



# Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae)

José Iannacone-Oliver<sup>1\*</sup>; Diana Pérez-Dávila<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Ucayali, Perú

## Abstract

### Toxic effects of four amazonian plants on *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) and *Artemia franciscana* Kellog 1906 (anostraca: artemiidae)

The aim of current research was to evaluate the ecotoxic effect of four Amazonian plants of ethnobotanical importance in Pucallpa, Peru: Dutchman's Pipe *Aristolochia pilosa* Kunth (Aristolochiaceae) in stem and leaves, Soapberry *Paullinia clavifera* Simpson (Sapindaceae) in cortex, Wandering Jew *Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse (Commelinaceae) in all plant and Curare *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pavon corr. Miers (Menispermaceae) in cortex and leaves on first instars' insect larvae of *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 and second instars' nauplii of brine shrimp *Artemia franciscana* Kellog, 1906. Standard procedures were employed to detect semiquantitative phytochemistry of hexane, chloroform and hydroalcohol extracts, for each plant evaluated. The LC<sub>50</sub> mean values of hexane and chloroform extracts of all plants on *A. franciscana* and hydroalcoholic extract on *C. calligraphus* were lower than values of chloroform extracts on *C. calligraphus*. Leaves hexane extract and stem chloroform extract of *A. pilosa*, and hydroalcohol extract of *P. clavifera* had higher activity on *C. calligraphus*. However, hexane and chloroform extracts of *T. zebrina*, and stem hydroalcoholic extract of *A. pilosa* had higher activity on *A. franciscana*.

**Keywords:** acute toxicity assay, *Aristolochia*, *Artemia*, *Chironomus*, *Chondrodendron*, insecticide, *Paullinia*, *Tradescantia*

## INTRODUCCIÓN

La Agricultura del nuevo milenio establece nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto y riesgo ambiental, y que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas sintéticos. La utilización de extractos vegetales para el control de plagas representa una alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente al conservar la biodiversidad (1).

Las plantas amazónicas son promisorias como biocidas, por lo que para una adecuada evaluación biológica, se requiere el empleo de bioensayos ecotoxicológicos sobre especies no destinatarias (2-4).

Pérez y Iannacone (5,6) evaluaron la efectividad de *Aristolochia pilosa* Kunth, (Aristolochiaceae), *Paullinia clavifera* Simpson (Sapindaceae), *Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse (Commelinaceae) y *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pavon corr. Miers (Menispermaceae) sobre la mortalidad y repelencia de *Rhynchoporus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) y *Eupalamides cyparissias* Fab. (Lepidoptera: Castniidae). Se ha determinado la toxicidad de *P. clavifera* sobre *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) y *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae) (7). En adición, *P. clavifera* mostró más eficiencia insecticida sobre *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941 en comparación con *T. zebrina* en términos de CL<sub>50</sub> (8).

*Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera: Chironomidae) es una especie de artrópodo de distribución predominantemente neotropical, y que también ocurre en

\*Autor para correspondencia. Dirección para correspondencia: Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Av. Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú. Teléfono 51-1-2750-4550. E-mail: joseiannacone@yahoo.es

el sur de la región Neártica, muy común en los ambientes acuáticos dulceacuícolas de la ciudad de Lima, Perú. *C. calligraphus* ha demostrado una alta sensibilidad a metales pesados y plaguicidas (9).

*Artemia franciscana* Kellog, 1906 (Anostraca: Artemiidae) es la especie de artrópodo más usada en bioensayos en la investigación fitoquímica, para detectar de sustancias bioactivas, debido a su amplia distribución geográfica, a que su ciclo biológico es bien conocido, es de fácil manejo en el laboratorio y su cultivo es relativamente sencillo y barato (10).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto tóxico de los extractos de cuatro plantas amazónicas peruanas: "Huanchuisacha" *A. pilosa* (Aristolochiaceae), "Oreja de Tigre" *T. zebrina* (Commelinaceae), "Curare" *C. tomentosum* (Menispermaceae) y "Sacha Yoco" *P. clavigera* (Sapindaceae) sobre *Ch. calligraphus* y *A. franciscana*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los bioensayos ecotoxicológicos se realizaron en el Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo, Palma, Distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú.

## EXTRACTOS BOTÁNICOS

Se seleccionaron cuatro especies de 62 plantas con potencial biocida, y se realizó la colecta del material vegetal empleando el mapa de Zonificación Ecológica y Económica de la Cuenca del Aguaytía y el estudio de prospección etnobotánica realizado por Pérez (11). La identificación de las especies vegetales siguió la nomenclatura propuesta por Brako y Zarucchi (12), Desmarchelier y Witting (13), y Weckerle y Rutishauser (14). Las semillas fueron extraídas directamente de frutos secos y se conservaron en bolsas plásticas. Las estacas leñosas se colectaron en segmentos de 20 y 30 cm de longitud. Las cuatro plantas empleadas fueron: 1) Huanchuisacha (*A. pilosa*, Aristolochiaceae) en tallo y hoja, 2) Sacha yoco (*P. clavigera*, Sapindaceae) en corteza, 3) Oreja de Tigre (*T. zebrina*, Commelinaceae) toda la planta, y 4) Curare (*C. tomentosum*, Menispermaceae) en corteza y hoja.

