

## Actividad larvicida de aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia graveolens*, contra *Aedes aegypti* L.

### Larvicidal activity of essential oils of *Lippia alba* and *Lippia graveolens*, on *Aedes aegypti* L.

Francisco Aldana<sup>1</sup>, Sully Cruz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales, Universidad de San Carlos de Guatemala.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.  
aldanacerna@hotmail.com

Recibido: 3 de agosto 2016 • Aceptado: 25 de enero 2017

#### Resumen

*Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), es vector de los virus que provocan las enfermedades febriles Dengue, Chikungunya y Zika, que afectan a gran parte de la población en los países tropicales, por lo que la búsqueda de nuevos plaguicidas naturales constituye un recurso importante para combatir a este mosquito. En el presente estudio se evaluaron cinco aceites esenciales obtenidos de tres quimiotipos de *Lippia graveolens* Kunth. (timol, carvacrol y mixto) y dos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (cital y carvona), como alternativa para disminuir el impacto ambiental, del uso de insecticidas químicos para el control de las larvas del mosquito. Se realizaron bioensayos para cada uno de los cuatro estadios larvarios, en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, empleando cuatro concentraciones de los aceites esenciales (0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL); la lectura de mortalidad se hizo a las 24 h de exposición y se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). En los cuatro estadios larvarios, el aceite esencial obtenido del quimiotipo timol de *L. graveolens*, mostró las CL<sub>50</sub> más bajas con las mayores mortalidades: primer estadio, 0.056 mg/mL 95% IC [0.046, 0.064]; segundo estadio 0.068 mg/mL 95% IC [0.062, 0.077]; tercer estadio, 0.088 mg/mL 95% IC [0.080, 0.096]; cuarto estadio, 0.092 mg/mL 95% IC [0.084, 0.100]. Estos resultados sugieren el potencial uso del aceite esencial quimiotipo timol, como un insecticida de origen natural, para el control de *A. aegypti*.

Palabras clave: Insecticida natural, quimiotipos, timol, Dengue, Zika.

## Abstract

*Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae), is a vector of the viruses that cause febrile illnesses such as Dengue, Chikungunya and Zika, which affect in large extent the population of tropical countries, thus, the search of pesticides of natural origin is an important resource to combat this mosquito. In this study five essential oils, obtained from three chemotypes of *Lippia graveolens* Kunth. (thymol, carvacrol and mixed) and two of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (citrinal and carvone), were evaluated as an alternative to chemical pesticides to reduce the environmental impact, in order to control the insect larvae. Bioassays were performed randomly for each of the four instars in an experimental design with four replications, using four concentrations of the essential oils (0.4, 0.2, 0.1 and 0.05 mg / mL); the mortality reading was recorded after 24 hours of exposure and the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was determined. In all larval stages, the essential oil obtained from *L. graveolens* thymol chemotype showed the lowest LC<sub>50</sub> with the highest mortality rate: first instar, 0.056 mg/mL 95 % CI ([0.046, 0.064]); second instar, 0.068 mg/mL 95 % CI [0.062, 0.077]; third instar, 0.088 mg/mL 95 % CI [0.080, 0.096]; fourth instar, 0.092 mg/mL 95 % CI [0.084, 0.100]. These results suggest the potential use of the essential oil thymol chemotype, as an insecticide of natural origin, to control *A. aegypti*.

Keywords: natural insecticide, chemotypes, thymol, Dengue, Zika.

## Introducción

En Guatemala en 2009 se reportó una epidemia de dengue con 10,438 casos; 71% se presentaron en el norte y zonas costeras, aumentando la ocurrencia de dengue hemorrágico de 12 en 2006 a 417 para ese año (Pan American Health Organization [PAOH], 2012). *Aedes aegypti* L. es vector en Guatemala de la enfermedad viral del dengue (Villatoro, 2006), alcanzando su máximo en la temporada de lluvias por la picadura de hembras infectadas (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala [MSPAS], 2007). *A. aegypti* es transmisor de la fiebre chikungunya, causada por arbovirus (Angelini et al., 2007; Pialoux, Gaüzère, Jauréguiberry, & Strobel, 2007); también es vector del virus del zika, reportado en Guatemala hasta finales del 2015, contabilizándose 112 casos para la tercera semana epidemiológica, del 17 al 23 de enero del 2016 (MSPAS, 2016). Nelson (1986), expresa que las larvas de *Aedes* pasan por cuatro estadios, creciendo durante las tres mudas de 1 hasta 7 mm (Marquetti, 2008);

por ello, la larva es un estado oportuno para su control, al carecer de su capacidad como transmisor y su desplazamiento aéreo.

