

EFFECTO BIOCIDA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE INFLORESCENCIAS Y PLANTAS DE *Piper tuberculatum jacq.* "MATICO" SOBRE LARVAS DEL III ESTADIO DE *Aedes aegypti* Y TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*

IN VITRO BIOCIDE EFFECT OF ETHANOL EXTRACTS AND PLANTS INFLORESCENCES OF *Piper tuberculatum Jacq.* "MATICO" ON 3rd INSTAR LARVAE OF *Aedes aegypti* AND TOXICITY TO *Artemia salina*

Dávila Campos Carlos Omar^{1b}, Chávez Saldaña Ángel Wilfredo^{1b}, Vergara Espinoza Martha Arminda^{1ab}, Vásquez del Castillo Ana María^{1ab}, Carpio Montenegro Wilmer^{1c}

RESUMEN

Determinar el efecto biocida *in vitro* de los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas de *Piper tuberculatum Jacq.* "Matico" sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* y, evaluar la toxicidad del extracto etanólico de inflorescencias y plantas sobre *Artemia salina*. Investigación experimental. Diseño de estímulo creciente. Las dosis de ambos extractos fueron 0,007815; 0,015630; 0,031260; 0,062520 y 0,125040 mg/mL usadas en las cepas Salvaje (Motupe) y control (Rockefeller). La mortalidad larvaria se evaluó a las 1, 2, 3, 4, 18 y 24 horas post exposición. Las DL₅₀ y DL₉₀ se analizaron con Probit 1.5. La dosis de los extractos para la prueba de toxicidad fueron: 150, 300, 600, 1,200 y 2,400 ug/mL (CYTED). Las DL₅₀ (mg/mL) a las 01 y 24 horas del extracto de inflorescencias de *P. tuberculatum* respectivamente, fueron 0,041 y 0,001 (cepa Rockefeller) y, 0,049 y 0,003 (cepa Salvaje); del extracto de plantas fueron 0,225 y 0,002 (cepa Rockefeller) y 0,344 y 0,002 (cepa Salvaje). La DL₉₀ tuvo la misma tendencia. En la prueba de toxicidad, las DL₅₀ (mg/mL) fueron 2215,936 y 3736,350 y las DL₉₀ fueron 3803,033 y 6418,254 para los extractos de inflorescencias y plantas respectivamente. Se concluye que los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas de *Piper tuberculatum Jacq.* tienen efecto biocida *in vitro* sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* siendo mayor el efecto del extracto de inflorescencias respecto al de plantas, tanto para la cepa salvaje como para la cepa Rockefeller y, *Piper tuberculatum Jacq.* no tuvo toxicidad frente a *Artemia salina*.

Palabras clave: *Aedes aegypti*; *Artemia salina*; Efecto biocida en *Aedes aegypti*; Extracto etanólico de matico; *Piper tuberculatum Jacq.* (**Fuente:** DeCS BIREME)

ABSTRACT

To determine the *in vitro* biocidal effect of ethanol extracts of inflorescences and plants of *Piper tuberculatum Jacq.* "Matico" on the third instar larvae of *Aedes aegypti* and evaluate the toxicity of ethanol extract of inflorescences and plants on *Artemia salina* Research design growing experimental stimulus doses of both extracts were 0.007815, 0.015630 ; 0.031260;. 0.062520 and 0.125040 mg/mL used in wild strains (Motupe) and control (Rockefeller). Larval mortality was assessed at 1, 2, 3, 4, 18 and 24 hours postexposure. The LD₅₀ and LD₉₀ were analyzed by Probit 1.5. The doses of both extracts in test toxicity were 150, 300, 600, 1,200 y 2,400 ug/mL (CYTED). The LD₅₀ (mg/mL) at 01 and 24 hours extract of *P. tuberculatum* inflorescences were respectively 0.041 and 0.001 (Rockefeller strain) and 0.049 and 0.003 (wild strain); the plant extract were 0.225 and 0.002 (Rockefeller strain) and 0.344 and 0.002 (wild type) The DL₉₀ had the same trend. In test toxicity, the LD₅₀ (mg/mL) were 2215.936 and 3736.350 and, the DL₉₀ were 3803,033 y 6418,254 for inflorescences and plant extracts respectively. In conclusion, the ethanol extracts of inflorescences and plants of *Piper tuberculatum Jacq.* have biocidal effect *in vitro* on III instar larvae of *Aedes aegypti* being greater the effect of the extract of the plant inflorescences respect both to the wild type strain and for Rockefeller and *Piper tuberculatum Jacq.* He had no toxicity towards *Artemia salina*.