Las cuatro especies seleccionadas de acuerdo a su disponibilidad de material botánico y referencias locales de actividad biocida, se conservaron *ex situ* en el Huerto de Plantas Medicinales y Biocidas del Centro Regional de Investigación, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana-Ucayali. El material tipo de las especies vegetales fue identificado y depositado en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MHN- UNMSM) y en el Herbario de la Facultad de Forestales de la Universidad Nacional Agraria La Molina (HFF-UNALM), Lima, Perú. Se recolectó el material de

acuerdo a las estructuras seleccionadas, y se separaron las partes u órganos de las plantas colectadas libres de enfermedades y picaduras de insectos, expulsando los residuos y otros materiales impropios de las plantas.

## "TRIADEM" FITOQUÍMICO

La preparación de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico y el "Triadem" fitoquímico de las cuatro plantas se realizó a partir de 100 g de muestra seca y molida. Posteriormente, se extrajo con hexano hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, después de eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida se obtuvieron los extractos hexánicos. Al residuo se le adicionó cloroformo y se extrajo hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, el solvente se eliminó hasta sequedad en rotavapor a presión reducida, para obtener los extractos clorofórmicos. Finalmente, al residuo se le adicionó etanol-agua (70:30) y se procedió como en los casos anteriores, obteniéndose los extractos hidroalcohólicos.

Se emplearon los procedimientos estándares para la detección fitoquímica semicualitativa de nueve compuestos propuesto por Lock (15) para alcaloides (reactivos de Mayer, de Dragendorff y de Wagner), saponinas (producción de espuma), esteroides (reacción de Liebermann Burchard), triterpenos (reacciones de Liebermann-Burchard y de Noller), taninos (reacción de la gelatina-sal y con el reactivo de  $FeCl_3$ ), fenoles (reactivo de  $FeCl_3$ ), flavonoides (reacción de Shinoda), cumarinas (revelado con vainilla y ácido ortofosfórico) y quinonas (reacción de Bornträger). Los resultados se clasificaron en cinco categorías semicualitativas: - = reacción negativa,  $\pm$  = reacción muy poco positiva, + = reacción poco positiva, ++ = Reacción positiva, y +++ = Reacción muy positiva.

## ORGANISMOS PRUEBA

### *Chironomus calligraphus*

Las masas de huevos de *C. calligraphus* se obtuvieron de las paredes de la Laguna terciaria de oxidación del Complejo Biotecnológico y Unidad de Acuicultura de Villa el Salvador, Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), Lima, Perú. Las masas fueron extraídas con la ayuda de pinzas entomológicas y con una pipeta, para luego ser trasladadas en recipientes de plástico de un litro de capacidad. En el laboratorio las masas de huevos se separaron del substrato a la cual estaban adheridos para luego ser cultivadas en una solución a base de hojas de cereal "Cereal Leaves" (Sigma®)(0,01 %) en recipientes de vidrio de 100 mL aproximadamente hasta su eclosión, y así obtener el estadio de larva I, óptimo para los ensayos de toxicidad. Las condiciones de mantenimiento de los organismos prueba se realizó a un fotoperiodo de

12:12, una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un pH de  $7,2 \pm 0,4$  (16).

Una vez obtenidas las larvas de primer estadio de *Chironomus*, dentro de las 24 h de eclosión, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad aguda. Se emplearon cinco concentraciones más un control, con cuatro repeticiones. En adición se usó un control con el solvente empleado. En cada prueba se utilizó un total de 280 larvas de *C. calligraphus* distribuyéndose al azar en cada envase diez formas inmaduras (larva I). Las larvas no fueron alimentadas durante el bioensayo (17). Para la discriminación de la mortalidad se usó el criterio propuesto por Iannacone *et al.* (18). En donde las larvas fueron consideradas muertas si no fueron capaces de moverse coordinada y normalmente cuando fueron pinchadas ligeramente con un alfiler, durante 15 seg bajo el microscopio (9,17).

### *Artemia franciscana*

Los huevos fueron obtenidos de un Acuario procedente del distrito de Jesús María, Lima, Perú. Previa a la recuperación definitiva de los huevos, se realizó su eclosión para evaluar la calidad biológica del lote. Para la adecuada eclosión de los huevos *Artemia* para la obtención de los nauplios de II estadio se empleó el siguiente procedimiento: a un vaso de precipitado de 50 mL conteniendo agua destilada se le incorporaron huevos de *Artemia* y se expusieron a luz intensa por 1 h, luego se le adicionó lejía Clorox® (5,25%), en proporción 1 parte de lejía por 9 de agua, se agitó continuamente y se observó el cambio de coloración de los huevos, siendo lavados luego en papel filtro poroso Whatman # 1. Cuando se vio que más del 50% de los huevos de coloración marrón inicial cambian a coloración naranja, se lavaron bien y se trasladaron a un vaso conteniendo agua de mar, a un pH = 8, agregándole bicarbonato de sodio y finalmente se llevaron a una incubadora a  $27^{\circ}\text{C}$  por 20 h. Una vez obtenidos los nauplios de II estadio de *Artemia*, dentro de las 24 h de eclosión, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad aguda. Se emplearon cinco concentraciones más un control, con cuatro repeticiones. En adición se usó un control con el solvente empleado. En cada prueba se utilizó un total de 280 nauplios de *A. franciscana*; distribuyéndose al azar en cada envase diez formas inmaduras (nauplio II). Los nauplios no se alimentaron durante el bioensayo (19). Las condiciones de mantenimiento de los organismos prueba se realizó a un fotoperiodo de 12:12, una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un pH de  $7,2 \pm 0,4$ .