Aceites esenciales obtenidos de especies aromáticas tales como *Piper auritum* Kunth., *Piper aduncum* L., Pimenta racemosa (P. Miller) J. W. Moore y *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (referida como *Chenopodium ambrosioides* L.), han demostrado efecto larvicida contra *Aedes aegypti* (Leyva et al., 2009). También se estudió la actividad insecticida y repelente del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britton & P. Wilson, quimiotipo carvona-limoneno sobre adultos de *Tribolium castaneum* Herbst., en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). La repelencia a las 2 y 24 h y a los 7, 14 y 21 días a concentración de 0.052 µL/mL de aire utilizando un olfatómetro, mostró diferencia significativa sobre el control. El efecto insecticida producido por

la pulverización e impregnación de papel con el aceite esencial a concentraciones de 0.131, 0.263 y 0.526  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de aire, fue evaluado haciendo conteos de mortalidad a las 24 h y a los siete días, encontrándose diferencias significativas a las 24 h a favor del método de pulverización, (Ringuelet et al., 2014).

Alvarado (2011), estudió el efecto insecticida sobre *Anopheles aegypti* y *Anopheles albimanus* C. R. G. Wiedemann, de los aceites esenciales de *Lippia dulcis* Trev., *L. graveolens* Kunth y *L. alba* en concentraciones de 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL y 0.025 mg/mL. De ellos, solo *L. graveolens* produjo respuesta letal para el primero y segundo estadio larvario de *A. aegypti* en concentraciones de 0.1 mg/mL; en tanto que para *A. albimanus*, la concentración de 0.1 mg/mL produjo algún efecto letal en los cuatro estadios larvarios y la de 0.05 mg/mL solo tuvo algún efecto para el primero y segundo estadios. Este estudio no evaluó los aceites obtenidos a nivel de los quimiotipos de ambas especies.

Mediante estudios previos se han caracterizado en Guatemala quimiotipos de distintas especies de *Lippia*. Para *L. alba*, Fischer y otros (2004), identificaron dos quimiotipos: mircenona (con olor a moho) y citral (con olor a limón). Para esta misma especie, Mérida (2012) estudió la composición de los aceites esenciales de dos morfotipos, los cuales forman parte de la colección del Centro Experimental Docente (CEDA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC), detectando igual número de quimiotipos: citral, que corresponde al morfotipo hojas lanceoladas, y carvona, representado por el morfotipo hojas redondas. Para *L. graveolens*, los estudios realizados por Fischer, Franz, López y Pöll (1997), citados por Pérez, Mérida, Farfán y Ribeiro (2012), sobre variabilidad en la composición del

aceite esencial de cinco poblaciones de las regiones áridas y suelo rocoso de Guatemala, se establecieron los siguientes quimiotipos: timol en la localidad de Casas de Pinto del departamento de Zacapa con 71%; carvacrol en la localidad de El Carrizal, municipio de San Jacinto del departamento de Chiquimula, con 51.8 % y mixto en la localidad de El Subinal, municipio de Guastatoya, departamento de El Progreso. Senatore y Rigano (2001), extrajeron por hidrodestilación los aceites esenciales de *L. alba* y *L. graveolens* de plantas silvestres de Guatemala, con un rendimiento de 0.22% y 0.26% volumen/peso en base seca respectivamente. La composición de los aceites esenciales analizada por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) para *L. alba* se caracterizó por su alto contenido de limoneno (43.6%) y piperitona (30.6%), en tanto que para *L. graveolens*, consistió principalmente en timol (30.6%) y sesquiterpenos, de los cuales, los mayoritarios fueron cariofileno (4.6%) y óxido de cariofileno (4.8%). En un estudio conducido por Salgueiro, Cavaleiro, Gonçalves y Cunha (2003), se evaluó la composición química del aceite esencial de dos muestras de *L. graveolens* de Guatemala, obtenidos por hidrodestilación y analizados por CG-MS. Los rendimientos de aceite esencial variaron del 3 al 3.5%; los principales constituyentes para cada una son: la primera con 0.2% de carvacrol, 18.1% de timol y 6.8% *p*-cimeno; la segunda con 44.8% de carvacrol, 7.4% de timol y 21.8% de *p*-cimeno.

En una revisión realizada por Linde, Colauto, Albertó y Gazim (2016), que recopila información de los principales quimiotipos de *L. alba* encontrados por diferentes autores en Sudamérica, se citan; para Brasil: citral–mircenona, citral–limoneno y carvona–limoneno (Atti-Serafini et al., 2002), citral, geraniol, trans- $\beta$ -cariofileno, carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno (López, Stashenko, &

Fuentes, 2011); para Colombia: citral y carvona (Mesa-Arango, Montiel-Ramos, Zapata, Durán, Betancur-Galvis, & Stashenko, 2009). carvona y limoneno (Stashenko, Jaramillo, & Martínez, 2003); y para Uruguay: linalol (Lorenzo, Paz, Davies, Vila, Cañigüeral, & Dellacassa, 2001).