Key words: *Aedes aegypti*; *Artemia salina*; biocide effect on *Aedes aegypti*; Matico ethanol extract; *Piper tuberculatum Jacq.* (**Source:** MeSH NLM)

¹Licenciado en Biología Microbiología Parasitología

^aDoctor en Microbiología

^bUniversidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. Perú

^cLaboratorio referencial de Salud- Lambayeque

1. Introducción

El mosquito hembra *Aedes aegypti* es el vector del virus causante del Dengue, enfermedad infecciosa aguda y reemergente cuya incidencia ha aumentado por el incremento de la pobreza, las poblaciones urbanas y el mal saneamiento, los que promueven la propagación del mosquito por su facilidad para desovar en agua estancada, sumado a esto su tenacidad para picar al humano. La enfermedad amenaza al 40% de la población mundial y 2.5 mil millones de personas viven en países endémicos¹⁻³. En el Perú, el Dengue está en la selva y costa norte del país (Tumbes, Piura y Lambayeque), con circulación de los 4 serotipos; en el 2011 se notificó 27 474 casos siendo la mayor epidemia reportada desde 1991⁴. Actualmente se calcula que casi el 50% de los habitantes en las áreas afectadas han tenido infección primaria por el serotipo 1 o 2 del virus. En la Región Lambayeque, en el mismo año, 18 distritos reportaron presencia del vector con índices aélicos entre 1.0 y 12.50%; en el 2012 se notificaron 1460 casos, de los cuales 831 fueron confirmados, 237 por LARESA y 594 por nexo epidemiológico⁵.

El control del mosquito y sus criaderos se realiza con organofosforados (Abate), organoclorados y carbonatados⁶⁻⁹ que actúan sobre el estadio larval III del vector, sin embargo su uso indiscriminado ha provocado mecanismos de resistencia¹⁰ especialmente frente al Abate o Temepho¹¹ además causa evasión del vector y destrucción de otras formas de vida, también es de elevado costo. Todo esto conduce a buscar nuevas alternativas como los extractos vegetales para el control de insectos¹² entre ellos los de *Piper tuberculatum*, “matico” “cordoncillo” o pimienta longa, a los que se les atribuye propiedades insecticidas sobre insectos de *Diatraea saccharalis* y *Sopodoptera frugiperda* “cogollero”^{13,14}, *Heliothis virescens* y estadio adulto de *Dysdercus peruvianu*¹⁵ y también sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis*¹⁶. Sin embargo es necesario incrementar y optimizar el uso de una alternativa natural, evitando los efectos colaterales, en tal sentido es importante evaluar la toxicidad de dichos extractos sobre organismos simples como *Artemia salina*^{17,18} para establecer una relación de toxicidad en el humano lo que permitiría su utilización sin correr riesgo de daño a nivel celular.

Por ello el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto biocida *in vitro* de los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas de *Piper tuberculatum jacq.* “matico” sobre larvas del iii estadio de *Aedes aegypti* y toxicidad sobre *Artemia salina*

2. Material y métodos

El estudio es experimental con diseño de contrastación de hipótesis de estímulo creciente¹⁹. Las variables independientes fueron los extractos de inflorescencias de las plantas de campo y el extracto de plantas *in vitro* y, las variables dependientes la mortalidad de larvas del III estadio de *Aedes aegypti* y de nauplios de *Artemia salina*.

Para el efecto biocida, la población fue *Aedes aegypti* obtenidos del Distrito de Motupe. La muestra fue 200, resultado de la interacción de los factores: Inflorescencias y plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum*², 5 concentraciones del producto (0,007815; 0,01563; 0,03126; 0,06252 y 0,12504 mg/mL) y larvas del III estadio de *Aedes aegypti*²⁰. Con las repeticiones³ se obtuvieron 600 unidades experimentales. Se trabajó con la cepa patrón Rockefeller (600 unidades

experimentales). En la evaluación de toxicidad se usó 340 nauplios (organismos recién nacidos) en estado de instar II de *Artemia salina* y 5 concentraciones de *Piper tuberculatum* (0,15; 0,3; 0,6; 1,2 y 2,4 mg/mL)

La investigación tuvo una fase de campo y una de laboratorio. En el campo se recogieron inflorescencias de *Piper tuberculatum* y larvas de *Aedes aegypti*. Las primeras se obtuvieron de plantas crecidas a orillas del río Cumbil (Chota-Cajamarca). Las larvas se recolectaron en Motupe de criaderos domiciliarios y peridomiciliarios como tanques, llantas, floreros y otros, conteniendo agua retenida. En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos (Facultad Ciencias Biológicas-UNPRG) se obtuvo plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* y los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas y, en el Laboratorio Referencial de Salud de Lambayeque Área de Entomología (LARESA) se obtuvo el estadio larval III *Aedes aegypti* y se realizó el bioensayo. Las plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* Jacq. procedieron del Banco de Germoplasma (Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos). Las larvas Rockefeller de *A. aegypti* fueron proporcionadas por el INS a través del LARESA-Lambayeque, dichas larvas poseen sensibilidad confirmada a concentraciones determinadas del Abate (Temephos).

