

Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio*

Insecticidal effect of plant extracts on *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in laboratory

Rebeca González Villegas^{1§}, Mariano Flores Dávila¹, Eugenio Guerrero Rodríguez (†)¹, Rosalinda Mendoza Villarreal², Antonio Cárdenas Elizondo¹, Luis Alberto Aguirre Uribe¹ y Ernesto Cerna Chavez¹

¹Departamento de Parasitología. ²Departamento de horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 2923. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25315. (rosalindamendoza@hotmail.com), (cise9@hotmail.com), (ancarel46@gmail.com), (luisaguirreu@yahoo.com.mx), (jabaly1@yahoo.com).

[§]Autora para correspondencia: leun21@hotmail.com.

Resumen

Los mosquitos son una plaga en todo el mundo, debido a las enfermedades transmitidas a los seres humanos procedentes de mamíferos o aves que migran de un lugar a otro. Los extractos de plantas prometen ser una alternativa debido a que no provocan efectos secundarios para el medio ambiente y al ser humano. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue; determinar el efecto insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Culex tarsalis* en el laboratorio. El trabajo se desarrolló en el laboratorio de la Universidad (UAAAN), donde se obtuvieron los extractos (metanólicos y hexánicos) de plantas y se realizaron los bioensayos. Las concentraciones evaluadas fueron: 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm y la lectura de muertos fue realizada a las 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados fueron analizados en el PC-Probit para la CL₅₀. Los extractos de semillas (*Annona muricata*, *Carica papaya* y *Azadirachta indica*) mostraron los mejores resultados al matar con 1000 ppm más de 80% de la población desde las 24 h. Los extractos vegetales de *Annona muricata*, *Carica papaya* y *Azadirachta indica* mostraron ser una buena alternativa para el control de *Cx. tarsalis*.

Palabras clave: guanabana, neem, papaya, metanol.

Abstract

Mosquitoes are worldwide pests, due to diseases transmitted to humans from mammals or birds that migrate from one place to another. Plant extracts promise to be an alternative because it does not cause side effects to the environment and humans. Therefore the objective of this study was, to determine the insecticidal effect of plant extracts on *Culex tarsalis* larvae in the laboratory. The work was developed in the laboratory of the University (UAAAN), where plant extracts (methanolic and hexanic) and the bioassays were performed. The concentrations tested were: 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 ppm and mortality were recorded at 24, 48 and 72 h after the application of treatments. The results were analyzed in the PC-Probit for LC₅₀. Seed extracts (*Annona muricata*, *Carica papaya* and *Azadirachta indica*) showed the best results by killing over 80% of the population after 24 h with 1000 ppm. Plant extracts of *Annona muricata*, *Carica papaya* and *Azadirachta indica* showed to be a good alternative for the control of *Cx. tarsalis*.

Key words: guanabana, neem, papaya, methanol.

Introducción

La familia Culicidae es un grupo diverso de insectos en gran medida hematófagos con 3 523 especies distribuidos en todo el mundo, excepto en los lugares que son permanentemente congelados. La mayoría de las especies habitan en ambientes tropicales y subtropicales. Un número importante de especies son vectores de virus, bacterias, nematodos y protozoos que causan enfermedades en los animales domésticos y los seres humanos (Harbach 2007).

A través de la historia de la humanidad, las enfermedades transmisibles se han propagado de un continente a otro y de un país a otro, a través de las comunicaciones terrestres, marítimas y aéreas. En las últimas décadas de este siglo ha incrementado de riesgo de personas enfermas o portadores, vectores u hospederos intermediarios (Cuba, 2006 y Rivera, 2009). Durante los últimos años, existía gran optimismo a nivel mundial, pues se pensaba que la lucha contra las enfermedades infecciosas estaba ganada, pero actualmente, han ocurrido cambios que han propiciado la aparición y resurgimiento de muchas de ellas que eran consideradas ya superadas (Berdasquera, 2007).

Culex tarsalis se encuentra distribuido en Canadá, EE. UU y México (ampliamente distribuido en Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León, y es vector de la Encefalitis Equina del Oeste (WEEV), también, el virus de la Encefalitis de San Luis (SLV) y el virus del Oeste del Nilo (WNV) han sido aislados de esta especie (Ortega, 2010).

Los primeros informes de actividad del virus del oeste del Nilo (VON) en México fueron publicadas en julio de 2003, cuando se detectaron anticuerpos contra el VON en caballos en los estados de Coahuila y Yucatán (Blitvich *et al.*, 2003; Lorono *et al.*, 2003). Comunicaciones más recientes incluyen la identificación de caballos, aves y mosquitos infectados, así como el informe de un caso confirmado en una persona en el estado de Sonora (Lorono *et al.*, 2003; Elizondo *et al.*, 2005; Blitvich *et al.*, 2004; Deardorff *et al.*, 2006).

El VON se desarrolla cuando las estaciones húmedas de primavera son seguidos por veranos calurosos y secos. La Lucha contra las poblaciones de mosquitos y los brotes del VON es más adecuado durante la primavera a través de medidas de control de larvas (Marra *et al.*, 2004). *Cx. tarsalis* y otras especies de mosquitos ponen sus huevecillos en charcas permanentes, temporales, y en recipientes de retención de

Introduction

The family Culicidae is a diverse group of blood-sucking insects largely with 3 523 species distributed worldwide, except in places that are permanently frozen. Most species live in tropical and subtropical environments. A number of species are vectors of viruses, bacteria, nematodes and protozoa that cause diseases in domestic animals and humans (Harbach 2007).

Throughout human history, transmissible diseases have spread from one continent to another and from one country to another, via communications by land, sea and air. In the last decades of this century has increased the risk of sick people or carriers, vectors or intermediate hosts (Cuba, 2006 and Rivera, 2009). In recent years, there was great optimism worldwide, since it was thought that the fight against infectious diseases had been won, but at present, there have been changes that have led to the emergence and resurgence of many of them being considered already overcome (Berdasquera, 2007).

Culex tarsalis is distributed in Canada, USA and Mexico (widespread in Tamaulipas, Coahuila and Nuevo Leon, and a vector of Western equine encephalitis (WEEV), also, the virus of St. Louis encephalitis (SLV) and West Nile virus (WNV) have been isolated from this species (Ortega, 2010).