Según lo indica Ciccio y Ocampo (2006), en los estudios realizados por ellos en Costa Rica (1998), en Guatemala por Fischer y otros (2004) y en la provincia de Corrientes, Argentina por Richiardi y otros (1999), se encontró en común, un quimiotipo que contiene mircenona (37.8 – 58.2%) y (Z)-ocimenona (11.1 – 16.3%); además, establecen que carvona (62.44 – 67.55%) y limoneno (20.77 – 24.95%) son los constituyentes mayoritarios en las muestras analizadas en 2006 en Costa Rica.

Para *L. graveolens* nativas de la península de Yucatán en México, Tezara, Herrera, Coronel, Urich, y Calvo-Irabien, (2003), refieren los quimiotipos timol, carvacrol y sesquiterpenoide, indicando que los dos primeros prevalecen en las zonas secas, en tanto que el tercero es propio de las zonas húmedas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad larvicida de los aceites esenciales obtenidos de dos quimiotipos de *L. alba* y de tres de *L. graveolens* sobre los cuatro estadios larvarios de *Aedes aegypti* estableciendo su CL50, para que la información pueda ser considerada en los programas de control del vector.

## Materiales y métodos

Obtención de material vegetal y larvas de *Aedes aegypti*.

Los dos quimiotipos de *L. alba* evaluados (citral

y carvona), corresponden a los estudiados por Mérida (2012) y se obtuvieron de la colección de plantas medicinales del CEDA-FAUSAC. Los tres quimiotipos de *L. graveolens* (timol, carvacrol y mixto), se colectaron en los sitios de crecimiento silvestre en los departamentos de El Progreso, Zacapa y Chiquimula, en las localidades indicadas por Pérez, Mérida, Farfán, y Ribeiro (2012); la cosecha del follaje de ambas especies, se realizó en el mes de septiembre del 2015 y fue secado a la sombra durante 20 días. Las larvas de *A. aegypti*, de la cepa Sanarate-Escuintla, fueron proveídas por el Laboratorio del Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala.

Extracción de los aceites esenciales por hidrodestilación

La extracción se realizó en el laboratorio del departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se determinó el contenido de humedad de las muestras con el cual se corrigió el peso del material requerido en cada corrida en base al 10% de contenido hídrico, teniendo todas la misma cantidad de materia seca. Para cada extracción, la cantidad equivalente a 50 g de material vegetal molido y tamizado fue introducida a un balón de un litro de capacidad, al que se agregó agua destilada a manera de cubrir la muestra y se acopló al aparato Neo-Clevenger. (Alvarado, 2011). Se mantuvo el balón en calentamiento a temperatura constante durante 3 h. Al terminar el procedimiento de extracción, se colectaron las muestras en viales previamente tarados y rotulados, estableciéndose el peso del aceite obtenido en cada corrida. Los viales se protegieron de la luz y se almacenaron en el refrigerador

hasta su uso. Para cada quimiotipo se corrió la extracción por triplicado y se determinó el rendimiento promedio.

#### Conducción de los bioensayos y descripción de los tratamientos

Se realizaron los bioensayos con cada uno de los cuatro estadios larvarios de *A. aegypti*, empleando cuatro concentraciones de cada quimiotipo de aceite esencial. Se preparó para cada uno la solución madre a concentración de 1 mg de aceite esencial por mL de agua reposada por 48 hr para eliminar el cloro residual, conteniendo 0.1% de dimetilsulfóxido como agente emulsificante. La solución madre se sonificó para optimizar la solubilidad y a partir de ella se prepararon concentraciones de 0.05, 0.10, 0.20 y 0.40 mg/mL. En cada pozo de una microplaca se colocaron 10 larvas del estadio larvario correspondiente, en 100 µL del agua de su medio de crianza, en donde posteriormente se agregaron 100 µL de la dilución del aceite a evaluar. El estudio incluyó un control negativo con agua conteniendo 0.1 % de dimetilsulfóxido; la lectura de mortalidad se realizó a las 24 h de iniciado el tratamiento (Alvarado, 2011).

#### Análisis de la información de los bioensayos

Se utilizó el programa StatPlus 5.8.4.0 de descarga libre para hacer el análisis probit, con el que se obtuvieron las  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  con un intervalo de confianza del 95%.

## Resultados

#### Sitios de colecta de follaje de quimiotipos de *Lippia*

El follaje de *L. alba*, se obtuvo de la colección de plantas medicinales de la FAUSAC, en el campus de la zona 12 de la ciudad de Guatemala. Para la obtención del follaje de *L. graveolens*, se acudió a campos de cultivo y a orilla de cercos en donde crece de manera espontánea en los departamentos de Chiquimula, Zacapa y El Progreso. Los especímenes de *L. graveolens* Kunth y *L. alba* (Mill.) N. E. Browne ex Britton; Familia LAMIACEAE, fueron depositados en el Herbario de la Escuela de Biología BIGU con los números de voucher 73,149, 73,145, 73,146, 73,147, 73,148 respectivamente. Se muestran los datos de colecta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Datos de colecta de follaje de *Lippia graveolens* y *Lippia alba*