Para obtención de plantas cultivadas *in vitro* de *Piper tuberculatum*, se utilizó explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de plantas de cultivo axénico *in vitro*, de 7-9 meses de edad inoculados en medio MS (Murashige y Skoog) e incubados a 24°C, 10Wm⁻² y fotoperiodo 16/8 h.

Las inflorescencias y plantas se desecaron a temperatura ambiente bajo sombra, se trituraron y se maceraron utilizando el doble de volumen de etanol al 96%, por tres veces durante 48 horas. Las fracciones de extracción, se filtraron y colocaron en placas Petri a temperatura ambiente para su evaporación, el producto se colocó en placas de peso conocido. El extracto obtenido de plantas *in vitro* alcanzó mayor rendimiento (7,925%), que el de inflorescencias (5,698%). Las concentraciones del extracto se obtuvieron de una solución madre (SM) preparada con 30 mg de extracto disuelto en 3 mL de etanol. Para, T1 se usó 0,094 ml de SM y 119,906 mL de agua destilada (AD) obteniéndose la concentración de 0,007815 mg/mL; T2 0,188 ml de SM y 119,812 mL de AD (0,01563 mg/mL); T3, 0,375 ml de SM y 119,625 mL de AD (0,03126 mg/mL); T4, 0,750 ml de SM y 119,250 mL de AD (0,06252 mg/mL) y T5, 0,500 ml de SM y 118,500 mL de AD (0,12504 mg/mL). El volumen total para cada concentración fue 120 mL el cual se distribuyó a razón de 20 mL por vaso con sus respectivas repeticiones y para cada tipo de cepas de *Aedes aegypti* (Motupe y Rockefeller).

Las larvas colectadas en Motupe se identificaron, entre otras, por la forma del sifón y la disposición de las escamas del peine. Se criaron a 75 y 80% HR y 23 y 26 °C obteniéndose la fase adulta entre las 24 a 72 horas²⁰⁻²², esta se caracterizó por el aspecto de mosaico en patas, cabeza, tórax y abdomen; la “lira” en la parte dorsal del tórax y las manchas plateadas en la parte lateral del abdomen; el macho se diferenció por poseer antenas plumosas más notorias y visibles. La oviposición se hizo en recipientes oscuros de plástico con papel kraft y agua. Los huevos, al inicio blancos, se tornaron negros y llegaron a medir 1 mm de longitud. Se conservaron y luego se expusieron al agua hasta la obtención de los estadios larvales. El periodo desde eclosión hasta el IV estadio larval fue de 7 a 10 días. Las larvas del estadio I se caracterizaron por ser

blanquecinas incluyendo el sifón, después de la muda el sifón se tornó oscuro. Desde el estadio II el sifón no cambió de tamaño pero el tórax y el abdomen crecieron considerablemente. Las larvas presentaron movimiento serpenteante y fotofobia. El estadio larval III tuvo un tamaño entre 3 y 5 mm.

Se ejecutó con larvas del III estadio de *Aedes aegypti* de las salvaje y Rockefeller. En cada vaso se colocó 20 mL de cada concentración de extracto etanólico de inflorescencias y plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* por separado, luego se agregó 20 larvas de insectos mantenidas en agua destilada. Los recuentos de mortalidad larvaria se midieron a las 1, 2, 3, 4, 18 y 24 horas. Se consideraron larvas muertas aquellas que no reaccionaron al ser tocadas en la región cefálica; larvas moribundas las que se mantuvieron por debajo del agua o las que no tuvieron reacción característica de sumergirse.

Para obtener la concentración de 0,15 mg/mL de los extractos de *Piper tuberculatum* se mezcló 0,45 mL de la solución madre (SM) y 29,55 mL de agua de mar (AM); para 0,30 mg/mL se utilizó 0,90 de SM y 29,10 de AM; para 0,60 mg/mL, 1,80 de SM y 28,20 de AM; para 1,2 mg/mL, 3,6 de SM y 26,40 de AM. Estas concentraciones estuvieron en los rangos de 1–10 µg/mL (extremadamente tóxico) y >1500 µg/mL (relativamente inocuo) establecidos por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Para cada test se incubaron 100 mg de cistos de *Artemia salina* en 10 mL de agua de mar artificial o natural (35°C) en placa petri, se expusieron a una fuente luminosa de 1000-4000 lux por 1 hora, luego se incubaron a 25 °C por 24 horas en oscuridad, después las larvas en estado instar I se transfirieron a depósitos con agua limpia. Se incubó a 25°C por 24 – 48 horas en oscuridad, hasta que los nauplios alcanzaron el estado instar II. A las 24 horas se seleccionaron 340 nauplios para el bioensayo. Los nauplios y los controles (agua de mar y etanol) se sometieron a los extractos de *P. tuberculatum* a diferentes concentraciones; se llenaron las placas con 10mL de agua de mar y se agregó 1mL de cada concentración. Con pipeta se agregaron 10 nauplios y se incubó a 25°C por 24 horas en oscuridad. Se evaluó el nivel de mortalidad por la movilidad de las larvas. Se contó las larvas vivas y muertas.

