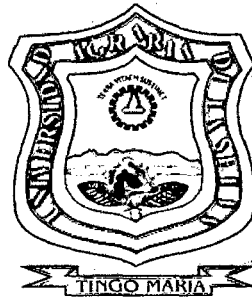


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Departamento Académico de Ciencias Agrarias



**“EFECTO BIOCIDA DE CUATRO EXTRACTOS DE
Paullinia clavigera Schldl. VAR. ‘Bullata’ D.R. SIMPSON
SOBRE TRES ARTRÓPODOS EN PUCALLPA”**

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Harvey Pacífico Pinedo Arévalo

PROMOCIÓN 2004 – II

Tingo María – Perú

2008

H10

P59

Pinedo Arévalo, Harvey P.

Efecto Biocida de Cuatro Extractos de Paullinia clavigera Schldl. VAR. 'Bullata' D.R. Simpson Sobre tres Antrópodos en Pucallpa. Tingo María, 2008

102 h.; 18 cuadros; 13 fgrs.; 54 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Agrónomo) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Agronomía.

PAULLINA CLAVIGERA SCHLDL / CONTROL - INSECTOS PLAGAS /
EXTRACTO VEGETAL / PLANTAS BIOCIDAS / CULTIVOS / TINGO
MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.

DEDICATORIA

Para mis padres JAIME y LINA, con todo el amor y el cariño de siempre, mi eterno agradecimiento, a quienes con su sacrificio hicieron posible que cumpla mi sueño de ser profesional.

A mis hermanos LUCY, PEDRO, JAIME y sus familias por todo el apoyo económico y moral.

A mis hijas KATIUSKA y LUCY, y a mi esposa PIERINA con mucho amor y cariño.

A la familia RAMÍREZ PANDURO, por el calor familiar, apoyo, amistad y orientación.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de la presente tesis se llevó a cabo gracias al apoyo del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IAAP- sede Ucayali), sin embargo no hubiese podido desarrollarse sin el apoyo del grupo humano, a los cuales hago una mención especial de agradecimiento:

- Al Dr. Dennis del Castillo Torres, Presidente del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; al Ing. Roger Beuzeville Zumaeta, Gerente general del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, ambas personas que desde su lugar y cargo velan y dirigen esta importante Institución en nuestra Amazonía.
- Al Dr. Luís Campos Baca, Director del Programa Biodiversidad, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.
- Al Ing. Fausto Hinojosa Maita, Gerente del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - sede Ucayali y a todo el personal Administrativo y operativo de esta institución por su participación en el momento oportuno.
- A mi Co-asesora e Investigadora del Programa de Biodiversidad, Ing. Diana Pérez Dávila, mi reconocimiento por las facilidades brindadas.

A los Docentes de la Facultad de Agronomía, en especial a mi asesor Blgo. M. Sc. José Luis Gil Bacilio; todos ellos representando a la Universidad Nacional Agraria de la Selva, gracias, por impartirme sus conocimientos técnicos, científicos y éticos durante mi formación profesional.

Al Dr. José Iannacone Oliver, Jefe del Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal, por el asesoramiento en el desarrollo de los bioensayos.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1. Plantas plaguicidas	13
2.2. Bioensayos con extractos vegetales	14
2.3. Importancia de los recursos botánicos con potencial biocida	17
2.4. Especie vegetal en estudio	19
2.5. Extractos vegetales	22
2.6. Metabolitos secundarios.....	23
2.7. Material biológico en estudio	24
2.8. Palabras claves	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Ubicación de experimento	28
3.2. Componentes en estudio	29
3.3. Metodología experimental	31
3.4. Tratamientos en estudio.....	43
3.5. Diseño experimental	45
3.6. Variables independientes	49
3.7. Variables dependientes	49
3.8. Datos registrados	50
3.9. Datos observados	50
3.10 Análisis fitoquímico	50

IV. RESULTADOS	53
4.1. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀) sobre larvas del III estadio de <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.	53
4.2. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀) sobre larvas del II estadio de <i>Eupalamides cyparissius</i> F.....	64
4.3. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀). sobre nauplios del II estadio de <i>Artemia salina</i> K.	75
4.4. Análisis fitoquímico	82
V. DISCUSIÓN	83
VI. CONCLUSIONES	88
VII. RECOMENDACIONES	90
VIII. RESUMEN	91
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	93
X. ANEXO	102

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
01. Tratamientos en estudio	44
02. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de <i>R. palmarum</i> L.	46
03. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de <i>E. cyparissias</i> F.	47
04. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de <i>Artemia salina</i> K.	48
05. Efecto biocida de <i>P. clavigera</i> en la mortalidad de larvas del III estadio de <i>R. palmarum</i> a diferentes horas de evaluación.	54
06. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>R. palmarum</i> , después de 12 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	55
07. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>R. palmarum</i> , después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	57
08. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>R. palmarum</i> , después de 48 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	59
09. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>R. palmarum</i> , después de 72 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	61

10. Efecto biocida de <i>P. clavigera</i> en la mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissius</i> a diferentes horas de evaluación	65
11. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>E. cyparissius</i> , después de 12 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	66
12. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>E. cyparissius</i> , después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	68
13. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>E. cyparissius</i> , después de 48 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	70
14. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>E. cyparissius</i> , después de 72 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	72
15. Efecto biocida de <i>P. clavigera</i> en la mortalidad de nauplios del II estadio de <i>Artemia salina</i> a diferentes horas de evaluación	76
16. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>Artemia salina</i> , después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	77
17. Análisis de varianza en la mortalidad de <i>Artemia salina</i> , después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i> (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$)	79
18. Características fitoquímicas de los diferentes tipos de extractos de <i>Paullinia clavigera</i> Var. 'Bullata' D.R. Simpsons.	82

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
01. Porcentaje de mortalidad de <i>R. palmarum</i> a 12 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	56
02. Porcentaje de mortalidad de <i>R. palmarum</i> a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	58
03. Porcentaje de mortalidad de <i>R. palmarum</i> a 48 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	60
04. Porcentaje de mortalidad de larvas del III estadio de <i>R. palmarum</i> a 72 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	62
05. Comportamiento de mortalidad de larvas del III estadio de <i>R. palmarum</i> frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i>	63
06. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissius</i> a 12 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	67
07. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissius</i> a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de	

extractos de <i>P. clavigera</i>	69
08. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissias</i> a 48 horas después de la aplicación de los diferentes tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	71
09. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissias</i> a 72 horas después de la aplicación de los diferentes tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	73
10. Comportamiento de mortalidad de larvas del II estadio de <i>E. cyparissias</i> frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i>	74
11. Porcentaje de mortalidad de nauplios del II estadio de <i>Artemia salina</i> a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	78
12. Porcentaje de mortalidad de nauplios del II estadio de <i>Artemia salina</i> a 48 horas después de la aplicación de los diferentes tipos de extractos de <i>P. clavigera</i>	80
13. Comportamiento de mortalidad de nauplios del II estadio de <i>Artemia salina</i> frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de <i>P. clavigera</i>	81

I. INTRODUCCION

En la actualidad, se requiere obtener productos de baja toxicidad y de menor costo mediante el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, por lo que es urgente contar con tecnologías alternativas en el control de insectos plagas, y excluir proporcionalmente el uso de agroquímicos que contaminan el ambiente.

En nuestra amazonía, la región Ucayali cuenta con una enorme biodiversidad de especies vegetales que, entre otros usos, pueden ser utilizados como biocidas; sin embargo es muy limitado el conocimiento científico, ya que estos en su mayoría aún no han sido validados.

El conocimiento del potencial agroecológico y de control de agentes que causan perjuicio a los cultivos objetos de la producción, permitirá contribuir de manera sostenible en la productividad del agroecosistema. Los estudios de investigación básica que se vienen desarrollando están orientados al conocimiento y desarrollo del potencial de los recursos de la diversidad biológica, la misma que contribuirá en el desarrollo socioeconómico de las comunidades amazónicas.

El presente estudio está orientado a la generación de conocimientos que nos conduzcan al control de insectos plagas, tomando como alternativa el uso de recursos botánicos con propiedades biocidas; investigaciones anteriores

demonstraron que la corteza de *Paullinia clavigera* Schldl. Var. Bullata D.R. Simpson por decocción posee efecto biocida, siendo utilizados como organismos de prueba el tercer estadio larval de *Rhynchophorus palmarum* L. así como el segundo estadio larval de *Eupalamides cyparissius* F. (VELA, 2003).

De lo anterior mencionado, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo fue:

- a. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de cuatro extractos (hexánico, clorofórmico, hidroalcohólico y decocción acuosa) de *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Eupalamides cyparissius* Fabricius (Castniidae), *Rhynchophorus palmarum* L. (Curculionidae) y *Artemia salina* Kellog. (Artemiidae) mediante bioensayos en laboratorio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas plaguicidas

Las plantas plaguicidas han cobrado interés por ser un método natural y de menor costo para el control de plagas en cultivos de hortalizas, granos, frutas y otros. Además, se menciona que contribuyen a mantener el equilibrio ecológico sin afectar drásticamente el desarrollo, cambio y evolución de la naturaleza (VICENTE *et al.*, 2000). ESTRADA y LÓPEZ (1998) hacen referencia que la RAAA (Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos), desde sus inicios consideró a los recursos botánicos con propiedades biocidas como una alternativa importante para prevenir y controlar las diversas plagas en los cultivos, promocionar y desarrollar acciones orientadas a dar validez de estos conocimientos hacia el campesinado.

Las plantas usadas por sus efectos plaguicidas pueden actuar mediante acción repelente, fagorrepelente, veneno de contacto, veneno estomacal y otras formas; algunos compuestos vegetales tienen efectos esterilizantes, interfieren con la oviposición o impiden el desarrollo de las larvas; otras son atrayentes; se siembran alternando con los cultivos que se desea proteger, al alterar a las plagas mantienen libres a los demás cultivos; debemos aprovechar los recursos disponibles pero conociendo sus propiedades, usos y aplicaciones (PASCUAL - VILLALOBOS 1996; VICENTE *et al.*, 2000).

