



REVISION

Actividad larvicida de extractos hidroalcohólicos de *Pala scholaris* (L.) Roberty sobre larvas de estadio III de *Aedes aegypti*

Larvicidal activity of hydroalcoholic extracts of Pala scholaris (L.) Roberty against III stage larvae of Aedes aegypti

Oscar Ivan Camacho-Romero¹, Stefanny Barrios-Márquez¹,
Eduardo Lozano-Contreras², Leonardo García-Viloria²

¹ Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i), Perseus Alianz S.A.S. Barranquilla, Colombia

² Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico -Ciudadela Universitaria. Barranquilla, Colombia

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: oscarivancamacho@gmail.com (Oscar Ivan Camacho-Romero).

Recibido el 19 de abril de 2019; aceptado el 29 de julio de 2019.

Como citar este artículo:

Camacho-Romero OI, Barrios-Márquez S, Lozano-Contreras E, García-Viloria L. Actividad larvicida de extractos hidroalcohólicos de *Pala scholaris* (L.) Roberty sobre larvas de estadio III de *Aedes aegypti*. JONNPR. 2019;4(10):1022-31. DOI: 10.19230/jonnpr.3081

How to cite this paper:

Camacho-Romero OI, Barrios-Márquez S, Lozano-Contreras E, García-Viloria L. Larvicidal activity of hydroalcoholic extracts of *Pala scholaris* (L.) Roberty against III stage larvae of *Aedes aegypti*. JONNPR. 2019;4(10):1022-31. DOI: 10.19230/jonnpr.3081



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos,
ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

Resumen

Introducción. Mediante estudios etnobotánicos se ha demostrado que diversas plantas presentan propiedades utilizadas en la comunidad, orientadas hacia el manejo de los vectores transmisores de enfermedades.

Objetivo. Evaluar la actividad larvicida de extractos hidroalcohólicos de la corteza de *Pala scholaris* (L.) Roberty sobre larvas de estadio IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Métodos. Se utilizaron larvas de *Aedes aegypti* en estadio III. La corteza de la especie fue recolectada en Puerto Colombia (Atlántico-Colombia), del cual se elaboraron los extractos hidroalcohólicos por



maceración, y se realizaron ensayos de calidad, marcha fitoquímica preliminar y actividad biológica siguiendo las recomendaciones dadas por la Organización Mundial de la Salud.

Resultados. Los extractos hidroalcohólicos de *Pala scholaris* mostraron la presencia de fenoles, saponinas, terpenos y flavonoides en gran medida, mientras que la actividad larvicida mostrada fue moderada con una CL_{50} de 475,42 ppm y 403,55 ppm, de los extractos elaborados con relación etanol/agua 1:1 y 7:3, respectivamente.

Conclusiones. Se consideró que el extracto de corteza de *Pala scholaris* podría ser una especie prometedora para la obtención de metabolitos secundarios con actividad larvicida.

Palabras clave

dengue; larvicida; hojas; extractos; Stegomyia aegypti; marcha fitoquímica

Abstract

Introduction. Through ethnobotanical studies, it has been shown that several plants have properties used in the community, oriented towards the management of disease-transmitting vectors.

Objective. To evaluate the larvicidal activity of hydroalcoholic extracts of the bark of *Pala scholaris* (L.) Roberty on stage IV larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Method. *Aedes aegypti* larvae were used in stage III. The bark of the species was collected in Puerto Colombia (Atlántico-Colombia), from which the hydroalcoholic extracts were elaborated by maceration, and quality tests, preliminary phytochemical march and biological activity were carried out following the recommendations given by the World Health Organization.

Results. The hydroalcoholic extracts of *Pala scholaris* showed the presence of phenols, saponins, terpenes and flavonoids to a large extent, while the larvicidal activity shown was moderate with an LC_{50} of 475,42 ppm and 403,55 ppm, of the extracts elaborated with ethanol/water relation 1:1 and 7:3, respectively.

