. 2012; 221-238pp.
- **Leyva M**, Castex M, Montada D, Quintana D, Lezcano D, Marquetti MC, Companioni A, Anaya J, González I. Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. *Anal. Biolog.* 2012; 34: 47-56.
- **Leyva M**, Marquetti MC, French L, Montada D, Tiomno O, Tacoronte JE. Efecto de un aceite de trementina obtenido de *Pinus tropicalis* Morelet 1851 sobre la biología de una cepa de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 resistente a insecticidas. *Anal. Biolog.* 2013; 35:75-84.
- **Leyva M**, French L, Marquetti MC, Montada D, Castex M, Tiomno O Tacoronte JE Aceite de trementina modificado: un inhibidor de la actividad de las enzimas detoxificadoras en dos cepas de *Aedes aegypti*. *Biomedica.* 2015; 26(1).
- **Leyva M**, French L, Marquetti MC, Montada D, Santos D, Hernandez A, Tacoronte JE Actividad insecticida de aceite de trementina modificado en *Culex quinquefasciatus* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Tropical* 2015; 67 (3).
- **Leyva M**, French-Pacheco L, Quintana F, Montada D, Castex M, Hernandez A, Marquetti MC. *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtaceae: Myrtaceae): Natural alternative for mosquito control. *Asian Pacific J Trop Medicine.* 2016; 9 (9):1-5.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS

- **Leyva M**, Aguilera L, Tacoronte J, Montada D, Bello A, Marquetti MC. Estudio de laboratorio del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) y su posible utilización para el control de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Rev. CNIC Cienc Biológ.* 2007a; 38(1):18-19.
- **Leyva M**, Tacoronte J, Marquetti MC. Composición química y efecto letal de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) en *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Rev Cubana Med Trop.* 2007b; 59 (2).
- **Leyva M**, Tacoronte JE, Marquetti MC, Montada D. Actividad insecticida de tres aceites esenciales en *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Rev Cubana Med Trop.* 2008; 60(3).
- **Leyva M**, Tacoronte JE Marquetti MC, Scull R, Montada D, Rodríguez Y, Bruzón Y. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop.* 2008; 60(1):78-82.

- **Leyva M**, Tacoronte JE, Marquetti MC, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D. Utilización de aceites esenciales de pináceas endémicas como una alternativa de control en *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop*. 2009a; 61(3):239-43.
- **Leyva M**, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D. Actividad larvívica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L) (Díptera: Culicidae). *Rev Biomed*. 2009b; 20(1): 5-13.
- **Leyva M**, French L, Pino O, Montada D, Morejón G, Castex M, Marquetti MC. Plantas con actividad insectívica: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Américas. *Biomedica* 2017; 28(3).

RESULTADO RELEVANTE INSTITUCIONAL AÑO 2016

- 1) Aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae): una alternativa natural y ecosostenible para el control de mosquitos de importancia médica y veterinaria. **Maureen Leyva**, Felipe Quintana, Leidys French, María del Carmen Marquetti, Mayda Castex, Domingo Montada, Ariel Hernández, Ariamys Companioni, Jorge Anaya.

TRABAJOS PREMIADOS EN EVENTOS

- 1) XVI Forum de Ciencia y Técnica 2014. Jornada de Base, Municipal (Relevante), Jornada Provincial (Destacada). Actividad insectívica de un aceite de trementina en 3 especies de mosquitos vectores de enfermedades.
- 2) Forum de Ciencia y Técnica 2017 Jornada de Base (Relevante) Jornada Municipal (Destacada) Aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae): una alternativa natural y ecosostenible para el control de mosquitos de importancia médica y veterinaria.
- 3) I Jornada Científica de Maestros y Doctorandos en el marco de actividades científicas por el 80 Aniversario. Utilización de plantas como una alternativa para el control vectorial (Premio) abril 2017.
- 4) II Jornada Científica de Maestros y Doctorandos IPK. Evaluación de la actividad insectívica de aceites esenciales de plantas cubanas sobre los vectores de importancia médica *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* (Díptera Culicidae) abril 2018 (PREMIO).

TESIS TUTOREADAS RELACIONADAS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS

- Actividad larvívica, adultívica e inhibidora del desarrollo de un aceite de trementina modificado en *Culex quinquefasciatus* y *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae). Tesina para optar por el título de Técnico Medio en Química Alumno: David Santos Pérez, Escuela Mártires de Girón. diciembre 2013.

- Actividad insecticida de tres aceites esenciales de plantas en dos poblaciones de *Aedes aegypti*. Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología. Alumna: Gisel Morejón, Facultad Biología Universidad de la Habana julio 2017.
- Actividad insecticida de los aceites esenciales obtenido de los rizomas de *Curcuma longa* Linn y *Curcuma aeruginosa* Roxb (Zingiberales: Zingiberaceae) sobre tres especies de mosquitos. Tesis para optar por el título de Doctor en Zootécnia y Medicina Veterinaria. Alumno Edilfredo Ávila Bornot, Centro de Estudio de Química Aplicada de la Universidad de Granma julio 2017.

Eventos científicos

- 1) **XII Curso Internacional de Dengue 2011.** Evaluación de diferentes formulaciones experimentales a base del aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* como repelentes.
- 2) **Congreso Internacional LABIOFAM 2012.** Efecto del aceite de trementina obtenido de pinaceas sobre la biología de larvas de *Aedes aegypti*.
- 3) **Convención de Salud 2012.** Utilización de Plantas como una alternativa al control de mosquitos.
- 4) **XIII Taller de Dengue 2013.** Efecto de un aceite de trementina obtenido de *Pinus tropicalis* sobre la biología de una cepa de *Aedes aegypti* resistente a insecticidas.
- 5) **XVI Forum de Ciencia y Técnica 2014 (Base, Municipal (Relevante), provincial (Destacada).** Actividad insecticida de un aceite de trementina en 3 especies de mosquitos vectores de enfermedades.
- 6) **LABIOFAM 2014.** Actividad insecticida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en *Aedes aegypti*.
- 7) **IX Taller Nacional de Vigilancia y Lucha Antivectorial y III Simposio Internacional sobre Control Integrado de Vectores Transmisores de Enfermedades al Hombre y Los Animales 2014.** Efecto inhibitor del desarrollo de un aceite de trementina modificado en tres especies de mosquitos.
- 8) **8vo Congreso de Microbiología y Parasitología. V Congreso Nacional de Medicina Tropical. III Simposio sobre VIH/Sida en Cuba 2014.** Efecto de un aceite de trementina modificado en la actividad de las enzimas detoxificadoras de una cepa susceptible y resistente a insecticidas de *Aedes aegypti*.
- 9) **III Jornada Científica de Organización de Integración para el Bienestar Social Diciembre 2014.** Actividad insecticida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*.
- 10) **CUBAZOO 2015.** Utilización de plantas con propiedades medicinales como una alternativa para el control de mosquitos.
- 11) **X Convención Internacional sobre Medio Ambiente 2015.** *Melaleuca quinquenervia* Una alternativa ecosostenible para el control vectorial.
- 12) **XIV Curso Internacional de Dengue 2015.** *Melaleuca quinquenervia* Una alternativa ecosostenible para el control vectorial.
- 13) **Naturaleza 2015.** *Melaleuca quinquenervia* una alternativa ecosostenible para el control vectorial.
- 14) **Cubazoo 2016.** Lo promisorio y lo ecosostenible de *Me. quinquenervia* como un método de control alternativo contra vectores de importancia médica y veterinaria.
- 15) **Conservación de la Diversidad Biológica en Cuba 2016.** Aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae): una alternativa natural y ecosostenible para el control de mosquitos de importancia médica y veterinaria.