Los plaguicidas vegetales pierden su efecto pronto, por lo que deben aplicarse en el momento de su preparación; su efecto y el contenido de los ingredientes activos dependen de factores como la especie y variedad de la planta, época de recolección, influencia del ambiente (clima, suelo, enfermedades), parte cosechada, forma de preparación, extracción y aplicación; comúnmente no se conoce el modo exacto de aplicación de los plaguicidas vegetales, razón por la que debe mantenerse en experimentación constante, recopilar y anotar todos los datos y resultados obtenidos e intercambio de información con otros usuarios de la agricultura orgánica (VICENTE *et al.*, 2000).

2.2. Bioensayos con extractos vegetales

BOBADILLA *et al.* (2002), sostienen que utilizando los extractos etanólicos de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (E₁) y *A. muricata* M. (E₂) en larvas de *Anopheles* sp., encontraron los mayores porcentajes de mortalidad (100%), a 24 h de exposición en concentraciones de 0,8 y 0,12 mL 100 mL⁻¹ en E₁ y E₂, respectivamente, observándose un mayor efecto tóxico larvario a favor de E₂ sobre E₁ en 4,58% de mortalidad. Asimismo, el análisis probit mostró un patrón de respuesta heterogénea de las larvas a las concentraciones letales (CL₅₀) al 50 y 90% a lo largo de todos los tiempos de evaluación y una mayor homogeneidad a los tiempos letales (TL₅₀) al 50 y 90% a medida que se incrementaban las concentraciones de los extractos; concluyendo por la forma de las rectas de regresión que los individuos larvarios presentan diferentes

susceptibilidades a los extractos, lo que establece diferentes poblaciones o genotipos que intervienen. Agregan que el trabajo les permitió demostrar el efecto larvívica de ambas semillas y subrayan la necesidad de realizar mayores ensayos *in vitro* como alternativa al control de estos insectos de importancia en salud pública.

MARIÑOS *et al.* (2002), al utilizar el extracto crudo de barbasco *Lonchocarpus utilis* (Fabaceae) como regulador de larvas de mosquitos de *Anopheles benarrochi*, obtuvieron 98 y 89% de mortalidad larvaria al utilizar agua destilada a 12 horas de evaluación post tratamiento en dosis de 6,25 g L⁻¹ y 3,1 g L⁻¹; mientras que al utilizar agua de criadero la mortalidad fue de 86 y 82%, respectivamente; a 24 horas la mortalidad alcanzó el 99 y 94% usando agua destilada; y usando agua de criadero fue 93 y 90% respectivamente. A 6 horas de exposición con agua destilada, la dosis letal media (DL₅₀) fue de 0,6307g L⁻¹ y la dosis letal noventa (DL₉₀) fue de 12,43 g L⁻¹; mientras que a las 12 horas la DL₅₀ fue de 0,48 g L⁻¹ y la DL₉₀ fue de 7,23 g L⁻¹; utilizando agua de criadero a 6 horas la DL₅₀ fue de 1,36 g L⁻¹ y la DL₉₀ fue de 27,5 g L⁻¹; mientras que a 12 horas la DL₅₀ fue de 0,83 g L⁻¹ y la DL₉₀ fue de 9,83 g L⁻¹ del extracto crudo de *L. utilis*, recomendándose su uso para controlar los mosquitos vectores de malaria.

IANNACONE *et al.* (2002a), determinaron la actividad insecticida del ingrediente activo de *Azadirachta indica* ("nim"), del extracto acuoso (F1),

hexánico (F2) y acetónico (F3) al 10% de *Schinus molle* ("molle"), y del extracto acuoso al 10% de *Lantana camara* ("lantana"), evaluados a 24 y 72 horas sobre larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, y encontraron alta actividad larvicida a partir de 3,75 mg L⁻¹. Asimismo, los valores de CL₅₀ para el "nim" a 24, 48 y 72 horas de exposición fueron 20,48; 3,57; y 1,32 mg IA L⁻¹; por su parte, los extractos F₁ del "molle" y la "lantana" mostraron poca actividad larvicida; en cambio las F₂ y F₃ del "molle" ocasionaron altas mortalidades larvales, 85 y 100%, respectivamente. Además, se empleó como control positivo al insecticida órgano fosforado Temephos y puntualizan que los extractos botánicos muestran resultados promisorios para el control larvario de culícidos. Sin embargo, recomiendan realizar evaluaciones del riesgo en el ambiente acuático sobre la fauna no destinataria, antes del empleo indiscriminado de estos extractos botánicos.

VELA (2003), utilizando diez extractos acuosos sobre *Eupalamides cyparissius* (= *Castnia daedalus*) y *R. palmarum*, plagas de palma aceitera y pijuayo para palmito, respectivamente, obtuvieron los mayores resultados con el extracto de corteza de *P. clavigera* por decocción y el extracto licuado de *Bixa orellana* L. "achiote" (Bixaceae) ambos con 63,30% de mortalidad de larvas de *E. cyparissius*; mientras que para el caso de *R. palmarum* los extractos de *Aristolochia pilosa* Kunth "huancahui sachá" (Aristolochiaceae), *Tradescantia zebrina* "oreja de tigre" (Commelinaceae) y *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav. "curaré" (Menispermaceae) obtuvieron las mayores mortalidades larvares, con 73,30; 70 y 60% respectivamente.

2.3. Importancia de los recursos botánicos con potencial biocida

Los plaguicidas fueron escasos hasta 1945, éstos eran principalmente sales metálicas y productos naturales extraídos de ciertas plantas, dentro de este último grupo estuvieron el quasin, la nicotina, las piretrinas, rianodina y la rotenona (DALE, 1994).

BRIONES (1991), menciona que los insecticidas botánicos en el Perú fueron usados en gran amplitud hasta el término de la Segunda Guerra Mundial, luego fueron desplazados por los plaguicidas clorados, la principal sustancia utilizada, proveniente de una planta con uso insecticida fue el sulfato de nicotina extraída del "tabaco", cuyo empleo abarcó un gran número de plagas agrícolas importantes; después se tenía a la rotenona proveniente del "barbasco", la piretrina proveniente del "piretro"; sin embargo los agricultores de las diversas regiones tanto costa, sierra y selva, han utilizado y utilizan en la actualidad una amplia gama de plantas biocidas y repelentes, por ejemplo el empleo de extractos de "penca" *Agave sp.*, para el control de insectos masticadores en el cultivo de papa en la sierra; el macerado de hojas y flores del "laurel rosa" *Nerium oleander* (Lauraceae), es todavía usado para el control de plagas en el cultivo de maíz en costa y sierra norte.

Los intentos dirigidos a la investigación y aplicación de productos vegetales están caracterizados por dos ejes fundamentales: primero, la experimentación empírica de recursos botánicos, preparados y evaluados de

manera artesanal; segundo, el estudio científico de las sustancias secundarias de plantas cultivadas que forman parte de los compuestos pre formados e inducidos, ambos métodos han logrado la identificación de una serie de especies y variedades botánicas, que pueden servir como punto de partida para la investigación (HOSS, 1999).

La utilización de las plantas con propiedades biocidas es un instrumento tecnológico importante dentro del manejo ecológico de plagas, la existencia de más de 300 especies inventariadas en el Perú entre nativas e importadas son potencialmente útiles para ser usadas con fines de manejo de poblaciones de insectos plagas (DALE, 1994).

Para la selección de las especies vegetales, una de las primeras actividades es la recopilación de referencias bibliográficas de los vegetales empleados en el control de plagas local e internacional. Además es prometedor consultar literatura etnobotánica y de medicina popular (HELLPAP, 2000; KHAMBAY, 2000).

IANNACONE (2001), ha señalado que para el desarrollo tecnológico de un plaguicida botánico se necesita estandarizar sus métodos de extracción, la extensión y la propagación de las plantas candidatas. Sin embargo, la selección de la especie de planta es el primer paso, pues uno de los métodos claves en la investigación de nuevos plaguicidas botánicos son los bioensayos. Estos bioensayos se emplean generalmente para estudiar las propiedades

biocidas de las diferentes partes de las plantas (raíces, corteza, hojas, frutos, flores, etc.), la eficacia de los diferentes extractos y formulaciones, y el modo de acción de los ingredientes activos; e inclusive un posterior análisis de mercado. Los bioensayos deben ser altamente sensitivos a las sustancias bioactivas, fáciles de manipular, baratos, de amplio espectro y dar rápidos resultados (IANNACONE, 2000).

2.4. Especie vegetal en estudio

Nombre científico : *Paullinia clavigera* Schldl. Var. 'Bullata' D.R.
Simpson.

Nombre vulgar : "Sacha yoco".

Familia : Sapindaceae.

Es una liana endémica semileñosa con tallo triangular de 16 m de alto, fruto de color vino-rojo, se encuentra formando parte del bosque primario y en las riberas de los ecosistemas acuáticos; se desarrolla en zonas con climas tropicales de moderada a alta humedad relativa, se le encuentra en suelos arcillosos, terrazas altas y es tolerante a suelos con baja fertilidad; se le reporta como un etnobiocida ya que la raíz y corteza se utiliza como veneno para la pesca; además de ictiotóxico presenta bioactividad antifúngica y molusquicida. Su toxicidad se observó en las saponinas aisladas; asimismo se menciona la presencia de triterpenos, β -sitosterol y de aceites etéreos, atribuyéndoles a los primeros la actividad ictiotóxica (HENRY *et al.*, 1995).

Existen registros para las principales características fitoquímicas semicualitativas para nueve componentes de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de corteza de *P. clavigera*, para el caso del extracto hexánico, esta especie presentó reacciones positivas para los triterpenos; en extracto clorofórmico, las cumarinas presentaron reacciones positivas; en extracto hidroalcohólico presentó reacción muy positiva para las saponinas, reacción positiva para los fenoles, flavonoides y quinonas (IANNACONE y PEREZ, 2006).

Se han aislado cumarinas, fenoles, flavonoides y triterpenos al cual se le atribuye actividad ictiotóxica (TEXEIRA *et al.* 1984); así como actividad antifúngica y molusquicida en las saponinas aisladas (EKABO *et al.*, 1996). SCHULTES y RAFFAUF (1990) mencionan la presencia de triterpenos, de β -sitosterol y de aceites etéricos en esta especie y determinaron que los primeros serían los responsables de la actividad ictiotóxica.