The first reports of activity of West Nile virus (WNV) in Mexico were published in July 2003, when detected antibodies against WNV in horses in the states of Coahuila and Yucatan (Blitvich *et al.*, 2003; Lorono *et al.*, 2003). Recent communications include the identification of horses, birds and mosquitoes infected, and the report of a confirmed case of a person in the state of Sonora (Lorono *et al.*, 2003; Blitvich *et al.*, 2004; Elizondo *et al.*, 2005; Deardorff *et al.*, 2006).

WNV develops when wet seasons in spring are followed by hot, dry summers. The fight against mosquito populations and WNV outbreaks is more appropriate during the spring through larval control measures (Marra *et al.*, 2004). *Cx. tarsalis* and other mosquito species lay their eggs in permanent ponds, temporary, and water holding containers (Johnson *et al.*, 2009). *Cx. tarsalis* has a wide range of habitats in which the larvae can survive. Changes in the population size can influence the temporal variation of the population (Gimnig *et al.*, 1999).

agua (Johnson *et al.*, 2009). *Cx. tarsalis* tiene una amplia gama de los hábitats en los que las larvas pueden sobrevivir. Los cambios en el tamaño de la población pueden influir en la variación temporal de la población (Gimnig *et al.*, 1999).

En muchos países, el empleo de agentes biológicos ha cobrado gran relevancia y se les considera con frecuencia alternativas ideales (De Barjac, 1987). Se sabe por ejemplo de la capacidad infectiva del hongo *Beauveria bassiana*, del nematodo *Romanomermis culicivorax* (Frederickson, 1993), de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 (Ventosilla *et al.*, 2001) y de la capacidad depredadora del crustáceo *Chlamydoteca* sp. (Torres *et al.*, 2002), entre otros, sobre larvas de culicidos. Asimismo, los productos naturales de origen vegetal están siendo investigados en cuanto a su actividad como repelentes en mosquitos (Novak, 2000), así como intoxicantes e inhibidores del crecimiento de entre los productos prometedores se encuentran el extracto de hojas de *Ipomoea carneafistolosa* eficaz contra larvas y pupas de *Anopheles gambiae* (OPS, 1999), además de la actividad de *Azadirachta indica* (Alva y Boyer, 2000) y *Lonchocarpus utilis* (Mariños *et al.*, 2000). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Culex tarsalis* en laboratorio.

Materiales y métodos

Ubicación del experimento: el presente trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada dentro de las coordenadas 25° 21' 08.07" latitud norte y 101° 01' 37.89" longitud oeste, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Extractos: se colectaron e identificaron las plantas empleadas en el presente estudio. Se obtuvieron 10 extractos con plantas de diferente familia taxonómica, de diferente parte de las plantas, estados de la república y solventes (Cuadro 1). Los materiales colectados se trasladaron al laboratorio para pesar el material vegetal, enseguida se molieron en una licuadora industrial y se les agregó el solvente. El material fue agitado constantemente por 3 días y guardado en un área oscura a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró el líquido y se procedió a la separación solvente-extracto con la ayuda de un rotavapor Buchii, dejando este último líquido para un

In many countries the use of biological agents, have become important and are often considered ideal alternatives (De Barjac, 1987). It is known for example of the infectivity of the fungus *Beauveria bassiana*, nematode *Romanomermis culicivorax* (Frederickson, 1993), of the bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 (Ventosilla *et al.*, 2001) and the predatory ability of crustacean *Chlamydoteca* sp. (Torres *et al.*, 2002), among others, on larvae of mosquitoes. Also, natural plant products are being investigated for their activity as mosquito repellents (Novak, 2000) as well as intoxicants and growth inhibitors; among the promising products are the leaf extract of *Ipomoea carneafistolosa* effective against larvae and pupae of *Anopheles gambiae* (WHO, 1999), besides of the activity of *Azadirachta indica* (Alva and Boyer, 2000) and *Lonchocarpus utilis* (Mariños *et al.*, 2000). Therefore, the objective of this study was to determine the insecticidal effect of plant extracts on *Culex tarsalis* larvae in the laboratory.

Material and method

Location of the experiment: this work was performed in the laboratory of Toxicology from the Department of Agricultural Parasitology of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), located within the coordinates 25° 21' 08.07" N and 101° 01' 37.89" W, located in Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

Extracts: were collected and identified the plants used in the present study. 10 extracts were obtained with plants from different taxonomic family, parts of the plant, states and solvents (Table 1). The material collected is transferred to the laboratory to weight the plant material, afterwards were ground in an industrial blender and the solvent is added. The material was stirred continuously for 3 days and stored in a dark area at room temperature. Subsequently, the liquid was filtered and proceeded to the solvent-extract separation with the aid of a Buchii rotavapor, leaving this liquid for better handle. The extract obtained was poured in a plastic container of 1 L which was covered with aluminum foil and kept refrigerated at 4 ° C for preservation.

Increase of the colonies: eggs were collected from the field and taken to the laboratory for their identification, where were provided the right conditions (25 ± 2 ° C and 12:12 h light and 65% RH) for hatching. Were maintained in the laboratory in plastic containers of 2 L with water were fed with plant material. This material was changed every 72 h until the adults emerged, which were determined

mejor manejo. El extracto obtenido se vació en un recipiente de plástico de 1 L el cual se cubrió con papel aluminio y se guardó en refrigeración a 4 °C para su conservación.

taxonomically to ensure that it was *Culex tarsalis* species. Adults were kept in cages of 1 m³ covered with fine mesh where they were provided food at night, for which chickens

Cuadro 1. Relación de las plantas colectadas para la obtención del extracto.

Table 1. List of plants collected for obtaining the extract.

Familia	Planta	Parte usada	Solvente	Procedencia
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	Semilla	Hexano	*
Annonaceae	<i>Annona muricata</i>	fruto	Metanol	Michoacán
	<i>Annona muricata</i>	hoja	Metanol	Michoacán
	<i>Annona muricata</i>	Semilla	Hexano	Michoacán
Caryaceae	<i>Caryca papaya</i>	hoja	Metanol	Coahuila
	<i>Caryca papaya</i>	Semilla	Hexano	Coahuila
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia dentada</i>	Planta completa	Metanol	Michoacán
Sapindaceae	<i>Sapindus saponaria</i>	Hoja	Metanol	Coahuila
Compositae	<i>Tagetes tenuifolia</i>	Planta completa	Metanol	Michoacán
Cupressaceae	<i>Thuja occidentalis</i>	hoja	Metanol	Coahuila

* Aceite comercial.