- 16) **IV Simposio Internacional sobre Vigilancia, Monitoreo y Control de Vectores implicados en la transmisión de enfermedades zoonóticas. 2016.** Plantas de nuestro entorno con propiedades medicinales como una alternativa para el control vectorial"
- 17) **Jornada Nacional de Botánica 2017.** Evaluación de plantas medicinales como una alternativa para el control Vectorial.
- 18) **I Jornada Científica de Maestros y Doctorandos en el marco de actividades científicas por el 80 Aniversario mayo 2017.** Utilización de plantas como una alternativa para el control vectorial (Premio) abril 2017.
- 19) **15 Curso Internacional de Dengue.** Evaluación de plantas medicinales como una alternativa para el control Vectorial.
- 20) **Forum Municipal de Ciencia y Técnica Base y Municipal Mayo, Septiembre 2017.** Aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae): una alternativa natural y ecosostenible para el control de mosquitos de importancia médica y veterinaria.
- 21) **Congreso 80 aniversario. 2017.** Actividad bioplaguicida de plantas medicinales contra *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*.
- 22) **Conservación de la Diversidad Biológica en Cuba. 2017.** Plantas con actividad insecticida una alternativa de control: Estado actual de la temática en las Américas.
- 23) **CUBASALUD 2018.** Bioactividad de plantas como un método alternativo para el control de mosquitos. **abril 2018.**
- 24) **II Jornada Científica de Maestros y Doctorandos IPK.** Evaluación de la actividad insecticida de aceites esenciales de plantas cubanas sobre los vectores de importancia médica *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera Culicidae) **abril 2018.**

ANEXO 3 Trabajos de la autora en la temática citados por otros autores en artículos científicos. Tomado de Google Scholar y Research Gate.

1) Leyva M, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed* .2009; 20:5–13.

- Barrios ERR Actividad de Extractos Vegetales Sobre Larvas de Insectos de Importancia en Entomología Médica Universidad San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 2010.
- Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Rodríguez H, Abreu Y, Duarte Y, Martínez B, Peteira B, Correa T, Martínez D Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake *Rev Protección Veg*. 2011; 26:(3).
- Sanchez Yet al. Actividad promisorio de aceites esenciales especies pertenecientes a la tribu pipereae frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. *Rev Protección Veg*. 2011;26(1) pp. 45-51.
- Diaz Castillo F. et al. Actividad larvicida de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Plant Med*. 2012; 17(3):256-267.
- Suazo G, González F, Urbina A; Pastene E, Sáez K, Serri H, Chavez R Insecticidal activity of essential oil of *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.)Epling in *Drosophila melanogaster* *Gayana Bot*. 2012; 69(2): 256-266.
- Vargas M. Una actualización de las publicaciones (período 1992-2010) y las categorías botánicas de aceites esenciales de plantas con efectos sobre los mosquitos (Diptera: Culicidae) *Bol Mal Sal Amb*. 2012; 52 (2.)
- Díaz F, Morelos S, Carrascal M, Pájaro Y, Gómez H. Actividad larvicida de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Rev Cubana Plant Med* .2012; 17 (3).
- Widiastuti F. Aktivitas larvasida fraksi polar ekstrak etanol 96%buah cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) terhadap larvan yamuk *Anopheles aconitus* dan *Aedes aegypti* serta profil kromatografi lapis tipisnya. *Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta* .2013.
- Noleto Dias C, Fernandes D. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review *Parasitol Res* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3687-6.
- Kellner AW. A Heavy metals partitioning in the Rodrigo de Freitas lagoon; larvicidal potential of a new essential oil against *Aedes aegypti*; and the socioeconomic impact of tourism due to wild dolphins provisioning. *An Acad Brasil Ciências*.2013 85(4): 1215-1216.
- Sanchez Y, Correa T M; Abreu Y y Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Rev. Protección Veg*. 2013; 28(3): 204-210.
- Oliveira G, Cardoso S, Lara C, Vieira T, Guimarães E, Figueiredo L, Martins E, Moreira D Kaplan M. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *An Acad Brasil Ciências*. 2013; 85(4).
- Kellner, Alexander W.A. Heavy metals partitioning in the Rodrigo de Freitas lagoon; larvicidal potential of a new essential oil against *Aedes aegypti*; and the socioeconomic impact of tourism due to wild dolphins provisioning. *An. Acad Brasil. Ciências*. 2013; 85 (4).