En cuanto a sus características botánicas, presenta tallos aristados con 3-6 lobulados, ramitas aristadas, puberulas; hojas pinnadas; folíolos ovado-elípticos, aserrados o subenteros, haz glabra, envés pubérulo; venas secundarias arqueadas, venación reticulada; caquis alado; estipulas lanceoladas a lanceolar-subaladas, obovadas, hasta 20 x 25 mm y estípites de 3 mm de largo (VILCAPOMA, 2000).

Los datos ecológicos reportan que es una liana endémica de la Amazonía, las poblaciones naturales se ubican en ecosistemas de altura formando parte del bosque primario y/o residuales, en planicie inundable, orilla de los ríos y en tierra firme de bosque primario; requieren de poca luminosidad, de moderada a alta humedad relativa, altitudes de 0 a 2000 msnm, prefieren suelos arcillosos y es tolerante a suelos con baja fertilidad. BRAKO y ZARUCCHI (1996), indican que esta familia también se encuentra distribuída en los departamentos de Junín, Loreto, San Martín, Ucayali.

Los usos etnobotánicos son varios, la raíz y corteza se utiliza como veneno para la pesca (ictiotóxico); presenta actividad antifúngica y molusquicida. En la Amazonía Peruana se utiliza la infusión de la corteza y la raíz en lavados de micosis y heridas cutáneas; también puede tomarse vía oral previo macerado en aguardiente (VELA, 2003).

La saponina timbonina es ictiotóxica, lo que puede explicar su uso tradicional; se reporta actividad estimulante del sistema nervioso central (SATO *et al.*, 1984), inhibición de la actividad de hiauronidasa en semillas (VINCENT *et al.*, 1954) y actividad citotóxica en líneas celulares CA mamaria micro alveolar (SATO *et al.*, 1989).

En cuanto a su bioactividad, es ictiotóxico, antifúngica y moluscicida. La toxicidad se ha observado en las saponinas aisladas. Asimismo, se mencionan la presencia de triterpenos, de β -sitosterol y de aceites etéreos, atribuyéndoles

a los primeros la actividad ictiotóxica. La propagación de esta especie se realiza por semilla botánica y estacas (VELA, 2003).

2.5. Extractos vegetales

Como primer representante dentro de los extractos vegetales se tiene al principio activo rotenona, el cual se acumula en las raíces de *Lonchocarpus nicou* y se utiliza para combatir áfidos, orugas, larvas de moscas y ácaros, siendo su forma de acción a nivel respiratorio, disminuyendo el oxígeno. Posteriormente tenemos a la piretrina que es un insecticida de contacto, que se obtiene de las cabezas florales de una especie conocida como *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae); en especial actúa sobre insectos voladores por su acción de "derribo" (unos cuantos seg.), baja toxicidad para mamíferos, muy inestables a la luz y al aire, y con acción primaria sobre el sistema nervioso, debido a que en algunos estudios histológicos ha revelado una desorganización extensiva del sistema nervioso, y una mayor acción a temperaturas negativas (son más potentes a temperaturas más bajas) (CREMLYN, 1995).

HOSS (1999), cita algunas dificultades fundamentales para la extracción de sustancias naturales entre las cuales se puede mencionar que los compuestos secundarios tienen variadas características: la polaridad de los analitos (sustancias activas a investigar en el tejido vegetal) frente a otras sustancias no investigadas con altas concentraciones en el tejido vegetal,

dificultan el análisis de las primeras; las sustancias investigadas tienen que pasar por membranas lipídicas para suspenderse en el solvente extractor; los compuestos aislados pueden ser destruidos o modificados por factores físicos (temperatura) y/o químicos (solventes) durante el proceso de extracción.

NOVO *et al.* (1997) citan a Ikan (1969), quien menciona el uso de solventes de polaridad creciente como el agua y el alcohol para la extracción de los compuestos secundarios sin alteración química; sin embargo se pueden realizar estudios de mayor especificidad conociendo la importancia y la composición del recurso, utilizando técnicas de extracción con solventes orgánicos que eviten la desnaturalización por efectos químicos.

Uno de los métodos más simples y prácticos de extracción para componentes activos de plantas con propiedades biocidas es la maceración, como un método de extracción de productos sin alteración alguna, para lo cual se deja en reposo las partes trituradas de la planta en un periodo entre 3 – 7 días (BOBADILLA *et al.*, 2002).

2.6. Metabolitos secundarios

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus

funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc) y ataque de organismos (ADZET *et al.*, 1987).

BOURGAUD *et al.* (2001), mencionan que los metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies vegetales y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competición entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta al daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbioses.

2.7. Material biológico en estudio

2.7.1. *Eupalamides cyparissius* Fabricius

Pertenece a la familia Castnidae, orden Lepidoptera, conocido comúnmente como "barrenador del racimo y el estipe de palmeras" y registrado inicialmente como *Castnia daedalus* Cramer; la duración del ciclo de desarrollo es de 314 días, las cuales corresponden 233 días del estado larval, el adulto es de hábito ambulatorio vespertino, la hembra suele poner 200 a 500 huevos, durante 12 días y suelen ser depositados en forma individual sobre la zona

inferior del paquete de flechas, sobre racimos verdes y el estipe (SCHUILING y VAN DINTHER, 1980).

RENGIFO (1999) hace mención a Vera (1974), quien detectó por primera vez esta plaga en plantaciones de Tocache - Perú cuando se inicia las primeras cosechas de racimos; así mismo refiere que el daño es significativo, aun más si la larva afecta las inflorescencias o racimos en floración repercutiendo en la reducción del tamaño y peso de los racimos, cuando afecta los racimos formados o maduros, provoca la pudrición total o parcial de los frutos.

2.7.2. *Rhynchophorus palmarum* Linneo

Pertenece a la familia Curculionidae, orden Coleoptera, conocido comúnmente como "suri de las palmeras"; la hembra se diferencia del macho, por tener un mayor tamaño, mientras que los machos tienen el cuerpo cubierto de espinillas; en cuanto al ciclo biológico se determina que los huevos eclosionan entre dos a tres días, el estado larval dura alrededor de 37 días (nueve estadios larvales), pasando al empupamiento por 20 días; los adultos permanecen en el capullo por cinco a siete días adicionalmente (MEXZÓN, 1994).

Los daños son ocasionados por el estado larval, el adulto ovíparita aprovechando las heridas generadas por las labores culturales, como poda y cosecha en caso del pijuayo para palmito, atacando en esta especie al

rizoma de la planta; en otras palmeras forma galerías en el tronco y en el pecíolo de las hojas (VELA, 2003).

2.7.3. *Artemia salina* Kellog

Este micro crustáceo (Anostraca: Artemiidae) es conocido también como “camarón salino”. Es utilizado para pruebas ecotoxicológicas (bioindicadores) por existir una amplia disponibilidad de material biológico y por presentar buena factibilidad del cultivo. Además, es de bajo costo en cuanto a su obtención, para ser aplicado en la experimentación. Finalmente, son de fácil evaluación, manipulación y lectura (IANNACONE *et al.*, 2002b).

Es la especie de artrópodo más usado en bioensayos fitoquímicos, para detección de sustancias bioactivas, debido a su amplia distribución geográfica; su ciclo biológico es bien conocido, es de fácil manejo en el laboratorio y su cultivo es relativamente sencillo y barato (MACHERA *et al.*, 1996; HLYWKA, 1997; DE LOS RÍOS y GAJARDO, 2004, GAJARDO *et al.*, 2004, CUADRA *et al.*, 2005).

2.8. Palabras claves

Efecto “biocida”: Este término abarca dentro del contexto de Manejo Integrado de Plagas al efecto que causan las plantas sobre los insectos, pudiendo considerarse los efectos tóxicos de repelencia olfativa, repelencia fagodisuasiva, inhibidores de alimentación, los mímicos de las hormonas juveniles y de la muda (PASCUAL – VILLALOBOS, 1996).

Extracto vegetal: Es el producto final de todo proceso de extracción de material vegetal ya sea por diferentes métodos químicos, físicos y convencionales (HOSS, 1999).

Plantas biocidas: PASCUAL - VILLALOBOS (1996) hace mención, que son aquellos recursos botánicos que tienen facultades de causar la mortalidad o tener efecto represivo sobre determinadas plagas y enfermedades. Además, EVANS y RAFFAUT (1990), adicionan a aquellas plantas que suelen tener efectos tóxicos en los organismos vivos.

Principio activo: Según HOSS (1999), son sustancias naturales que se forman de la biosíntesis de los metabolitos primarios, son llamados también metabolitos secundarios, se pueden conceptualizar de acuerdo al grupo químico o en forma específica según el compuesto.

Extracción por decocción: Es un método de extracción en la que se hace hervir la materia prima generalmente entera con el solvente extractor (agua, alcohol, mezclas, etc.) en recipientes no herméticos, durante un tiempo no muy prolongado (15', 25', 45', 1 h) (BONILLA, 1993).

Concentración letal media (CL₅₀): Es el grado de toxicidad de un insecticida contra una población de insectos, se expresa como "Dosis Letal Media" (DL₅₀) o "Concentración Letal Media" (CL₅₀); esto es la cantidad de insecticida requerida para causar la muerte del 50% de un grupo representativo de insectos (CALDERÓN, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

3.1.1 Ubicación y duración del estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Entomología del Programa de Biodiversidad en la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP - sede Ucayali), ubicado en el Km 12,40 de la carretera Federico Basadre (Pucallpa-Aguaytía), distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali; localizado geográficamente a 8°22'13" Sur y 74°34'23" Oeste y a una altitud de 154 msnm, donde se realizó el confinamiento y crianza de los insectos en estudio, así como la preparación, aplicación y evaluación del efecto de los extractos acuosos. La presente investigación tuvo una duración de doce meses (abril 2005 - abril 2006).