Se calcularon los parámetros CL₅₀ y CL₉₀. Los datos de mortalidad se corrigieron según la mortalidad de los controles (fórmula de Abbott). Se usó el software EPA Probit análisis program 1.5.

3. Resultados

Efecto biocida del extracto etanólico de *Piper tuberculatum* sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* de cepas Rockefeller y Salvaje.

a. Efecto del extracto de inflorescencia de *Piper tuberculatum*.

La mortalidad larvaria de *A. aegypti* aumentó en relación directa a la concentración y al tiempo de exposición de los extractos de inflorescencias (mg/mL). Con la concentración 0,125 mg/mL se obtuvo 100% de mortalidad para ambas cepas. A la concentración 0,0078 mg/ la mortalidad fue 20% para la cepa Salvaje y 23,33% para la Rockefeller (Tabla 1).

b. Efecto del extracto de plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum*

La mortalidad larvaria de *A. aegypti* fue directamente proporcional a la concentración y tiempo de exposición de los extractos de plantas *in vitro*. El efecto del extracto a la concentración de 0,125 mg/mL fue 98,33% para la cepa Salvaje, mientras que para la Rockefeller fue 100%. El porcentaje de mortalidad larvaria más bajo para el grupo Salvaje fue 41,67% a la concentración de 0,031 mg/mL y para la cepa Rockefeller fue 3,33% a la concentración de 0,015 mg/mL (Tabla 2).

Dosis Letal (DL₅₀ y DL₉₀) de los extractos de inflorescencia y plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* sobre larvas de *A. aegypti* de las cepas Salvaje y Rockefeller.

a. Dosis Letal (DL₅₀ y DL₉₀) del extracto de inflorescencias de *P. tuberculatum* sobre larvas de *A. aegypti* de las cepas Salvaje y Rockefeller

La cepa Rockefeller fue más susceptible que la salvaje al extracto de inflorescencia; para la cepa Rockefeller se obtuvo una DL₅₀= 0,041 mg/mL en la primera hora y 0,001 mg/mL a las 24 horas y, para la cepa Salvaje DL₅₀= 0,049 mg/mL a la primera hora y 0,003 mg/mL a las 24 horas. Para la DL₉₀, esta fue de 0,107 y de 0,050 mg/mL con la cepa Rockefeller y, con la cepa Salvaje de 0,117 y 0,054 mg/mL a las 01 y 24 horas respectivamente (Tablas 3 y 4).

b. Dosis Letal (DL₅₀ y DL₉₀) del extracto de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* sobre larvas de *A. aegypti* de las cepas Salvaje y Rockefeller

Frente al extracto de plantas *in vitro* y compararlas a nivel de dosis letal media (Tablas 5 y 6), la cepa Rockefeller tuvo una mayor susceptibilidad, obteniéndose para la 01 hora una DL₅₀=0,225 mg/mL y para el grupo salvaje una DL₅₀=0,344 mg/mL. A las 24 horas se reportó la misma DL₅₀=0,002 mg/mL para los dos tipos de cepas. A la DL₉₀ se observó mayor susceptibilidad en las larvas de la cepa Rockefeller, resultando en la 01 hora una DL₉₀=0,383 mg/mL y para la cepa Salvaje una DL₉₀ = 0,528 mg/mL. A las 24 horas se obtuvo la misma DL₉₀=0,097 mg/mL para las cepas.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad larvaria de *A. aegypti* (Motupe y Rockefeller) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición del extracto de inflorescencias de *P. tuberculatum Jacq.* (mg/ mL) y sus respectivos controles (Agua destilada y Etanol 96°)

CONC. (mg/ml)	LARVAS		01 HORA %		02 HORAS %		03 HORAS %		04 HORAS %		18 HORAS %		24 HORAS %	
	VASO	TOT	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC
AGUA DEST.	20	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ETANOL 96°	20	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.007815	20	60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1,66	1,66	1,66	13,33	23,33	20	23,33
0.01563	20	60	1,66	1,66	10	11,67	20	31,67	38,33	40	88,33	95	91,67	95
0.03126	20	60	16,67	38,33	31,67	70	61,67	78,33	90	90	100	100	100	100
0.06252	20	60	71,67	93,33	95	98,33	100	100	100	100	1000	100	100	100
0.12504	20	60	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Leyenda: Conccent: Concentraciones, Tot: Total, Sal: Grupo Salvaje, Roc: Grupo Rockefeller, Dest: Destilada