Incremento de las colonias: se colectaron huevecillos de campo, se llevaron al laboratorio para su identificación donde se les proporcionaron las condiciones adecuadas (25 ± 2 °C y 12:12 h luz y 65% de HR) para la eclosión. Se mantuvieron en laboratorio en recipientes plásticos de 2 L con agua donde se alimentaban con material vegetal. Este material se les, el cual se les cambiaba cada 72 h, hasta que emergieron los adultos, los cuales fueron determinados taxonómicamente para garantizar que la especie era *Culex tarsalis*. Los adultos se mantuvieron en jaulas de 1 m³ cubiertas con tela de organza donde se les proporcionaba el alimento por las noches para lo cuales se les colocaba pollos de 20 días de edad dentro de una jaula. Además se colocaban en la jaula recipientes con agua para que ovipositaran las hembras. Los huevos eran extraídos de los recipientes diariamente y colocados por separado para su incubación, de esta manera, fue posible obtener grupos de larvas de edad homogénea para llevar a cabo los bioensayos. El incremento de la población se llevo a cabo en una cámara bioclimática a 25 ± 2 °C y 12:12 h luz y 65% de HR de la misma universidad.

Bioensayos: las soluciones fueron preparadas mezclando con agua la cantidad necesaria de extracto. Se utilizo la técnica de inmersión, depositando 1 ml del extracto a la concentración deseada en vasos de plástico conteniendo 99 mL de agua. Posteriormente, se depositaron 10 larvas en cada vaso, teniendo 3 repeticiones por cada tratamiento. Además, se incluyó un testigo absoluto para cada concentración. Las concentraciones utilizadas para

of 20 days of age were placed in the cage. Furthermore in the cage were placed containers with water so females could oviposit. The eggs were removed from the containers daily and placed separately for incubation; this way it was possible to obtain age larvae groups homogeneous to perform bioassays. The increase in population was conducted in a growth chamber at 25 °C and 12:12 h light and 65% RH at the same university.

Bioassays: the solutions were prepared mixing with water the amount of extract required. The immersion technique was used, depositing 1 ml of the extract to the desired concentration in plastic cups containing 99 mL of water. Then, 10 larvae were placed into each cup, having 3 replications per treatment. It also included an absolute control for each concentration. The concentrations used for all extracts were from 400 to 1 000 ppm. Mortality readings were taken at 24, 48 and 72 h. The results were analyzed by the computer program PC-Probit (Camacho, 1990).

Results and discussion

Effect over time of *Culex tarsalis*

Azadirachta indica: Figure 1A, shows that the concentration of 900 ppm killed 50% of the population within 24 h, whereas 800 ppm were sufficient to kill 100% at 48 h. and finally, 700 ppm killed 78% of the population at 72 h. The result coincides

todos los extractos fueron desde 400 hasta 1 000 ppm. Las lecturas de mortalidad se tomaron a las 24, 48 y 72 h. Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa computarizado de PC-Probit.

Resultados y discusión

Efecto a través del Tiempo de *Culex tarsalis*

***Azadirachta indica*:** la Figura 1A, muestra que la concentración de 900 ppm mató a 50% de la población a las 24 h, en cambio 800 ppm fueron suficientes para matar a 100% a las 48 h. finalmente, 700 ppm mataron a 78% de la población a las 72 h. El resultado coincide con el de Khan *et al.* (2000), quienes reportan que 150 ppm son suficientes para matar 85% de la población de *Anopheles stephensi*. Por otra parte Pérez *et al.* (2004) no obtuvieron resultados positivos al emplear aceite para el control de *Culex quinquefasciatus*.

***Annona muricata* (fruto):** la Figura 1B muestra que en los extractos de fruto a la concentración menor (400 ppm) mato sólo 10% y la concentración de 1 000 ppm causó 66.6% de mortalidad a las 24 h. Finalmente, 1 000 ppm causaron 90% de mortalidad a las 72 h. diversos trabajos prueban que otras partes de la planta de guanábana tienen altos porcentajes de mortalidad de insectos (Bobadilla *et al.*, 2005, Pérez *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004).

***Annona muricata* (hoja):** la Figura 1C muestra que la concentración menor (400 ppm) causó un 6.6 de mortalidad a las 24 h, en cambio 1 000 ppm mataron a 96.6% de la población a las 72 h. Tal efecto coincide con Bobadilla *et al.* (2005), quienes obtuvieron buenos resultados contra *Aedes aegypti* en el extracto de hoja de esta planta a las 36 h después de la aplicación. Por el contrario, Pérez *et al.* (2004) mencionan que no obtuvieron buenos resultados aplicando el extracto acuoso de hoja de *A. muricata*.

***Annona muricata* (semilla):** la Figura 1D muestran que los extractos de semilla fueron más tóxicos que los anteriores con 100 ppm murió 70% a las 24 h, mientras que 100% de las larvas murió a las 72 h. Éste resultado coincide con lo obtenido por Bobadilla *et al.* (2005) y Parra *et al.* (2007) quienes obtuvieron hasta 100% de muertos de *Ae. aegypti*. Por otra parte Bobadilla *et al.* (2002) encontraron efecto bioinsecticida con extractos

with that of Khan *et al.* (2000), who reported that 150 ppm are enough to kill 85% of the population of *Anopheles stephensi*. Moreover Pérez *et al.* (2004) did not have positive results when using oil to control *Culex quinquefasciatus*.

***Annona muricata* (fruit):** Figure 1B, shows that in extracts of fruit at lower concentration (400 ppm) killed only 10% and the concentration of 1000 ppm caused 66.6% mortality at 24 h. and finally, 1000 ppm caused 90% mortality at 72 h.; several studies show that other parts of the guanabana plant have high percentages of insect mortality (Pérez *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004; Bobadilla *et al.*, 2005).

***Annona muricata* (leaf):** Figure 1C, shows that the lower concentration (400 ppm) caused 6.6 mortality at 24 h, whereas 1000 ppm killed 96.6% of the population at 72 h. This effect coincides with Bobadilla *et al.* (2005), who obtained good results against *Aedes aegypti* in the leaf extract of this plant at 36 h after application. By contrast, Pérez *et al.* (2004) mentioned that were not successful using the leaf extract of *A. muricata*.