- Estrada G. Repelencia y composición química de aceites esenciales de plantas etnorepelentes a mosquitos en comunidades de Oaxaca, México. **Tesis para optar por el grado académico de Maestra en Ciencias.** 2014 Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca Mexico.
 - Santiago V, Bonifaz E, Alegre A, Iannacone J. Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae) and Imidacloprid on *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). *Catedra Villareal*. 2014; 2(1):19-27.
 - Aragón A, De Vega Lotzin JL, Pérez-Torres B et al. Aceite de *Cymbopogon nardus* y *Pelargonium citrosum*, como repelentes de *Culex quinquefasciatus*. *Rev Mex Ciencias Agrí.* 2014; 5(4): 591-603.
 - Pavela R Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review *Ind Crops Prod.* 2015; 76:174-187.
 - Marques AM, Kaplan MAC Active metabolites of the genus Piper against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. *Univ. Scient.* 2015; 20(1): 61-82.
 - Santiago V, Bonifaz E, Alegre A, Iannacone J. Toxicidad de *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae) e Imidacloprid sobre *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) *Cátedra Villarreal* 2014; 2(1).
 - Gomes PRB. et al. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do Zingiber officinale Roscoe (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. *Rev Bras Plantas Med.* 2016; 18(2) sup1.
 - Aldana F, Cruz S. Actividad larvicida de aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia graveolens*, contra *Aedes aegypti* *Rev Cient Fac Cienc Quím Farm.* 2017; 26: (2).
- 2) Leyva M, Tiomno O, Tacoronte JE, Marquetti MC, Montada D. Essential Plant Oils and Insecticidal Activity in *Culex quinquefasciatus*. Insecticides Pest Engineering (Perveen, F., Ed.) Ed. Intech. 2012:221-238.
- Oz E, Yanikouglu A, Cetin H. Chemical compositions and fumigant activity of essential oils of three Lamiaceae species against German cockroach (*Blattella germanica* (L.)) *Fresenius Environ Bull* 2012; 21(6):1571-1577.
 - Ebadollahi A. Essential Oils Isolated from Myrtaceae Family as Natural Insecticides Annual Review *Res Biol.* 2013 3(3): 148-175.
 - Oz E, Koc S, Yanikouglu A, Cetin H Repellent activity of three essential oil components (cineole, terpinen-4-OL and Alpha-Pinene) against nymphs of *Blattella germanica* L. and *Supella longipalpa* Fabricius. *Fresenius Environ Bull* 2013;22(10):3048-3052 ·
 - Koutsaviti K, Giatropoulos A, Pitarokili D, Papachristos D, Michaelakis A, Tzakou O. Greek Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) *Parasitol Res* 2014 DOI 10.1007/s00436-014-4220-2.
 - Gainza Y, Ferreira L, Pino O, Dias M, Roque E, de Souza Chagas AC. Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Ind Crops Products.* 2015 DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.07.056.
 - Roldán J, Morales R, Otiniano G. Efecto repelente del aceite del endospermo de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), bajo condiciones experimentales. *REBIOL.* 2015; 35(1):82-90.
 - Dávila C E. Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia Culicidae. **Tesis Para optar al título profesional de Químico Farmacéutico** Universidad Nacional Mayor De San Marcos Lima – Perú 2016.
 - Castillo R, Stashenko E, Duque J Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. *J Amer Mosq Control Assoc.* 2017; 33(1):25 – 35.

3) Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MC, Scull R, Montada D, Rodríguez Y, Bruzón RI. Insecticidal Effect of Essential Oils from Plants in *Aedes aegypti* Larvae (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop* 2008; 60, (1): 78–82.

- Guevara et al Efecto antimicrobiano de hojas de *Melaleuca leucadendron* L, que crece en la Ciénaga de Zapata. *Rev Med Electrón*. 2010; 32(4).
- Vargas M. Una actualización de las publicaciones (período 1992-2010) y las categorías botánicas de aceites esenciales de plantas con efectos sobre los mosquitos (Diptera: Culicidae). *Bol Mal Sal Amb* 2012; 52(2).
- Gonzalez-Coloma A, Diaz CE, Fraga BM, Santana-Meridas O . Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. *Chem Mol Sci Chem Eng*. 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.02770-0>
- Noleto Dias C, Fernandes D. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review *Parasitol Res* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3687-6
- Murcia CH. Determinación del estado de susceptibilidad DDT y piretroides y los mecanismos de resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) de los municipios de La Mesa (Cundinamarca) y Bucaramanga (Santander). **Tesis de Maestría** Colombia. 2015.
- Dávila Guerra Carlos Eduardo Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia Culicidae **Tesis Para optar al título profesional de Químico Farmacéutico** Universidad Nacional Mayor De San Marcos Lima – Perú 2016.
- Gutierrez Y, Montes R, Scull R, Sanchez A, Cos P, Monzote L, Setzer WN. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chem Biod*. 2016; 13:1715–1719.
- Aldana F, Cruz S. Actividad larvicida de aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia graveolens*, contra *Aedes aegypti*. *Rev Cien Fac Cienc Quím Farm* 2017;26:(2).

4) Leyva M, Tacoronte JE, Marquetti MDC, Scull R, Tiomno O, Mesa A, MontadaD. Use of essential oils from endemic Pinaceae as an alternative for *Aedes aegypti* control. *Rev Cubana Med Trop*. 2009; 61:39–243.

- Dieguez L, Cruz-Pineda C, Acao Luis. *Aedes* (*St.*) *aegypti*: relevancia entomoepidemiológica y estrategias para su control. *AMC* 2011;15(3).
- González-Coloma A, Diaz CE, Fraga BM, Santana-Meridas O . Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. *Chem Mol Sci Chem Eng*. 2013 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.02770-0>
- Noleto Dias C, Fernandes D. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review *Parasitol Res* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3687-6.
- Koutsaviti K, Giatropoulos A, Pitarokili D, Papachristos D, Michaelakis A, Tzakou O. Greek Pinus essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) *Parasitol Res*. 2014 DOI 10.1007/s00436-014-4220-2.
- Muñoz JÁ, Staschenko E, Ocampo C Beatriz. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Rev Colom Entom*. 2014: 198-202.
- Andrade G, Abrão F, Silva P, Ambrósio S R, Sola RC, Cunha WR, PiresRH. Antifungal Antifungal activity of oleoresin and fractions of *Pinus elliottii* Engelmand *Pinus tropicalis* against phytopathogens. *Am J Plant Sc*. 2014; 5: 3898-3903.
- Mackay AJ, Amador M, Felix G, Barrera R. Evaluation of Household Bleach as an Ovicide for the Control of *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015 ; 31(1):77-84.

- Benelli G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review *Parasitol Res.* 2015;114(9).
- Wagner de Souza R , Fernandes dos Santos S, da Silva Morga F, Ribeiro B M. Insecticidal and Repellent Activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* *PLoS ONE* 2015;10(2).
- Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Ecotox Environ Saf.* 2016; 129: 85 – 90.
- Romano C. Atividade inseticida do líquido da castanha de *Anacardium humile* (Anacardiaceae) sobre *Aedes aegypti* Universidade Federal De Goiás programa De Pós-Graduação Em Biologia Das Relações Parasito-Hospedeiro. *Goiania* 2016.

5) Leyva M, Castex M, Montada D, Quintana F, Lezcano D, Marquetti, MC, Companioni, A, Anaya JY, González I. Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. *Anales de Biología* 2012; 34, 47-56.

- Estrada G. Repelencia y composición química de aceites esenciales de plantas etnorepelentes a mosquitos en comunidades de Oaxaca, México .**Tesis para optar por el grado académico de Maestra en Ciencias. 2014.** Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca México.
- Otiniano G, Roldán J Actividad repelente y tiempo de protección experimental del aceite del endospermo de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) en *Aedes aegypti* *Rebiolest* 2014; 2(2): e35.
- Roldán J, Morales R, Otiniano G. Efecto repelente del aceite del endospermo de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), bajo condiciones experimentales *REBIOL* 2015; 35(1):82-90.
- Castillo R, Stashenko E, Duque J. Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. *J AmMosq Control Assoc.* 2017;33 (1):25-35.