## BIOENSAYOS

Se obtuvieron las larvas de I estadio de *C. calligraphus* y los nauplios de II estadio de *A. franciscana*. En el caso de la *Artemia*, se dejó pasar 18 h desde la eclosión, antes de ser utilizadas en los bioensayos. A continuación 10 de las larvas de I estadio de *C. calligraphus* o nauplios de II estadio de *A. franciscana* fueron llevados a cada uno de los

envases de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución y en cada una de las cuatro réplicas, los cuales contuvieron las cinco diferentes diluciones de los seis extractos vegetales. A las 48 h de exposición, se contó el número de las larvas o nauplios muertos en cada una de las diluciones. Los ensayos fueron considerados válidos cuando la mortalidad en el control no fue mayor al 10% según el criterio estándar propuesto por Calow (20). De cada uno de los tres extractos (hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico) empleados para las cuatro plantas en estudio, fueron pesados 100 mg de la masa obtenida a partir de 100 g de planta seca en 1 mL del solvente respectivo y luego diluido en 1 L de agua declorinada. A partir del cual se hicieron 5 diluciones empleando un factor de 0,5. Las diluciones fueron: 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mg del extracto  $\text{L}^{-1}$ . El agua de dilución empleada para todos los casos fue agua de grifo declorinada, cuyas características fisicoquímicas fueron: pH = 7,2; CE =  $0,86 \text{ dS m}^{-1}$ ; dureza total =  $362 \text{ mg L}^{-1}$ ; Ca =  $6,17 \text{ me L}^{-1}$ ; Mg =  $1,26 \text{ me L}^{-1}$ ; K =  $0,10 \text{ me L}^{-1}$ ; Na =  $1,58 \text{ me L}^{-1}$ ; Nitratos =  $0,10 \text{ me L}^{-1}$ ; Carbonatos =  $3,55 \text{ me L}^{-1}$ ; Sulfatos =  $2,30 \text{ me L}^{-1}$ ; Cloruros =  $2,40 \text{ me L}^{-1}$ ; Boro =  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ . Los bioensayos se realizaron a un fotoperiodo de 12:12 y una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . En adición el control por solvente para todos los casos fue 1 mL de hexano, cloroformo o alcohol según el caso en 1L de agua declorinada.

## TRATAMIENTO DE DATOS

Las pruebas de toxicidad aguda se evaluaron en cinco concentraciones, más un control o testigo, y más un control con solvente con cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA) de  $7 \times 4$ . En todos los casos la eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un análisis de Varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los porcentajes de mortalidad a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal. En el caso de las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey. La  $\text{CL}_{50}$  y sus respectivos límites de confianza al 95%, se calcularon usando el programa computarizado EPA - Probit versión 1,5. Para el cálculo de las estadísticas descriptivas e inferenciales se usó el paquete estadístico SPSS, versión 12,0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las principales características fitoquímicas semicualitativas para nueve componentes de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de las cuatro plantas amazónicas: tallo y hoja de *A. pilosa*, corteza de *P. clavigera*, toda la planta de *T. zebrina* y corteza y hoja de *C. tomentosum* son mostradas en las Tablas 1, 2 y 3.

La toxicidad letal aguda en términos de  $CL_{50}$  y sus límites inferior y superior de los extractos hexánicos, clorofórmico e hidroalcohólicos para *C. calligraphus* es indicado en las Tablas 4, 5 y 6. De igual manera en *A. franciscana* el efecto ecotoxicológico de los extractos hexánicos, clorofórmico e hidroalcohólicos es observado en las Tablas 7,8 y 9. El coeficiente de variación (CV) global de todos los ensayos ecotoxicológicos fue de 56%, con un mínimo de 8,2% a 98,4%.

**Tabla 1.** Características fitoquímicas de los extractos hexánicos de cuatro plantas con potencial biocida procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Pruebas fitoquímicas	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>	<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>	<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>
Masa a partir 100 g (en g)	7,7069	9,3222	2,8383	2,0513	3,0350	7,3133
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	±	-	-
Esteroides	++	±	-	++	++	++
Triterpenos	-	-	++	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Fenoles	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	+	-	+	-
Cumarinas	±	±	-	-	-	-
Quinonas	-	-	±	-	-	-

- = Reacción negativa. ± = Reacción muy poco positiva. + = Reacción poco positiva. ++ = Reacción positiva. +++ = Reacción muy positiva. <sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta.