***Annona muricata* (seed):** Figure 1D, shows that seed extracts was more toxic than previous, with 100 ppm 70% died at 24 h, whereas 100% of the larvae died within 72 h. This result agrees with that obtained by Bobadilla *et al.* (2005) and Parra *et al.* (2007) who obtained up to 100% of deaths of *Ae. aegypti*. Moreover Bobadilla *et al.* (2002) found bio-pesticide effect with seed extracts of *A. muricata* and *A. cherimolima* against *Anopheles* sp., being the best *A. muricata* obtaining 96% mortality from 12 h. Pérez *et al.* (2004) obtained 100% of dead with seed extracts of *A. squamosal* with acetone against *Cx. quinquefasciatus*. The effect of seeds of *A. muricata* may be due to the accumulation of secondary metabolites. García *et al.* (2004) obtained 83% of deaths with free alkaloid and liberated alkaloids of *Erythrina americana* seed against *Cx. quinquefasciatus*.

***Carica papaya* (leaf):** Figure 1E, shows the concentration of 600 ppm with mortality of 10% at 24 h, in contrast to 1 000 ppm that manages to kill 80% at 72 h. Papaya leaves have been used primarily in the medical area. Pérez *et al.* (2004) found that extracts of *Azadirachta indica*, *Bambusa vulgaris*, *Carya illinoensis*, etc. from leaves at 5 to 15% killed 0%, otherwise what happened with *Taxus globosa* at 15% that killed 67%.

***Carica papaya* (seed):** Figure 1F, in the concentration of 900 ppm kills 100% at 72 h, on the other hand 1 000 ppm kills 88% at 24 h, reaching 100% at 48 h, the latter coincides

de semilla de *A. muricata* y *A. cherimolina* contra *Anopheles* sp., siendo el mejor *A. muricata* al obtener 96% de mortalidad desde las 12 h. Pérez *et al.*, (2004) obtuvieron 100% de muertos con extractos de semilla de *A. squamosa* con acetona contra *Cx. quinquefasciatus*. El efecto de las semillas de *A. muricata* puede deberse a la acumulación de metabolitos secundarios. García *et al.*, (2004) obtuvieron 83% de muertos con alcaloides libres y alcaloides liberados de semillas de *Erythrina americana* contra *Cx. quinquefasciatus*.

Carica papaya (hoja): la Figura 1E, muestra en la concentración de 600 ppm una mortalidad del 10 a las 24 h, en cambio a 1 000 ppm logra matar 80% a las 72 h. Las hojas de papaya se han utilizado principalmente en el área medicinal. Pérez *et al.* (2004) encontraron que los extractos de *Azadirachta indica*, *Bambusa vulgaris*, *Carya illinoensis*, etc. a partir de hojas al 5 y 15% mataban el 0%, caso contrario a lo sucedido con *Taxus globosa* al 15% que mató 67%.

Carica papaya (semilla): la Figura 1F, en la concentración de 900 ppm mata 100% a las 72 h, por otra parte a 1 000 ppm mata 88% a 24 h, alcanzando 100% a las 48 h, lo anterior coincide con Franco *et al.* (2006) quienes obtuvieron 100% de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* con 15% de polvos de semilla de papaya de diferentes variedades, lo cual prueba la efectividad del extracto de semillas de papaya.

Euphorbia dentata (planta completa): la Figura 1G muestra que en la concentración de 1 000 ppm mata 68% a las 72 h, resultados similares a lo obtenido por Silva *et al.* (2010), quienes probaron extractos de varias especies del género *Euphorbia* necesitando más de 1000 ppm para matar 50% de la población de *Aedes aegypti*. Por otro lado Tabares *et al.* (2007) mencionaron que algunas especies del género *Euphorbia* presentan buenos efectos antivirales debido al látex característico de los integrantes de la familia Euphorbiaceae.

Sapindus saponaria (hoja): la Figura 1H mostró que a una concentración de 1000 ppm mata 53.3% a las 24 h, aumentando gradualmente a 60% a las 48 h, 86.6% a las 72 h. El efecto coincide con lo reportado por Cardona *et al.* (2007) quienes probaron *S. saponaria* contra hembras de *Boophilus microplus* que a 5000 ppm permite una sobrevivencia de 10.88 días, teniendo un efecto positivo en la disminución de la ovoposición de las hembras. Abreu *et*

with Franco *et al.* (2006) who obtained 100% mortality of *Spodoptera frugiperda* with 15% of papaya seed powders of different varieties, which proves the effectiveness of papaya seed extract.

Euphorbia dentata (whole plant): Figure 1G, shows that the concentration of 1000 ppm kills 68% at 72 h, similar results to those obtained by Silva *et al.* (2010), who tested extracts from several species of the genus *Euphorbia*, over 1 000 ppm needed to kill 50% of the population of *Aedes aegypti*. Furthermore Tabares *et al.* (2007) reported that some species of the genus *Euphorbia* have good antiviral effects due to characteristic latex from the members of the family Euphorbiaceae.

Sapindus saponaria (leaf): Figure 1H, showed that at a concentration of 1 000 ppm kills 53.3% at 24 h, gradually increasing to 60% at 48 h, 86.6% at 72 h. The effect coincides with that reported by Cardona *et al.* (2007) who tested *S. saponaria* against *Boophilus microplus* females that at 5 000 ppm allows a survival of 10.88 days, having a positive effect in decreasing female oviposition. Abreu *et al.* (2003) reported that *S. saponaria* has positive effects by reducing populations of ciliated protozoa in rumen fermentation.

Tagetes tenuifolia (whole plant): Figure 1I shows effects in higher doses of 1 000 ppm of 68% mortality at 72 h. Martínez (2002) reports a mortality of 88% at a concentration of 80 ppm with fresh extract of *Tagetes lucida* and 94% with the extract of a year old. Moreover Iannacone *et al.* (2008) found low *Tagetes minuta* effect on mortality of *Sitophilus zeamais*. This indicates that the sample genus *Tagetes* as insecticide and does not work in some cases is attractive effects. Moreover Serrato *et al.* (2003) reports that *Tagetes tenuifolia* repellent effect *Bemisia* and *Trialeurodes* sp.

Tagetes tenuifolia (planta completa): la Figura 1I, muestra efectos en su dosis más alta de 1 000 ppm de 68% de mortalidad a las 72 h. Martínez (2002), reporta una mortalidad de 88% con una concentración de 80 ppm con extracto fresco de *Tagetes lucida* y 94% con el extracto de un año de antigüedad. Por otra parte Iannacone *et al.* (2008), encontraron bajo efecto de *Tagetes minuta* sobre la mortalidad de *Sitophilus zeamais*. Lo anterior indica que el género *Tagetes* como insecticida muestra no funciona y que en algunos casos tiene efectos de atrayente. Por otra parte Serrato *et al.* (2003) reporta que *Tagetes tenuifolia* tiene efecto repelente contra *Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.

al. (2003) reporta que *S. saponaria* tiene efectos positivos al disminuir poblaciones de protozoarios ciliados con la fermentación ruminal.