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad larvaria de *A. aegypti* (Motupe y Rockefeller) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición del extracto de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum Jacq.* (mg/ ml) y sus respectivos controles (Agua destilada y Etanol 96°)

CONC. (mg/ml)	LARVAS		01 HORA %		02 HORAS %		03 HORAS %		04 HORAS %		18 HORAS %		24 HORAS %	
	VASO	TOT	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC	SAL	ROC
AGUA DEST.	20	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ETANOL 96°	20	20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.007815	20	60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.01563	20	60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3,33
0.03126	20	60	0.00	11,67	5	18,33	11,67	36,67	16,67	46,67	38,33	81,67	41,67	86,67
0.06252	20	60	5	8,33	5	25,00	16,67	40	30	50	71,67	88,33	73,33	90
0.12504	20	60	8,33	23,33	26,67	38,33	41,67	65	65	78,33	98,33	100	98,33	100

Leyenda: Conccent: Concentraciones, Tot: Total, Sal: Grupo Salvaje, Roc: Grupo Rockefeller, Dest: Destilada

Tabla 3. Análisis Probit del efecto del extracto de inflorescencias a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de *P. tuberculatum* Jacq. sobre el estadio larval III de *A. aegypti* de cepa Salvaje

Extracto de inflorescencia	Cepa	Tiempos	Pendiente	DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	Límites (95%)
<i>P. tuberculatum</i>	Salvaje	1 Hora	18,900 (±23,263)	0,049	0,035 0,062	0,117	0,052 (±0,105)
		2 Hora	17,540 (±24,687)	0,057	0,042 0,071	0,130	0,067 (±0,134)
		3 Hora	14,525 (±26,000)	0,041	0,023 0,059	0,129	0,076 (±0,152)
		4 Hora	10,929 (±25,134)	0,005	-0,018 0,028	0,122	0,033 (±0,066)
		18 Hora	24,926 (±19,395)	0,007	-0,003 0,017	0,058	0,005 (±0,011)
		24 Hora	25,300 (±18,146)	0,003	-0,006 0,013	0,054	0,004 (±0,009)

Tabla 4. Análisis Probit del efecto del extracto de inflorescencias a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de *P. tuberculatum* Jacq. sobre el estadio larval III de *A. aegypti* de cepa Rockefeller.

Extracto de inflorescencia	Cepa	Tiempos	Pendiente	DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	Límites (95%)
<i>P. tuberculatum</i>	Rockefeller	1 Hora	19,391 (±25,102)	0,041	0,022 0,060	0,107	0,008 (±0,016)
		2 Hora	14,761 (±26,251)	0,039	0,021 0,056	0,125	0,009 (±0,018)
		3 Hora	11,170 (±24,459)	0,016	-0,006 0,039	0,131	0,045 (±0,091)
		4 Hora	11,119 (±24,907)	0,004	-0,018 0,027	0,119	0,031 (±0,063)
		18 Hora	25,859 (±17,830)	0,001	-0,013 0,015	0,050	0,003 (±0,006)
		24 Hora	25,859 (±17,830)	0,001	-0,013 0,015	0,050	0,003 (±0,006)

Tabla 6. Análisis Probit del efecto del extracto de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* Jacq. a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el estadio larval III de *A. aegypti* de cepa Rockefeller.

Extracto planta <i>in vitro</i>	Cepa	Tiempos	Pendiente	DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	Límites (95%)
<i>Piper tuberculatum</i>	Salvaje	1 Hora	6,966 (±7,700)	0,344	0,291 0,396	0,528	0,040 (±0,080)
		2 Hora	12,582 (±6,398)	0,181	0,152 0,210	0,283	0,021 (±0,042)
		3 Hora	10,444 (±5,555)	0,156	0,136 0,176	0,279	0,021 (±0,042)
		4 Hora	13,363 (±8,945)	0,107	0,091 0,124	0,211	0,015 (±0,031)
		18 Hora	12,903 (±23,094)	0,047	0,027 0,067	0,146	0,010 (±0,021)
		24 Hora	13,515 (±26,422)	0,002	-0,016 0,021	0,097	0,007 (±0,014)

Tabla 5. Análisis Probit del efecto del extracto de plantas *in vitro* de *P. tuberculatum* Jacq. a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el estadio larval III de *A. aegypti* de cepa Salvaje.