Sitios de recolección	Especie y quimiotipo	Coordenadas		Altitud msnm
		Latitud	Longitud	
El Carrizal, San Jacinto, Chiquimula	<i>L. graveolens</i> carvacrol	14° 39' 18.09" N	89° 29' 50.60" O	83
Casas de Pinto, Río Hondo, Zacapa	<i>L. graveolens</i> timol	15° 01' 34.00" N	89° 36' 51.10" O	205
El Subinal, Guastatoya, El Progreso	<i>L. graveolens</i> mixto	14° 51' 21.00" N	90° 08' 01.00" O	520
*CEDA, Zona 12, Ciudad de Guatemala.	<i>L. alba</i> citral	14° 35' 11" N	90° 55' 58" O	1502
*CEDA, Zona 12, Ciudad de Guatemala.	<i>L. alba</i> carvona	14° 35' 11" N	90° 55' 58" O	1502

\*CEDA corresponde al acrónimo del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Porcentaje de rendimiento de aceites esenciales

La Tabla 2 contiene los resultados de la extracción de los cinco materiales empleados

en el presente estudio. Se puede apreciar que *L. graveolens* presenta mayor contenido de aceite y entre sus quimiotipos, el carvacrol, el de rendimiento superior.

**Tabla 2.** Porcentaje de rendimiento de aceite esencial

Especie	Quimiotipo (morfortipo u origen)	Rendimiento en %	Desviación típica
<i>L. alba</i>	citral (hojas lanceoladas)	0.87	0.02
<i>L. alba</i>	carvona (hojas redondas)	1.05	0.04
<i>L. graveolens</i>	carvacrol (San Jacinto)	4.15	0.13
<i>L. graveolens</i>	timol (Casas de Pinto)	3.99	0.09
<i>L. graveolens</i>	mixto (El Subinal)	1.23	0.07

Mortalidad observada a las 24 h

En los bioensayos realizados, el tratamiento testigo no reportó mortalidad, por lo cual no fue necesario incluirlo en el análisis. El

resumen de los datos de mortalidad procesados por el programa StatPlus 5.8.4.0 para los cinco quimiotipos de aceite se presenta en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Resumen del análisis Probit para el primer y segundo estadios larvarios de *A. aegypti*

Estadio larvario	Primer estadio larvario				Segundo estadio larvario				
	Concentración →	CL <sub>50</sub> mg/mL	95% IC	CL <sub>95</sub> mg/mL	95% IC	CL <sub>50</sub> mg/mL	95% IC	CL <sub>95</sub> mg/mL	95% IC
Quimiotipo ↓									
Timol	0.056	[0.046, 0.064]	0.093	[0.081, 0.119]	0.068	[0.062, 0.077]	0.095	[0.085, 0.111]	
Carvacrol	0.061	[0.046, 0.071]	0.117	[0.099, 0.155]	0.098	[0.088, 0.112]	0.146	[0.127, 0.191]	
Mixto	0.100	[0.091, 0.114]	0.142	[0.124, 0.187]	0.164	[0.148, 0.181]	0.241	[0.217, 0.279]	
Citral	0.084	[0.076, 0.091]	0.112	[0.104, 0.127]	0.106	[0.088, 0.125]	0.219	[0.187, 0.277]	
Carvona	0.087	[0.079, 0.095]	0.118	[0.109, 0.136]	0.148	[0.107, 0.187]	0.437	[0.360, 0.583]	

IC= Intervalo de confianza

**Tabla 4.** Resumen del análisis Probit para el tercer y cuarto estadios larvarios de *A. aegypti*

Estadio larvario	Tercer estadio larvario				Cuarto estadio larvario				
	Concentración →	CL <sub>50</sub> mg/mL	95 % IC	CL <sub>95</sub> mg/mL	95 % IC	CL <sub>50</sub> mg/mL	95 % IC	CL <sub>95</sub> mg/mL	95 % IC
Quimiotipo ↓									
Timol	0.088	[0.080, 0.096]	0.120	[0.110, 0.140]	0.092	[0.084, 0.100]	0.127	[0.115, 0.152]	
Carvacrol	0.151	[0.136, 0.166]	0.213	[0.194, 0.242]	0.318	[0.288, 0.350]	0.459	[0.417, 0.525]	
Mixto	0.280	[0.251, 0.313]	0.434	[0.389, 0.503]	0.333	[0.303, 0.363]	0.463	[0.424, 0.526]	
Citral	0.285	[0.256, 0.320]	0.447	[0.400, 0.520]	0.356	[0.322, 0.384]	0.481	[0.441, 0.554]	
Carvona	0.304	[0.270, 0.346]	0.509	[0.447, 0.608]	0.367	[0.336, 0.401]	0.506	[0.459, 0.598]	

IC= Intervalo de confianza

La  $CL_{50}$  en los cuatro estadios larvarios para los aceites de los cinco quimiotipos varió desde 0.056 mg/mL 95 % IC [0.046, 0.064], hasta 0.367 mg/mL 95 % IC [0.336, 0.401], mostrando el mejor valor en todos los casos el quimiotipo timol de *L. graveolens*, cuyo máximo registrado fue para el cuarto estadio, con valor de 0.092 mg/mL 95 % IC [0.084, 0.100]. Su correspondiente  $CL_{95}$  varió desde 0.093 mg/mL 95% IC [0.081, 0.119], hasta 0.509 mg/mL 95 % IC [0.447, 0.608], mostrando el mejor valor en todos los casos el quimiotipo timol de *L. graveolens*, cuyo máximo reportado fue para el cuarto estadio con valor de 0.127 mg/mL 95% IC [0.115, 0.152].