3.1.2 Características climáticas

Según la clasificación de Holdrige, la zona corresponde a la formación ecológica de Bosque Húmedo Tropical y Bosque Muy Húmedo Premontano Tropical. La temperatura media anual es de 25,42°C, junto con una precipitación promedio anual de 1773,44 mm y una humedad relativa de 84,47% (POLO y MUÑOZ, 1982).

3.2 Componentes en estudio

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron cuatro tipos de extractos de *Paullinia clavigera* var. 'Bullata': Extracto acuoso (decocción, fue preparado el día de la ejecución del bioensayo), hidroalcohólico, hexánico y clorofórmico (estos extractos fueron preparados y conservados por el laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - Iquitos).

3.2.2 Material biológico

- *Artemia salina* Kellog (Anostraca: Artemiidae)
- *Eupalamides cyparissius* Fabricius (Lepidoptera: Castniidae)
- *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptera: Curculionidae)

3.2.3 Insumos

- Agua destilada.
- Agua de mar.
- Cloroformo.
- Hexano.
- Alcohol al 96%.
- Hipoclorito de sodio al 5.25% (Lejía Clorox®).

3.2.4 Material alimenticio para los insectos en prueba

- Trozos de palmito.
- Trozos de fibra basal de pijuayo para palmito.
- Trozos de pecíolo de aguaje.
- Raquis de racimos de palma aceitera.
- Frutos tiernos de palma aceitera.

3.2.5 Materiales de campo

- Red entomológica.
- Machete.
- Vernier.
- Cámara fotográfica digital Cannon.
- Plumones indelebles.
- Balde de 5 litros.
- Bolsas de polietileno.
- Cartulina negra y blanca.

3.2.6 Equipos y materiales de laboratorio

- Termo higrómetro.
- Estereoscopio.
- Microscopio.
- Balanza semianalítica OHAUS d: 0,01 g; Rango: 0 - 200 g.
- Cámara fotográfica digital Cannon.
- Placas petri.

- Vasos de precipitación.
- Probetas graduadas.
- Pipetas.
- Pinceles y pinzas entomológicas.
- Peceras.
- Envases para bioensayos de 25 ml.
- Frascos entomológicos, etc.

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Colecta del material biológico

3.3.1.1 *Rhynchophorus palmarum* Linneo

Para *R. palmarum*, se colectaron larvas entre el VI y IX estadio, con la finalidad de obtener ejemplares adultos, aparearlos, obtener posturas y lograr una generación homogénea, dichas larvas se obtuvieron comercialmente ("suri") en el mercado central de la localidad.

3.3.1.2 *Eupalamides cyparissius* Fabricius

La colecta de adultos de *E. cyparissius*, se realizó en plantaciones comerciales de palma aceitera ubicadas en el Km 60 de la carretera Federico Basadre, interior carretera Neshuya - Curimaná, se consideraron estos lugares para la colecta debido a la presencia de estos insectos en dichas plantaciones. El método empleado para la captura del insecto fue el siguiente:

- a. Las capturas se realizaron a partir de las 4:00 pm por ser esta especie de hábito vespertino y por observarse una mayor actividad en las plantaciones a partir de esta hora.
- b. Para la captura se emplearon redes entomológicas y sobres colectores de lepidópteros.
- c. Una vez capturado el insecto se procedió a confinarlos en jaulas de malla plástica de 1 m³, provistas con retazos de tela poliseda en su interior, para que estas pudieran posar, a los que también se les adicionaron gotas de miel.

3.3.1.3 *Artemia salina* Kellog

Mientras que para *Artemia salina*, los quistes (huevos) fueron obtenidos de un acuario procedente del distrito de San Isidro, Lima, Perú. Previo a la recuperación definitiva de los huevos, se realizó su eclosión para evaluar la calidad biológica del lote.

3.3.2 Métodos de crianza de los insectos en prueba

3.3.2.1 Crianza de *Rhynchophorus palmarum* L.

Se obtuvieron comercialmente 105 larvas, que fueron evaluadas y seleccionadas según las consideraciones de clasificación de MEXZÓN *et al.* (1994), quien menciona que el tamaño de la cabeza es un buen indicador del estadio larval, pues este crece un milímetro por cada muda (9 mudas).

Luego de la determinación del estadio larval del material biológico, se acondicionaron las larvas individualmente en envases de polipropileno de un litro para evitar el canibalismo; fueron alimentados con trozos de palmito ($3,5 \text{ g día}^{-1}$) previa desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 0,2%, el proceso de alimentación se manejó asépticamente, para evitar una alta tasa de mortalidad por contaminación; este grupo de larvas fueron evaluadas y alimentadas diariamente observando el número de mudas, hasta que estas estén aptas para ser inducidas al empupamiento.

Las larvas que se encontraban entre el octavo y noveno estadio fueron inducidas al empupamiento utilizando trozos de pecíolo de aguaje de 12 cm para cada larva; las que fueron colodas en envases de plástico de 25 x 15 x 10 cm. donde se colocaron cuatro larvas con sus respectivos pecíolos, también se utilizaron envases de 30 x 25 x 10 cm. donde se acondicionaron seis individuos.

Cuando los adultos iniciaron la emergencia de sus respectivos cocones (estructura auto construida en estado de prepupa) se inició la identificación sexual e individualización en envases de polipropileno de 1 litro cubiertos con doble tela poliseda y ajustadas con ligas; luego se procedió al apareamiento de los adultos, colocándose un macho para cada hembra por un periodo de media hora, evitando así el desgaste biológico, provistos de sustrato fibroso alimenticio (parte basal del pijuayo para palmito); a los dos días

se revisó el sustrato con la finalidad de observar las primeras posturas. Una vez identificadas las posturas se procedió a extraerlas cuidadosamente (con pinzas y estiletes), estas a su vez fueron seleccionadas y acondicionadas en 3 placas petri provistas de discos de papel toalla, se caracterizaron las posturas por su coloración (los que están a punto de eclosionar se tornan más blancos), y se roció agua destilada para mantener la humedad de los huevos.

Diariamente se procedió a revisar las placas petri caracterizadas, retirando aquellas larvas eclosionadas e individualizándolas en envases de 5 x 5 x 3 cm, utilizando como sustrato alimenticio trozos de palmito (1,5 g), el que fue cambiado cada dos días, hasta llegar al III estadio (8 días después de la eclosión de las larvas) para finalmente realizar los bioensayos en laboratorio (adaptado de BARTRA, 1994).

3.3.2.2. Crianza de *Eupalamides cyparissius* Fabr.

La captura de los adultos, tuvo por finalidad obtener posturas (huevos), para realizar la crianza en laboratorio, logrando así una población homogénea y representativa de larvas criadas hasta el segundo estadio (14 estadios larvales); se colectaron sólo hembras ovíparas, en el caso de capturar machos adultos se procedieron a decapitarlos, para contribuir así con el control manual de esta plaga.

Una vez trasladadas las jaulas con el material biológico al laboratorio, las posturas fueron seleccionadas según la coloración de las

mismas (viables de color plomo a morado y, no viables de color lila a rojo) y colocadas en placas petri provistas con discos de papel toalla donde se asperjó agua destilada para conservar la humedad. Una vez seleccionadas se acondicionaron las placas petri en un lugar seguro para que estas pasen al proceso de incubación a temperatura ambiente, y finalmente obtener la etapa larval II (apropiado para realizar las pruebas, estadio más susceptible); las larvas fueron alimentadas con el raquis del racimo de palma aceitera y frutos inmaduros (los verdes y más pequeños), para finalmente realizar los bioensayos en laboratorio.

3.3.2.3 Crianza de *Artemia salina* K.

Esta especie fue cultivada hasta la obtención de los nauplios de II estadio, previo a la recuperación definitiva de los huevos, se realizó su eclosión para evaluar la calidad biológica de nuestro lote (Adaptado de IANNACONE *et al.*, 2002a), empleando tres diferentes modalidades:

- a. En un vaso de precipitación de 50 mL conteniendo agua de mar UV bien oxigenada (por aireación) se adicionaron huevos de *A. salina* K. Se mantuvo bajo luz intensa por 1 hora y luego se llevó a incubación a 25° C durante 24 horas, al término de este tiempo se evaluó el porcentaje de eclosión de los huevos.
- b. En un segundo vaso de precipitación de 50 mL conteniendo agua destilada bien oxigenada se incorporaron huevos de *A. salina*, luego se expuso a luz intensa durante 1 hora, después de este periodo se filtró el

agua para recuperar los huevos y trasladarlos a otro vaso de precipitación conteniendo agua de mar bien oxigenada, finalmente fue llevado a la incubadora a 25° C por 24 horas.

- c. En un tercer vaso de precipitación de 50 mL conteniendo agua destilada se incorporaron huevos de *Artemia* y se expuso a luz intensa por 1 hora, luego se le adicionó lejía Clorox® (5,25%), en proporción 1 parte de lejía por 9 de agua, se agitó continuamente hasta observar el cambio de coloración de los huevos, siendo lavados luego en papel filtro poroso Whatmman # 1. Cuando se observó que más del 50% de los huevos de coloración marrón inicial cambiaron a naranja, se lavaron y se trasladaron a un vaso conteniendo agua de mar con pH = 8, se agregó bicarbonato de sodio y finalmente se llevaron a incubación a 25°C por 24 horas.

3.3.3 Bioensayos con extractos vegetales en laboratorio

Los bioensayos con extractos vegetales comprendieron los procedimientos de preparación, aplicación según el tipo de extracto y finalmente la evaluación de los efectos.

3.3.3.1 Preparación de extractos

En esta investigación la única extracción que se preparó en el laboratorio fue el extracto acuoso por decocción, las demás extracciones (hexánico, clorofórmico y hidroalcohólico) ya estuvieron preparadas y conservadas por el Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - Iquitos.

Para la ejecución de los bioensayos, las diferentes concentraciones de los extractos fueron preparados minutos antes, para el caso del extracto acuoso (decocción) sólo se requirió esperar el enfriado, ya que este fue preparado en caliente.