***Tagetes tenuifolia* (planta completa):** la Figura 1I, muestra efectos en su dosis más alta de 1 000 ppm de 68% de mortalidad a las 72 h. Martínez (2002), reporta una mortalidad de 88% con una concentración de 80 ppm con extracto fresco de *Tagetes lucida* y 94% con el extracto de un año de antigüedad. Por otra parte Iannacone *et al.* (2008), encontraron bajo efecto de *Tagetes minuta* sobre la mortalidad de *Sitophilus zeamais*. Lo anterior indica que el género *Tagetes* como insecticida muestra no funciona y que en algunos casos tiene efectos de atrayente. Por otra parte Serrato *et al.* (2003) reporta que *Tagetes tenuifolia* tiene efecto repelente contra *Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.

Rodríguez *et al.* (1999) y Kumar *et al.* (2000) evaluaron la eficacia de extractos acuosos y alcohólicos de raíces, tallos, hojas y flores de especies de *Tagetes* sobre macroinvertebrados acuáticos y adultos de *Sitophilus oryzae* cuyas soluciones etílicas de *T. patula* tienen un poder insecticida notablemente mayor que otras especies sobre todo en hojas y tallos. *T. patula* presenta piretrinas, tiofenos, tienilos, piperitonas entre otras sustancias vegetales responsables de los efectos contra insectos (Perich *et al.*, 1995; Vasudevan *et al.*, 1997; Serrato *et al.*, 2003; Rondón *et al.*, 2006). También se reporta para el género un principio insecticida y nematicida, la tagetona; todas ellas causantes de la toxicidad de *T. patula* sobre *A. aegypti* (Vasudevan *et al.*, 1997).

***Thuja occidentalis* (hoja):** la Figura 1J, muestra que a 1000 ppm mata 35% a las 24 h, alcanzando 73% a las 24 h y un 88% a las 72 h. *T. occidentalis* en mas empleada en el área farmacéuticos contra enfermedades en humanos. Algunos especies del Genero de *Thuja* presentan efecto insecticida, tal es el caso mencionado por Sharma *et al.* (2005) del extracto etanolico de *Thuja orientalis* que con 13.10 y 9.02 ppm obtuvieron 50% de mortalidad de *Anopheles stephensi* y con 22.74 y 16.72 ppm obtuvo 50% de mortalidad de *Cx. quinquefasciatus* a las 24 y 48 h respectivamente, también el autor realizo pruebas extracto de *T. orientalis* a base de acetona requiriendo 200.87 y 127.53 ppm para matar 50% de la población de *Anopheles stephensi* y con 69.03 y 51.14 ppm para matar 50% de la población de *Cx. quinquefasciatus* a las 24 y 48 h respectivamente.

Rodríguez *et al.* (1999) and Kumar *et al.* (2000) evaluated the efficacy of aqueous and alcoholic extracts of roots, stems, leaves and flowers of *Tagetes* species on aquatic macro invertebrates and adults of *Sitophilus oryzae*, whose ethylic solutions of *T. patula* have insecticidal power significantly higher than other species especially in leaves and stems. *T. patula* presents pyrethrins, thiophenes, tienil, piperitone, among other vegetable substances responsible for the effects against insects (Perich *et al.* 1995; Vasudevan *et al.*, 1997; Serrato *et al.*, 2003; Rondón *et al.*, 2006). Also reported, tagetone with insecticide and nematicide properties; all of which cause the toxicity of *T. patula* on *A. aegypti* (Vasudevan *et al.*, 1997).

***Thuja occidentalis* (leaf):** Figure 1J, shows that at 1000 ppm kills 35% at 24 h, reaching 73% at 24 h and to 88% at 72 h. *T. occidentalis* in more employed in the pharmaceutical area in human diseases. Some species of *Thuja* have insecticidal effect, as in the case mentioned by Sharma *et al.* (2005) of the ethanol extract of *Thuja orientalis* that with 13.10 and 09.02 ppm obtained 50% mortality of *Anopheles stephensi* and with 22.74 and 16.72 ppm obtained 50% mortality of *Cx. quinquefasciatus* at 24 and 48 h respectively, the author also tested extracts of *T. orientalis* acetone-based requiring 200.87 and 127.53 ppm to kill 50% of the population of *Anopheles stephensi* and with 69.03 and 51.14 ppm to kill 50% of the population of *Cx. quinquefasciatus* at 24 and 48 h respectively.

Table 2 shows the LC₅₀ of the different extracts. The lowest LC₅₀ (235.23 ppm) was for the seed extract of *A. muricata*, followed by the seed extract of *C. papaya* (306.27 ppm) and *A. indica* (318.78 ppm). Robinson (1979), mention that the seeds are the sites of accumulation of secondary metabolites such as alkaloids and from there it's toxicity.

The base extracts of *A. muricata* (seed) had good effects on mortality, being the lowest LC₅₀ of 235.23 ppm; the latter agrees with Rodríguez and Lagunes (1989), who demonstrated that the plants of genus *Annona* are potentially toxic to control *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* and *Anopheles* sp. Larvae with aqueous and acetone extracts. The seeds cause a more rapid effect on larvae of *Cx. Tarsalis*, which coincides with Bobadilla *et al.* (2005) who found that the suspensions of seeds, indicate a pattern of much higher effectiveness compared to other plant parts of *A. muricata* on larvae of *A. aegypti* to be a storage organ most likely to contain active ingredients compared to the root bark whose

El Cuadro 2 muestra las CL₅₀ de los diferentes extractos. La CL₅₀ menor (235.23 ppm) fue para el extracto de semillas de *A. muricata*, seguido del de semilla de *C. papaya* (306.27 ppm) y *A. indica* (318.78 ppm). Robinson (1979), menciona que las semillas son los sitios de acumulación de los metabolitos secundarios como los alcaloides, de hay su toxicidad.

toxicity was very low. Mortality varied depending on the part of the plant used, the proportion of active ingredients and varying concentrations.