6) Leyva M, Marquetti del MC, French L, Montada D, Tiomno O, et al. Efecto de unaceite de trementina obtenido de *Pinus tropicalis* Morelet sobre la biología de unacepa de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 resistente a insecticidas. *Anales de Biología.* 2013; 35: 75-84.

- Bonet, M. y Soledad-González, D. La escritura científica en las disciplinas: análisis del metadiscursio interpersonal en artículos científicos de química, biología y filosofía. *Signo y Pensamiento.* 2016; 35(69), 16-28. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.syp35-69.ecda>.
- Tesfahuneygn G, Gebreegziabher G. Vector control for mosquito in Ethiopia: A Review. *Journal of Infectious Diseases & Travel Medicine* 2018 ISSN: 2640-2653.

ANEXO 4

Estado de susceptibilidad a insecticidas en mosquitos adultos en las poblaciones utilizadas en el estudio

	Rockefeller	SMP 2011	Marianao 2013	Baraca 2014	Fraga 2012	
malation 5%						FR<5 población susceptible 5<FR<10 vigilancia estrecha FR>10 población resistente (Hemingway <i>et al.</i> ,1997)
N	500	500	500	500	500	
b (±SE)	5,64(0,70)	4,75(0,39)	5,94(0,47)	4,03(0,35)	3,00(0,31)	
TL ₅₀	0,24	1,50	1,60	1,96	1,52	
TL ₉₀	0,41	2,80	2,63	4,09	4,05	
X2 (p)	1,76(0,41)	0,027(0,98)	1,21(0,54)	0,12(0,94)	0,248(0,88)	
FR ₅₀ /FR ₉₀	-	6,25/6,8	6,66/6,4	-	-	
bendiocarb						
N	500	500	500	500	500	
b (±SE)	6,47(0,53)	4,72(0,38)	3,33(0,34)	3,08(0,33)	3,11(0,34)	
TL ₅₀ (h)	0,49	1,84	0,33	0,61	0,30	
TL ₉₀ (h)	0,77	3,44	0,81	1,60	0,78	
X2 (p)	1,87(0,39)	0,13(0,93)	2,5(0,28)	1,45(0,10)	4,11(0,128)	
FR ₅₀ /FR ₉₀	-	3,7/4,6	0,6/1,05	-	-	
deltametrina 0.05%,						
N	500	500	500	500	500	
b (±SE)	4,84(0,42)	4,46(0,39)	2,55(0,34)	2,32(0,17)	2,05(0,23)	
TL ₅₀	0,33	2,23	0,32	0,52	0,42	
TL ₉₀	0,62	4,32	0,82	1,48	1,05	
X2 (p)	3,22(0,20)	0,21(0,89)	0,34(0,82)	1,08(0,40)	6,5(0,037)	
FR ₅₀ /FR ₉₀	-	6,75/6,96	0,96/1,36	-	-	
cipermetrina 0,05			cipermetrina 0,1			
N	500	500	500	500	500	
b (±SE)	7,89(0,73)	5,43(0,43)	4,60(0,50)	3,43(0,34)	4,72(0,86)	
TL ₅₀	0,47	1,59	0,87	2,42	0,41	
TL ₉₀	0,69	2,74	1,65	5,71	0,77	
X2 (p)	1,6(0,44)	1,23(0,53)	5,19(0,75)	2,22(0,32)	0,88(0,64)	
FR ₅₀ /FR ₉₀	-	3,38/3,97	1,85/2,3	-	-	
lambdacialotrina 0.05%,						
N	500	500	500	500	500	
b (±SE)	5,43	4,52(0,44)	3,67(0,31)	3,71(0,35)	2,53(0,46)	
TL ₅₀	0,34	2,78	1,44	2,31	0,31	
TL ₉₀	0,58	5,34	3,23	5,12	1,01	
X2 (p)	3,65(0,16)	1,05(0,59)	0,59(0,087)	8,0(0,018)	0,95(0,95)	
FR ₅₀ /FR ₉₀	-	8,1/9,2	4,25/5,56	-	-	

Anexo 4 Cont.

Estado de susceptibilidad a diferentes insecticidas en el estadio de larvas en las poblaciones de Rockefeller y SMP 2011.

	Rockefeller	SMP2011	Marianao 2013
malation			
N	500	500	500
b (±SE)	1,62(0,28)	1,56(0,31)	5,94(0,47)
CL ₅₀ (ppm)	0,00032	0,00036	1,60
CL ₉₉ (ppm)	0,0019	0,00239	2,63
X2 (p)	1,87(0,40)	0,31(0,14)	1,21(0,54)
FR ₅₀ /FR ₉₉	-	11/12,19	6,66/6,4
bendiocarb			
N	500	500	500
b (±SE)	1,52(0,23)	1,55(0,38)	3,33(0,34)
CL ₅₀ (ppm)	0,0011	0,019	0,33
CL ₉₉ (ppm)	0,0080	0,130	0,81
X2 (p)	0,33(0,04)	2,9(0,13)	2,5(0,28)
FR ₅₀ /FR ₉₉	-	17/9,2	0,6/1,05
deltametrina			
N	500	500	500
b (±SE)	1,81(0,51)	3,16(0,44)	2,55(0,34)
CL ₅₀ (ppm)	0,0030	0,0088	0,32
CL ₉₀ (ppm)	0,014	0,022	0,82
X2 (p)	0,6(0,19)	0,21(0,1)	0,34(0,82)
FR ₅₀ /FR ₉₉	-	29/96	0,96/1,36
temefos			
N	500	500	500
b (±SE)	2,15(0,46)	1,44(0,17)	2,55
CL ₅₀ (ppm)	0,00535	0,024	0,018
CL ₉₀ (ppm)	0,0162	0,187	0,256
X2 (p)	1,5(0,23)	3,91(0,72)	1,8(0,24)
FR ₅₀ /FR ₉₉	-	4,8/6,1	5,1/6,5
lambdacialotrina			
N	500	500	500
b (±SE)	2,17(0,22)	2,64(0,43)	3,67(0,31)
CL ₅₀ (ppm)	0,0014	0,004	1,44
CL ₉₀ (ppm)	0,0053	0,014	3,23
X2 (p)	2,25(0,47)	1,70(0,57)	0,59(0,087)
FR ₅₀ /FR ₉₉	-	33/48	4,25/5,56

FR<5 población susceptible
5<FR<10 vigilancia estrecha
FR>10 población resistente
(Hemingway *et al* ,1997)

ANEXO 5 Descripción botánica de las familias y especies utilizadas en el estudio

Según Roig, 1965.