La preparación y aplicación de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* se mantuvieron en condiciones de luminosidad difusa, asimismo según la duración del experimento se tuvo como promedio $25,32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura y $77.6 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de humedad relativa. Para la preparación de los extractos se siguió el siguiente procedimiento:

- a. **Extracto acuoso (decocción):** La preparación del extracto de *P. clavigera* por decocción se realizó de la siguiente manera:
- **Recolección:** La colecta de *P. clavigera* se realizó en el Banco de Genes de Plantas Medicinales y Biocidas del IIAP sede Ucayali, ubicada en el Km 12,40 de la carretera Federico Basadre.
 - **Secado:** Se secaron las lianas (corteza) directamente al sol, previa segmentación de los mismos.
 - **Molido:** Las lianas secas se trituraron con ayuda de un molino de martillo.
 - **Pesada y medida:** Se pesó 250 g de biomasa de *P. clavigera* en una balanza semianalítica y se midió 2,5 litros de agua destilada, estandarizado a pH 7 con NaOH 1N, en una probeta graduada.

- Decocción: Se introdujo 250 g de *P. clavigera* seca y molida, dentro de un recipiente conteniendo 2,5 litros de agua (proporción 1:10), y se hirvió por espacio de 2 horas en una hornilla eléctrica, hasta obtener 1 litro de solución madre.
- Filtrado: Esta operación se realizó con la ayuda de mallas ú tela poli seda, para separar el jugo ó extracto de los residuos y obtener el material madre.
- Enfriado: Se vertió la decocción en un recipiente de vidrio pirex para el enfriado por espacio de 2 horas.
- Solución madre: Se obtuvo 1 litro de extracto vegetal de *P. clavigera* de color rojo tinto y con olor característico, pero solo se trabajó con 500 mL de la solución madre.
- Preparación de las concentraciones: Se prepararon concentraciones al 100, 75, 50 y 25%, las cuales correspondieron a extraer de la solución madre 125 mL, obteniendo así la concentración al 100%; se agregó 125 mL de agua destilada a la solución madre, se agitó y se extrajo otros 125 mL de la última dilución (75%), se agregó otros 125 mL de agua destilada, se agitó y extrajo 125 mL de la última dilución (50%) y, el mismo proceso se repitió hasta obtener el 25% de la solución. Se utilizó como testigo agua destilada a pH 7.
- Finalmente se tomaron datos de temperatura (°C), conductividad (mV) y pH, de cada una de las concentraciones.

b. Extracto hexánico: La preparación de las concentraciones del extracto hexánico de *P. clavigera* se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó 0,1 g del extracto preparado y conservado por el Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía – UNAP – Iquitos.
- Se procedió a diluir el extracto pesado utilizando como disolvente entre 4 a 16 gotas de hexano, según la temperatura del día de los bioensayos.
- Luego se diluyó en 1 litro de agua destilada estandarizada a pH 7, del cual se utilizó 500 mL como solución madre.
- Se prepararon las concentraciones al 100, 75, 50 y 25%, los cuales correspondieron a extraer de la solución madre 125 mL, obteniendo así la concentración al 100%; se agregó 125 mL de agua destilada a la solución madre, se agitó y se extrajo otros 125 mL de la última dilución (75%), se agregó otros 125 mL de agua destilada, se agitó y extrajo 125 mL de la última dilución (50%) y el mismo proceso se repitió hasta obtener el 25% de la solución. Se utilizaron dos testigos, el testigo alternante (gotas de disolvente utilizado) y testigo absoluto (agua destilada a pH 7).
- Finalmente se tomaron datos de temperatura (°C), conductividad (mV) y pH, de cada una de las concentraciones.

c. Extracto clorofórmico: La preparación de las concentraciones del extracto clorofórmico de *P. clavigera* se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó 0.1 g del extracto preparado y conservado por el Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía – UNAP – Iquitos.
 - Se procedió a diluir el extracto pesado utilizando como disolvente entre 8 a 22 gotas de cloroformo, según la temperatura del día de los bioensayos.
 - Luego se diluyó en 1 litro de agua destilada estandarizada a pH 7, del cual se utilizó 500 mL como solución madre.
 - Se prepararon las concentraciones al 100, 75, 50 y 25%, las cuales correspondieron a extraer de la solución madre 125 mL, obteniendo así la concentración al 100%; se agregó 125 mL de agua destilada a la solución madre, se agitó y se extrajo otros 125 mL de la última dilución (75%), se agregó otros 125mL de agua destilada, se agitó y extrajo 125 mL de la última dilución (50%) y el mismo proceso se repitió hasta obtener el 25% de la solución. Se utilizaron dos testigos, el testigo alternante (gotas de disolvente utilizado) y testigo absoluto (agua destilada a pH 7).
 - Finalmente se tomaron datos de temperatura (°C), conductividad (mV) y pH, de cada una de las concentraciones.
- d. Extracto hidroalcohólico:** La preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* se realizó de la siguiente manera:
- Se pesó 0,1 g del extracto preparado y conservado por el Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía – UNAP – Iquitos.

- Se procedió a diluir el extracto pesado utilizando como disolvente entre 5 a 12 gotas de alcohol, según la temperatura del día de los bioensayos.
- Luego se diluyó en 1 litro de agua destilada estandarizada a pH 7, del cual se utilizó 500 mL como solución madre.
- Se prepararon las concentraciones al 100, 75, 50 y 25%, los cuales correspondieron a extraer de la solución madre 125 mL, obteniendo así la concentración al 100%; se agregó 125 mL de agua destilada a la solución madre, se agitó y se extrajo otros 125 mL de la última dilución (75%), se agregó otros 125 mL de agua destilada, se agitó y extrajo 125 mL de la última dilución (50%) y el mismo proceso hasta obtener el 25% de la solución. Se utilizaron dos testigos, el testigo alternante (gotas de disolvente utilizado) y testigo absoluto (agua destilada a pH 7).
- Finalmente se tomaron datos de temperatura (°C), conductividad (mV) y pH, de cada una de las concentraciones.

3.3.3.2 Aplicación de extractos (bioensayos)

La aplicación de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* se realizó individualmente para cada organismo en prueba, constituyendo un ensayo independiente para *R. palmarum*, *E. cyparissius* y *A. salina*.

Para los dos primeros organismos en prueba (insectos plaga) se embebió el sustrato alimenticio por 30 segundos (trozos de alimento para cada concentración) en cada tipo de extracto, colocando las larvas en los envases de 500 g individualmente, con 10 réplicas por concentración.

Para *R. palmarum* se utilizaron larvas del III estadio, para esto se pesó 3,5 g de trozos de palmito cortadas en forma cúbica, con dimensiones aproximadas de 2,0 cm de largo x 1,5 cm de ancho x 0,5 cm de alto, previamente desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0,02%.

Para el caso de *E. cyparissius*, se utilizaron larvas del II estadio, se pesaron 1,5 g de raquis de racimos de palma aceitera cortadas en forma cúbica, con dimensiones aproximadas de 2,5 cm de largo x 2. cm de ancho x 0,5 cm de alto, previamente desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.02%.

Con respecto al bioindicador *A. salina*, se emplearon nauplios del II estadio, se dejó pasar 18 horas desde la eclosión. A continuación, 10 nauplios del II estadio de *A. salina* fueron llevados a cada uno de los envases de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución para cada una de las cuatro réplicas, las cuales contenían las cinco diferentes concentraciones de los cuatro tipos de extractos de *P. clavigera*.

3.3.3.3 Evaluación de los efectos de los bioensayos

Las evaluaciones se realizaron a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, se registraron las variables: número de individuos muertos, porcentaje de mortalidad, repelencia y sobrevivencia de las larvas después de las 72 horas de aplicación, para el caso de *R. palmarum* y *E. cyparissius*.

A las 24 y 48 horas de exposición, para el caso de *Artemia salina*, se contó el número de nauplios muertos en cada una de las diluciones. Los ensayos fueron considerados válidos cuando la mortalidad no fue mayor al 10%, según el criterio estándar propuesto por CALOW *et al.* (1993).

3.4 Tratamientos en estudio

Los distribución de los tratamientos en estudio se presentan en el Cuadro 1, el cual muestra los tipos de extractos de la especie biocida estudiada con sus diferentes concentraciones, siendo la misma descripción de los tratamientos para los tres artrópodos en prueba.

Cuadro 1. Tratamientos en estudio.

Interacción		Descripción de los tratamientos
Trat.	Código	Tipo de extracto + concentración
1	C1Hi	Extracción hidroalcohólica al 100% de concentración
2	C2Hi	Extracción hidroalcohólica al 75% de concentración
3	C3Hi	Extracción hidroalcohólica al 50% de concentración
4	C4Hi	Extracción hidroalcohólica al 25% de concentración
5	C5HiS	Testigo con solvente (gotas de alcohol)
6	C6HiA	Testigo con agua destilada
7	C1He	Extracción hexánica al 100% de concentración
8	C2He	Extracción hexánica al 75% de concentración
9	C3He	Extracción hexánica al 50% de concentración
10	C4He	Extracción hexánica al 25% de concentración
11	C5HeS	Testigo con solvente (gotas de hexano)
12	C6HeA	Testigo con agua destilada
13	C1Cl	Extracción clorofórmica al 100% de concentración
14	C2Cl	Extracción clorofórmica al 75% de concentración
15	C3Cl	Extracción clorofórmica al 50% de concentración
16	C4Cl	Extracción clorofórmica al 25% de concentración
17	C5ClS	Testigo con solvente (gotas de cloroformo)
18	C6ClA	Testigo con agua destilada
19	C1D	Extracción por decocción al 100% de concentración
20	C2D	Extracción por decocción al 75% de concentración
21	C3D	Extracción por decocción al 50% de concentración
22	C4D	Extracción por decocción al 25% de concentración
23	C5DA	Testigo con agua destilada

3.5 Diseño experimental

Los datos obtenidos fueron evaluados siguiendo los lineamientos del modelo estadístico basado en un Diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA) de 6 x 10, donde se evaluaron cuatro concentraciones mas dos controles (testigo disolvente y testigo absoluto), con diez repeticiones para los tipos de extractos en estudio empleados para *R. palmarum* L. y *E. cyparissius* F.