**Tabla 2.** Características fitoquímicas de los extractos clorofórmicos de cuatro plantas con potencial biocida procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Pruebas fitoquímicas	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>	<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>	<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>
Masa a partir 100 g (en g)	4,5522	4,0712	4,5323	4,3636	8,3635	8,9102
Alcaloides	-	-	-	-	+++	+
Saponinas	-	-	±	±	-	-
Esteroides	++	+	+	++	++	±
Triterpenos	-	+	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Fenoles	-	-	-	-	+	-
Flavonoides	-	-	+	-	+	-
Cumarinas	+	+	++	±	-	±
Quinonas	-	-	±	-	±	-

- = Reacción negativa. ± = Reacción muy poco positiva. + = Reacción poco positiva. ++ = Reacción positiva. +++ = Reacción muy positiva. <sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta.

**Tabla 3.** Características fitoquímicas de los extractos hidroalcohólicos de cuatro plantas con potencial biocida procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Pruebas fitoquímicas	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>	<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>	<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>
Masa a partir 100 g (en g)	19,0426	22,8147	8,7587	8,5375	13,0788	16,1453
Alcaloides	-	-	-	-	+++	+
Saponinas	+	-	+++	+	±	±
Esteroides	++	±	-	-	-	+
Triterpenos	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Fenoles	-	-	++	±	-	±
Flavonoides	-	-	++	-	-	-
Cumarinas	+	+	±	±	+	+
Quinonas	-	-	++	+	±	-

- = Reacción negativa. ± = Reacción muy poco positiva. + = Reacción poco positiva. ++ = Reacción positiva. +++ = Reacción muy positiva. <sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta.

**Tabla 4.** Bioensayos de actividad con *Chironomus calligraphus* a 48 h de exposición con extractos hexánicos de cuatro plantas amazónicas procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg del extracto L <sup>-1</sup> )	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>		<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>		<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>		<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
Control con hexano	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
6,25	14,4	b	65,7	b	6,4	a	34,3	b	22,8	b	68,5	B
12,5	34,4	bc	71,4	bc	17,7	ab	45,7	bc	31,5	bc	82,8	Bc
25	31,5	bc	85,7	bc	37,6	b	62,9	cd	40,0	bcd	94,3	Cd
50	34,4	bc	94,3	c	38,7	b	79,9	d	48,6	cd	100	D
100	45,7	d	97,1	c	60,3	c	85,7	d	57,1	d	100	D
$CL_{50}$	>100		3,61		65,84		13,61		56,09		4,01	
Límite inferior	47,60		0,73		37,49		6,68		22,92		1,37	
Límite superior	> 200		6,84		134		21,21		>318		6,25	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05).  $CL_{50}$  = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

**Tabla 5.** Bioensayos de actividad con *Chironomus calligraphus* a 48 h de exposición con extractos clorofórmicos de cuatro plantas amazónicas procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg del extracto L <sup>-1</sup> )	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>		<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>		<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>		<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
Control con alcohol etílico	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
6,25	73,3	b	66,6	b	80	b	63,2	b	8,79	b	90,0	b
12,5	83,3	b	76,6	bc	86,6	b	73,3	bc	38,1	c	96,7	bc
25	93,3	bc	83,3	bc	90	bc	83,3	bc	57,6	cd	100	c
50	100	c	93,3	c	96,7	c	93,3	c	70,7	d	100	c
100	100	c	100	c	96,7	c	100	c	73,9	d	100	c
$CL_{50}$	3,32		3,59		0,73		4,39		24,83		1,94	
Límite inferior	0,58		0,55		0,01		1,01		11,06		nd	
Límite superior	5,94		7,14		3,46		8,03		41,72		nd	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05).  $CL_{50}$  = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

**Tabla 6.** Bioensayos de actividad con *Chironomus calligraphus* a 48 h de exposición con extractos hidroalcohólicos de cuatro plantas amazónicas procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg del extracto L <sup>-1</sup> )	<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>1</sup>		<i>Aristolochia pilosa</i> <sup>2</sup>		<i>Paulinia clavigera</i> <sup>3</sup>		<i>Tradescantia zebrina</i> <sup>4</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>		<i>Chondrodendron tomentosum</i> <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
Control con alcohol etílico	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
6,25	73,3	b	66,6	b	80	b	63,2	b	8,79	b	90,0	b
12,5	83,3	b	76,6	bc	86,6	b	73,3	bc	38,1	c	96,7	bc
25	93,3	bc	83,3	bc	90	bc	83,3	bc	57,6	cd	100	c
50	100	c	93,3	c	96,7	c	93,3	c	70,7	d	100	c
100	100	c	100	c	96,7	c	100	c	73,9	d	100	c
$CL_{50}$	3,32		3,59		0,73		4,39		24,83		1,94	
Límite inferior	0,58		0,55		0,01		1,01		11,06		nd	
Límite superior	5,94		7,14		3,46		8,03		41,72		nd	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05).  $CL_{50}$  = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