Conclusions. It was considered that the bark extract of *Pala scholaris* could be a promising species for obtaining secondary metabolites with larvicidal activity.

Keywords

dengue; larvicidal; leaves; extracts; Stegomyia aegypti; phytochemical screening

Introducción

El dengue es una enfermedad de interés en salud pública, por el impacto que ocasiona en morbilidad y mortalidad a nivel mundial, nacional y local ⁽¹⁾, en las últimas décadas el índice de casos de esta endemia ha aumentado, donde más de 2.500 millones de personas aproximadamente el 40% de la población mundial están en riesgo de contraer esta enfermedad; de acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽²⁻³⁾, calcula



que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones por el virus proveniente del *Aedes aegypti* en el mundo ⁽⁴⁾. Esta situación se agrava en países donde predomina el clima tropical y subtropical, con condiciones de temperatura, humedad relativa y altitud óptima para el desarrollo del mosquito responsable de la transmisión de uno de los 4 cuatro serotipos identificados (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) ⁽⁵⁻⁶⁾.

Colombia es el segundo país en Suramérica después de Brasil con mayor incidencia de esta enfermedad; en las últimas décadas en el territorio nacional se observa un comportamiento de carácter creciente ⁽¹⁾. A pesar de existir en el mercado insecticidas químicos neurotóxicos (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, entre otros) ⁽⁷⁾. Para frenar el crecimiento de las poblaciones de *Aedes aegypti*, sin embargo el constante uso de estas sustancias ha generado resistencia en las poblaciones de este vector ⁽⁸⁾.

A nivel mundial se plantea la búsqueda de plantas que posean constituyentes con propiedades que inhiban el estado larvario de *Aedes aegypti* ⁽⁹⁾, con el fin de poner freno al constante desarrollo del vector responsable de diversas enfermedades que día tras día causa miles de muertes. Es por ello, que especies pertenecientes a la familia Apocynaceae presentan constituyentes activos que son reconocidos como insecticidas ⁽¹⁰⁾.

Por lo anterior, se planteó evaluar la actividad larvica de extractos hidroalcohólicos de la corteza de *Pala scholaris* (L.) Roberty sobre larvas de estadio IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Métodos

Se planteó un estudio de tipo descriptivo-transversal ⁽¹¹⁾, y se ejecutó en las instalaciones del laboratorio de Investigaciones adscrito a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad del Atlántico, durante el periodo de marzo-agosto del 2014.

Recolección del material vegetal

La recolección de la corteza de *Pala scholaris* (L.) Roberty, también conocida como *Alstonia scholaris* (L.) R.Br., se realizó en el municipio de Puerto Colombia, Departamento del Atlántico, de la Costa Norte Colombiana, en marzo de 2014 (25°C, H.R. 70% y tiempo seco), sin presencia de partes dañadas o deterioradas por insectos, aproximadamente 650 g del órgano vegetal. A un espécimen completo de la planta se le realizó la identificación taxonómica en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y registró con el código COL 576296.



Obtención de los extractos hidroalcohólicos

El material vegetal fue expuesto a secado a temperatura ambiente entre $29 \pm 1^\circ\text{C}$, bajo sombra por 15 días. Posteriormente, fue llevado a un tamaño de partícula moderadamente grueso por molienda y sometido a extracción con dos mezclas en relación etanol/agua 1:1 y 7:3 por maceración por 8 días. Concluido el tiempo, se filtraron y concentraron en un rotaevaporador a 40°C y 80 rpm, obteniendo dos extractos hidroalcohólicos obtenidos bajo las mismas condiciones de extracción. Los extractos se almacenaron a 20°C y protegidos de la luz durante el periodo de estudio ⁽¹²⁾.