## Discusión

### Extracción y rendimiento de aceites esenciales

Entre las dos especies estudiadas, se determinó un mayor potencial de producción de aceites esenciales en *L. graveolens*, que en *L. alba*, excepto para el quimiotipo mixto de *L. graveolens*, colectado en la aldea El Subinal de Guastatoya, El Progreso, cuyo contenido es ligeramente superior que el mayor de los encontrados en *L. alba* pero muy por debajo de los otros dos quimiotipos de su misma especie. Estos rendimientos, guardan coherencia con los referidos por Alvarado (2011), quien reportó para *L. alba* 1.02% y para *L. graveolens* 4.02%. El origen de las colectas no se especifica en el estudio, solamente que fueron obtenidas de áreas silvestres de Guatemala. También se encuentra relación con lo expresado por Alonso (2004), que refiere para *L. alba* un contenido de aceites esenciales entre el 0.5 y el 1.5%; así como por los rendimientos encontrados por Pérez y otros (2012), que reportan para *L. graveolens*, un contenido de aceites esenciales del orden del 4.34%, siendo también en

este caso la excepción, el rendimiento del quimiotipo mixto, que produjo un rendimiento de 1.23%.

Los contenidos de aceites esenciales reportados por Morataya (2006), difieren grandemente de los encontrados en el presente caso para *L. graveolens* y aunque también refiere valores diferentes para *L. alba*, si guardan una relación con los resultados obtenidos, siendo sus datos, los siguientes: *L. graveolens* 1.8022%, *L. alba* lanceolada 0.0345% y *L. alba* redonda 1.4831%. Cabe señalar sin embargo, que el origen de las colectas de ambas especies para el caso de Morataya (2006), corresponde al municipio de Samayac del departamento de Suchitepéquez; siendo diferente a la procedencia de las muestras evaluadas en el presente estudio.

### Respuesta letal a las 24 h

La  $CL_{50}$  en los cuatro estadios larvarios para los aceites de los cinco quimiotipos varió desde 0.056 mg/mL 95% IC [0.046, 0.064], hasta 0.367 mg/mL 95% IC [0.336, 0.401], mostrando el mejor valor en todos los casos el quimiotipo timol de *L. graveolens*, cuyo máximo registrado fue para el cuarto estadio con valor de 0.092 mg/mL 95% IC [0.084, 0.100].

La  $CL_{95}$  en los cuatro estadios larvarios para los aceites de los cinco quimiotipos varió desde 0.093 mg/mL 95% IC [0.081, 0.119], hasta 0.509 mg/mL 95 % IC [0.447, 0.608], mostrando el mejor valor en todos los casos el quimiotipo timol de *L. graveolens*, cuyo máximo reportado fue para el cuarto estadio con valor de 0.127 mg/mL 95 % IC [0.115, 0.152].

Los resultados obtenidos, difieren con los reportados por Alvarado (2011), al haber

encontrado que solo *L. graveolens* produjo respuesta letal para el primero y segundo estadio larvario de *A. aegypti*, en concentraciones de 0.1 mg/mL; ya que en el presente estudio, esta especie, particularmente el quimiotipo timol, provocó mortalidades hasta el cuarto estadio larvario con  $CL_{50}$  de 0.092 mL 95% IC [0.084, 0.100] y una  $CL_{95}$  de 0.127 mL 95% IC [0.115, 0.152]. Es evidente que la composición de los aceites esenciales de los quimiotipos, incide en la respuesta de mortalidad de la larva del vector.

Rojas, García y Morales (2010), estudiaron los aceites esenciales de nueve especies de *Piper* colectadas en Guatemala. La dosis más baja utilizada (0.025 mg/mL) no mostró mayor actividad larvicida. Los aceites con mayor potencial contra larvas de los cuatro estadios de *A. albimanus* y *A. aegypti* (referido en el estudio como *Stegomyia aegypti*), fueron los obtenidos de *Piper patulum* Bertol. y *P. auritum* a la mayor dosis empleada (0.2 mg/mL), mostrando el de *P. patulum* para *S. aegypti* la mejor  $CL_{50}$ , con un valor de 0.062 mg/mL para los primeros tres estadios larvarios y de 0.122 mg/mL para el cuarto estadio. Los resultados de las evaluaciones de aceites esenciales de *Piper auritum* Kunth, *P. aduncum* L., *P. racemosum* y *C. ambrosioides*, sobre larvas de *A. aegypti* por Leyva y otros (2009), registraron alta actividad, siendo *P. auritum* el que presentó mayor efecto letal con la menor  $CL_{50}$  (0.17 mg/mL), seguido por *P. racemosum* (0.27 mg/mL), *C. ambrosioides* (0.35 mg/mL) y *P. aduncum* (0.57 mg/mL). Al comparar los datos sobre el efecto larvicida del aceite esencial de *P. patulum* reportado por Rojas y otros (2010), cuya composición no se describe en el estudio, se advierten resultados similares a los producidos en el presente caso, particularmente con los reportados por *L. graveolens* quimiotipo timol, con una  $CL_{50}$  para