**Tabla 7.** Bioensayos de actividad con *Artemia franciscana* a 48 h de exposición con extractos hexánicos de cuatro plantas con potencial biocida procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg del extracto L <sup>-1</sup> )	Aristolochia pilosa <sup>1</sup>		Aristolochia pilosa <sup>2</sup>		Paullinia clavigera <sup>3</sup>		Tradescantia zebrina <sup>4</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	A	0	a	0	a	0	a	0	A
Control con hexano	0	a	0	A	0	a	0	a	0	a	0	A
6,25	57,5	b	65	B	65	b	62,5	b	40	b	62,5	B
12,5	75	b	90	C	77,5	bc	87,5	c	60	bc	82,5	c
25	92,5	c	92,5	C	90	c	92,5	c	75	cd	90	c
50	95	cd	97,5	C	97,5	c	95	c	87,5	d	92,5	c
100	100	d	100	C	97,5	c	95	c	92,5	d	95	c
CL <sub>50</sub>	5,09		3,49		3,54		2,38		8,78		2,55	
Límite inferior	2,55		1,14		1,07		0,32		5,02		0,35	
Límite superior	7,37		5,65		6,03		4,95		12,43		5,32	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05). CL<sub>50</sub> = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

**Tabla 8.** Bioensayos de actividad con *Artemia franciscana* a 48 h de exposición con extractos clorofórmicos de cuatro plantas amazónicas procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg de extracto L <sup>-1</sup> )	Aristolochia pilosa <sup>1</sup>		Aristolochia pilosa <sup>2</sup>		Paullinia clavigera <sup>3</sup>		Tradescantia zebrina <sup>4</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
Control con clorofórmico	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
6,25	37,5	b	67,5	b	52,5	b	77,5	b	47,5	b	65	b
12,5	57,5	bc	82,5	bc	67,5	bc	82,5	bc	80	c	67,5	b
25	80	cd	85	c	70	cd	92,5	bc	90	cd	90	c
50	90	d	90	c	87,5	d	95	bc	97,5	cd	92,5	c
100	97,5	d	97,5	c	100	d	97,5	c	100	d	95	c
CL <sub>50</sub>	9,44		2,12		6,65		1,27		6,27		3,44	
Límite inferior	6,36		0,17		3,27		0,02		3,93		0,76	
Límite superior	12,43		4,92		9,87		3,64		8,03		6,38	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05). CL<sub>50</sub> = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

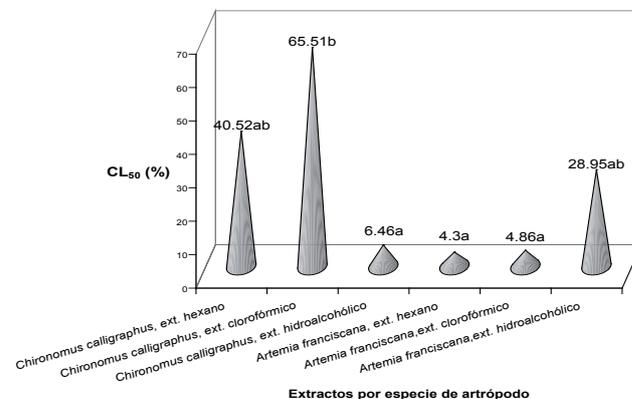
**Tabla 9.** Bioensayos de actividad con *Artemia franciscana* a 48 h de exposición con extractos hidroalcohólicos de cuatro plantas amazónicas procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú.

Concentración (mg del extracto L <sup>-1</sup> )	Aristolochia pilosa <sup>1</sup>		Aristolochia pilosa <sup>2</sup>		Paullinia clavigera <sup>3</sup>		Tradescantia zebrina <sup>4</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>		Chondrodendron tomentosum <sup>2</sup>	
	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.	% M	Sig.
Control con agua destilada	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
Control con alcohol etílico	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a	0	a
6,25	35	b	0	a	17,5	b	0	a	0	a	20	b
12,5	40	b	25	b	27,5	b	7,5	a	7,5	a	40	bc
25	70	c	35	b	57,5	c	25	b	25	b	60	cd
50	82,5	cd	57,5	c	87,5	d	45	bc	45	bc	72,5	cd
100	100	d	75	d	90	d	65	c	65	c	100	D
CL <sub>50</sub>	15,01		41,47		20,29		19,89		59,46		17,62	
Límite inferior	9,96		30,02		16,04		13,83		30,06		13,71	
Límite superior	22,63		57,30		25,67		28,61		92,90		22,17	

<sup>1</sup> = Tallo; <sup>2</sup> = Hoja; <sup>3</sup> = Corteza; <sup>4</sup> = Toda la planta. Promedios en una misma columna, seguidos por la misma letra, no difieren significativamente según prueba de Tukey (P = 0,05). CL<sub>50</sub> = Concentración letal media. % M = Porcentaje de mortalidad.