Características botánicas de *Bursera graveolens* (Sapindales: Burseraceae) es una especie que crece en bosques secos en gran parte de América tropical de la costa pacífica de Sudamérica. Son árboles, que alcanzan un tamaño de 4–10 m de alto, corteza lisa, gris, no exfoliante. Hojas pinnadas, de hasta 27.5 cm de largo y 13 cm de ancho, glabras a pubescentes en el raquis, peciolos y nervios principales de los folíolos, raquis alado; folíolos 5–9, angostamente ovados a obovados u ovales, ápice acuminado a largamente atenuado (agudo), crenados, más o menos del mismo color en ambas superficies. Panículas hasta 6 cm de largo (6.5–14 cm de largo en fruto); sépalos 4, 1/4–1/3 del largo de los pétalos; pétalos 4, 2–3 mm de largo. Frutos obovoides a elipsoides, 7–11 mm de largo, 2-valvados, matizados de rojo al madurar. **Nombre popular** sasafras o palo santo **Propiedades medicinales** se utiliza en caso de neuralgia, menorragia, catarro. Diurético. Se usa la corteza macerada en alcohol contra el reuma y en cocimiento como sudorífico. Las hojas se usan en cocimiento como antiespasmódico. También se usan los cogollos como abortivo.

Características botánicas de *Ocimum basilicum* (Lamiales:Lamiaceae) es una hierba anual, cultivada como perenne en climas tropicales, de crecimiento bajo (entre 30 y 130 cm), con hojas opuestas de un verde lustroso, ovales u ovadas, dentadas y de textura sedosa, que miden de 3 a 11 cm de longitud por 1 a 6 cm de anchura. Emite espigas florales terminales, con flores tubulares de color blanco o violáceo las cuales, a diferencia de las del resto de la familia, tienen cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior de la corola. Tras la polinización entomófila, la corola se desprende y se desarrollan cuatro aquenios redondos en el interior del cáliz bilabiado. **Nombre popular:** albahaca **Propiedades medicinales:** está especialmente indicada en desnutrición, digestiones lentas y pesadas, espasmos del aparato digestivo, jaquecas y tos convulsiva. Externamente se puede utilizar en heridas, eccemas y mialgias (dolores musculares). Además tradicionalmente la albahaca se ha utilizado para curar, calambres, rinitis, sinusitis, asma, bronquitis, enfisemas pulmonares, espasmos intestinales, hipo, náuseas, inapetencia, dolores musculares, hipo-

tensión nerviosa, cabello débil, crecimiento lento del pelo, dispepsia, gota, enfermedades infecciosas, otitis, reumatismos.

Características botánicas de *Eucalyptus globulus* (Myrtales: Myrtaceae) Tronco cilíndrico, recto, grueso alcanza hasta 2m. Posee una copa alargada e irregular sobre un fuste limpio de ramas hasta en 2/3 de su altura total. De corteza de 3 cm. de grosor que desprende en tiras al madurar dejando una segunda corteza lisa dando al árbol un aspecto característica en ocasiones expulsa resina. Sus hojas juveniles opuestas, sésiles, de base cordada, de color gris-azulado, de 8-15 cm. de longitud y 4-8 cm. de anchura. Las adultas alternas, pecioladas, con la base cuneada, linear-lanceoladas, de 15-25 cm de longitud, con el ápice acuminado. Las flores axilares, solitarias o en grupos de 2-3, de hasta 3 cm de diámetro, con numerosos estambres de color blanco. El fruto en cápsula campaniforme de color glauco y cubierta de un polvo blanquecino, de 1.4-2.4 cm. de diámetro. **Nombre popular** eucalipto. **Propiedades medicinales:** Las hojas son utilizadas como anticatarrales, antiinflamatoria, balsámicas y expectorantes, antisépticas y febrífugas.

Descripción botánica de *Piper aduncum* (Piperales: Piperaceae) arbusto que oscila entre 1 y 8 metros ampliamente distribuido en los trópicos americanos. De tallos delgado y erecto de color amarillento. Las hojas son pecioladas, simples y alternas. Miden entre 12 y 22 cm de largo, lampiñazas, ovaladas o elípticas, ápice acuminado y base redondeada. Color verde amarillento, peciolo de 2- 5 mm de largo, presenta nerviaciones pronunciadas, entre 4 y 6 pares por hoja. Presenta una inflorescencia en forma de espiga floral que nace del nudo de los tallos principales, de forma opuesta a las hojas. Las flores son de color blanco y se disponen en forma de espiral a lo largo del raquis, bisexuales aclamídeas **Nombre popular:** Matico, hierba del soldado, achotlín o cordoncillo. **Propiedades medicinales:** Es utilizado como expectorante, antitusígeno, cicatrizante, antiinflamatorio y antiséptico.

Características botánicas de *Melaleuca quinquenervia* (Myrtales: Myrtaceae) Es un árbol siempre verde procedente de Australia (Geary et al 1990). Mide 20 m de altura, presenta

corteza gruesa, esponjosa, blanca en la parte exterior y oscura en la interior; ramas puberulas. Hojas elípticas u oblongas de 5-10 cm de largo, estrechas hacia ambos extremos, nervadura longitudinal y paralela. Flores blanco cremoso agrupadas en espigas terminales de 5-15 cm de largo. Fruto capsular, casi esférico, de 3 mm de diámetro. Comprende unas 150 especies nativas de Australia y algunas de Nueva Guinea y Malasia, son escasamente cultivadas en Cuba como ornamental. Su aceite se extrae de las hojas, las cuales son utilizadas de forma medicinal. **Nombres populares;** melaleuca, cayeputi, cayeput, bálsamo de cayeput, cajeput-tree. **Propiedades medicinales;** antiséptico, expectorante, analgésico, antihistamínico, antiparasitario dérmico y antimicrobiano (Roig, 1988)

Descripción botánica de *Citrus aurantium* (Sapindales:Rutaceae) Arbol que puede alcanzar hasta los 10 metros . Tallos ligeramente espinosos, hojas coriáceas, elípticas y con el pecíolo provisto de alas estrechas. Flores de color blanco perfumadas. El fruto es un hesperidio con la corteza lisa. **Nombre popular:** naranja dulce **Propiedades medicinales:** propiedades sedantes , antiespasmódicas, carminativas, antipirética, antioxidantes.