Pruebas de calidad y Marcha fitoquímica preliminar

Para los controles de calidad se evaluó las características organolépticas (olor y color), densidad, pH, sólidos totales y rendimiento, según las metodologías descritas por *Ochoa (2013)* ⁽¹³⁾. Mientras, para determinar la presencia de los grupos químicos mayoritarios de los extractos hidroalcohólicos de la corteza de *Pala scholaris*, se utilizó diversas pruebas y reactivos específicos para identificar la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, antraquinonas, fenoles, glicósidos cardiotónicos, saponinas, leucoantocianinas, esteroides y terpenos ⁽¹⁴⁾.

Evaluación de la actividad larvica

Las larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller se colectaron en la zona residencial del municipio de Barranquilla (Atlántico), a partir de reservas de agua potable, las cuales se trasladaron al Laboratorio de Salud Pública del Atlántico, donde se realizó su identificación y se obtuvieron huevos de la siguiente generación del vector. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio para la formación del estado larvario de *Aedes aegypti* sumergidos en agua para inducir la eclosión, las larvas que emergieron se transfirieron a agua limpia para la alimentación de las mismas, se criaron hasta el III estadio ⁽¹⁵⁾, se seleccionaron las larvas necesarias para efectuar el ensayo biológico, bajo condiciones adecuadas de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa ($72 \pm 4\%$).

A partir del extracto seco, se realizaron concentraciones sucesivas de 1000, 500, 250, 150 y 100 ppm; se colocaron 20 larvas *Aedes aegypti* en envases de 100 mL de cada concentración según lo establecido por el protocolo de la OMS ⁽¹⁶⁾. Cada ensayo se realizó por triplicado. Como control positivo se usó temefos (fosforotionato de o,o,o'-tetrametil-o'-tio-di-p-fenileno) a 0,05 mg/L y como control negativo se empleó agua destilada ⁽¹⁷⁾. Las lecturas de



mortalidad larvaria, se realizaron a las 1, 3, 6, 12, 24 y 36 h de exposición. Para el registro de las larvas que se declaraban muertas, se tenía en cuenta aquellas que no presentaban movimiento al contacto físico en el mesotórax ⁽¹⁵⁾.

Análisis estadístico

Se registraron y procesaron los datos cuantitativos del control de calidad expresados en promedio \pm desviación estándar, mientras en el caso de la acción larvicida se procesó la mortalidad para calcular el porcentajes de mortalidad presentado por las concentraciones evaluadas; adicional, utilizando un análisis Probit del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, se calculó los valores para CL₅₀ con sus respectivos límites de confianza al 95% ⁽¹⁸⁾.

Para el cálculo de los porcentajes de mortalidad se utilizaron las fórmulas que aparecen a continuación:

$$\text{Porcentaje de mortalidad (\%)} = \frac{\text{Número de larvas muertas}}{\text{Número total de larvas expuestas}} \times 100$$

Resultados

Marcha fitoquímica preliminar

Tabla 1. Relación de metabolitos secundarios identificados en los extractos hidroalcohólicos de corteza de *Pala scholaris*.

Clase de metabolito secundario	Prueba y/o reactivo	Extracto hidroalcohólico de corteza	
		Relación 1:1	Relación 7:3
Alcaloides	Mayer	-	+
	Dragendorff	+	+
	Marquis	+++	++
	Hager	+	++
Fenoles	FeCl ₃	++	+++
Flavonoides	Shinoda	++	++
	HCl	+	++
Leucoantocianinas	Rösenhein	++	+
Saponinas	Espuma	++	+++
Esteroles y terpenos	Placa con éter de petróleo: acetato de etilo (8:2) con revelador Liebermann Burchard	++	+++
Taninos	Gelatina-Sal	+	+
Antraquinonas	Bortränger-Krauss	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Keller - Killiani	-	-

(-): no identificado, (+): escaso, (++) : moderado, (+++) : abundante.