El Andeva realizado entre los valores de CL<sub>50</sub> (en mg de extracto L<sup>-1</sup>) para los tres extractos hexánico, clorofórmico y hidroalcohólico evaluados con *C. calligraphus* y *A.*

*franciscana* para las cuatro plantas amazónicas mostró que existieron diferencias significativas (F = 8,42; P < 0,001). Se encontró que los valores de CL<sub>50</sub> de los extractos hexánicos y clorofórmicos de *A. franciscana* y los hidroalcohólicos para *C. calligraphus* fueron estadísticamente diferentes a los clorofórmicos de *C. calligraphus* (Figura. 1).



**Figura 1.** Valores de CL<sub>50</sub> para los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico sobre *C. calligraphus* y *A. franciscana*.

En los extractos hidroalcohólicos de *Paullinia elegans* Cambess, especie congénica a *P. clavigera*, no se han encontrado efectos molusquicidas sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (21). En cambio, en *Paullinia pinnata* L. se han registrado actividades molusquicidas contra *B. glabrata* (22), posiblemente debido a flavonas glicosiladas (23). Ekabo *et al.* (24) señalan propiedades molusquicidas del “Sacha yoco” *P. clavigera*, debido a la concentración de las saponinas. Lo cual concuerda con las altas concentraciones de saponinas encontradas en el extracto hidroalcohólico que mostró alta toxicidad sobre *C. calligraphus* (Tabla 3). Asimismo, Schultes y Raffauf (25) indican la presencia de triterpenos, β-sitosterol y de aceites etéreos en una planta de la misma familia, *Serjania* (Jacq.) Willd (Sapindaceae), determinando que los primeros son responsables de actividad tóxica. En el presente estudio se encontró que el extracto hidroalcohólico y el clorofórmico de *P. clavigera* tuvieron alta actividad sobre *C. calligraphus* (Tabla 6) y en concordancia a reacciones positivas a saponinas y a cumarinas, respectivamente (Tabla 3).

Se ha observado que el extracto acuoso de *T. zebrina* contiene saponinas (8). En nuestro estudio, los extractos hexánico y clorofórmico de *T. zebrina* tuvieron un alto efecto tóxico sobre *A. franciscana* (Tablas 7 y 8). Estos dos extractos coincidentemente presentaron reacciones positivas a los esteroides, los cuales estuvieron ausentes en el extracto hidroalcohólico (Tablas 1 al 3).

Se ha observado el efecto de *C. tomentosum* sobre el rotífero dulceacuícola *Asplanchna brightwellii* Gosse, 1850, en el que disminuyó la actividad de natación, pero aumentó la duración de su tiempo de vida (26). Los extractos hexánicos e hidroalcohólicos de la hoja tuvieron alta efectividad sobre *C. calligraphus* y *A. franciscana* (Tablas 4, 6, 7 y 9). En el extracto hexánico de la hoja de *C. tomentosum*, los esteroides tuvieron reacción positiva,

y en el extracto clorofórmico, los alcaloides y las cumarinas se encontraron presentes. Los alcaloides no estuvieron presentes en el extracto hexánico de la hoja de *C. tomentosum*, por lo que el efecto tóxico de este extracto no se debe a la presencia de alcaloides (Tabla 1). Por otro lado, aunque los alcaloides tuvieron una reacción muy positiva en el extracto clorofórmico de la corteza del curare, no encontrándose efectos en términos de  $CL_{50}$  a las concentraciones empleadas de este extracto sobre *C. calligraphus* y en contraste, alta actividad sobre *A. franciscana* (Tablas 5 y 8).

Se tienen registros que los alcaloides tóxicos denominados ácidos aristolóquicos son secuestrados de la planta congénérica a *A. pilosa*, *Aristolochia californica* Torrey, por *Battus philenor* (Linnaeus, 1771) (Lepidoptera: Papilionidae) para protegerse de sus depredadores (27). Los extractos acetónicos y etanólicos del tubérculo de *Aristolochia pubescens* (Willd) mostraron efectos insecticidas sobre *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera) (5,28). En *A. onoei arimaensis* Mart y *A. debilis* Sieb et Zucc se ha observado efectos en la coloración de *Atrophaneura alcinousus* (Klug, 1836) (Lepidoptera) (29). Efectos insecticidas de los extractos de especies congénéricas a huacahuisacha como *A. pubescens* y *A. argentina* han sido encontrados sobre *A. gemmatalis* y *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Curculionidae), respectivamente (28,30). Efectos repelentes de las raíces de *Aristolochia aff. orbicularis* Durch se han encontrado sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) (31). Efectos tóxicos de los extractos de *A. bracteolata* han sido encontrados en *Dysdercus koenigii* Fabricius, 1775, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (32). En forma similar el extracto hexánico de la hoja y el extracto clorofórmico del tallo de *A. pilosa* tuvieron actividad sobre *C. calligraphus*; de igual forma el extracto hidroalcohólico del tallo de *A. pilosa* presentó mayor efecto tóxico sobre *A. franciscana* (Tablas 4, 5 y 9). Estos extractos presentaron reacciones positiva a los esteroides y a las cumarinas, y a los esteroides en los dos últimos, respectivamente (Tablas 1-3).