The leaf-based extracts are followed after the seed-based and also show good mortality effect and its LC₅₀ does not require much product, for the case of *A. muricata*, shows

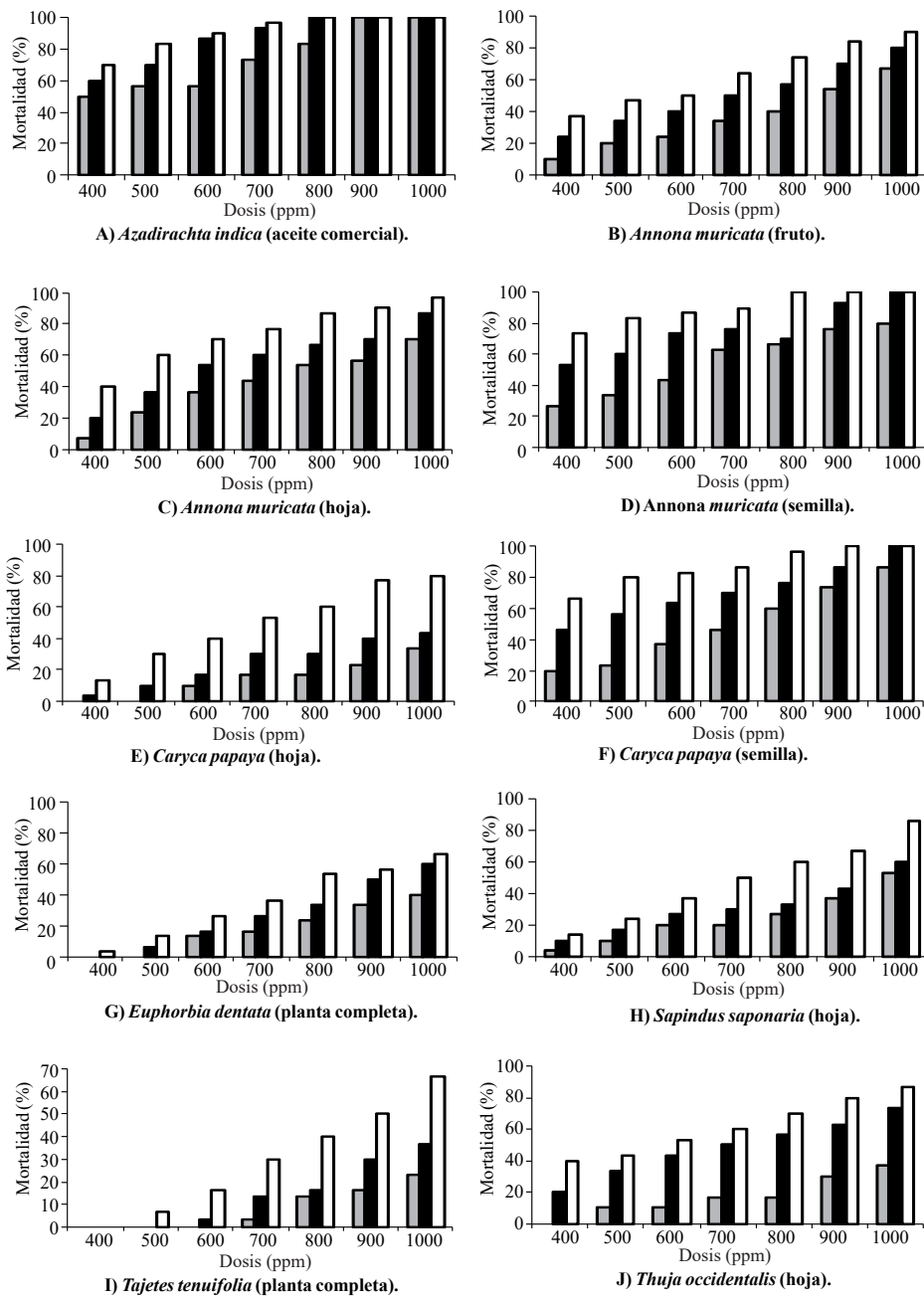


Figura 1. Porcentajes de mortalidad de larvas de *Culex tarsalis* (Coquillet) por efecto de extractos vegetales a 24 \square 48 \blacksquare y 72 \square h.
Figure 1. Percentage of mortality of larvae *Culex tarsalis* (Coquillet) by effect of plant extracts to 24 \square 48 \blacksquare and 72 \square h.

**Cuadro 2. Concentración letal (CL₅₀) y límites fiduciales (ppm) estimada de 10 extractos sobre larvas de *C. tarsalis*.
Table 2. Lethal concentration (LC₅₀) and fiducial limits (ppm) estimated from 10 extracts on larvae of *C. tarsalis*.**

Planta	CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	
		Inferior	Superior
<i>A. indica</i> (Prod. Comerc.)	318.78	244.10	364.44
<i>A. muricata</i> (F)	532.91	490.88	568.97
<i>A. muricata</i> (H)	455.54	416.39	487.99
<i>A. muricata</i> (S)	235.23	73.53	320.64
<i>C. papaya</i> (H)	670.00	638.27	702.76
<i>C. papaya</i> (S)	306.27	220.48	361.83
<i>E. dentata</i> (Pc)	809.20	773.22	852.47
<i>S. saponaria</i> (H)	691.30	660.70	723.59
<i>Tagetes tenuifolia</i> (Pc)	870.38	832.20	919.54
<i>T. occidentalis</i> (H)	535.28	487.62	575.45

F= fruto; H= hoja; S= semilla; PC= planta completa.

Los extractos a base de *A. muricata* (semilla) presentaron buenos efectos de mortalidad, siendo de las CL₅₀ mas bajas de 235.23 ppm, lo anterior coincide con Rodríguez y Lagunes (1989), quienes demostraron que las plantas del género *Annona* son potencialmente toxicas para el control de larvas de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *Anopheles* sp. con extractos acuosos y acetonicos. Las semillas causan un efecto más rápido sobre las larvas de *Cx. Tarsalis* lo cual coincide con Bobadilla *et al.* (2005) quienes en un trabajo realizado encontraron que las suspensiones de las semillas indican un patrón de efectividad muy superior comparado a las demás partes vegetales de *A. muricata* sobre las larvas de *A. aegypti* por ser un órgano de reserva con mayor probabilidad de contener los principios activos en comparación a la corteza de raíces cuya toxicidad fue muy baja. La mortalidad varió en función a la parte vegetal, proporción de principios activos y variación de concentraciones.