Extracto plantas <i>in vitro</i>	Cepa	Tiempos	Pendiente	DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	Límites (95%)
<i>P. tuberculatum</i>	Rockefeller	1 Hora	8,095 (±6,105)	0,225	0,199 0,251	0,383	0,007 (±0,014)
		2 Hora	6,822 (±5,441)	0,186	0,156 0,217	0,374	0,028 (±0,056)
		3 Hora	8,841 (±9,898)	0,098	0,075 0,122	0,243	0,018 (±0,036)
		4 Hora	10,007 (±11,583)	0,066	0,045 0,087	0,194	0,014 (±0,028)
		18 Hora	13,822 (±27,435)	0,005	-0,012 0,024	0,098	0,007 (±0,014)
		24 Hora	13,515 (±26,422)	0,002	-0,016 0,021	0,097	0,007 (±0,014)

Toxicidad comparativa de los extractos de inflorescencia y plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* sobre nauplios de *Artemia salina*

a. Toxicidad del extracto de inflorescencias sobre nauplios de *Artemia salina* según la DL₅₀ y DL₉₀

La concentración de 150 µg/ml del extracto de inflorescencias causó la muerte de sólo el 3% de nauplios; mientras que a concentración de 2400 µg/ml mató al 53% (Tabla 7). Por otro lado, la Tabla 6 muestra que los valores de la DL₅₀ (2215 µg/mL) y de la DL₉₀ (3803 µg/mL) son considerados por el CYTED como relativamente inocuos.

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de nauplios de *Artemia salina* a 24 horas de exposición al extracto de inflorescencias (µg/ml) de *P. tuberculatum* Jacq.

CONCENTRACION (µg/mL)	NAUPLIOS			24 HORAS %
	POR ENSAYO	TOTAL USADOS	TOTAL MUERTOS	
AGUA DEST.	10	10	00	00
ETANOL 96°	10	10	00	00
150	10	30	01	03
300	10	30	02	07
600	10	30	02	07
1200	10	30	08	27
2400	10	30	16	53

Tabla 8. Análisis Probit del efecto del extracto de inflorescencias de *P. tuberculatum* Jacq. sobre nauplios de *Artemia salina*.

Extracto Inflorescencia	Especie	Pendiente (±SE)	Dosis Letal (%) ug/mL			
			DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	Límites (95%)
<i>Piper tuberculatum</i>	<i>Artemia salina</i>	0,0008 (±0,0003)	2215,936	1763,567 2668,305	3803,033	2966,365 4639,700

Evaluación de la toxicidad de los extractos de plantas *in vitro* sobre nauplios de *Artemia salina* según la DL₅₀ Y DL₉₀

La tabla 9 muestra que por efecto de los extractos a la concentración de 150 µg/ml murió sólo el 3% de nauplios y a la mayor concentración de 2400 µg/ml murió el 23%. Así mismo, los valores de la DL₅₀ (3736 µg/mL) y de la DL₉₀ (6418 µg/mL) son considerados según el CYTED como relativamente inocuos (Tabla 10).

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de nauplios de *Artemia salina* a 24 horas de exposición al extracto de plantas *in vitro* (ug/ ml) de *P. tuberculatum* Jacq.

CONCENTRACION (µg/ml)	NAUPLIOS			24 HORAS %
	POR ENSAYO	TOTAL USADOS	TOTAL MUERTOS	
AGUA DEST.	10	10	00	00
ETANOL 96°	10	10	00	00
150	10	30	01	03
300	10	30	02	07
600	10	30	02	07
1200	10	30	03	10
2400	10	30	08	23

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de nauplios de *Artemia salina* a 24 horas de exposición al extracto de plantas *in vitro* (ug/ ml) de *P. tuberculatum* Jacq.

Extracto <i>in vitro</i>	Especie	Pendiente (±SE)	Dosis Letal (%) mg/ml			Límites (95%)
			DL ₅₀	Límites 95%	DL ₉₀	
<i>Piper tuberculatum</i>	<i>Artemia salina</i>	0,0005 (±0,0003)	3736,35 0	2971,929 4500,771	6418,254	5105,141 7731,367

4. Discusión

Se demostró que los extractos etanólicos de inflorescencias y de plantas *in vitro* de *Piper tuberculatum* Jacq. tienen efecto biocida sobre el III estadio larval de *Aedes aegypti*, de las cepas Salvaje (Motupe) y Rockefeller, esto por la presencia en la planta de los principios activos piperina, plipartina/ piperlonguminina, 8,9-dihidropiplartina, 4,5-Dyhidropiperina, pyrrolidina y dihidropyridona que son biocidas, de ellos, la amida isobutilica 4,5 – dyhidropiperlonguminina²³, tiene actividad bifuncional actuando como inhibidor neurotóxico en insectos y estadios larvales y como inhibidor de enzimas del citocromo P₄₅₀ impidiendo la función de desintoxicación, aun así, los principios activos son seguros al consumo en mamíferos²⁴. Así mismo ambas cepas fueron más susceptibles al extracto de inflorescencias, debido a que los principios activos no se distribuyen uniformemente por toda la planta²⁵, siendo la semilla (Inflorescencias) la parte de mayor concentración de ellos¹⁴. A la vez el grupo Salvaje mostró mayor resistencia que el Rockefeller, se atribuye a que el primero está en constante enfrentamiento a factores ambientales y productos químicos usados para su erradicación; a diferencia del segundo que es manipulado y usado solo bajo condiciones de laboratorio.