los cuatro estadios larvarios, de 0.056 mg/mL 95% IC [0.046, 0.064] hasta 0.092 mg/mL 95% IC [0.084, 0.100], aun cuando la composición de los aceites pudiese variar notoriamente.

En otro estudio conducido (Leyva et al., 2008), se encontraron los siguientes datos en el uso de aceites esenciales para el control de larvas de *A. aegypti*: *Curcuma longa* L. con  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de 0.025 y 0.044 mg/mL respectivamente; *Malaleuca leucadendron* L. con  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de 0.041 y 0.051 mg/mL en el orden presentado; *Artemisia abrotamum* L. con  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de 0.193 a 0.272 correspondientemente. Los resultados de las dos primeras especies citadas, muestran superior efecto letal sobre el mejor quimiotipo de *L. graveolens* de los acá estudiados (timol), con  $CL_{50}$  que va de 0.056 mg/mL 95% IC [0.046, 0.064] a 0.092 mL 95% IC [0.084, 0.100] y  $CL_{95}$  en el rango de 0.093 mg/mL 95% IC [0.081, 0.119] a 0.127 mg/mL 95% IC [0.115, 0.152], para los cuatro estadios larvarios. Aun cuando *C. longa* y *M. leucadendron* parecen ser buenas alternativas de control, la actividad larvicida mostrada por *L. graveolens* del quimiotipo timol es promisoriosa, siendo una ventaja desde la perspectiva ambiental, que *L. graveolens* al ser una especie nativa de Guatemala, se encuentra adaptada a las condiciones que prevalecen en sus sitios de crecimiento silvestre y áreas de cultivo, generalmente, de escasa precipitación pluvial.

Bassolé y otros (2003), estudiaron la actividad de los aceites esenciales obtenidos de las hojas deshidratadas de *Cymbopogon proximus* (Hochst. ex A. Rich.) Maire, & Weiller, *Lippia multiflora* Moldenke y *Ocimum canum* Sims, contra huevos y larvas del tercer y cuarto estadio de *A. aegypti* y de miembros del complejo *Anopheles gambiae*. *L. multiflora*, con timol como constituyente principal del aceite

esencial (29.9 %), mostró la mayor actividad larvicida, con  $CL_{50}$  0.0535  $\mu\text{L}/\text{mL}$  95% IC [0.0474, 0.0593] y  $CL_{90}$  de 0.0748  $\mu\text{L}/\text{mL}$  95 % IC [0.0707, 0.0820] para *A. aegypti*; Estos resultados son semejantes a los producidos por el quimiotipo timol de *L. graveolens* del presente estudio, probablemente por su alto contenido en este componente (71%), según lo reportan Fischer y colaboradores (1997), citados por Pérez y otros (2012).

En un estudio realizado en Río de Janeiro, Brasil por Carvalho y otros (2003), con el aceite esencial extraído de *Lippia sidoides* Cham. mediante arrastre de vapor, se evaluó la actividad larvicida del tercer y cuarto estadio de *A. aegypti*, empleando el aceite esencial puro, su hidrolato puro (agua del proceso de co-distilación cuyo análisis reveló la presencia de derivados alquílicos de fenol, timol y carvacrol), hidrolato diluido (1:2; 1:5; 1:10 1:20, v/v) y sus principales constituyentes timol y carvacrol (Sigma Co., USA), a las concentraciones de 0.085, 0.04, 0.017 y 0.008% para timol y 0.04% carvacrol, en Tween-80 a 0.04% en agua destilada, el cual también fue utilizado como testigo. Los resultados mostraron que el aceite puro, el hidrolato puro y en dilución de 1:2, mataron a la totalidad de larvas en 5 min, la dilución 1:5 y 1:10 lo hicieron en 20 min y 24 h respectivamente y la de 1:20 mató al 50% de las larvas en 24 h; el Tween-80 diluido en agua no produjo mortalidad. El timol produjo el 100% de mortalidad en 30 min a concentraciones de 0.085 y 0.040%, y en 1.5 h a la concentración de 0.017. El carvacrol solo, a concentración de 0.040% no produjo mortalidad a las 24 h, pero al combinar 0.040% de timol y 0.040% de carvacrol, se produjo el 100% de la mortalidad a los 30 min. Barreira, de Morais, Lima y Pinho, (2004), estudiaron la actividad larvicida contra el tercer estadio de *A. aegypti*, de los aceites esenciales de nueve plantas de