En *Artemia* y *Chironomus* se ha evidenciado al evaluarse la mortandad, las propiedades tóxicas de los materiales vegetales en estudio. Nuestro trabajo muestra una clara influencia por parte de los componentes fitoquímicos sobre la supervivencia de *A. franciscana* en los tres diferentes extractos empleados con mayores efectos tóxicos en relación a *C. calligraphus* ( $t = 2,68$ ;  $P = 0,01$ ). Investigaciones realizadas con compuestos no fitoquímicos y con sustancias antimicrobianas han evidenciado resultados similares de mayor sensibilidad en comparación a otros dípteros acuáticos, mostrando una vez más la ventaja del uso de *Artemia* como especie de invertebrado en la realización de bioensayos toxicológicos, a pesar de su menor relevancia ecológica (33).

Con relación a los tres tipos extractos ensayados y la especie de artrópodo evaluada, no se encontró un único comportamiento de toxicidad. Así, los valores promedio de

$CL_{50}$  de los extractos hexánicos y clorofórmicos de todas las plantas sobre *A. franciscana* y los hidroalcohólicos sobre *C. calligraphus* presentaron mayor toxicidad que los extractos clorofórmicos en *C. calligraphus*.

Tampoco se encontró un único patrón de toxicidad con relación al tipo de extracto, especie de planta ensayada y artrópodo evaluado. Así, el extracto hexánico de la hoja y el clorofórmico del tallo de *A. pilosa*, y el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* tuvieron mayor actividad sobre *C. calligraphus*. En cambio, el extracto hexánico y clorofórmico de *T. zebrina*, y el extracto hidroalcohólico del tallo de *A. pilosa* tuvieron mayor actividad sobre *A. franciscana*.

De igual forma tampoco se observó con relación a la planta evaluada un único comportamiento de mayor toxicidad sobre los dos artrópodos ( $F = 0,52$ ;  $P = 0,75$ ). Sin embargo, una evaluación integral mostró que la hoja de *C. tomentosum* presentó una mayor toxicidad en comparación a las otras plantas sobre los dos artrópodos analizados. Por ende, podría considerarse que la hoja del curare es la planta más eficaz con efectos tóxicos sobre artrópodos.

Los resultados obtenidos en los bioensayos con estas cuatro especies de plantas que se presentan naturalmente en el área estudiada demuestran que la flora local Peruana presenta un gran potencial biocida. Los extractos botánicos más activos deben ser priorizados para el fraccionamiento e identificación de sus principales componentes activos.

## AGRADECIMIENTOS

A las Biólogas Marianella Alayo Rivera y Anita Arrascue Lino por su colaboración en el manejo de los cultivos de *Ch. calligraphus* y *A. franciscana*. Este trabajo fue presentado en el VIII Congreso Brasileiro de Ecotoxicología (ECOTOX 2004), 17 - 20 de Octubre. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto ecotóxico de cuatro plantas amazónicas de importancia etnobotánica en Pucallpa, Perú: "Huacahuisacha" *Aristolochia pilosa* Kunth (Aristolochiaceae) en tallo y hoja, "Sacha Yoco" *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) en corteza, "Oreja de Tigre" *Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse (Commelinaceae) toda la planta y "Curare" *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pavon corr. Miers (Menispermaceae) en corteza y hoja sobre las larvas de primer estadio de *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 y sobre los nauplios de segundo estadio del camarón salino *Artemia franciscana* Kellog, 1906. Se emplearon procedimientos estándares para la detección fitoquímica semicualitativa de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de las plantas evaluadas.

Los valores promedios de  $CL_{50}$  de los extractos hexánicos y clorofórmicos de todas las plantas sobre *A. franciscana* y los hidroalcohólicos sobre *C. calligraphus* fueron más bajos que los valores de los extractos clorofórmicos sobre *C. calligraphus*. El extracto hexánico de la hoja y clorofórmico del tallo de *A. pilosa*, y el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* tuvieron mayor actividad sobre *C. calligraphus*. En cambio, el extracto hexánico y clorofórmico de *T. zebrina*, y el extracto hidroalcohólico del tallo de *A. pilosa* tuvieron mayor actividad sobre *A. franciscana*.

**Palabras claves:** *Aristolochia*, *Artemia*, *Chironomus*, *Chondrodendron*, ensayo de toxicidad aguda, insecticida, *Paullinia*, *Tradescantia*