Al comparar las DL₅₀ de los extractos de inflorescencias y plantas *in vitro* sobre el estadio larval III obtenidos hasta la tercera hora, 0,041 y 0,098 mg/mL respectivamente, éstos fueron mayores en relación a un estudio similar¹⁶ en el que se obtuvo 0,015 y 0,019 mg/mL, se explica porque en el presente estudio se empleó como extractor EtOH a fin de disminuir los riesgos de toxicidad a nivel celular, a diferencia del DCM-MeOH utilizado por los autores, que es un buen extractor de principios pero es tóxico, por lo que puede afectar directamente al estadio larval alterando los índices de mortalidad.

La diferencia de resultados también se debe al tiempo de conservación de la planta puesto que en ésta investigación se usó muestras con un lapso de conservación, y en el estudio referido se empleó plantas recién colectadas, debiéndose considerar que la concentración y composición de los principios activos varían con la edad, desarrollo y técnicas de cultivo de la planta, lugar y época de colecta, condiciones de clima y tipo de suelo²⁵. Tampoco se descarta la procedencia, generación y época de colecta del estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* ya que el presente trabajo se realizó mucho tiempo después del estudio en mención y en los últimos años se llevó a cabo programas de erradicación, prevención y control vectorial con uso de químicos (INS/MINSA) que predispone el incremento de los niveles de resistencia^{6,8}.

La mortalidad larvaria aumentó al incrementar las concentraciones y tiempos de exposición de los extractos, debido al refuerzo de estas variables para la actividad de los mecanismos interdependientes que presenta la acción insecticida de *Piper tuberculatum*: transporte a través de la cutícula al sitio de acción, inhibición enzimática y efecto sobre el sistema nervioso central, respiratorio u otro sistema involucrado²⁶. Aun así la DL₅₀ obtenida queda ampliamente relegada de la ofrecida por el Temephos de 0,02 mg/L^{27,28}, debiéndose esto a que los extractos no son productos purificados por lo que los principios activos, a diferencia del Temephos, se encuentran en menores concentraciones, sin embargo la ventaja es el nulo efecto residual y las pocas probabilidades de desarrollo de resistencia por los insectos⁹.

Los ingredientes activos del *Piper tuberculatum* son irritantes sin embargo el riesgo para la salud humana es muy reducido²⁴ lo que ha sido demostrado con la evaluación de su toxicidad empleando el bioensayo con *Artemia salina*²⁹, en consecuencia las DL₅₀ resultantes para los extractos de inflorescencias y plantas *in vitro* según la CYTED los califica como relativamente inocuos³⁰. Con los resultados favorables de efecto biocida y de no toxicidad de *Piper tuberculatum Jacq.* obtenidos en la presente investigación se propone una alternativa natural con una buena relación de costo/efectividad, evitando los efectos colaterales que causan los compuestos químicos por acumulación en órganos diana como el hígado, además de obtener mayor accesibilidad al producto, brindando una herramienta más para la erradicación del mosquito y así disminuir las cifras de morbimortalidad causadas por el Dengue.

5. Conclusiones

- Los extractos etanólicos de inflorescencias y plantas de *Piper tuberculatum Jacq.* tienen efecto biocida *in vitro* sobre larvas del III estadio de *Aedes aegypti* siendo mayor el efecto del extracto de inflorescencias con respecto al extracto de plantas, tanto para la cepa Salvaje como para la cepa Rockefeller.

- *Piper tuberculatum* Jacq. “Matico” no tuvo toxicidad frente a *Artemia salina*, según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