amplia distribución en el noreste de Brasil. Los mejores resultados y los constituyentes principales del aceite esencial corresponden a: *Ocimum gratissimum* L. (LC50 0.060  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; 43.7% de eugenol y 32.7% de 1-8 cineol), *L. sidoides*. (LC50 0.063  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; 80.8 % de timol), *Ocimum americanum* L. (LC50 0.067  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; 70.9 % de *E*-metil-cinamato), *Cymbopogon citratus* Stapf. (LC50 0.069  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; 60.3% de geraniol y 39.7% de neral). Silva y colaboradores (2008), expresan que el aceite esencial de *Lippia gracilis* HBK mostró potente efecto insecticida contra larvas de *A. aegypti* del tercer y cuarto estadio. El carvacrol y el óxido de cariofileno fueron los principales compuestos responsables de la actividad de *L. gracilis* e *Hyptis pectinata* Poit; los componentes menores probablemente actúan de forma sinérgica para *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. Con excepción de lo expresado por Silva y colaboradores (2008), estos datos podrían explicar la razón por la cual el aceite esencial del quimiotipo timol de *L. graveolens* evaluado en el presente estudio, produjo mejores efectos letales, pudiendo ser entonces los otros constituyentes o sus interacciones para el quimiotipo carvacrol, los responsables de su actividad larvicida.

Como conclusiones de la evaluación de la actividad larvicida de los aceites obtenidos de los cinco quimiotipos de *Lippia*, se enfatiza que *L. graveolens* presenta mayor contenido de aceites esenciales y mayor efecto letal que *L. alba*. Los resultados obtenidos evidencian la susceptibilidad de las larvas más jóvenes a la acción insecticida de los aceites esenciales, produciendo 10 de los 20 tratamientos 100 % de mortalidad para el primer estadio larvario, disminuyendo paulatinamente al cuarto, en el que únicamente dos tratamientos eliminaron la totalidad de las larvas (*L. graveolens* quimiotipo timol a concentraciones de 0.2 y

0.4 mg/mL). Queda claro, que *L. graveolens* reportó mayor efectividad, particularmente el quimiotipo timol, con una CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> de 0.092 mL 95 % IC [0.084, 0.100] y 0.127 mg/mL 95% IC [0.115, 0.152] respectivamente para el cuarto estadio larvario, en comparación con *L. alba*, cuyo mejor resultado lo mostró para ese mismo estadio larval de *A. aegypti*, el quimiotipo citral, con CL<sub>50</sub> de 0.356 mg/mL 95% IC [0.332, 0.384] y CL<sub>95</sub> de 0.481 mg/mL 95% IC [0.441, 0.554].

Por lo ya expresado, es conveniente considerar el uso del quimiotipo timol de *L. graveolens*, en los programas de control del vector *A. aegypti*. Asimismo, se recomienda realizar evaluaciones de su actividad insecticida contra otras especies de plagas, principalmente, aquellas relevantes desde el punto de vista de la entomología médica. Se deben conducir estudios de la persistencia del aceite esencial en aplicaciones de campo, con el fin de establecer la frecuencia de los tratamientos a los criaderos del mosquito. También es conveniente que se evalúe en diferentes épocas del año el rendimiento y composición del aceite esencial de esta especie y quimiotipo, para definir los mejores momentos de cosecha.

Además de su propiedad insecticida, los aceites esenciales estudiados, pueden tener aplicación, por su efecto repelente como lo estableció para *L. alba* Ringuelet y otros (2014).

### Agradecimientos

Ha sido de gran valor el apoyo de las siguientes entidades y personas: Laboratorio del Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, por la donación de las larvas de *A. aegypti*; Francisco Salcedo, auxiliar de investigación de proyectos y estudiante de Química Farmacéutica

Carol Betancourt, Auxiliar del Laboratorio de Fitoquímica, CCQQ-USAC, por su participación en el montaje de los bioensayos; Biólogo Max Mérida, investigador de proyectos CCQQ-USAC, por la ubicación de los sitios de recolección y participar en la cosecha del follaje de los quimiotipos de *L. graveolens*.

### Referencias

- Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Rosario, Argentina: Corpus
- Alvarado, B. (2011). *Determinación de la actividad larvicida de seis extractos y aceites de plantas del género Lippia nativas de Guatemala*, contra *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* vectores transmisores del dengue y el paludismo respectivamente. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Angelini, R., Finarelli, A., Angelini, P., Petropulacos, K., Macini, P., Fiorentini, C., & Cassone, A. (2007). An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Eurosurveillance*, 12(36), 3260. Recuperado de <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3260>
- Atti-Serafini, L., Pansera, MR, Atti-Santos, AC, Rossato, M., Pauletti, GF, Rota, LD, ... y Moyna, P. (2002). La variación en el rendimiento de aceite esencial y la composición de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. crecido en el sur de Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 4 (2), 72-74.