Para el caso de *A. salina* K. se utilizó el Diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA) de 6 x 4 evaluándose cuatro concentraciones mas dos controles (testigo disolvente y testigo absoluto), con cuatro repeticiones para los tipos de extractos en estudio.

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANVA) de dos vías, previa transformación de los datos a $\sqrt{y+0,5}$. La comparación de promedios se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Los cálculos de la mortalidad corregida se realizó mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando éste sea menor al 20% (CALZADA, 1982). Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete SAS Institute Inc, 1989. Las CL_{50} , así como los valores de las pendientes con sus límites de confianza y valores "chi" cuadrado se determinaron utilizando la EPA Probit Analysis Program. Las condiciones y criterios de aceptabilidad de las pruebas de toxicidad aguda, son las siguientes (adaptado de IANNACONE, 2002a,b).

Cuadro 2. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de *R. palmarum* L.

-
- Tipo de bioensayo: estático.
 - Tiempo de exposición: 1, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h.
 - Temperatura: $29^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - Humedad relativa: 60 - 85 %.
 - pH de solución: 7.
 - Fotoperiodo: 12:12.
 - Tamaño de envase: capacidad de 250 mL.
 - Volumen en la solución / envase: 3.5 g de alimento (palmito de pijuayo) embebido por 30 seg.
 - Edad del organismo: larvas de III estadio.
 - N° de replicas / concentración: 10.
 - N° de concentraciones más testigos (Testigo absoluto y testigo solvente): 6.
 - N° de larvas / concentración: 50 (de cocción) y 60.
 - N° de larvas / envase: 1.
 - N° total de organismos por ensayo: 250.
 - Régimen de alimentación: alimento embebido con extracto una sola vez.
 - Agua control (testigo: destilada.) y de dilución (testigo : solvente)
 - Tiempo de observación en los envases descartables: 10 segundos de observación directa.
 - Respuesta letal: mortalidad (inmovilización de larvas)
 - Criterio de aceptabilidad sugerida: Sobre 80% de sobrevivencia en los controles.
-

Cuadro 3. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de *E. cyparissius* F.

- Tipo de bioensayo: estático.
 - Tiempo de exposición: 1, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h.
 - Temperatura: $29^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - Humedad relativa: 60 - 85 %.
 - pH de solución: 7.
 - Fotoperiodo: 12:12.
 - Tamaño de envase: capacidad de 250 mL.
 - Volumen en la solución / envase: 1,5g de alimento (raquis de racimos de palma aceitera): embebido por 30 seg.
 - Edad del organismo: larvas del II estadio.
 - N° de replicas / concentración: 10.
 - N° de concentraciones más testigos (Testigo absoluto y testigo solvente): 6.
 - N° de larvas / concentración: 50 (de cocción) y 60.
 - N° de larvas / envase: 1.
 - N° total de organismos por ensayo: 250.
 - Régimen de alimentación: alimento embebido con extracto una sola vez.
 - Agua control (testigo: destilada.) y de dilución (testigo : solvente)
 - Tiempo de observación en los envases descartables: 10 segundos de observación directa.
 - Respuesta letal: mortalidad (inmovilización de larvas)
 - Criterio de aceptabilidad sugerida: Sobre 80% de sobrevivencia en los controles.
-

Cuadro 4. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda para el caso de *Artemia salina* K.

- Tipo de bioensayo: estático.
 - Tiempo de exposición: 24, 48 h.
 - Temperatura: $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - Humedad relativa: 60 - 85%.
 - pH de solución: 7.
 - Fotoperiodo: 12:12.
 - Tamaño de envase: capacidad de 5 mL.
 - Volumen en la solución / envase: 2 mL.
 - Edad del organismo: nauplios 24 h de eclosionadas
 - N° de replicas / concentración: 4.
 - N° de concentraciones más testigos (Testigo absoluto y testigo solvente): 6.
 - N° de larvas / concentración: 40.
 - N° de larvas / envase: 10.
 - N° total de organismos por ensayo: 200.
 - Régimen de alimentación: ausente.
 - Agua control (testigo: destilada.) y de dilución (testigo : solvente).
 - Tiempo de observación en los envases descartables: 10 segundos de observación directa.
 - Respuesta letal: mortalidad (inmovilización de la larva).
 - Criterio de aceptabilidad sugerida: Sobre 80% de sobrevivencia en los controles.
-

Si la mortalidad en los testigos o controles es superior al 20% la prueba se desecha y toda la prueba se tendría que repetir; si alcanza una mortalidad menor al 5% la prueba no necesita corrección alguna y, cuando es del orden del 5 al 20% en los testigos, la mortalidad en los expuestos al extracto se corrigió empleando la fórmula de Abbott:

$$\% \text{ mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ mortalidad de expuestos} - \% \text{ mortalidad de testigos} \times 100}{100 - \% \text{ mortalidad de testigos}}$$

(IANNACONE, 2000)

3.6 Variables independientes

Diferentes tipos de extractos de la especie *P. clavigera*:

- Extracción por decocción (acuosa).
- Extracción clorofórmica.
- Extracción hexánica.
- Extracción hidroalcohólica.

3.7 Variables dependientes

- Mortalidad y sobrevivencia de larvas de *R. palmarum* L. (Coleoptera).
- Mortalidad y sobrevivencia de larvas de *E. cyparissius* F. (Lepidoptera).

- Mortalidad y sobrevivencia del micro crustáceo *A. salina* K. (Anostraca).

3.8 Datos registrados

- Temperatura y humedad relativa máxima y mínima en laboratorio, los días de evaluación de los bioensayos.
- Mortalidad de los artrópodos en prueba.
- Sobre vivencia de los artrópodos en prueba.
- Fecha de instalación del experimento.
- Tiempo de duración de cada bioensayo.

3.9 Datos observados

- Número de larvas muertas / tipo de extracto.
- Número de larvas vivas / tipo de extracto.

3.10. Análisis fitoquímico

Con la finalidad de conocer qué metabolitos secundarios pueden estar causando la mortalidad de las larvas expuestas, se enviaron muestras de la especie vegetal en estudio, seca y molida al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía de la UNAP - Iquitos, para realizar el análisis fitoquímico respectivo. Se hicieron pruebas para la identificación de alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenos, taninos, fenoles,

flavonoides, cumarinas y quinonas. Los extractos utilizados fueron por decocción, hexánico, clorofórmico é hidroalcohólico.

Screening fitoquímico

La preparación de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico y el screening fitoquímico de esta especie biocida lo realizaron a partir de 100 g de muestra seca y molida. Posteriormente, extrajeron con hexano (solvente apolar) hasta agotamiento con renovación del solvente cada 48 h, después de eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida se obtuvieron los extractos hexánicos. Al residuo le adicionaron cloroformo (CHCl_3) (solvente medianamente polar) y lo extrajeron hasta agotamiento con renovación del solvente cada 48 h, el solvente fue eliminado hasta sequedad en rotavapor a presión reducida, de esta forma se obtuvieron los extractos clorofórmicos. Finalmente, al residuo le adicionaron etanol-agua (70:30) (solventes polares) 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 (1994) 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.
- ± = Reacción muy poco positiva.
- + = Reacción poco positiva.
- ++ = Reacción positiva.
- +++ = Reacción muy positiva.

De acuerdo al objetivo de la tesis, la identificación de estos métodos se consideran complementarios, ya que todo este procedimiento lo desarrollo el laboratorio en mención.

IV. RESULTADOS

4.1. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) sobre larvas del III estadio de *Rhynchophorus palmarum* L.

Los cuatro tipos de extracción y sus respectivas concentraciones empleadas según el protocolo establecido (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas), no mostraron mortalidad las 8 primeras horas de evaluación en los bioensayos; en esta especie las mortalidades se iniciaron a partir de las 12 horas, donde se observaron respuestas diversas de acuerdo al efecto biocida de las concentraciones en los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (a 12, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación); los datos de mortalidad y la CL₅₀ se muestran en el Cuadro 5. Tal como se observa, el extracto por decocción indica un patrón de efectividad superior comparado con los demás tipos de extractos; por ejemplo, a las 12 y 72 horas, el control del 50% (CL₅₀) de las larvas se logró con 89,53 mg L⁻¹ y 59,15 mg L⁻¹ (Límites de confianza 34,97 – 71,88), respectivamente. En oposición, el extracto hidroalcohólico alcanzó valores de CL₅₀ muy superiores, de 117,42 mg L⁻¹ a las 48 horas y 118,85 mg L⁻¹ a las 72 horas; la ausencia de concentraciones (CL₅₀) en el caso de los extractos clorofórmico y hexánico, no pudieron procesarse adecuadamente por el programa EPA Probit, por no registrar por lo menos tres valores de mortalidad para los cuatro tiempos de evaluación.

Cuadro 5. Efecto biocida de *P. clavigera* en la mortalidad de larvas del III estadio de *R. palmarum* a diferentes horas de evaluación.

TE ¹	Concentración (%)	Tiempo (horas)							
		12 h	Sig.	24 h	Sig.	48 h	Sig.	72 h	Sig.
D	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	10	a	20	a
	50	0	a	10	a	20	a	40	ab
	75	10	a	30	ab	40	ab	80	b
	100	20	a	50	b	70	b	100	b
	CL ₅₀	89,53		92,74		85,95		59,15	
	X ²	0,208		0,552		0,078		0,554	
Hi	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control alcohol	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	0	a
	50	0	a	0	a	0	a	10	a
	75	0	a	10	a	10	a	20	ab
	100	10	a	10	a	30	ab	40	b
	CL ₅₀	-		-		117,42		118,85	
X ²	-		-		0,081		0,596		
Cl	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control clorof.	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	0	a
	50	0	a	0	a	0	a	0	a
	75	0	a	0	a	0	a	0	a
	100	0	a	0	a	0	a	0	a
	CL ₅₀	-		-		-		-	
X ²	-		-		-		-		
He	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control hexano	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	0	a
	50	0	a	0	a	0	a	0	a
	75	0	a	0	a	0	a	0	a
	100	0	a	0	a	0	a	0	a
	CL ₅₀	-		-		-		-	
X ²	-		-		-		-		

¹ Tipo de extracto: D = Decocción, Hi = Hidroalcohólico, Cl = Clorofórmico y He = Hexánico

Sig.= Significancia: promedios en una misma línea vertical seguidos por la misma letra minúscula no difieren significativamente a P= 0,05. Prueba de Tukey (SAS, 1989)

CL₅₀ = Valor de la concentración letal media (CL₅₀) en mg L⁻¹ (peso seco / volumen de solución madre)

X² = Valores Chi cuadrado.