6. Referencias Bibliográficas

1. Figueroa R, Herrera A. Vigilancia Entomológica. Proyecto de cooperación entre países. Ecuador-Perú. 2001.
2. Githco AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA. El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: Un Análisis Regional. Boletín de la OMS. 2001; 79(9): 74 – 79.
3. Guzmán M. El Dengue y el Dengue hemorrágico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. La Habana (Cuba). 2002; 54(3): 1-2.
4. Dirección General de Epidemiología, Red Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud. Situación actual del dengue en el Perú. Semana epidem.33. (Lima). 2011.
5. Gerencia Regional de Salud Lambayeque-Oficina de Epidemiología. Situación actual del Dengue en Lambayeque. Semana epidem. 38. Boletín Epidemiológico Perú. 2012.
6. Chávez J, Córdova O, Vargas F. Niveles de susceptibilidad a Temephos en el vector transmisor del Dengue en Trujillo, Perú. An Fac Med. (Lima). 2005; 66(1): 53-56.
7. Bisset J, Rodríguez M, Cáceres L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. Rev Cubana Med Trop. 2003; 55(3):191-195.
8. Palomino M, Solari L, León W, Vega R, Vergaray M, Cubillas L, Mosqueda R, García N. Evaluación del efecto residual del Temephos en larvas de *Aedes aegypti* en Lima. (Perú). Rev. Perú Med Exp salud pública. 2006; 23(3).
9. Vargas F, Córdova O, Alvarado A. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. Rev. Perú Med. Exp Salud Pública. 2006; 23(4):259-264.
10. Ministerio de Salud. Dengue Clásico y Dengue Hemorrágico. Módulos Técnicos 7. Lima. 2000.
11. Wirth M. Temphos resistance in mosquito larvae: Historia & Consequence. The abstract book of the 87 Annual Meeting of the Amer Mosquit Contrs. Assoc. New Yersy. 2000.
12. Weinzier R, Henn T. Alternatives in insect mangement Biological and bionational approaches North Central Regional Extensión Publicattión 401 University of Hiinois at Habana Champaign. 1992.
13. Miranda JE, Navickiene HM, Murata AT, Kato MJ, Bortoli SA, Santos M, Bolzani VS. Furlan M. Compostos inseticidas isolados de *Piper tuberculatum*-teste de suscetibilidade em *Diatraea saccharalis*. In: congresso brasileiro de defensivos agrícolas naturais 1. Fortaleza. Anais. Fortaleza: Academia Cearense de Ciências. 2000.
14. Soberon G. Susceptibilidad de poblaciones larvarias de *Diatraea saccharalis* Fabr (“bover”) y *Spodoptera frugiperda* Smith (“Colloquero”) a la acción biocida de extractos etanólicos, DCM – MeOH y acuosos de plantas de campo e in vitro de *Piper tuberculatum* Jacq. Tesis para obter el título profesional de Licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología. UNPRG. (Lambayeque). 2004.
15. Mendoza N, Monsalve L. Actividad biocida del extracto DCM-MeOH de inflorescencias y plantas in vitro de *Piper tuberculatum* Jacq. Sobre larvas del III estadio de *Heliothis virescens* Fabr. (Bellotero) y adultos de *Dysdercus peruvianus* Guerin. (Arrebiatado). Tesis

- para optar el título de licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología. UNPRG. (Lambayeque). 2012.
16. Bazán F. Efecto del extracto de inflorescencias y plantas in vitro de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis* en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el título de licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología. Lambayeque, Perú. 2007.
 17. Meyer B, Ferrigni N, Putman J, Jacobsen L, Nichols D, Mc Laughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*. 1982; 45:31-34.
 18. Mc Laughlin JL, Rogers LI, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 1998; 32:513-524.
 19. Alvitres V. Metodología de la Investigación Científica. Editorial Ciencia. Perú; 2000.
 20. Estrada J, Craig Y. Biología, Relaciones con Enfermedades y control de *Aedes albopictus* OPS/OMS .Washington EUA. 1995.
 21. Nelson M. *Aedes aegypti*. Biología y Ecología. OPS/ OMS. (Washington). 1986.
 22. Consoli R, Lourenco R. Principais mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. Fiocruz Ira Ed. Brasil. 1998.
 23. Bernard CB, Krishnamurty HG, Chauret D, Durst T, Philogene BJR, Sánchez C, Hasbun L, Poveda L, San Roman L, Amason J. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology*. 1995; 21: 801 – 814.
 24. Scott IM, Punianai E, Durst T, Phelps D, Merali S, Asabgui RA, Sánchez P, Vindas L, Povedat L, Philogene B. Arnason J. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. *Agricultural and Forest Entomology*, Londres. 2002; 4:137-144.
 25. Shaparin N. Machado L. Extracción y fabricación de extractos vegetales. En: Curso Internacional de Fitofarmacia II Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia Lima. 2003.
 26. Gunther A, Jeppson Y. Insecticidas Modernos y la Producción Mundial de Alimentos. Compañía Editorial Continental S.A. México. D. F; 1962.
 27. Ministerio de Salud. Distribución de los principales insectos vectores de enfermedades en el Perú. Documento técnico 4. Lima. 2002.
 28. Milian R, Frias P. Susceptibilidad y Factor de resistencia (FR₅₀) de larvas (estadio III) de *Aedes aegypti* procedente de los distritos de Olmos y Motupe –Región de Lambayeque a Temephos (Abate®) a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Tesis para optar el título de licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología. UNPRG. (Lambayeque). 2013.
 29. Juárez S. Evaluación citotóxica in vitro de diez extractos de plantas en larvas de *A. salina*. Tesis. Universidad San Carlos de Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia-USAC; 1996.
 30. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, Scull R, Gutiérrez Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*. 2009; 61(3):254-8.

Correspondencia:

Carlos Omar Dávila Campos
Correo electrónico: caromar16_1@hotmail.com

Fecha de recepción: 18 marzo 2016

Fecha de aceptación: 20 junio 2016