## BIBLIOGRAFÍA

- Iannacone J, Lamas G. Plantas biocidas usadas en el control de la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Rev per Ent 2003; 43:79-87.
- Oberlies NH, Rogers LL, Martins JM, Mc. Laughlin JL. Cytotoxic and insecticidal constituents of unripe fruits of *Persea americana*. J Nat Prod 1998; 61:781-785.
- Hoss R. Recursos Botánicos con potencial biocida: conceptos básicos y métodos de análisis. 1ª Ed. Lima - Perú. RAAA. 1999.
- Nano GM, Binello A, Bianco MA, Ugazio G, Burdino S. *In vitro* tests to evaluate potential biological activity in natural substances. Fitoterapia 2002; 73:140-146.
- Pérez D, Iannacone J. Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., insecto plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agric Tec (Chile) 2006; 66:21-30.
- Pérez D, Iannacone J. Mortalidad y repelencia en *Eupalamides cyparissias* (Lepidoptera: Castniidae), plaga de la palma aceitera *Elaeis guineensis*, por efecto de diez extractos botánicos. Rev Soc Entomol Argent 2008; 67: (En prensa).
- Iannacone J, Alvarino L, Soto JC, Salcedo C. Efecto toxicológico del "Sachayaco", *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas. J Braz Soc Ecotoxicol 2007; 2:15-25.
- Pérez D, Iannacone J. Efecto insecticida de Sachayaco (*Paullinia clavigera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. Ecol Apl 2004; 3:64-72.
- Iannacone J, Arrascue A, Cárdenas M. Evaluación de la ecotoxicidad de sedimentos del río Aruri y del Lago Junín (Perú) usando *Escherichia coli* y *Chironomus calligraphus*. Rev Bras Toxicol 2005; 18:27-41.
- Dos Santos AF, De Azevedo DPL, Dos Santos Mata RC, Mendonca DIMD, Sant'Ana AEG. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. Bioresource Tech 2006; 98:135-139.
- Pérez D. Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región Ucayali. Folia Amazoniana 2002; 13:85-106.
- Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. St. Louis, USA. Missouri Botanical Garden. 1993. 1286 p.
- Desmarchelier C, Witting F. Sesenta plantas medicinales de la Amazonía peruana, ecología, etnomedicina y bioactividad. Lima, Perú. 2000. 270 p.
- Weckerle CS, Rutishauser R. Gynoecium, fruit and seed structure of Paullinieae (Sapindaceae). Bot J Linn Soc 2005; 147:159-189.
- Lock O. Investigación Fitoquímica: métodos de estudio de productos naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1994. 300 p.
- Iannacone J, Salazar N. Efecto toxicológico de muestras de agua del Lago Junín, Perú, sobre *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). Braz Soc Ecotoxicol 2007; 2:219-227.
- Iannacone J, Dale WE. Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y el crustáceo *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el río Rímac. Rev per Ent 1999; 41:111-120.
- Iannacone J, Alvarino L, Mansilla J. Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). Wiñay Yachay 2002; 6:59-74.
- Maguiña A, Iannacone J. *Artemia franciscana* Kellog, 1906 "Camarón salino" como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas con propiedades antiparasitarias. Bol Soc quím Perú 2000; 66:154-169.
- Calow P. Handbook of ecotoxicology. Vol. I. Sheffield, UK: Blackwell Science Ltd; 1993. 478 p.
- Truiti MC, Ferreira IC, Zamuner ML, Nakamura CV, Sarragiotto MH, Souza MC. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. Braz J Med Biol Res 2005; 38:1873-1878.
- Meléndez PA, Carriles VA. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96:209-218.
- Abourashed EA, Toyang NJ, Choinski JJr, Khan IA. Two new flavone glycosides from *Paullinia pinnata*. J Nat Prod 1999; 62:1179-1181.

24. Ekabo O, Farnsworth N, Henderson T, Mao G, Mukherjee R. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. J Nat Prod 1996; 59:431-435.
25. Schultes RE, Raffauf RF. The Healing Forest: Medicinal and toxic Plant of the Northwest Amazonia (Historical, Ethno- & Economic Botany, Vol. 2). Portland, Oregon, USA. 1990. 484 p.
26. Beauvais JR, Enesco HE. Life span and age-related changes in activity level of the rotifer *Asplanchna brightwelli*: influence of curare. Exp Gerontol 1985; 20:359-366.
27. Fordyce JA. The lethal plant defense paradox remains: inducible host-plant aristolochic acids and the growth and defense of the pipevine swallowtail. Ent Exp Appl 2001; 100:339-346.
28. Nascimento IR, Murata AT, Bortoli SA, Lopes LM. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. Pest Manage Sci. 2004; 60:413-416.
29. Saito M, Yamanaka A, Masaki H, Nishijima A, Harada Y, Kitazawa C, Abe H, Watanabe M, Endo K. Environmental factors affecting black/white coloration of the silken girdle in the swallowtail butterfly, *Atrophaneura alcinous* (Lepidoptera: Papilionidae). Zoolog Sci 2005; 22:1259-1263.
30. Broussalis AM, Ferraro GE, Martino VS, Pinzon R, Coussio JD, Alvarez JC. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. J Ethnopharmacol 1999; 67:219-223.
31. Rauscher J, Guillen RM, Albores-Velasco M, Gonzales G, Vostrowsky O, Bestmann LL. The repellence of *Aristolochia aff. orbicularis* roots againsts the corn borer *Sitophilus zeamais*. Z Naturforsch 2001; 56:575-580.
32. Muthukrishnan J, Pushpalatha E. Effects on plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. J Appl Ent 2001; 125:31-35.
33. Barahona MV, Sanchez FS. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. Bull Environ Contam Toxicol 1996; 56:271-278.