De acuerdo con los resultados de la identificación de constituyentes mayoritarios, se evidenció la presencia de alcaloides, lo cual es soportado por las investigaciones de *Salim (2004)*, donde informan el aislamiento e identificación de cinco alcaloides a partir de un extracto etanólico de corteza de *P. Scholaris*⁽¹⁹⁾, esto coincide con las afirmaciones de *Khyade (2014)*, donde se indica que estos metabolitos son los principales componentes de esta especie y han sido reportados en todos los órganos de la planta, siendo las hojas donde se encuentran con mayor abundancia⁽²⁰⁾; también se identificaron fenoles, flavonoides, leucoantocianinas, saponinas, triterpenos en ambos extractos, la presencia estos constituyentes coincide con lo reportado por *Khyade (2006)* y *Khyade-Vaikos (2010)*, en sus investigaciones en hojas y corteza de *P. scholaris*⁽²¹⁻²²⁾.

Tabla 2. Resultados promedios de los controles de calidad de los extractos

Control de calidad evaluado	Extracto hidroalcohólico de corteza (Etanol:H ₂ O)*	
	Relación 1:1	Relación 7:3
Características organolépticas	Homogeneidad en textura Color: Marrón claro Olor: Madera-resina	Homogeneidad en textura Color: Marrón oscuro Olor: Madera-resina
Densidad (g/mL)	0,9834 ± 0,0001	0,9595 ± 0,0001
pH	6,02 ± 0,006	6,16 ± 0,015
Sólidos totales (g/mL)	0,0084 ± 0,0009	0,0062 ± 0,0011
Rendimiento (%)	2,92	2,81

* Valores por triplicado

Los ensayos de control de calidad de los extractos hidroalcohólicos permitieron diferenciar los extractos, teniendo en cuenta las características evaluadas, ambos extractos fueron homogéneos, presentaron un olor característico a madera-resina, color marrón, pero la intensidad del color fue diferente, debido a que el extracto hidroalcohólico de proporción 7:3, presentó una tonalidad oscura, esto se debe a que contiene una menor proporción de agua, que el extracto con proporción 1:1; estos resultados permiten establecer criterios de identificación de los extractos elaborados, teniendo en cuenta las diferencias encontradas; en relación con la densidad, el extracto con proporción 1:1 presentó un valor más alto, soportado por el aumento de la constante dieléctrica, lo cual permitió un mayor arrastre de sustancias⁽²³⁾, este parámetro proporciona información acerca de la composición de los extractos evaluados, indicando que el extracto que presentó una mayor densidad, contiene mayor proporción de constituyentes polares y el extracto de proporción 7:3 contiene mayoritariamente sustancias menos polares, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica, donde



este extracto presentó mayor cantidad de terpenos; esto se encuentra directamente relacionado con la cantidad de sólidos totales, que indican la cantidad de sustancias suspendidas en el extracto, este parámetro es muy variable porque depende muchos factores⁽²⁴⁾, el extracto hidroalcohólico de proporción 1:1 presentó una mayor concentración de sustancias, en relación con el extracto hidroalcohólico de proporción 7:3.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de los extractos hidroalcohólicos de corteza de *Pala scholaris*.

Extracto corteza	Concentración	Tiempo de contacto/ porcentaje de mortalidad (%)*					
		1	3	6	12	24	36
Hidroalcohólico Etanol:H₂O (1:1)	100 ppm	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	150 ppm	0%	0%	0%	0%	0%	3%
	250 ppm	0%	0%	0%	0%	5%	10%
	500 ppm	8%	18%	22%	25%	30%	37%
	1000 ppm	30%	73%	98%	100%	100%	100%
Hidroalcohólico Etanol:H₂O (7:3)	100 ppm	0%	0%	2%	2%	2%	2%
	150 ppm	0%	10%	10%	10%	12%	12%
	250 ppm	3%	13%	20%	22%	23%	25%
	500 ppm	5%	15%	32%	40%	55%	60%
	1000 ppm	20%	65%	83%	85%	90%	98%
Control positivo: Temefos (0,05 mg/L)		36%	72%	90%	100%	100%	100%
Control negativo: agua destilada		0%	0%	0%	0%	0%	0%