Descripción botánica de *Curcuma longa* (L) (Zingiberales: Zingiberaceae) conocida vulgarmente como “yuquilla” o “raíz de Madrás”. Es una hierba erguida con hojas oblongas o elípticas, acuminadas de 30 -50 cm, inflorescencia en espiga de 10-20 cm, Brácteas florales aovadas de 3.5-4 cm verde pálido, las superiores matizadas de rosado. Corola amarillo pálido y cápsula globosa. Nativa de las indias orientales. Ubicada en la Habana, Oriente. El rizoma contiene un aceite esencial rico en monoterpenos y sesquiterpenos . **Nombres populares;** Azafrán de la India, rizoma de curcuma, raíz de curcuma, turmeric, azafrán cimarrón; yuquilla (Cuba), turmérico **Propiedades medicinales;** se le atribuyen propiedades antiescleróticas, diuréticas, antiinflamatorias, anticoagulante. (Hnos León y Alain, 1957; Kosuge, 1985).

Aceites de trementina:

El aceite de trementina es el término aplicado a numerosas oleorresinas semifluidas, amarillas o de color pardo, que se obtienen por destilación de la resina de los árboles de pino en Asia, Europa y América. Cuando es sometida a un proceso de destilación produce la esencia de trementina dejando como residuo la colofonia. Es un líquido incoloro, tiene una densidad relativa de 0,86 a 0,88 y un punto de ebullición de 155 °C. Está compuesto de una mezcla de terpenos (α -pineno, β -pineno) y de aceites esenciales. En estado líquido es insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol diluido, e insoluble en éter y alcohol absolutos (Kirk 1983, Encarta, 2006). El α -pineno es el componente mayoritario y más reactivo pero el β -pineno se usa en la producción de mircenol y geraniol además de resinas terpenicas (Kirk, 1983;Wiley, 1964). **Nombre popular:** aguarras empleada a gran escala como disolvente y diluyente para pinturas y barnices, a los que aporta consistencia y propiedades secantes. **Propiedades medicinales** la esencia de trementina actúa como un potente estimulante y se emplea a menudo como antiespasmódica, astringente, antirreumática, antialgica, antiséptica, antiparasitaria, catártico y cicatrizante. (Encarta, 2006; www.mailxmail.com)

Anexo 6. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales utilizados en el estudio.

Compuesto	Contenido %									
	<i>M.q</i>	<i>O.b</i>	<i>P.a sub o</i>	<i>B.g</i>	<i>E.g</i>	<i>C.l</i>	<i>C.a</i>	<i>C.xa</i>	<i>AT</i>	<i>ATM</i>
α -pineno	8,9								91	
α -cadinol			2,6							
α -bergamotene		1,6	2,2							
α -tumerone						7,0				
ar-curcumene						2,0				
β -pineno	3,3								3,7	
β -elemeno				12,5						
β -selineno				1,9						
β -tumerone						42,2				
carvacrol					1,1					
canfeno									1,0	
chavicol			2,9							
cis-isopulegona				1,4						
copaeno				1,5						
cis-carveol				1,2						
dicumene						2,6				
epicurzerona							95,5			
globulol	2,2									
gamma-terpinen					16,7					
globulol					2,2					
limoneno	13,6			21,8				97,5	1,5	
linalol		30,3	32,6							
L-carvone				3,4						
mentona				1,3						
mirceno								1,5		
metilchavicol (estragol)		50,8	43,4							
p-cimene					47,6					1,3
pulegona				2,6						38,3
trans-carveol				3,8						
thymol					1,4					
T-cadinol		1,6		1,6						
l-bornyl acetate		1,1								
1,8-cineol	28,8	6,2	5,9	1,4	15,5					
l-alpha-terpineol				1,8						
l-camphor							4,5			
4-terpinen-ol					6,6					
viridiflorol	25,3									
verbenona										36,7

M.q: *Melaleuca quinquenervia*; *O.b*: *Ocimum basilicum*; *B.g*: *Bursera graveolens*; *P.a sub o*: *Piper aduncum subsp ossanum*; *E.g*: *Eucalyptus globulus*; *C.l*: *Curcuma longa*; *C.a*: *Curcuma aeruginosa*; *C.s*: *Citrus aurantium* (Estos aceites fueron analizados en el Centro antidopig); *AT*: aceite de trementina; *ATM*: aceite de trementina modificado (Estos dos aceites fueron analizados en el CIQ)
En la tabla no se incluyeron compuestos con abundancia relativa menor al 1%

Anexo 7

Carta de ética de la tesis



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 47-18

"Actividad insecticida e inhibidora del desarrollo de aceites esenciales y derivados en tres especies de mosquitos"

INVESTIGADOR PRINCIPAL
Ing. Maureen Leyva

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. APROBADO TRAS MODIFICACIONES PROPUESTAS POR EL CEI-IPK, el protocolo presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 16 días del mes de marzo de 2018

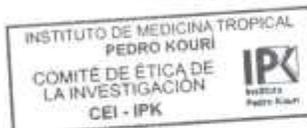
DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente

DrC. Daniel González Rubio
Vicepresidente

DrC. Iliana Valdés Hernández
Secretaria

DrC. María Caridad Montalvo Villalva
Miembro

DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez
Miembro



Carta de ética del proyecto asociado a programa que abarcó parte del tiempo de estudio



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios
Para el estudio de las Enfermedades Viricas
En Tuberculosis y Micobacterias



COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 02-15

"Actividad insecticida de aceites esenciales como una alternativa natural para el control de varias especies de mosquitos"

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Ing Maureen Leyva

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el protocolo presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 17 días del mes de Febrero de 2015

Dr. Eric Martínez Dr. Cs
Presidente

Lic. Ana Margarita Montalvo Dr. C.
Secretaria p.s.r.

Dra. María Caridad Montalvo

Dr. René Gato

Lic. Roberto Fernández Llanes

Bioensayos toxicidad realizados

Los informes hacen referencia a la especie *Melaleuca leucadendron*, porque en un principio se infirió que era esta especie con la cual se estaba trabajando, luego de la evaluación por los especialistas de Ecología y Sistemática se dió como conclusión que la especie era *Melaleuca quinquenervia*. No obstante los ensayos de toxicidad se estaban realizando y en los informes quedó el nombre de *M.leucadendron*. De estos se anexa última página con las conclusiones.