4.1.1 Mortalidad de larvas del III estadio de *R. palmarum* L. según el tiempo de evaluación

4.1.1.1 Mortalidad a las 12 horas

Los resultados de mortalidad a 12 horas después de la aplicación de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* se muestran en el Cuadro 5. Al efectuarse el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos estudiados obteniendo un coeficiente de variabilidad de 3,81% (Cuadro 6). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto por decocción de *P. clavigera* al 100% causó una mortalidad de 20% ($n = 10$ larvas), siendo superior a las demás concentraciones (Apéndice 2, 2.1, a).

Cuadro 6. Análisis de varianza en la mortalidad de *R. palmarum*, después de 12 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,0016177	2,1762	NS
Bloques	5	0,0007434	1,0000	NS
Error	15	0,0007434		
Total	23			

C.V. (%) = 3,81

NS = No significativo

La Figura 1, muestra el inicio de la actividad letal a las 12 horas con el extracto por decocción en las dos primeras concentraciones (100% y 75%), seguidos por el extracto hidroalcohólico con un 10% de mortalidad en 100% de concentración; siendo nula la actividad biocida en los extractos clorofórmico y hexánico.

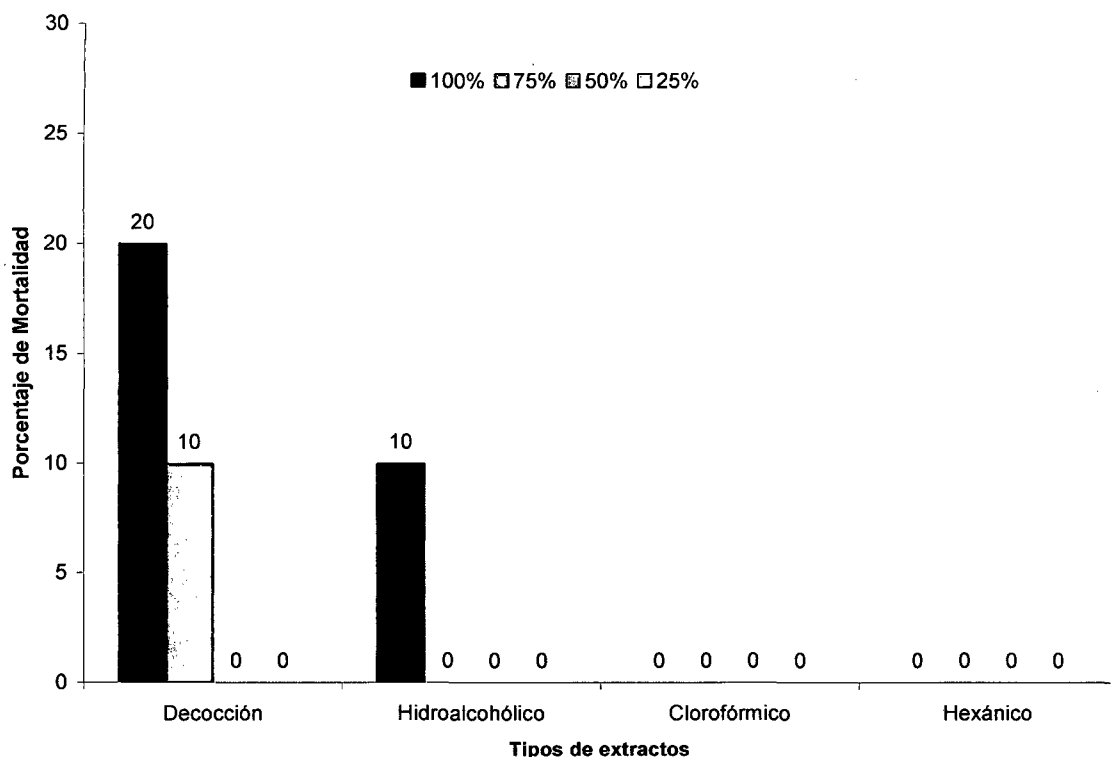


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *R. palmarum* a 12 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.1.1.2 Mortalidad a las 24 horas

Los resultados de mortalidad a las 24 horas de exposición con los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* se muestran en el Cuadro 5. Al efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos estudiados obteniendo un

coeficiente de variabilidad de 3,69% (Cuadro 7). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto de *P. clavigera* por decocción al 100% de concentración causó la mayor mortalidad larvaria (50%), seguido por la concentración al 75 y 50% con mortalidades de 30 y 10% respectivamente (Apéndice 2, 2.1, b).

Cuadro 7. Análisis de varianza en la mortalidad de *R. palmarum*, después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,0026095	0,03624	S
Bloques	5	0,0014781	0,12418	
Error	15	0,0007090		
Total	23			

C.V. (%) = 3,69

S = Significativo

La Figura 2, muestra las mortalidades a 24 horas después de la aplicación de los diferentes tipos de extractos, se observa un doble incremento del extracto por decocción a 100% de concentración y el inicio de la actividad letal del extracto hidroalcohólico, en sus dos primeras concentraciones, continuando sin actividad los extractos clorofórmico y hexánico.

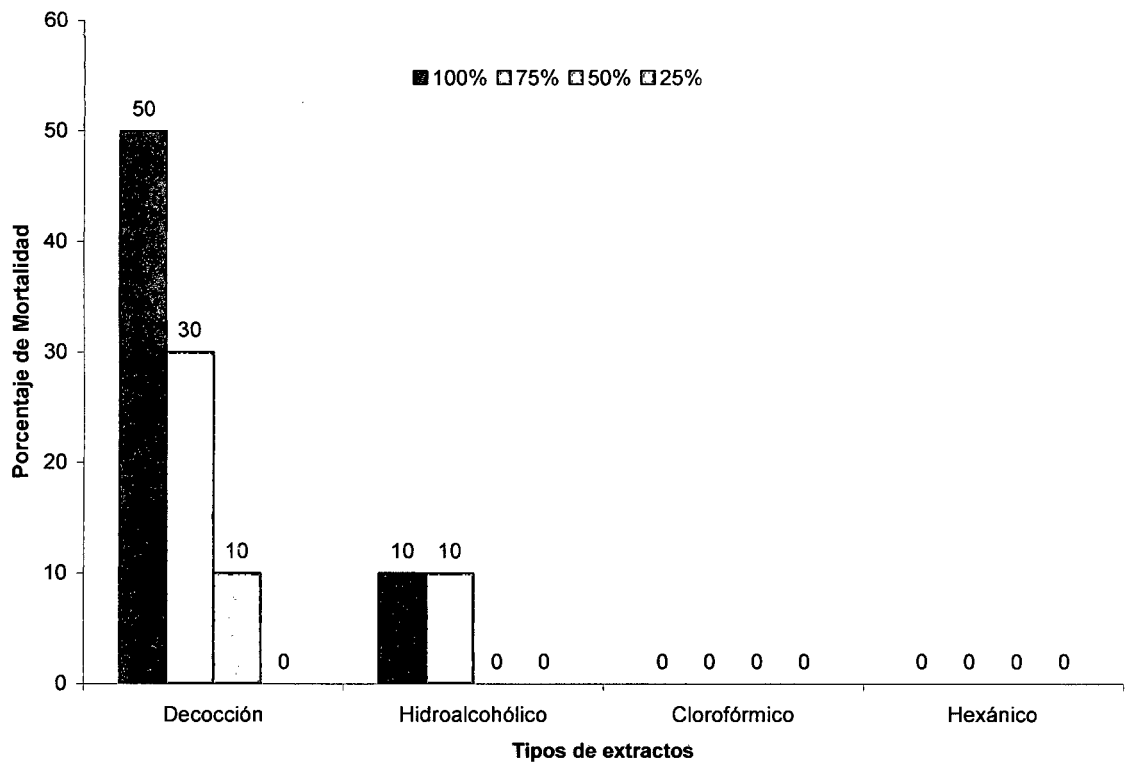


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de *R. palmarum* a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.1.1.3 Mortalidad a las 48 horas

Los resultados de mortalidad a las 48 horas de exposición al efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los bloques estudiados obteniendo un coeficiente de variabilidad de 5,82% (Cuadro 8). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto de *P. clavigera* por decocción al 100% de concentración causó la mayor mortalidad larvaria (70%), seguidos por las concentraciones al 75, 50 y 25% con mortalidades de 40, 20 y 10% respectivamente; el extracto hidroalcohólico inicia su actividad letal en forma

descendente al 100 y 75% con mortalidades de 30 y 10% respectivamente, no existiendo actividad en las demás concentraciones (Apéndice 2, 2.1, c).

Cuadro 8. Análisis de varianza en la mortalidad de *R. palmarum*, después de 48 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr> F	Significancia
Tratamientos	3	0,003832	0,149775	NS
Bloques	5	0,009185	0,007292	AS
Error	15	0,001867		
Total	23	0,085429		

C.V. (%) = 5,82

NS = No significativo

AS = Altamente significativo

La Figura 3, denota que las mortalidades a 48 horas mantienen el mismo comportamiento de toxicidad que el anterior intervalo de evaluación, iniciándose en forma gradual el extracto hidroalcohólico; manteniendo su inactividad los extractos clorofórmico y hexánico.