* Valores por triplicado

Al analizar los resultados del porcentaje de mortalidad de los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones con el factor tiempo de contacto, se pudo establecer ambos extractos presentan comportamientos similares, el extracto hidroalcohólico de proporción 1:1 presentó un porcentaje de mortalidad de 100% a partir de las 12 horas a concentración de 1000 ppm; por otra parte, el extracto hidroalcohólico de proporción 7:3 a concentración de 500 ppm presentó un porcentaje de mortalidad a las 36 horas de exposición del 60% de las larvas y a concentración de 1000 ppm, a partir de las 12 horas un porcentaje de mortalidad de 100%, por lo que este resultado resulta muy prometedor, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el control positivo, el insecticida larvario temefos, donde se observa un comportamiento muy parecido al de los extractos, con un porcentaje de mortalidad a las 12 horas de 100%, estos resultados se encuentran acorde a uno de los propósitos planteados por la Organización Mundial de la Salud, donde se promueve la investigación para el control vectorial, debido al fenómeno de resistencia hacia los insecticidas sintéticos⁽²⁵⁻²⁶⁾.



Tabla 4. Concentraciones letales 50 de los extractos hidroalcohólicos de corteza de *Pala scholaris* a 24 h de evaluación

Extracto corteza	Concentración	CL ₅₀ (mg/L)	Límites de confianza (95%)	
			Inferior	Superior
Hidroalcohólico Etanol:H ₂ O (1:1)	1000 ppm	475,42	447,71	503,14
Hidroalcohólico Etanol:H ₂ O (7:3)	1000 ppm	403,55	371,89	435,20

El extracto hidroalcohólico de corteza *P. Scholaris* a una concentración de 1000 ppm, con una proporción 1:1 obtuvo una CL₅₀ (mg/L) de 475,42 y el extracto de corteza *P. Scholaris* a una concentración de 1000 ppm, con una proporción 7:3 una CL₅₀ (mg/L) de 403,55, en la literatura se ha reportado que la actividad larvica se debe principalmente a la presencia de monoterpenos, los cuales han demostrado actividad larvica en diferentes especies de mosquitos; esto coincide con la presencia de estos constituyentes en los extractos evaluados, se ha descrito que la acción de los compuestos larvicidas se debe principalmente a la absorción por el tracto respiratorio o la ingestión de estos compuestos que al entrar en contacto con la larva causan un efecto generalizado, ocasionando la muerte⁽²⁷⁾, este efecto depende de la concentración y el tiempo de exposición, como se observó en los resultados obtenidos.

Conclusiones

Los extractos hidroalcohólicos totales de *P. scholaris* evaluados poseen una gran variedad de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, fenoles, flavonoides, leucoantocianinas, saponinas y triterpenos; además presentaron unos valores de CL₅₀ de 475,42 y 403,55 mg/L, respectivamente; Por lo cual, se puede concluir, que esta especie es prometedora para ser usada como una alternativa natural para el control vectorial, con ventajas para el medio ambiente, teniendo en cuenta la toxicidad de los insecticidas utilizados comúnmente, se sugiere realizar estudios de elucidación estructural que permitan identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos totales responsables de la actividad larvica, para facilitar utilización de los mismos en una formulación y así evitar el inconveniente de los extractos totales de incorporarse en el agua, debido a que alteran sus propiedades organolépticas.