Con la especie *Citrus aurantium* no se realizaron ensayos de inocuidad por este aceite ser considerado por la FDA (agencia de drogas y alimentos) como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) (generalmente reconocido como seguro) <https://www.fda.gov/Food/>

IES

Instituto de Ecología y Sistemática

Carretera de Varona km. 3 1/2, Capdevilla, Boyeros,
La Habana 19, C.P. 11 900, Ciudad de La Habana, Cuba.
Teléfonos (537) 643-8266, 643-8088, 643-8010 Fax (537) 643-8090
e-mail: botanica.ies@ama.cu
direccion.ies@ama.cu



"Herbario Nacional Onaney Muñiz"

e-mail: hac@ecologia.cu

CERTIFICO

La Habana, 15 de septiembre de 2011
"Año 53 de la Revolución"

CERTIFICO

Que los individuos revisados en medio natural en los alrededores de la Boca de la Laguna del Tesoro en la Ciénaga de Zapata y la muestra botánica colectada y registrada con el número: 42678 en el Herbario Nacional de Cuba (HAC), perteneciente al Instituto de Ecología y Sistemática (IES), del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), corresponde a la especie botánica: *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blacke, de la Familia Myrtaceae. A esta especie se le conocen los siguientes sinónimos: *Melaleuca leucadendrum* L., *Metrosideros quinquenervia* Cav.

En Cuba esta especie se le conoce generalmente bajo los nombres vulgares de: cayeput, melaleuca, árbol del corcho. Otros nombres comunes reportados son: gelam (Indonesia); niaouli (Nueva Caledonia); mod, samed y samet (Tailandia); cayeput (Puerto Rico); melaleuca (Florida); corcho (Costa Rica); cayeput-tree, cayeput-oil-tree, punk-tree y paper-bark-tree (inglés).

Síntesis de descripción botánica:

Árbol erecto de crecimiento rápido, de 8-12-18 y hasta 25 metros de alto. La corteza presenta varias capas gruesas de consistencia sedosa integradas por muchas láminas de liber (semejante a papel). Hojas perennes, simples, alternas, verde grisáceas, de 7-10 cm de largo

Hipersensibilidad retardada del aceite de *M. quinquenervia*

Centro de Estudio de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)
Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana
Laboratorios LIORAD



Ave. 23 # 21425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa.
C.P. 13600, Ciudad Habana, Cuba.
E-mail: gaston@cieb.sld.cu

Fecha: 13/06/2010

Informe de Resultado del Protocolo N.º 10/31

Página 15 de 12.

8. CONCLUSIONES:

1. En los animales (tratados y control), no se apreciaron lesiones en la piel de índole eritematosa o edematosa.
2. No se encontró ningún animal sensibilizado, debido a la aplicación del **producto en estudio**.
3. La aplicación del *Aceite de Melaleuca leucocendron* no afectó la ganancia en peso de los curieles sometidos a prueba.

CONCLUSIONES GENERALES.

El producto, *Aceite de Melaleuca leucocendron*, no es un alérgeno potencial de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo que emplea el curiel como animal de experimentación por lo que pasa **SATISFACTORIAMENTE** la prueba de **SENSIBILIZACION**.

9. Documentos aplicables

1. OECD Guideline for testing of chemical. Skin sensitization. Julio 1992.
2. ISO 10993. Part 10, Biological evaluation of medical devices, 2007
3. OPPTS 870.2600. Skin Sensitization. EPA 712-C-96-197, June 1996.
4. PNT/TEC/0209. Ensayo de sensibilización, CIEB-IFAL-UH.
5. PNT/ANI/009. Pesaje de conejos.
6. PNT/ANI/000. Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales de laboratorio.
7. PNT/ANI/005. Alimentación de rutina.
8. PNT/ANI/006. Suministro de agua.
9. PNT/ANI/011. Procedimiento de cuarentena.

Toxicidad aguda oftálmica *M.quinquenervia*

Centro de Estudio de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)
Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana
Laboratorios LIORAD



Ave. 23 # 21425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa.
C.P. 13600, Ciudad Habana, Cuba.
E-mail: gaston@cieb.iaid.cu

Fecha: 19/04/2010

Informe de Resultado del Protocolo N.º 10153

Página 10 de 12

Se obtuvo un Índice de irritación igual a 18 puntos lo que permite clasificar al *Aceite de Melalueca leucodendron* procedente del *Organo de Integración para la Salud* como **Ligeramente IRRITANTE**.

Desde el punto de vista clínico no se produjeron alteraciones en los animales de experimentación.

Tabla 1. Resultados del estudio de Irritabilidad Oftálmica del <i>Aceite de Melalueca leucodendron</i> procedente del <i>Organo de Integración para la Salud</i> .				
Animal	Σ (Conjuntiva + Iris + Cornea)			
	1h	24 h	48 h	72 h
Conejo	140	52	18	6

8. Conclusiones

Con la aplicación en la estructura ocular del *Aceite de Melalueca leucodendron* procedente del *Organo de Integración para la Salud* se obtiene un Índice de Irritación de 18 puntos con lo cual se clasifica al mismo como Ligeramente IRRITANTE, por lo que debe tenerse cuidado con la estructura ocular.

9. Documentos aplicables

1. OECD Guideline for testing of chemical. Acute ocular Irritation, Julio 1992.
2. PNT/TEC/0208. Ensayo de irritabilidad oftálmica, CIEB-IFAL-UH.1996.

Toxicidad aguda dérmica de aceite *M.quinqueneroia*

Centro de Estudio de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)
Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana
Laboratorios LIORAD
Ave. 23 # 21425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa.
C.P. 13600, Ciudad Habana, Cuba.
E-mail: gaston@cieb.sid.cu



Revisado por: Lic. Yanet Hernández Matos
Jefe de Aseguramiento de la Calidad

Fecha: 24/04/2010

Página 13 de 15

Informe de Resultados del Protocolo No. 10/05

HISTOPATOLOGIA

Las muestras tomadas de los órganos seleccionados no presentaron afectaciones desde el punto de vista macroscópico, por lo que el patólogo decidió no efectuar la toma de las mismas para su estudio histopatológico.

8. Conclusiones:

- 1- No se observaron signos clínicos en ninguno de los animales sometidos a ensayo.
- 2- Desde el punto de vista de las necropsias efectuadas a los animales no se presentaron afectaciones en los órganos seleccionados.
- 3- El producto estudiado no afecta la ganancia en peso de los animales en prueba.
- 4- Cuando se administra de forma aguda **EL ACEITE DE MELALEUCA LEUCODENDRON PROCEDENTE DE LOS ORGANOS DE INTEGRACIÓN PARA LA SALUD** no se producen efectos Tóxicos sobre los animales en prueba.

CONCLUSIONES GENERALES.

EL ACEITE DE MELALEUCA LEUCODENDRON PROCEDENTE DE LOS ORGANOS DE INTEGRACIÓN PARA LA SALUD no indujo Toxicidad Aguda Dérmica observable en los animales de experimentación cuando se utiliza el ensayo descrito por la OECD TG 402, a la dosis límite (2000 mg/kg) por lo que el producto se considera prácticamente inocuo para los humanos, cuando se aplica de forma aguda, no siendo necesario entonces estudios de Toxicidad Aguda a dosis superiores.