Los extractos a base de hoja son los seguidos después de los que son a base de semilla y también muestran buen efecto de mortalidad y su CL₅₀ no requiere de tanto producto, para el caso de *A. muricata* muestra buenos efectos aunque no alcanza los mismos niveles que al emplear semilla. Rodríguez (2000) en estudios realizados menciona que el extracto acuoso de flor y hoja de *A. muricata* muestran una leve mortalidad y que probablemente se incrementa con el extracto de semilla, debido a que esta contiene anonacina, asimicina y bulatacina ingredientes activos contra larvas de mosquitos.

Pérez *et al.* (2004) obtuvo los mejores resultados de mortalidad en los productos a base de semillas en comparación a los que eran extraídos de hoja, flor, fruto,

good effects but does not reach the same levels when using the seed. Rodríguez (2000), mention that the aqueous extract of flower and leaf of *A. muricata* show a slight mortality and likely increases with seed extract because it contains annonacine, muricine active ingredients against mosquito larvae.

Pérez *et al.* (2004) obtained the best results in mortality seed-based products compared to those extracted from leaf, flower, fruit, bark, pod or whole plant as was the case in this paper that products based of leaf, whole plant or fruit gave lower results to seed products.

Conclusions

Seed extracts caused higher mortality rates than the fruit and leaf because of the concentration of secondary metabolites accumulated in the seeds. However, obtaining seeds is more difficult because it requires large amounts of fruit to obtain a kilo of seeds. Furthermore, at present there are fruits that no longer produce seed such as papaya, which makes more difficult the production of a seed extract at large scale.

Leaf extracts also show good effects and have the advantage of being able to produce higher amounts of extract because the removal of the leaves from the trees have the effect of pruning, that helps to obtain more new growth without causing damage to the atmosphere.

corteza, vaina o planta completa como fue el caso en el presente trabajo que los productos a base de hoja, planta completa o fruta dieron resultados mas bajos a los productos de semilla.

Conclusiones

Los extractos de semillas causaron porcentajes de mortalidad mayores que los frutos y hoja debido a la concentración de metabolitos secundarios acumulados en las semillas. Sin embargo, la obtención de semillas es más difícil ya que se requiere de grandes cantidades de fruta para obtener un kilo de semillas. Además, en la actualidad hay frutas que ya no producen semilla como es el caso de la papaya, lo cual hace más difícil la producción de un extracto de semillas a gran escala.

Los extractos de hoja muestran también buenos efectos y tienen la ventaja de poder producir cantidades más altas de extracto debido a que la remoción de hojas de los frutales tienen el efecto de una poda que ayuda a la obtención de más brotes nuevos sin causar daños al medio ambiente.

Algunas especies silvestres con acción insecticida se encuentran en proceso de domesticación, a fin de obtener la materia prima del medio cultivado en lugar de impactar aún más los ecosistemas naturales.

Agradecimiento

Al Dr. Eugenio Guerrero R. (†), por todas las aportaciones y enseñanzas en todo momento, los buenos MAESTROS perduran para siempre.

Literatura citada

Abreu, A.; Carolla, J. E.; Kreuzer, M.; Lascano, C. E.; Díaz, T. E.; Cano, A. y Hans, D. H. 2003. Efecto del fruto del pericarpio y de extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus Saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* de un sistema RUSITEC, Rev. Colombiana Ciencia Pec. Vol. 16(2):147-154.

Some wild species with insecticidal action are in the process of domestication, to obtain the raw material from the cultured medium instead of further impact to natural ecosystems.

End of the English version



- Alva, V. y Boyer, A. 2000. Prueba de susceptibilidad de larvas de mosquito *Anopheles* a *Azadirachta*. In: Resúmenes de la XLII Convención Nacional de Entomología. Tarapoto. San Martín. 84-85 pp.
- Berdasquera, C. D. 2007. El control de las enfermedades infecciosas en la atención primaria de salud, un reto para la medicina comunitaria. Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 23(1):5-8.
- Blitvich, B. J.; Fernández, S. I.; Contreras, C. J. F.; Lorono, P. M. A.; Marlenee, N. L. and Díaz, F. J. 2004. Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. Emerg Infect Dis. 10(7):1314-1317.
- Blitvich, B. J.; Fernández, S. I.; Contreras, C. J. F.; Marlenee, N. L.; González, R. J. I. and Komar, N. 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. Emerg Infect Dis. 9(7):853-856.
- Bobadilla, M. G.; Zavaleta, G.; Gil, F.; Pollack, L. y Sisniegas, M. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller «chirimoya» y *A. muricata* Linnaeus «guanábana» sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. Rev. Perú Biol. 9(2): 64-73.
- Bobadilla, M.; Zavala F.; Sisniegas M.; Zavaleta G.; Mostacero, J. y Taramona, L. 2005. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). Rev. Perú. Biol. 12(1):145-152.
- Cardona, Z.; Torres R. E. y Echeverri, L. F. 2007. Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre hembras ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae). Scientia et Technica. XIII(33):51-54.
- Ministerio de Salud Pública de Cuba. Dirección Nacional de Epidemiología. 2006. Programa de Control Sanitario Internacional. La Habana: MINSAP.
- De Barjac, H. 1987. Operational bacterial insecticides and their potential for future improvement. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:85-90.