- Bassolé H., Guelbeogo, R., Nébié, R., Constantini, C., Sagnon, N., Kabore, Z., & Traoré. S. (2003). Ovicidal and larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes of essential oil extracted from three spontaneous plants of Burkina Faso. *Parassitologia* 45(1), 23-26.
- Barreira, E., de Moraes, S., Lima, M., & Pinho, E. (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99(5), 541-544.
- Carvalho, A., Melo, V., Craveiro, A., Machado, M., Bantim, M., & Rabelo, E. (2003). Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 569-571.
- Ciccio, J., & Ocampo, R. (2006). Variación anual de la composición química del aceite esencial e *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica. *Lankesteriana*, 6(3), 149-154.
- Fischer, U., Lopez, R., Pöll, E., Vetter, E., Novak, J., & Franz, C. (2004). Two chemotypes Within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(4), 333-335. doi: 10.1002/ffj.1309
- Leyva, M., Tacoronte, J., Marquetti, M., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, & Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 60(1), 78-82
- Leyva, M., Marquetti, M., Tacoronte, J., Scull, R., Tiomno, O., Mesa, A., & Montada, D. (2009). Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomédica*, 20, 5-13
- Linde, G., Colauto, N., Albertó, E., & Gazim, Z. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 191-200. doi: 10.1590/1983-084X/15\_037
- López, M., Stashenko, E., & Fuentes, J. (2011). Composición química y propiedades antígenotóxicas de los aceites esenciales de *Lippia alba*. *Genética y Biología Molecular*, 34 (3), 479-488. doi.org/10.1590/S1415-47572011005000030
- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigueral, S., y Dellacassa, E. (2001). Composición de un nuevo tipo de aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown de Uruguay. *Flavour Frag*, 16 (5), 356-359.
- Marquetti, M. (2008). *Aspectos bioecológicos de importancia para el control de Aedes aegypti y otros culicidos en el ecosistema urbano*. (Tesis de Doctorado) Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Departamento de Control de Vectores. La Habana.
- Mérida, M. (2012). *Estudio del rendimiento y composición del aceite esencial de diferentes poblaciones silvestres de Lippia chapasensis Loes. del altiplano occidental guatemalteco*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Mesa-Arango, CA, Montiel-Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L., & Stashenko, E. (2009). Citral y carvona quimiotipo de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) NE Marrón colombianos: composición., La citotoxicidad y la actividad antifúngica *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (6), 878-884.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala. (2007). *Protocolos Nacionales de Vigilancia y Salud Pública*. Recuperado de [Phttp://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/PROTOCOLOS\\_MSPAS\\_2007.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/PROTOCOLOS_MSPAS_2007.pdf)
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala. (2016). *Centro Nacional de Epidemiología*. Recuperado de [http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202016/SEMEPI/SEMEPI\\_3\\_2016.pdf](http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202016/SEMEPI/SEMEPI_3_2016.pdf)
- Morataya, M. (2006). *Caracterización farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala: albahaca de monte (Ocimum micranthum), orégano (Lippia graveolens), salvia sija (Lippia alba) y salviyá (Lippia chiapasensis)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala
- Pan American Health Organization (2012). Guatemala. *Health in the Americas: country volume*, 358-372. Recuperado de [http://www.paho.org/salud-en-las-americas-2012/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=132&Itemid=](http://www.paho.org/salud-en-las-americas-2012/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=132&Itemid=)
- Pérez, J., Mérida, M., Farfán, C., & Ribeiro, A. (2012). Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, cg-em e análise multivariada. *Quimica Nova*, 35(1), 97-101.
- Pialoux, G., Gaüzère, B., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet, Infectious Diseases*, 7(5), 319-327. doi:10.1016/S1473-3099(07)70107-X
- Ringuelet, J., Ocampo, R., Henning, C., Padín, S., Urrutia, M., & Dal Bello, G. (2014). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.) *Revista Brasileira de Agroecología*, 9(2), 214-222.
- Rojas, E., García, R., & Morales, A. (2010). *Actividad de extractos vegetales sobre larvas de insectos de importancia en entomología médica*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M., & da Cunha, A. (2003). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, 69(1), 80-83. doi:10.1055/s-2003-37032
- Senatore, F., & Rigano, D. (2001). Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3), 169-171. doi:10.1002/ffj.972
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad

antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 27(105), 579-597.

Silva, W., Dória G., Maia, R., Nunes, R., Carvalho, G., Blank, A., ... Cavalcanti, S. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, 99(8), 3251–3255. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.064.

Tezara, W., Herrera, A., Coronel, I., Urich, R., y Calvo-Irabien, L. (2003). Características fotosintéticas y producción de aceites esenciales de *Lippia graveolens* en poblaciones naturales y cultivadas en un jardín común en Yucatán. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, 6, 153-156.

Villatoro, G. (2006). *Historia del dengue en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades. Guatemala.