9. Documentos aplicados

1. Hayes W., Principles and Methods of Toxicology. Principles and Methods for Acute Toxicity and Eye Irritancy Ed. Raven Press, Ltd. N.Y., 169-220, 1989
2. *ibid*, Statistic for toxicologist. 435-483, 1984

Toxicidad aguda oral del aceite *M.quinqueneroia*

Centro de Estudio de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB)
Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana
Laboratorios LIORAD

Ave. 23 # 21425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa.
C.P. 13600, Ciudad Habana, Cuba.
E-mail: gaston@cieb.sid.cu



Revisado por: Lic. Yanet Hernández Matos
Jefe de Aseguramiento de la Calidad

Fecha: 17/02/2010

Página 13 de 15

Informe de Resultados del Protocolo N^o 10/64

8. Conclusiones:

- 1- No se observaron signos clínicos en ninguno de los animales sometidos a ensayo.
- 2- Desde el punto de vista de las necropsias efectuadas a los animales no se presentaron afectaciones en los órganos seleccionados de ninguno de los grupos sometidos a estudio.
- 3- El producto estudiado no afecta la ganancia en peso de los animales en prueba.
- 4- Cuando se administra de forma aguda EL ACEITE DE MELALEUCA LEUCODENDRON a la dosis límite, no se producen efectos Tóxicos sobre los animales en prueba.

CONCLUSIONES GENERALES.

El ACEITE DE MELALEUCA LEUCODENDRON no produjo Toxicidad Aguda por la vía Oral en los animales de experimentación cuando se utiliza el ensayo descrito por la OECD TG 423 y con el empleo de la dosis límite 2000 mg/kg, clasificándose como Sin clasificar, según la Unión Europea, por lo que no resulta necesario estudiar al mismo con dosis superiores.

9. Documentos aplicados

1. Hayes W., Principles and Methods of Toxicology. Principles and Methods for Acute Toxicity and Eye Irritancy Ed. Raven Press, Ltd. N.Y., 169-220, 1989
2. ibid, Statistic for toxicologist. 435-483, 1984
3. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. (OECD) Guidelines for testing of chemical. Paris.423, 2001.
4. García G. Los estudios toxicológicos de primera barrera y la toxicología Alternativa. Tesis para optar por el grado académico de Maestro en Ciencias. La Habana, junio del 2000.
5. PNT/ANI/008 Peso Corporal de las ratas CIEB-IFAL.

Consentimiento informado

El Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Habana, en colaboración con el Organismo de Integración para el Bienestar Social (OIBS) y el Centro Nacional Sanidad Agropecuaria (CENSA) están conduciendo el presente estudio para la evaluación de formulaciones de aceites de plantas como posibles repelentes.

Este documento tiene 2 partes:

- Hoja informativa (con información mínima necesaria sobre el estudio).
- Certificado de consentimiento (donde usted firmará, en caso que acceda a participar en el estudio).

Parte I: Hoja informativa

Introducción

Estamos realizando una investigación relacionada con la actividad insecticida de plantas de entorno como una alternativa para el control de mosquitos. Por este medio le estamos brindando información e invitándolo a participar en la investigación. Este documento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, tome su tiempo para realizar las preguntas que necesite relacionadas con el estudio. Deseamos que acceda a participar solo si comprende todo sobre el mismo.

Propósito y descripción de la investigación

El propósito de esta investigación es evaluar la posible actividad repelente que pudiesen presentar algunas plantas de nuestro entorno. La evaluación se realizará mediante formulaciones elaboradas con aceites de plantas y solventes como etanol, aceite mineral, propilenglicol, dipropilenglicol. Este estudio se realiza con vistas a brindar un método alternativo a los repelentes químicos para evitar la picadura de mosquitos y el contagio de enfermedades transmitidas por estos vectores.

Voluntariedad

Usted ha sido seleccionado a participar en el estudio. No obstante, su participación en el mismo es totalmente voluntaria. Es su elección participar o no. Y si decide hacerlo, puede retirarse cuando así lo desee sin perjuicio para usted.

Procedimientos

El estudio se realizará partiendo del principio de voluntariedad y siguiendo metodología estandarizada de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2009). Antes de la aplicación de la formulación los voluntarios se lavaran los antebrazos con jabón y agua destilada por 10 minutos. A los participantes se le cubrirán las manos con guantes de latex y sus antebrazos con mangas de papel, dejando libre un área de exposición de 30 cm² (parte interior media del antebrazo) en donde se aplicarán las formulaciones clasificadas y enumeradas según el tipo de aceite, solvente y concentración. No debe tener contacto

previo con desodorantes, lociones, perfumes o jabones perfumados 12 horas antes de la prueba. El antebrazo será expuesto 3 minutos cada 30 minutos en jaulas cúbicas de 30 cm que contendrán 200 mosquitos hembras sin alimentar. Las picaduras de los voluntarios se cuantificarán en ese periodo de tiempo. Después de aplicado el tratamiento cuando se observe una picadura seguida de otra confirmatoria en el mismo periodo o en el periodo de exposición siguiente se dará por terminado el bioensayo. Se procederá a retirar el guante de latex y lavarse la zona aplicada con abundante agua y jabón, con el fin de eliminar restos de la formulación.

Privacidad y confidencialidad de la información

La información que usted brinde será totalmente confidencial. Solo los investigadores involucrados en el estudio tendrán acceso a ella. A usted se le asignará un número como participante y no se utilizará su nombre en ningún momento. La información que usted ofrezca no se reportará de manera individual sino, de conjunto con la que brinden otros participantes del estudio.

Beneficios

Su participación en el mismo no tendrá ningún beneficio directo para usted. Los resultados de la investigación solo beneficiarían las investigaciones relacionadas con la temática con vistas a la elaboración de un método alternativo menos contaminante contra las picaduras de insectos vectores y como consiguiente la prevención de enfermedades.

Posibles riesgos

Los riesgos por participar en el estudio son mínimos. Irritación en la piel por la picada de mosquitos cuando la formulación resulte ineficaz. Usted tiene todo el derecho a retirarse del estudio si es alérgico a la picadura de insectos

Uso de los resultados de la investigación

Los resultados que se obtengan del presente estudio serán compartidos con usted y su comunidad antes de hacerse públicos. Está prevista la publicación de los resultados de investigación en revistas médicas, libros u otros materiales con fines científicos; así como la utilización de la información con fines educativos.

¿Tiene alguna duda o pregunta hasta aquí?

Contactos en caso que le surjan otras dudas o preguntas

Si usted desea hacer alguna otra pregunta posteriormente, puede contactar a la Ing Maureen Leyva Vicedirección de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí