

Actividad larvicida de extractos vegetales de la familia Asteraceae y modelación matemática para su uso en el control de poblaciones de *Aedes aegypti*

Larvicidal activity of plant extracts from Asteraceae family and a mathematical model for its use to control populations of *Aedes aegypti*

Oscar A. Aguirre-Obando^{1*}, Irene Duarte-Gandica¹, Juan C. Álvarez-Londoño¹, Jorge A. Jiménez-Montoya¹

Resumen

El dengue, chikunguña y Zika, todas transmitidas por *Aedes aegypti*, son enfermedades que afectan ampliamente la población mundial. La evaluación de extractos vegetales permite el establecimiento de productos eficientes para el control de éste mosquito. Este trabajo evaluó la actividad larvicida en *A. aegypti* de 23 especies de la familia Asteraceae, y su composición fitoquímica preliminar. El material vegetal utilizado se recolectó en el Departamento del Quindío, Colombia. Con este material se prepararon los extractos vegetales etanólicos utilizados en la caracterización fitoquímica y en los bioensayos. Para cada extracto se realizó un bioensayo dosis-respuesta con larvas provenientes del municipio de Armenia (Quindío, Colombia) siguiendo el protocolo de la OMS. Estos indican que, después de 48 h, los extractos de *Jaegeria hirta* (694,8% $\pm$ 149,9), *Austroeupatorium inulaefolium* (753,3% $\pm$ 198,8) y *Heliopsis oppsitifolia* (764,4% $\pm$ 170,0) requieren menor concentración para matar el 95% de las larvas. Adicionalmente, se construyó un modelo matemático que describe el comportamiento de las poblaciones, con el fin de evaluar diferentes estrategias de control con los extractos; las simulaciones obtenidas a partir de la solución numérica del sistema permiten concluir que la aplicación de extractos de estas plantas constituye una herramienta viable para el control de *A. aegypti*. Por su parte, la marcha fitoquímica preliminar de las 23 especies muestra la presencia de taninos, quinonas, flavonoides, esteroides, cumarinas y alcaloides. Se concluye que *J. hirta*, *A. inulaefolium* y *H. oppsitifolia* ameritan ser estudiadas en profundidad, dado su potencial larvicida para el control de *A. aegypti*.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, bioensayos, extractos vegetales, fitoquímica, larvicida, modelo matemático

Abstract

Dengue, chikungunya and Zika, all transmitted by *Aedes aegypti*, are diseases that affect the human world population. The evaluation of raw plant extracts allows the establishment of efficient products for the control of populations of this mosquito. This work evaluated the larvicidal activity of 23 species of the family Asteraceae, and its preliminary phytochemical composition, to control populations of *A. aegypti*. The vegetable material was collected in the department of Quindío, Colombia. We prepared the plant extracts used in the phytochemical characterization and bioassays with the material collected. For each extract, a dose-response bioassay was performed with larvae from the municipality of Armenia (Quindío, Colombia) following the WHO protocol. These assays indicated that after 48h the extracts of *Jaegeria hirta* (694.8% $\pm$ 149.9), *Austroeupatorium inulaefolium* (753.3% $\pm$ 198.8) and *Heliopsis oppsitifolia* (764.4% $\pm$ 170.0) require less concentration to kill 95% of larvae. Additionally, a mathematical model that describes the behavior of the mosquito populations was constructed, in order to evaluate different control strategies using the extracts; the simulations obtained from the numerical solution of the system allow us to conclude that the application of extracts from these plants constitutes a viable tool for *A. aegypti* control. On the other hand, the preliminary phytochemical analysis of the 23 plant species shows the presence of tannins, quinones, flavonoides, sterols, coumarins and alkaloids. It is concluded then, that *J. hirta*, *A. inulaefolium* and *H. oppsitifolia* deserve to be further studied, given their larvicidal potential for the control of *A. aegypti*.

Key words: *Aedes aegypti*, bioassays, vegetable extracts, phytochemistry, larvicide, mathematical model

¹. Escuela de Investigación en Biomatemática, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

* Autor para correspondencia: <oscaraguirre@uniquindio.edu.co>

Recibido: octubre de 2017; aceptado: febrero de 2018.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por artrópodos afectan anualmente millones de personas en todo el mundo. Entre esas enfermedades, el dengue posee el mayor potencial epidemiológico (WHO 2014). *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) es un importante vector de dengue, chikunguña y Zika (Evans et al. 2015). En las Américas, particularmente en Colombia, *A. aegypti* es el principal vector de dengue y recientemente de los virus de chikunguña y Zika (Higgs y Vanlandingham 2015, WHO 2013). Varios estudios se realizan para desarrollar una vacuna eficaz contra estas enfermedades (Kantor 2016), principalmente el dengue, la cual ya cuenta con una vacuna en el mercado (Villar et al. 2015). Sin embargo, dada la complejidad en la elaboración de estas vacunas (v. g., varios serotipos por cada arbovirus, efectos colaterales en personas nunca antes infectadas y número de dosis (Aguir et al. 2016, Halstead y Aguiar 2016), actualmente el medio más eficaz es controlar las densidades poblacionales del vector a fin de reducir el número de casos de dengue, chikunguña y Zika (WHO 2013).

A nivel mundial, incluyendo Colombia, las estrategias de control vectorial son orientadas a la participación comunitaria mediante campañas de educación para reducir los posibles criaderos de larvas. Sin embargo, en situaciones epidémicas se sugiere la aplicación de insecticidas químicos a gran escala (MinSalud et al. 2011). No obstante, el uso continuo de los insecticidas utilizados en los programas de control vectorial ha resultado en la selección de poblaciones de *A. aegypti* resistentes en Colombia y el mundo (Aguirre-Obando et al. 2015, Bisset Lazcano et al. 2014, Conde et al. 2015, Fonseca-González et al. 2011, Linss et al. 2014, Santacoloma et al. 2012).

Las opciones de insecticidas para el reemplazo son escasas, debido a los altos costos de desarrollo y la resistencia inevitable a los insecticidas (Nkya et al. 2013). Por lo anterior, es necesario buscar alternativas para el control de *A. aegypti* que reduzcan los problemas que posee el uso de insecticidas sintéticos (Maciel-de-Freitas et al. 2012). Como métodos alternativos, para el control de este mosquito vector, se han evaluado en laboratorio controladores biológicos como: depredadores naturales (Anogwih et al. 2015, Tran et al. 2015), hongos entomopatógenos (Soares-da-Silva et al. 2015) y extractos naturales de plantas (Hernández-Morales et al. 2015). Estos métodos han demostrado ser efectivos controlando poblaciones de mosquitos y evitando el desarrollo de resistencia. En Colombia, varios trabajos usando extractos vegetales se han desarrollado en la búsqueda de nuevas

moléculas para el control de *A. aegypti* (Amariles-Barrera et al. 2013, Bello et al. 2008, Parra et al. 2007).

Entre estos métodos, los extractos naturales de plantas constituyen una fuente de nuevas y variadas estructuras bioactivas (metabolitos secundarios), las cuales pueden tener actividad intrínseca o servir como líderes para el desarrollo de insecticidas más seguros (Díaz Castillo et al. 2012). Los metabolitos secundarios, entre los que sobresalen alcaloides, terpenoides, cumarinas y fenoles, se caracterizan por presentar actividad biológica para controlar insectos vectores (Pani et al. 2015, Tehri y Singh 2015).

Los insecticidas de origen botánico son usados tradicionalmente por las comunidades humanas en muchos lugares del mundo para el manejo de mosquitos vectores (Kishore et al. 2014, Pani et al. 2015). Entre las familias botánicas con potencial insecticida para el control de *A. aegypti* se encuentra la familia Asteraceae (Bessada et al. 2015, Sukhthankar et al. 2014, Tennyson et al. 2015). Esta familia constituye una de las más grandes de plantas vasculares, comparable en complejidad y número de especies (25.000 aproximadamente) con las orquídeas (Bessada et al. 2015, Duarte et al. 2015). Después de Brasil (2.000 especies) y Perú (1.655 especies), Colombia es el país con más especies (1.420) descritas en América del Sur (Jørgensen et al. 2011, Silva y Andrade 2013). Dada la alta diversidad de la flora colombiana, incluyendo la familia Asteraceae (Jørgensen et al. 2011), es plausible identificar especies con potencial larvicida para controlar las poblaciones naturales de *A. aegypti*.

El presente estudio evaluó la actividad larvicida y la composición fitoquímica preliminar de algunas especies de la familia Asteraceae presentes en Colombia contra larvas de III y IV instar de *A. aegypti*. Adicionalmente, con el fin de evaluar diferentes estrategias de control con los extractos, se construyó un modelo matemático en ecuaciones diferenciales ordinarias que describe el comportamiento de las poblaciones cuando se varían las dosis letales (DL) y los periodos de aplicación de estas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolectas. Se recolectaron y utilizaron poblaciones naturales de *A. aegypti* para verificar el potencial efecto larvicida de algunos extractos crudos vegetales de la familia Asteraceae, usando poblaciones naturales de este vector (Asiry et al. 2017, Coria et al. 2008). Para esto, se recolectaron larvas de *A. aegypti* de cuatro localidades de

la ciudad de Armenia (Quindío, Colombia): El Ancianato del Carmen (4° 31' 37" N, 75° 42' 38" W), el barrio Berlín (4° 32' 1" N, 75° 40' 47" W), la Ciudadela La Patria (4° 32' 22" N, 75° 42' 8" W) y la Terminal de Transportes (4° 31' 38" N, 75° 41' 2" W). Las recolectas se realizaron siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para determinar índices de infestación de *A. aegypti* (WHO 1998). Estas localidades fueron utilizadas por presentar altos índices de infestación del vector (Osorio et al. 2017). De cada localidad fueron recolectadas aleatoriamente larvas de *A. aegypti* de al menos 10 tanques diferentes de almacenamiento de agua ubicados en viviendas seleccionadas. Cada tanque de almacenamiento de agua estaba localizado con al menos 100 m de separación uno del otro. Las larvas de cada localidad fueron llevadas al laboratorio y mantenidas bajo condiciones controladas (25 ± 1 °C, humedad 80 ± 10% y fotoperíodo 12:12 h) hasta la emergencia de los adultos. Todos los adultos de *A. aegypti* fueron reunidos para establecer una colonia base, la cual fue denominada ARM08. Los mosquitos adultos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y sangre (para inducir ovoposición en hembras) dos veces por semana utilizando ratones (*Mus musculus* Swiss). Las larvas de la generación F₃ fueron usadas como material para determinar, en bioensayos dosis-respuesta, la actividad larvicida de las especies vegetales recolectadas.

El material vegetal seleccionado para evaluar la actividad larvicida fue obtenido a partir del levantamiento de la flora arvense de la región cafetera centro-andina de Quindío-Colombia (Vélez et al. 1998). Las 23 especies recolectadas de la familia Asteraceae corresponden a las más frecuentes encontradas en el departamento del Quindío. La identificación taxonómica de las especies recolectadas se realizó por comparaciones con los ejemplares de herbario previamente depositados en el Herbario de la Universidad del Quindío (HUQ) (Vélez et al. 1998), así como con la ayuda de especialistas del HUQ. De cada ejemplar recolectado se depositó una muestra en el HUQ. La recolección del material vegetal, así como el procesamiento en laboratorio siguió las recomendaciones descritas por Bilbao (1997). Las especies vegetales fueron recolectadas en el departamento del Quindío en los municipios: Armenia (4° 32' 20" N, 75° 40' 21" W), Salento (4° 38' 14" N, 75° 34' 15" W), Génova (4° 12' 27" N, 75° 47' 24" W) y Córdoba (4° 23' 28" N, 75° 41' 16" W).

Marcha fitoquímica preliminar. La obtención, extracción y análisis fitoquímico preliminar de las especies recolectadas se realizó siguiendo la metodología descrita por Bilbao (1997), en la cual se examinó la presencia/ausencia de los

metabolitos secundarios: taninos, quinonas, flavonoides, esteroides, aglicones cardiotónicos, desoxiazúcares, saponinas, cumarinas y alcaloides. Para la extracción de cada especie se utilizaron hojas frescas (2.400 g por especie) y se empleó etanol al 95% rectificado. De cada extracto etanólico crudo obtenido, 40 ml fueron utilizados para obtener las fracciones químicas sin clorofila, polar y no polar y posteriormente realizar en cada una de estas las pruebas fitoquímicas, incluyendo el extracto crudo. Brevemente, para obtener la fracción sin clorofila se utilizó acetato de plomo al 4% y ácido acético al 0,5%. Posteriormente, a esta nueva fracción se le realizó una extracción líquido-líquido con 22 ml (4 veces) de éter de petróleo (Mallinckrodt grado técnico), el cual permitió la obtención de la fracción polar y no polar. El volumen restante (460 ml) de cada extracto etanólico se concentró en rotoevaporador (40 °C) hasta la eliminación del etanol. La sustancia sólida obtenida para cada extracto crudo se pesó y disolvió en un volumen conocido de agua destilada para obtener las concentraciones finales: 1.000, 500, 100, 10, 1,0 y 0,1%. Cada extracto crudo concentrado se utilizó para la realización de los bioensayos dosis-respuesta.

Bioensayos dosis-respuesta. Los bioensayos dosis-respuesta para cada extracto crudo concentrado se realizaron siguiendo la metodología propuesta por la OMS (WHO 1981). En estos experimentos, las larvas de *A. aegypti* (tercero o cuarto instar inicial) fueron expuestas a seis concentraciones (1.000, 500, 100, 10, 1,0 y 0,1%) para determinar la mortalidad larval a las 24 y 48 h de exposición. Las larvas fueron consideradas muertas cuando no reaccionaron al contacto físico en la región cervical y/o cuando presentaron movimientos muy lentos o incapacidad para flotar. Para cada concentración y para el control, fueron evaluadas cuatro réplicas de 20 larvas. Adicionalmente, para cada bioensayo se incluyeron dos grupos control para los experimentos, uno utilizando agua filtrada y otro etanol absoluto al 95% (solvente empleado para la obtención de los extractos etanólicos).

Los datos de mortalidad (expresados en número de muertos por dosis) fueron utilizados para calcular las concentraciones letales 50 y 95 (CL₅₀ y CL₉₅) a las 24 y 48 h de los individuos expuestos y analizados a través del método log-probit de Finney (1971), utilizando el programa Probit de Raymond (1993). Este análisis se realizó para aquellos extractos vegetales que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después de 48 h.

Adicionalmente, para los extractos etanólicos que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después

de 48 h, se realizó un análisis de varianza factorial completamente aleatorizado (ANOVA factorial). Previo al ANOVA factorial se comprobó la distribución normal y la homogeneidad de varianzas de los datos. El ANOVA factorial evaluó las diferencias entre los factores: especie, tiempo (24 y 48 h) y concentración (1.000, 500, 100, 10, 1,0 y 0,1%) con cuatro repeticiones. Cuando las diferencias fueron significativas se utilizó el test de Tukey HSD (Honestly-Significant-Difference) para explicar las diferencias entre niveles de cada factor. Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA 7 (Statsoft Inc. 1984-2004).

Modelo matemático. Se construyó un modelo matemático en ecuaciones diferenciales que describe el comportamiento de las poblaciones.

Se consideraron cuatro estadios para *A. aegypti*: Huevo (*H*), larva (*L*; incluye desde el primero hasta el cuarto instar), pupa (*P*) y adulto (*A*). Las variables, *H*(*t*), *L*(*t*), *P*(*t*), y *A*(*t*) representan el número de individuos en el tiempo (medido en días), en los estadios huevo, larva, pupa y adulto, respectivamente.

A través de cada estadio, las tasas vitales se asumieron constantes.

λ_H es la proporción de huevos que pasan a larva.

λ_L es la proporción de larvas que pasan a pupa (incluyendo sobrevivencia por estadio).

λ_P es la proporción de pupas que pasan a adulto.

λ_A es el número de huevos que oviposita una hembra

θ es la proporción hembra-macho.

El sistema en ecuaciones diferenciales que interpreta la dinámica es el siguiente:

$$\begin{aligned} H'(t) &= \lambda_A \theta A(t) - \mu_H H(t) \\ L'(t) &= \lambda_H H(t) - (\lambda_L + \mu_L) L(t) \\ P'(t) &= \lambda_L L(t) - (\lambda_P + \mu_P) P(t) \\ A'(t) &= \lambda_P P(t) - \mu_A A(t) \end{aligned}$$

Se obtuvo la solución numérica usando el método de Runge-Kutta de orden 4 (Burden y Faires 2005) implementado en ambiente MATLAB® (Mathworks 2009).

Simulaciones. Se simuló el comportamiento de las poblaciones suponiendo la no aplicación de extractos vegetales (referencia), así como aplicaciones sucesivas de las CL₅₀ y CL₉₅ en diversos períodos. En todas las simulaciones, las poblaciones iniciales fueron de 10 individuos en cada uno de los estadios de *A. aegypti*. Los parámetros biológicos utilizados en las simulaciones, estimados a partir de los datos proporcionados en Bar-Zeev (1958), Li et al. (1985), Manrique-Saide (1998) y Rebelo et al. (1999), fueron los siguientes:

$$\mu_H=0,9; \mu_L=0,89/11,5; \mu_P=0,18; \mu_A=0,1; \lambda_H=0,714; \lambda_L=0,1; \lambda_P=0,09; \lambda_A=8; \theta=0,5$$

RESULTADOS

Marcha fitoquímica preliminar. La marcha fitoquímica preliminar evidenció la presencia, en todas las plantas, de taninos, flavonoides, cumarinas y alcaloides (tabla 1). Adicionalmente, en algunas especies se encontraron quinonas, esteroides y saponinas. Entre todas las especies analizadas, *Emilia coccinea* fue la única especie que presentó todos los metabolitos secundarios evaluados.

Bioensayos dosis-respuesta. Las especies *Jaegeria hirta* (CL₉₅ = 694,8% ± 149,9), *Heliopsis oppsitifolia* (CL₉₅ = 764,4% ± 170,0), *Austro eupatorium inulaefolium* (CL₉₅ = 753,3% ± 198,8), *Conyza bonariensis* (CL₉₅ = 1174,8% ± 278,0), *Hypochoeris radicata* (CL₉₅ = 1600,7% ± 425,2), *Acmella mutisii* (CL₉₅ = 1528,6% ± 383,0) y *Galinsoga quadriradiata* (CL₉₅ = 1570,4% ± 406,5) causaron porcentajes de mortalidad mayores al 50% después de 24 y 48 h (tabla 2). En ningún experimento se presentó mortalidad en alguno de los dos grupos control. Entre estas especies, *J. hirta*, *H. oppsitifolia*, *C. bonariensis* y *A. mutisii* presentaron los metabolitos secundarios taninos, quinonas, flavonoides, esteroides, cumarinas y alcaloides. Por su parte, *A. inulaefolium* presentó taninos, flavonoides, cumarinas y alcaloides y *G. quadriradiata* taninos, quinonas flavonoides, cumarinas y alcaloides (tabla 1).

El ANOVA factorial para los extractos etanólicos que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después de 48 h, mostró diferencias significativas entre todos los factores analizados, así como sus interacciones (tabla 3). En la figura 1 se puede apreciar que concentraciones mayores (500 y 1.000%) de extractos etanólicos de *J. hirta*, *H. oppsitifolia*; y *A. inulaefolium*, consiguen eliminar un mayor porcentaje de larvas. Esta tendencia se mantuvo en los dos tiempos de lectura realizados (24 y 48 h). En contraste, las concentraciones más bajas (0,1 – 1,0%) no ocasionaron mortalidad larval.

Tabla 1. Composición fitoquímica preliminar de extractos etanólicos de especies de la familia Asteraceae colectadas en el departamento del Quindío, Colombia. En negrilla se resaltan las especies que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después de 48 h

Especie	Vouchers	Metabolito secundario						
		Taninos	Quinonas	Flavonoides	Esteroles	Saponinas	Cumarinas	Alcaloides
<i>J. hirta</i>	10401	X	X	X	X		X	X
<i>H. oppsitifolia</i>	15590	X	X	X	X		X	X
<i>A. inulaefolium</i>	00421	X		X			X	X
<i>C. bonariensis</i>		X	X	X	X		X	X
<i>H. radicata</i>	00471	X		X			X	X
<i>A. mutisii</i>	11367	X	X	X	X		X	X
<i>G. quadriradiata</i>	11378	X	X	X			X	X
<i>C. japonica</i>	10321	X	X	X	X		X	X
<i>T. officinale</i>	11132	X		X	X		X	X
<i>A. cumanensis</i>	32637	X		X	X		X	X
<i>E. coccinea</i>	11087	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. acuminata</i>	11538	X		X			X	X
<i>F. microstemon</i>	03349	X		X			X	X
<i>A. conyzoides</i>	10988	X		X			X	X
<i>C. caudata</i>	10370	X	X	X		X	X	X
<i>S. eupatorioides</i>	15489	X	X	X			X	X
<i>B. pilosa</i>	11026	X	X	X			X	X
<i>T. erecta</i>	30770	X		X			X	X
<i>A. vulgaris</i>	10998	X	X	X			X	X
<i>A. ciliata</i>	14178	X		X			X	X
<i>B. trinervis</i>	11508	X	X	X	X		X	X
<i>B. nítida</i>	10975	X		X			X	X
<i>C. surinamense</i>	00353	X	X	X	X		X	X

Por su parte, los bioensayos dosis-respuesta indican que los extractos etanólicos de *J. hirta*, *H. oppsitifolia* y *A. inulaefolium* presentaron las CL_{50} y CL_{95} más bajas en los dos tiempos de lectura, 24 y 48 h (tabla 4). Sin embargo, entre estas especies, los extractos etanólicos que requieren menor concentración para matar el 95% de las larvas en 48 h son, en su orden: *J. hirta*, *A. inulaefolium* y *H. oppsitifolia*.

Simulaciones. La figura 2 muestra algunas de las simulaciones hechas a partir de la solución numérica del modelo. La figura 2 A corresponde al comportamiento de las poblaciones cuando no hay aplicación de extractos y es

tomada como la gráfica de referencia; la figura 2 B y 2 C muestran el comportamiento de las poblaciones cuando se aplica la DI_{50} , en periodos de 30 y 15 días, respectivamente; la figura 2 D y 2 E corresponden a la aplicación de la DI_{95} , en periodos de 30 y 15 días, respectivamente. Se observa que las aplicaciones más frecuentes, cada 15 días, hacen que la población de adultos disminuya rápidamente, alcanzando el 50% de la población inicial en aproximadamente 2 meses con la DI_{95} y en aproximadamente 3 meses con la DI_{50} . Cuando el intervalo de aplicación es mayor a 30 días, el tiempo tomado para alcanzar este mismo nivel de 50% de la población inicial de adultos es de aproximadamente 3 meses para la DI_{95} y de aproximadamente 6 meses para la DI_{50} .

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad (en orden descendente) de larvas de 3-4 estadio de *A. aegypti* frente a diferentes especies y concentraciones de extractos etanólicos evaluados después de 24 y 48 h. En negrilla se resaltan las especies que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después de 48 h. En todos los experimentos no se presentó mortalidad en ninguno de los dos grupos control

Especie	Concentración (%)											
	1000		500		100		10		1		0,1	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>J. hirta</i>	79	97	14	77	4	4	1	1	1	1	1	1
<i>H. oppsitifolia</i>	90	94	66	71	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. inulaefolium</i>	86	90	89	90	19	25	0	0	0	0	0	0
<i>C. bonariensis</i>	41	72	17	67	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. radicata</i>	36	62	1	17	0	15	0	0	0	0	0	0
<i>A. mutisii</i>	27	56	19	38	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>G. quadriradiata</i>	9	52	11	42	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. japonica</i>	9	42	5	24	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. officinale</i>	2	39	2	21	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>A. cumanensis</i>	6	35	2	26	5	9	1	2	0	0	0	0
<i>E. coccinea</i>	25	32	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. acuminata</i>	2	30	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. microstemon</i>	1	22	9	19	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>A. conyzoides</i>	5	17	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. caudata</i>	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. eupatorioides</i>	0	10	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. pilosa</i>	0	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. erecta</i>	1	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. vulgaris</i>	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. ciliata</i>	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. trinervis</i>	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. nitida</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. surinamense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. Análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad de larvas de 3-4 estadio de *A. aegypti* frente a diferentes especies y concentraciones de extractos etanólicos para las especies que mostraron porcentajes de mortalidad >50% después de 48 h

Factor analizado	F	p
Especie (E)	109,96	0,0001*
Tiempo (T)	159,79	0,0001*
Concentración (C)	1166,41	0,0001*
E x T	8,50	0,0001*
E x C	38,84	0,0001*
T x C	57,96	0,0001*
E x T x C	6,21	0,0001*

*Valores de p con diferencias significativas ($p < 0,05$).

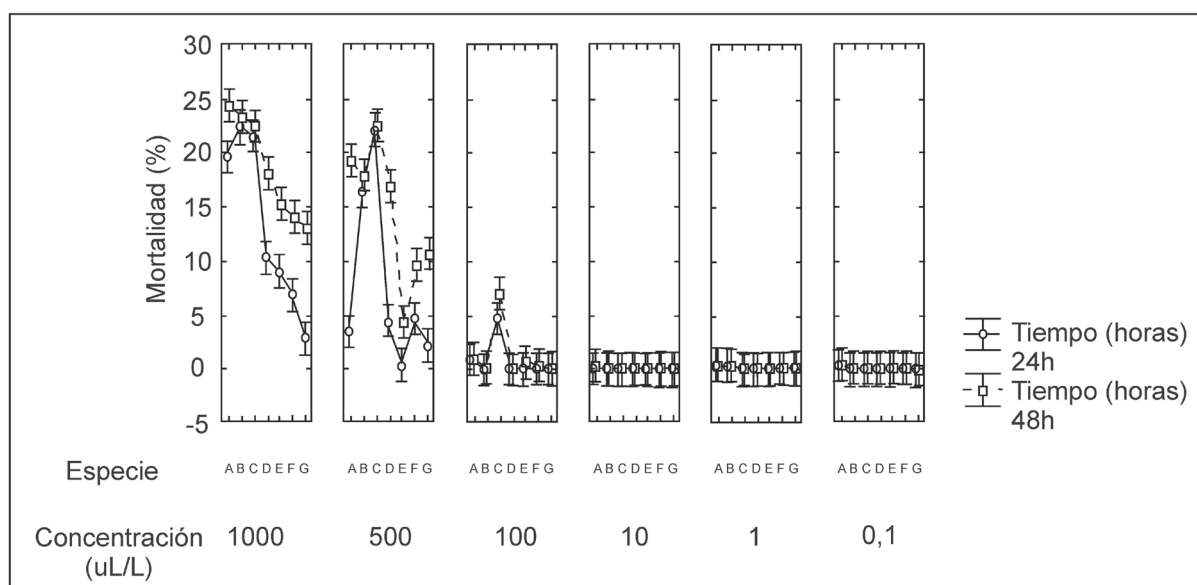


Figura 1. Gráfico de interacción para el porcentaje de mortalidad obtenido en larvas de *A. aegypti* utilizando extractos etanólicos de algunas especies de la familia Asteraceae. Adicionalmente se presentan los porcentajes de mortalidad para los factores especie (A-G), tiempo (24 y 48 h) y concentración (1.000 - 0,1 uL/l). Los valores de las figuras representan el promedio $\pm$ desviación estándar. A. *J. hirta*, B. *H. oppositifolia*, C. *A. inulaefolium*, D. *C. bonariensis*, E. *H. radicata*, F. *A. mutisi*, G. *G. quadriradiata*.

Tabla 4. Perfil de susceptibilidad de larvas de 3-4 estadio de *A. aegypti* frente a extractos etanólicos de especies de la familia Asteraceae que mostraron porcentajes de mortalidad $>50\%$ después de 24 y 48 h. Entre paréntesis se presenta la desviación estándar para cada CL. En todos los experimentos no se presentó mortalidad en ninguno de los dos grupos control

Especie*	TE (horas)	CL (%)	
		50	95
<i>J. hirta</i>	24	784,6 (131,8)	1289,9 (264,4)
<i>H. oppositifolia</i>	24	502,9 (99,6)	880,1 (207,5)
<i>A. inulaefolium</i>	24	403,3 (100,0)	833,8 (216,4)
<i>C. bonariensis</i>	24	1040,2 (205,9)	1709,3 (500,3)
<i>H. radicata</i>	24	1070,3 (143,6)	1439,7 (578,3)
<i>A. mutisii</i>	24	1196,8 (326,4)	2011,8 (794,6)
<i>G. quadriradiata</i>	24	1568,5 (781,8)	2488,2 (1921,6)
<i>J. hirta</i>	48	402,1 (81,6)	694,8 (149,9)
<i>H. oppositifolia</i>	48	461,7 (83,1)	764,4 (170,0)
<i>A. inulaefolium</i>	48	360,4 (93,4)	753,3 (198,8)
<i>C. bonariensis</i>	48	619,4 (130,6)	1174,8 (278,0)
<i>H. radicata</i>	48	867,7 (181,7)	1600,7 (425,2)
<i>A. mutisii</i>	48	844,9 (168,0)	1528,6 (383,0)
<i>G. quadriradiata</i>	48	859,9 (175,7)	1570,4 (406,5)

* Todos los bioensayos incluyeron larvas de la generación filial F_1 ; TE= Tiempo de exposición.

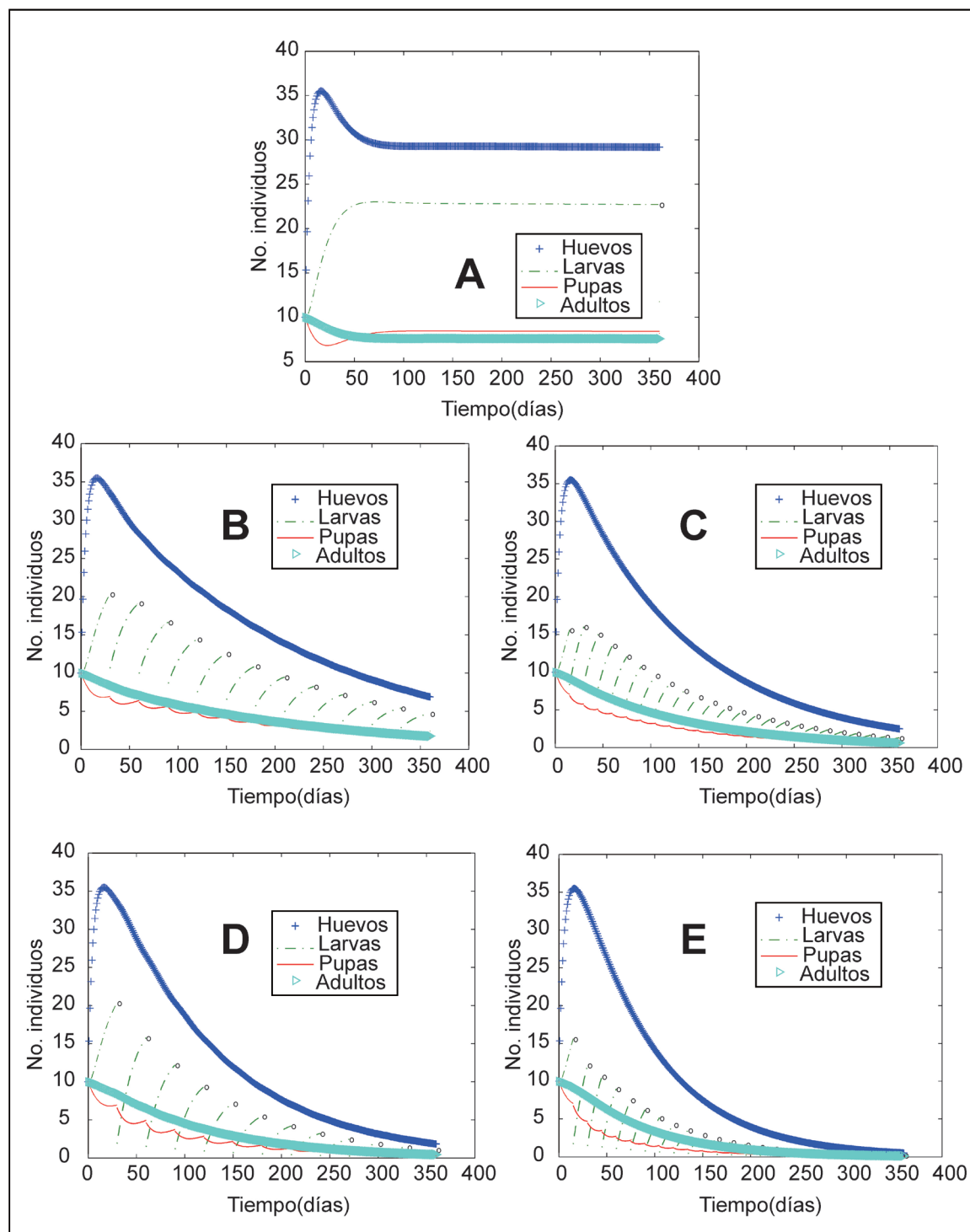


Figura 2. Comportamiento de poblaciones de *A. aegypti*. A. sin aplicación de producto durante 6 meses y con aplicaciones sucesivas de la dosis letal 50 de extractos etanólicos concentrados: B. cada 30 días, durante 1 año; C. cada 15 días, durante 1 año. Adicionalmente, se presenta el comportamiento de las poblaciones del vector cuando se aplica sucesivamente la CL₉₅ D. cada 30 días, durante 1 año y E. cada 15 días, durante 1 año.

DISCUSIÓN

El presente trabajo evaluó la posible utilización de tres plantas arvenses (*J. hirta*, *A. inulaefolium* y *H. oppositifolia*), presentes en la flora colombiana, para controlar el vector de los virus del dengue, chikunguña y Zika. La utilización de especies arvenses (especies que crecen de forma predominante en zonas cultivadas y/o controladas por el hombre) para la elaboración de potenciales larvicidas de origen vegetal presenta varias ventajas, entre estas su fácil consecución, cultivo y poca inversión económica para su mantenimiento, una tendencia observada en el Sur de Asia (Yadav et al. 2015). Adicionalmente, las plantas en general son una fuente rica de agentes alternativos (ecológicamente amigables) para el control de mosquitos vectores de enfermedades, dado que poseen productos químicos bioactivos que actúan en contra de un número limitado de especies, incluyendo las especies diana (Govindarajan 2016).

Una revisión bibliográfica reciente muestra que compuestos derivados de plantas como: taninos, quinonas, flavonoides, esteroides, cumarinas y alcaloides son utilizados ampliamente como potenciales larvicidas (Sarwar 2015), metabolitos secundarios presentes en las especies evaluadas. De estos compuestos, en la familia Asteraceae, los flavonoides y terpenos (y sus derivados, v. g., esteroides, triterpenos) han sido registrados como metabolitos con actividad larvicida (Macêdo et al. 1997, Nikon et al. 2011, Vivekanandhan et al. 2018). Por lo tanto, los resultados aquí encontrados son promisorios para el control de larvas de *A. aegypti*.

Sin embargo, los efectos larvicidas encontrados para cada extracto fueron distintos. Según Tehri y Sing (2015), estas diferencias están influenciadas por factores extrínsecos e intrínsecos propios de las especies como: localización geográfica de la planta, variación temporal de los metabolitos, concentración, parte de la planta usada (v. g., hojas, tallos, raíces) y solvente empleado en la extracción. Entre estos, la especie utilizada y sus partes influyen significativamente en la eficacia de los mosquitocidas botánicos. Revisiones sobre plantas (y sus partes evaluadas) con potencial insecticida para controlar mosquitos de importancia médica indican que el uso de extractos de hojas de las familias Malvaceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Annonaceae y Asteraceae exhiben el mayor potencial para controlar *A. aegypti* (Kishore et al. 2014, Tehri y Sing 2015). Sin embargo, para la familia Asteraceae, también se ha encontrado un efecto insecticida cuando se usan extractos de tallos y flores (Amrutha et al. 2013, Sharma et al. 2006).

Adicionalmente, la respuesta biológica aquí encontrada se podría atribuir a la presencia de varios metabolitos con propiedades insecticidas, los cuales en conjunto pueden generar un efecto sinérgico potencializando su efecto; efecto observado cuando se han usado extractos acuosos de *Terminalia catappa* (Combretaceae) que contenían taninos y flavonoides para controlar hongos fitopatógenos del suelo (Espínosa-Ruiz et al. 2012).

La familia Asteraceae se caracteriza por poseer especies promisorias para controlar mosquitos vectores de enfermedades (Abdel-Salam et al. 2005, Nikkon et al. 2011). Entre las especies aquí encontradas con potencial insecticida, únicamente el género *Heliopsis* posee registros de especies con potencial insecticida (García-Chávez et al. 2004, Hernández-Morales et al. 2015). Esto indica que otras especies de los géneros *Austro eupatorium* y *Heliopsis* (géneros pertenecientes a las dos especies aquí evaluadas) podrían ser utilizadas en la búsqueda de nuevas especies con potencial larvicida. Por su parte, las especies del género *Heliopsis* se caracterizan por presentar alcaloides/alquilamida (ácido graso + amina), una fitohormona presente en las raíces con poder insecticida (García-Chávez et al. 2004).

Recientemente, Hernández-Morales et al. (2015) encontraron que extractos crudos de raíces de *H. longipes*, una especie endémica de México, presentaron una actividad larvicida del 100% después de 48 h en larvas de *A. aegypti* y *Anopheles albimanus* (vector de malaria). Adicionalmente, encontraron que para *A. aegypti* la actividad larvicida fue mayor utilizando los extractos crudos (hecho atribuido al efecto sinérgico de los demás metabolitos secundarios presentes) que utilizando la afinina, alcaloides aislada a partir de esa especie con propiedad insecticida. Es de resaltar que los resultados para los extractos crudos de *H. oppositifolia* (especie colombiana) corresponden a extracciones realizadas en hojas. La presencia/ausencia, así como la concentración de un metabolito secundario puede variar de un órgano de una planta (v. g., hojas, tallos, raíces, flores y frutos) a otro (Pichersky y Lewinsohn 2011). Por lo tanto, se sugiere la corroboración de la presencia/ausencia de alcaloides en hojas de *H. oppositifolia*.

Adicionalmente, se sugiere realizar estudios con las especies aquí utilizadas que involucren la elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes, así como la evaluación individual de estos compuestos en laboratorio, ya que en algunas especies de la familia Asteraceae se han encontrado y aislado piretrinas (Matsuda et al. 2005). Las piretrinas son compuestos orgánicos con

actividad insecticida presente de modo natural en flores del género *Chrysanthemum*. A partir de las piretrinas se han sintetizado los piretroides (Kawada et al. 2014), insecticidas sintéticos más ampliamente utilizados para controlar las formas adultas de mosquitos vectores de enfermedades (Nkya et al. 2013). Sin embargo, su uso frecuente y desmedido ha seleccionado poblaciones resistentes a nivel mundial (Vontas et al. 2012).

Por otra parte, las simulaciones numéricas sugieren que la aplicación más adecuada, en términos de disminución de tamaño poblacional de adultos y tiempo para ello, es la que se hace cada 15 días con la CL_{95} . Sin embargo, la aplicación de la CL_{50} cada 30 días tiene también un efecto benéfico ya que consigue disminuir el tamaño poblacional en poco tiempo (en cuatro meses diezma la población inicial de adultos en 50%) y no requiere gasto extra de material para su potencial implementación como la CL_{95} . Por lo tanto, se concluye que los extractos de *J. hirta*, *H. oppsitifolia* y *A. inulaefolium* fueron las más eficientes para controlar las poblaciones de *A. aegypti*, por lo que ameritan ser estudiadas en profundidad dado su potencial efecto larvicida. Adicionalmente, el modelo matemático sugiere que la aplicación de la DI_{50} , en períodos de 30 días, de extractos de estas plantas podría constituir una herramienta viable para el control. Sin embargo, se sugieren futuros estudios fitoquímicos (identificación y aislamiento de las estructuras químicas) y de laboratorio (bioensayos que incluyan las moléculas identificadas y aisladas) más profundos, para poder establecer cuál o cuáles compuestos químicos están involucrados con la respuesta insecticida aquí encontrada.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad del Quindío por el apoyo financiero del proyecto 372.

Referencias

- Abdel-Salam E, Canyon D, Younes M, Abdel-Wahab H, Abdel-Hamid M. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*, 31(8): 1149-1166. DOI:10.1016/j.envint.2005.03.003
- Aguiar M, Stollen N, Halstead S. 2016. The risks behind Dengvaxia recommendation. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8): 882. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30168-2
- Aguirre-Obando O, Dalla-Bona A, Duque-Luna J, Navarro-Silva M. 2015. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba)*, 32(1): 14-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702015000100003>
- Amariles-Barrera S, García-Pajón C, Parra-Henao G. 2013. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *Revista CES Medicina*, 27(2): 193-203. <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2680/2038>
- Amrutha P, Priya B, Lakshmanasenthil S, Jenifer A, Pillai L, Suja G, Vinothkumar T. 2013. Pyrethrin from *Tanacetum cinerifolium* as repellent against mosquitoes. *International Current Pharmaceutical Journal*, 2(10): 170-176. <http://dx.doi.org/10.3329/icpj.v2i10.16411>
- Anogwih JA, Makanjuola WA, Chukwu LO. 2015. Potential for integrated control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using larvicides and guppies. *Biological Control*, 81:31-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.001>
- Asiry KA, Hassan SSM, Ibrahim NA, Al-Khuraiji IA, Kehial MA, Al-Anazi NA, Al-nasser AS, Al-Shehri AZ. 2017. Larvicidal efficacy of ethanolic leaf extracts of four selected local plants from hail region, northern saudi arabia, against the dengue fever vector, *Aedes aegypti* (L.) under laboratory conditions. *International Journal of Mosquito Research*, 4(3): 81-87. <http://www.dipterajournal.com/pdf/2017/vol4issue3/PartB/4-3-1-519.pdf>
- Bar-Zeev M. 1958. The effect of temperature on the growth rate and survival of the immature stages of *Aedes aegypti* (L.). *Bulletin of Entomological Research*, 49(1): 157-163. <https://doi.org/10.1017/S0007485300053499>
- Bello FJ, Roza Á, Zapata C. 2008. Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* LF (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Ciencias de la Salud*, 6(2): 64-73. <http://revistas.urosario.edu.co/index.php/revsalud/article/view/483>
- Bessada S, Barreira J, Oliveira B. 2015. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: a review. *Industrial Crops and Products*, 76: 604-615. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.07.073
- Bilbao M. 1997. Análisis fitoquímico preliminar. Armenia (Colombia): Universidad del Quindío.
- Bisset JA, Esteban R, Rodríguez-Coto MM, Ricardo-Leyva Y, Hurtado-Núñez D, Fuentes I. 2014. Evaluación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3): 360-369.
- Burden R, Faires J. 2005. Análisis numérico. Séptima edición. México: Thomson Learning.
- Coria C, Almiron W, Valladares G, Carpinella C, Ludueña F, Defago M, Palacios S. 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, 99(8): 3066-3070. DOI:10.1016/j.biortech.2007.06.012
- Conde M, Orjuela L, Castellanos C, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones M. 2015. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica*, 35(1): 43-52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367>

- Díaz-Castillo F, Morelos-Cardona SM, Carrascal-Medina M, Pájaro-González Y, Gómez-Estrada H. 2012. Actividad larvica de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3): 256-267.
- Duarte I, Chaib de Mares M, Luna D, Aguirre-Obando O, Méndez R. 2015. Estudio demográfico de *Emilia sonchifolia* (Asteraceae) en una finca cafetera de Armenia, Quindío, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2): 101-110. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.41790>
- Espinosa-Ruiz R, Herrera-Isla L, Bravo-Sánchez LR, Hernández-Aro M, Torres-García S, Ramos-González Y, Espinosa-Mill M. 2012. Efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en *Terminalia catappa* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 16(1): 27-32. <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/208/229>
- Evans BR, Gloria-Soria A, Hou L, McBride C, Bonizzoni M, Zhao H, Powell JR. 2015. A Multipurpose High Throughput SNP Chip for the Dengue and Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Genes Genomes Genetics*, 3(5): 711-718. DOI:10.1534/g3.114.016196
- Finney D. 1971. Probit analysis. 3rd edition. Cambridge (England): University Press.
- Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*, 67:430-437. <https://doi.org/10.1002/ps.2081>
- García-Chávez A, Ramírez E, Molina-Torres J. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*, 69:115-131. <https://doi.org/10.21829/abm69.2004.983>
- Govindarajan M. 2016. Mosquito Larvicidal Potential of Medicinal Plants. In Veer V, Gopalakrishnan R editores. *Herbal Insecticides, Repellents and Biomedicines: Effectiveness and Commercialization*. New Delhi: Springer India. p. 25-61.
- Halstead S, Aguiar M. 2016. Dengue vaccines: Are they safe for travelers? *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14(4):378-383. DOI: 10.1016/j.tmaid.2016.06.005
- Hernández-Morales A, Arvizu-Gómez JL, Carranza-Álvarez C, Gómez-Luna BE, Alvarado-Sánchez B, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J. 2015. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2): 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.09.004>
- Higgs S, Vanlandingham DL. 2015. Chikungunya: here today, where tomorrow? *International Health*, 7(1):1-3. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihu092>
- Jørgensen PM, Ulloa-Ulloa C, León B, León-Yáñez S, Beck SG, Nee M, Zarucchi JL, Celis M, Bernal R, Gradstein R. 2011. Regional patterns of vascular plant diversity and endemism. En: Herzog SK, Martínez R, Jørgensen PM editores. *Climate change and biodiversity in the tropical Andes*. São José dos Campos (Brasil): Inter-American Institute of Global Change Research (IAI) and Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE). p. 192-203.
- Kantor I. 2016. Dengue, Zika and Chikungunya. *Medicina*, 76(2): 93-97. <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/26942903.pdf>
- Kawada H, Oo SZM, Thuang S, Kawashima E, Maung YNM, Thu HM, Thant KZ, Minakawa N. 2014. Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7): e3032. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003032
- Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V, Lall N. 2014. Natural products as leads to potential mosquitocides. *Phytochemistry Reviews*, 13(3): 587-627. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9316-2>
- Li C, Lim T, Han L, Fang R. 1985. Rainfall, abundance of *Aedes aegypti* and dengue infection in Selangor, Malaysia, Southeast Asian. *Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 16(4): 560-568.
- Linss JG, Brito L, Garcia G, Araki A, Bruno R, Lima JB, Valle D, Martins A. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites and Vectors*, 7: 25-35. doi: 10.1186/1756-3305-7-25
- Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill SL, Moreira LA. 2012. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6): 828-829. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000600021>
- Macêdo ME, Consoli RA, Grandi TS, Anjos AM, Oliveira AB, Mendes NM, Queiróz RO, Zani CL. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(4): 565-570. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000400024>
- Manrique-Saïde P, Delfín-González H, Parra-Tabla V, Ibáñez-Bernal S. 1998. Desarrollo, mortalidad y sobrevivencia de las etapas inmaduras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en neumático. *Revista Biomédica*, 9:84-91. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb98922.pdf>
- Matsuda K, Kikuta Y, Haba A, Nakayama K, Katsuda Y, Hatanaka A, Komai K. 2005. Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Phytochemistry*, 66(13): 1529-1535. DOI:10.1016/j.phytochem.2005.05.005
- Mathworks T. 2009. The Mathworks, Inc; [fecha de acceso enero 24, 2018]. <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/techdoc/matlab.html>
- MinSalud, INS, OPS. 2011. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de Dengue. Bogotá (Colombia): Ministerio de Salud y Protección Social. http://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1215-gestion-para-la-vigilancia-entomologica-y-control-de-la-transmision-de-dengue&Itemid=688
- Nikon F, Habib MR, Saud ZA, Karim MR. 2011. *Tagetes erecta* Linn. and its mosquitocidal potency against *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3): 186-188. DOI:10.1016/S2221-1691(11)60024-5

- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4): 407-416. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>
- Osorio C, Rincón C, Londoño N. 2017. Informe primer semestre de los eventos de interés en salud pública departamento del Quindío – 2016. https://quindio.gov.co/home/docs/items/item_196/INFORME_QUINDIO_PRIMER_SEMESTRE_FINAL.pdf
- Pani M, Nahak G, Sahu RK. 2015. Review on larvicidal activity of medicinal plants for malaria vector control. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 6(2): 94-114.
- Parra G, García C, Cotes J. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Revista CES Medicina*, 21(1): 47-54. <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/34/26>
- Pichersky E, Lewinsohn E. 2011. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 62:549-566. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>
- Raymond M. 1993. PROBIT software. CNRS UMII, Licence L93019 Avenix, France.
- Rebêlo JM, Costa JM, Silva FS, Pereira YN, Silva JM. 1999. Distribution of *Aedes aegypti* and dengue in the State of Maranhão, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 15(3): 477-486. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1999000300004>
- Santacoloma L, Chaves B, Brochero H. 2012. Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia. *Biomédica*, 32(3): 333-343. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.680>
- Sarwar M. 2015. The Killer Chemicals for Control of Agriculture Insect Pests: The Botanical Insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3): 123-128. <http://files.aiscience.org/journal/article/html/70420032.html>
- Sharma P, Mohan L, Srivastava C. 2006. Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. *Bioresource Technology*, 97(14): 1599-1604. DOI:10.1016/j.biortech.2005.07.024
- Silva A, Andrade L. 2013. Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do Nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco. *Biotemas*, 26(2): 93-104. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n2p93>
- Soares-da-Silva J, Pinheiro VCS, Litaiiff-Abreu E, Polanczyk RA, Tadei WP. 2015. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 59(1): 01-06. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.001>
- Sukhthankar JH, Kumar H, Godinho M, Kumar A. 2014. Larvicidal activity of methanolic leaf extracts of plant, *Chromolaena odorata* L. (Asteraceae) against vector mosquitoes. *International Journal of Mosquito Research*, 1(3): 33-38. <http://www.dipterajournal.com/vol1issue3/august2014/16.1.pdf>
- Tehri K, Singh N. 2015. The role of botanicals as green pesticides in integrated mosquito management—A review. *International Journal of Mosquito Research*, 2(1): 18-23. <http://www.dipterajournal.com/pdf/2015/vol2issue1/PartA/1-5-3-882.pdf>
- Tennyson S, Ravindran J, Eapen A, William J. 2015. Ovicidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3): 199-203. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60653-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60653-8)
- Tran TT, Olsen A, Viennet E, Sleight A. 2015. Social sustainability of *Mesocyclops* biological control for dengue in South Vietnam. *Acta Tropica*, 141(Part A):54-59. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.006>
- Vélez MC, Agudelo CA, Macial D. 1998. Flora Andina. Volumen 1. Flora arvense de la región cafetera centro-andina de Colombia. Armenia (Colombia). Universidad del Quindío.
- Villar L, Dayan G, Arredondo-García J, Rivera D, Cunha R, Deseda C, Carrasquilla G. 2015. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 372(2): 113-123. DOI: 10.1056/NEJMoa1411037
- Vivekanandhan P, Senthil-Nathan S, Shivakumar M. 2018. Larvicidal, pupicidal and adult smoke toxic effects of *Acanthospermum hispidum* (DC) leaf crude extracts against mosquito vectors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101: 156-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2017.05.005>
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Della Torre A, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2): 126-131. DOI:10.1016/j.pestbp.2012.05.008
- WHO. 1981. Instructions for determining susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization. WHO/VBC/81.807.
- WHO. 1998. Report of the WHO Informal Consultation. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Geneva: World Health Organization. Parasitic Diseases and Vector Control (PVC)/Communicable Disease Control, Prevention and Eradication (CPE), 43.
- WHO. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; [Fecha de acceso marzo 20, 2015]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf
- WHO. 2014. Dengue and severe dengue. Fact sheet No.117. Geneva: World Health Organization; [Fecha de acceso marzo 20, 2015]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Yadav R, Tikar S, Sharma A, Tyagi V, Sukumaran D, Jain A, Veer V. 2015. Screening of some weeds for larvicidal activity against *Aedes albopictus*, a vector of dengue and chikungunya. *Journal of Vector Borne Diseases*, 52(1): 88-94. http://www.jvbd.org/temp/JVectorBorneDis52188-5404541_150045.pdf