Referencias

1. Ronald M-S, Doris G-C. Dengue: epidemiología, políticas públicas y resistencia de vectores a insecticidas. *Rev Cienc Biomed.* 2013;4(2):302-17.
2. Torres-Galicia I, Cortés-Poza D, Becker I. Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín médico del Hospital Infantil de México.* 2014;71(4):196-201.
3. Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de Situación de Salud (ASIS) Colombia, 2016. Dirección de epidemiología y Demografía. Bogota; Noviembre, 2016.
4. Álvarez Escobar MdC, Torres Álvarez A, Torres Álvarez A, Semper González AI, Romeo Almanza D. Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. *Revista Médica Electrónica.* 2018; 40 (1): 120-8.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue y dengue grave. *Notas Informativas* 117; septiembre, 2013.
6. Pereira Y, Samudio M, Ojeda A, Cabello Á. Seroprevalencia de la infección por dengue en un distrito del Chaco Paraguayo: Estudio poblacional. *Revista chilena de infectología.* 2015; 32(6): 618-27.
7. Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2008; 25(1): 74-100.
8. Lage RJ, Graña TH, Johnson BS, Torres ZZ. Aspectos actualizados sobre dengue. *Revista Información Científica.* 2015; 90 (2): 374-90.
9. Romero L, Pacheco O, De la Hoz F, Díaz F. Evaluación de la notificación del dengue durante una epidemia, Colombia. *Rev Saúde Pública.* 2014; 48(6): 899-905.
10. Nava-Pérez E, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez JR, Vázquez-Montoya EL. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai.* 2012; 8(3): 17-29.
11. Rodríguez M, Mendivelso F. Diseño de investigación de corte transversal. *Revista medica Sanitas.*(2018); 21 (3): 141-146.
12. Camacho-Romero OI, Melgarejo-Gómez S, De-la-Rosa-Torres C. Extraction and evaluation of the secondary metabolites of ether extracts of *Syzygium cumini* (Jambol) fruit. *Revista Tecnología en Marcha.* 2017;30(1):113-20.
13. Ochoa Pacheco A, Marin Moran J, Rivero Breff D, Saborit A. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2013;44(1):52-9.
14. García EJA, Ramos AMA, Parra JJP, Aguilar AA, Pinto MA, Lozano JEP. Fitoquímica de *Ambrosia artemisiifolia* L, *Croton conduplicatus* kunth, *Lantana camara* L, de la región norte de Colombia. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas.* 2018;1(30):42-9.
15. De La Rosa C, Torres C, Camacho O, Calderon Z, Herrera E, Osorio O. Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycine max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. *Rev Col Cien Salud.* 2012;1:39-43.
16. WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization Geneva, Switzerland; 1981.
17. Díaz Castillo F, Morelos Cardona SM, Carrascal Medina M, Pájaro González Y, Gómez Estrada H. Actividad larvicida de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2012;17(3):256-67.



18. Torres HJG, Rossi AM. Apreciaciones sobre el uso y aplicación de la estadística en las ciencias de la salud. Duazary: Revista internacional de Ciencias de la Salud. 2013;10(1):62-6.
19. Salim AA, Garson MJ, Craik DJ. New Indole Alkaloids from the Bark of *Alstonia scholaris*. Journal of Natural Products. 2004;67(9):1591-4.
20. Khyade MS, Kasote DM, Vaikos NP. *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don: A comparative review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 2014;153(1):1-18.
21. Khyade M. Pharmacognostic studies of some plants of Aurangabd district-II: Thesis in Botany, Faculty of Science, Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada ...; 2006.
22. Khyade M, Vaikos N. Comparative Phytochemical and Antibacterial Studies on the bark of *Alstonia scholaris* R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don. Pharmacognosy Journal. 2009;1(4).
23. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos: Convenio Andrés Bello; 2000.
24. Córdoba M, Ley LP. Evaluación de un defoliante y dos promotores de la brotación para la producción forzada de ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) en Chiapa de Corzo, Chis./por Limberg Martínez Córdoba.
25. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D, Pérez O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2004; 56 (1): 54-60.
26. Maestres R, Rey G, de las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to temephos in Atlántico-Colombia. Revista Colombiana de Entomología. 2009;35(2):202-5.
27. Souza LGdS, Almeida MCS, Monte FJQ, Santiago GMP, Braz-Filho R, Lemos TLG, et al. Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil. Química Nova. 2012;35(11):2258-62.