- Deardorff, E.; Estrada, F. J.; Brault, A. C.; Navarro, L. R.; Campomanes, C. A. and Paz, R. P. 2006. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis.* 12(2):314-318.
- Elizondo, Q. D.; Davis, C. T.; Fernández, S. I.; Escobar, L. R.; Velázco, O. D. and Soto, G. L. C. 2005. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 11(9):1449-1452.
- Franco, A. S. L.; Jiménez, P. A.; Luna, L. C. y Figueroa, B. R. 2006. Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de papaya (Carycaea) en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 45(2):171-177.
- Frederickson, E. 1993. Bionomia y control de *Anopheles Albimanus*. OPS/SMS. Cuaderno técnico Núm. 34.
- García, M. R. Pérez P. R.; Rodríguez, H. C. y Soto, H. M. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Fitotec. Mex.* 27(4):297-303.
- Gimnig, J. E.; Reisen, W. K.; Eldridge, B. F.; Nixon, K. C. and Schutz, S. J. 1999. Temporal and spatial genetic variation within and among populations of the mosquito, *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) from California. *J. Medical Entomol.* 36(1):23-29
- Harbach, R. E. 2007. Mosquito taxonomic inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> (consultado mayo, 2009).
- Iannacone, J.; Wong, Y. S.; Alcántara, P. y Rodríguez, R. 2008. Actividad insecticida y repelente de plantas en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. *Scientia (Lima)* 10:171-180.
- Johnson, G.; Rolston, M. and Hale, K. 2009. Mosquitoes and West Nile virus in Montana. Bozeman, MT: Montana State University.
- Khan, M. F.; Khan, M. A. and Tabassum, R. 2000. Letal effects of neem fruit extract against mosquitoes as compared killifish. *Patistan J. Biol. Sci.* 3(6):1037-1038.
- Kumar, A.; Dunkel, F., Matthew, J.; Broughton, M. and Sriharan, Sh. 2000. Effect of root extracts of Mexican marigold, *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae), on Six Nontarget Aquatic Macroinvertebrates. *Environ. Entomol.* 29(2):140-149.
- Lorono, P. M. A.; Blitvich, B. J.; Farfan, A. J. A.; Puerto, F. I.; Blanco, J. M. and Marlenee, N. L. 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg. Infect Dis.* 9(7):857-859.
- Mariños, C.; Castro, J. y Nongrados, D. 2000. Efecto biocida de *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) sobre *Anopheles benarrochi* (Gabaldón, 1941). *In: Resúmenes del IV Congreso Peruano de Parasitología.* Lima, Perú. 246 pp.
- Marra, P. P. S.; Griffing, C.; Caffrey, A. M.; Kilpatrick, R.; McLean, C.; Brand, E.; Saito, A. P.; Dupuis, L.; Kramer, and Novak, R. 2004. West Nile Virus and Wildlife. *Bioscience* 54(5):393-402.
- Martínez, J. G. 2002. Identificación de compuestos activos en especies de *Tagetes* (Compositae) con toxicidad en larvas de *Aedes aegypti*. Tesis de maestría de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 49p.
- Novak, R. 2000. The use of plant extracts as repellents for mosquitoes and biting flies. The abstract book of the 87th Annual Meeting of the Amer. Mosq. Contr. Assoc. New Jersey. 44 p.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1999. Control selectivo de vectores de malaria. Guía para el nivel local de los sistemas de salud. Washington, DC. IV. 48 pp.
- Ortega, M. A. I. 2010. Los mosquitos del noreste de México (Diptera: Culicidae). Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Entomología Médica. 214 p.
- Parra, G. J.; García, C. M. y Cotes, J. M. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Rev CES Med.* 21(1):47-54
- Pérez, P. R.; Rodríguez, H. C.; Lara, R. J.; Montes, B. R. y Ramírez, V. G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* SAY (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana.* 20(1):141-152.
- Perich, J.; Wells, C.; Bertsch, W. and Tredway, E. 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. *J. Ame. Mosquito Control Association* 11(3):307-310.
- Rivera, G. O. 2009. Siglo XXI: era de los vectores. *Rev Electr Vet.* (consultado febrero, 2011). 10(96):1695-7504. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909.html>.
- Robinson, T. 1979. The evolutionary ecology of alkaloid. *In: herbivore: their interactions with secondary plant metabolites.* Rosenthal, A. G and Jansen, D. H. (Eds.). Academic Press. New York, USA. 413-448 pp.

- Rodríguez, H. C. 2000. Plantas contra plagas; potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Editado por la red de acción sobre plaguicidas y alternativa en México. Texcoco, Estado de México. 133 p.
- Rodríguez, H. C. y Lagunes, R. 1989. Combate de mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) con sustancias acuosas vegetales. Primer encuentro estatal sobre Entomología Médica y Veterinaria. Cuernavaca, Morelos. 133.142 p.
- Rodríguez, S.; Pelicano, A.; Heck, G. y Delfino, S. 1999. Evaluación de la eficacia de extractos naturales de *Tagetes* spp. como bioinsecticidas sobre adultos de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). Revista IDESIA 17(1-2):79-89.
- Rondón, M.; Velasco, J.; Hernández, J.; Pecheneda, M.; Rojas, J.; Morales, A.; Carmona, J. and Díaz, T. 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the *Tagetes patula* L. Rev. Latinoamer. Quím. 34(1-3):32-36.
- Serrato, C. M. A.; Reyes, T. B.; Ortega A. L.; Domingo, G. A.; Gómez, S. N.; López M. F.; Sánchez, M. A.; Carvajal, V. L.; Jiménez, R. O.; Morgado, G. A.; Pérez, M. E.; Quiroz, M. J. y Vallejo, G. C. I. 2003. Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): recurso genético mexicano para controlar la mosquita blanca (*Bemisia* sp. y *Trialurodes* sp.). Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2):65-70.
- Sharma, P.; Mohan, L. and Srivastava, N. C. 2005. Potencial larvicida de *Nerium indicum* y *oriertelis Thuja* extrae contra la malaria y el vector de la encefalitis japonesa. J Environ Biol. 26 (4):657-60.
- Silva, B. S. Y.; Colunga, U. E. M.; De la Garza, R. L. M.; Flores, C. R. M. y Villa, S. P. Y. 2010. Obtención de extractos vegetales con efecto larvicida de *Euphorbia trгона*, *Euphorbia hyssapifolia* y *Euphorbia prostrata* para el control de *Aedes Aegypti*. Congreso Internacional del QFB 2010. Ed No. 10-2010. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Tabares, P.; Ávila, L.; Torres, F.; Cardona, D.; Quiñones, W.; Forero, J. E.; Regules, M. T. y Echeverría, F. 2007. Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. Scientia et Technica. Año XIII. Núm. 33. 107-110.
- Torres, J.; García, F. y Martín, A. 2002. Eficiencia de *Chlamydoteca* sp. como controlador biológico de larvas de *Anopheles* sp. a nivel de laboratorio. Libro de Resúmenes del XIV Congreso Nacional de Biología y VIII Simposio Nacional de Educación en Ciencias Biológicas. Tarapoto. Lima, Perú 102 pp.
- Vasudevan, P.; Kashyap S.; Sharma S.; Vasudevan P.; Kashyap S. and Sharma S. 1997. *Tagetes*: a multipurpose plant. Bio. Technol. 62(1-2):29-35.
- Ventosilla, P.; Infante, B.; Merello, J. y Chauca, J. 2001. Guía de Prácticas para la Producción de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. OPS/OMS/ROW/ IMTAvH. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 64 p.
- Vidal, J.; Carbajal A.; Sisniegas, M. y Bobadilla, M. 2009. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. Rev. Perú. Biol. 15(2):103-109.