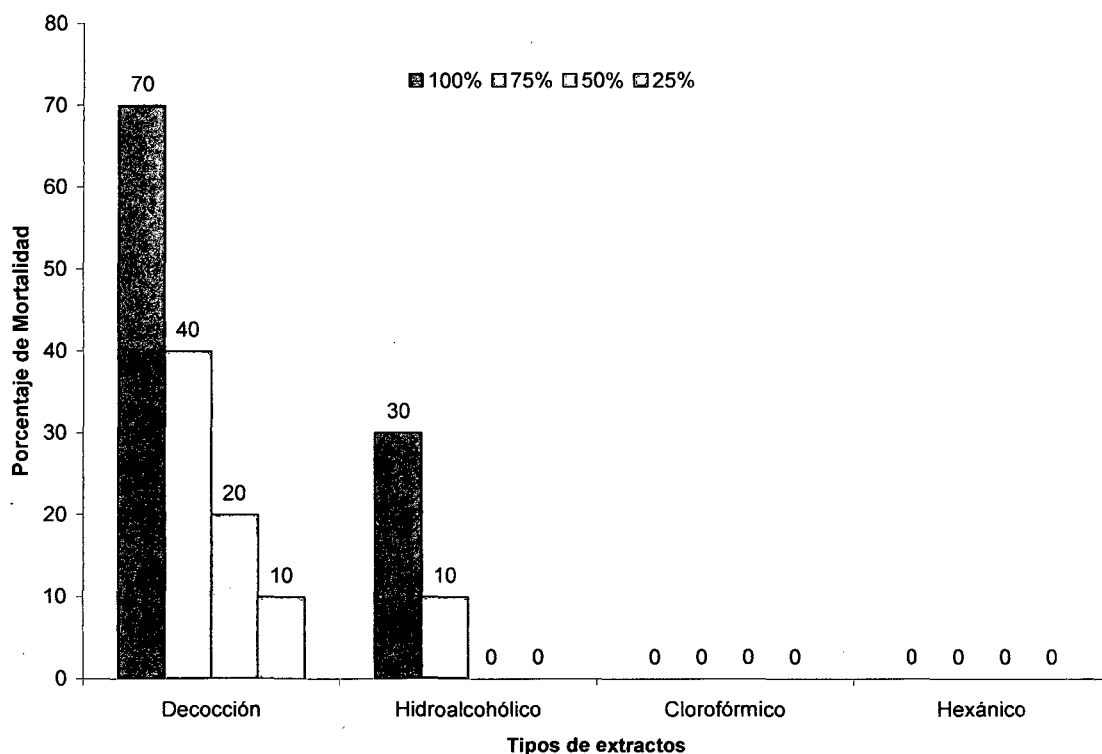


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de *R. palmarum* a 48 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.1.1.4 Mortalidad a las 72 horas

Finalmente, la mortalidad a las 72 horas después de la aplicación, al efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los bloques y tratamientos obteniendo un coeficiente de variabilidad de 8,69%, mostrando una alta significación entre bloques (Cuadro 9). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto de *P. clavigera* por decocción al 100% de concentración causó la máxima mortalidad larvaria, seguidos por las concentraciones al 75, 50 y 25% con mortalidades de 80, 40 y 20% respectivamente; el extracto hidroalcohólico incrementó su toxicidad letal en forma descendente al 100 y

75% con mortalidades de 40 y 20% respectivamente; los extractos clorofórmicos y hexánicos no mostraron ninguna actividad letal hasta el final de la evaluación con esta especie (Apéndice 2, 2.1, d).

Cuadro 9. Análisis de varianza en la mortalidad de *R. palmarum*, después de 72 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,02733	0,011430	S
Bloques	5	0,08545	0,000013	AS
Error	15	0,00523		
Total	23			

C.V. (%) = 8,69

S = Significativo

AS = Altamente significativo

La Figura 4, denota que las mortalidades a 72 horas mantienen el mismo comportamiento de toxicidad que el anterior intervalo de evaluación, iniciándose en forma gradual el extracto hidroalcohólico; manteniendo su inactividad los extractos clorofórmico y hexánico.

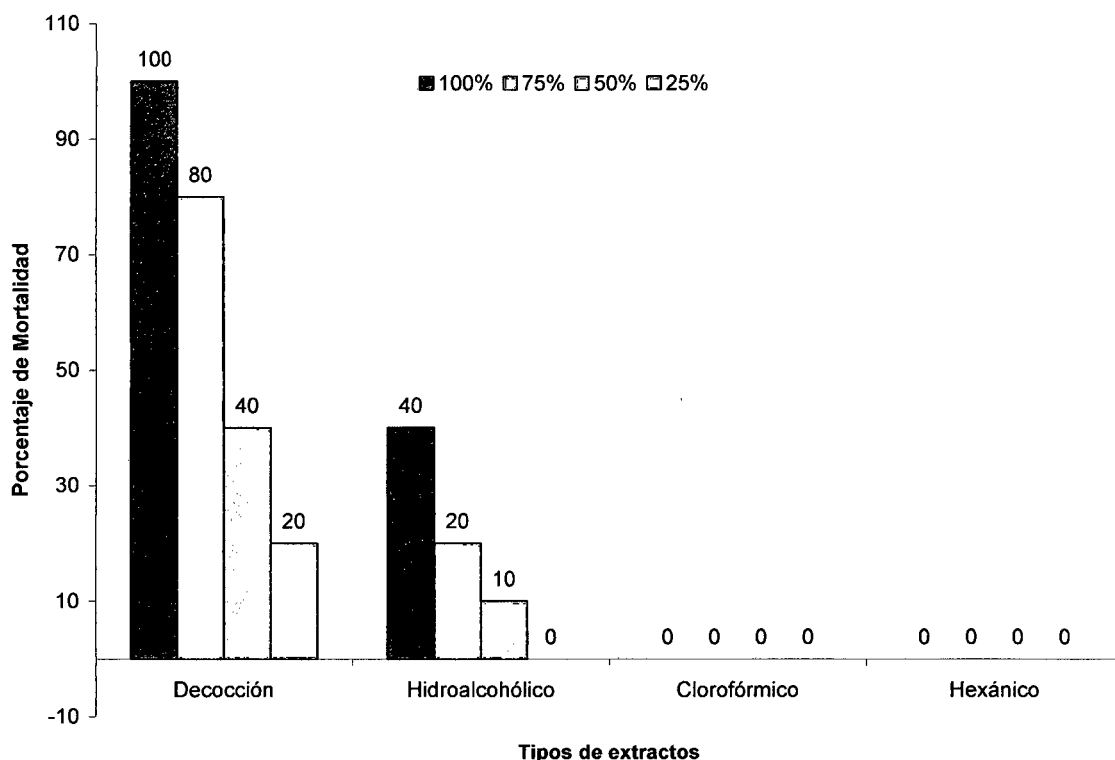


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de larvas del III estadio de *R. palmarum* a 72 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

En la Figura 5, se muestra el comportamiento de mortalidad de larvas del III estadio de *R. palmarum* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera*. Se puede apreciar que las mortalidades se inician a 12 horas de exposición para los extractos por decocción y hidroalcohólico. La concentración al 100% tiene las mayores mortalidades iniciales para el extracto por decocción, seguido por el extracto hidroalcohólico; sin embargo en el rango de 24 horas las concentraciones al 100 y 75% para el extracto hidroalcohólico se mantiene, incrementando su letalidad el extracto por decocción. El que mostró un comportamiento de

mortalidad progresiva uniforme fue la concentración al 100% para el extracto por decocción, a medida que avanza el tiempo de exposición va ascendiendo, manteniendo su efecto biocida en forma uniforme hasta las 72 horas, controlando el total de la población. Los extractos que no mostraron actividad biocida hasta el final de los bioensayos en esta especie fueron los extractos hexánicos y clorofórmicos.

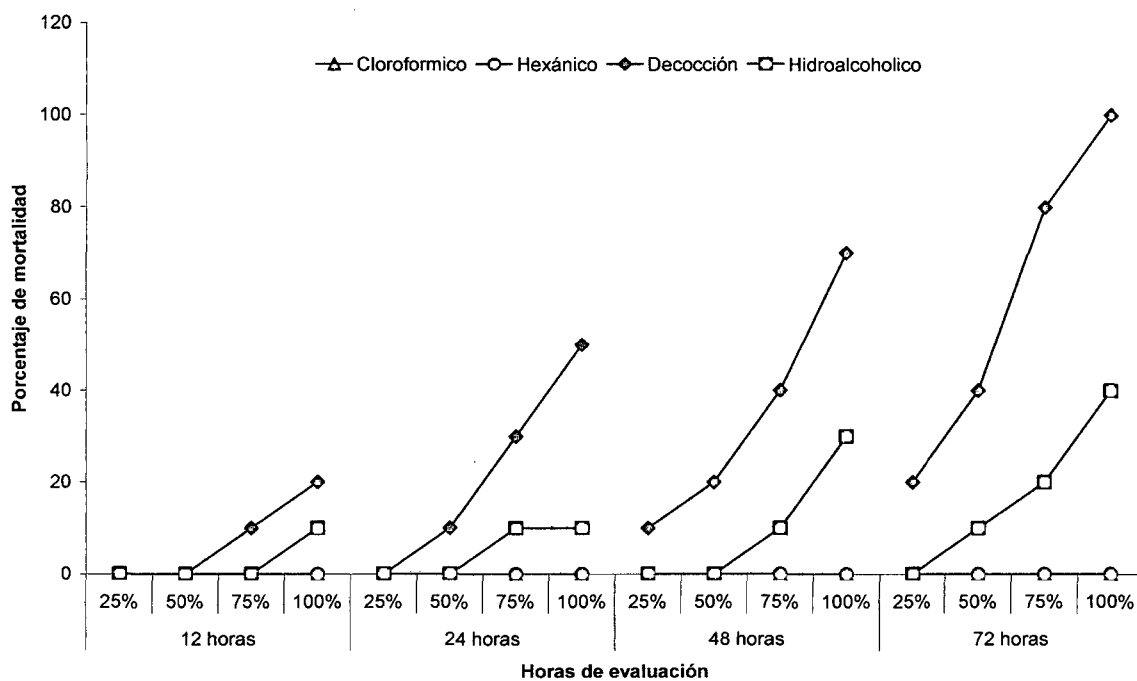


Figura 5. Comportamiento de mortalidad de larvas del III estadio de *R. palmarum* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera*.

4.2. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) sobre larvas del II estadio de *Eupalamides cyparissius* F.

Los datos de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) se observan en la Cuadro 10, en esta se observa que hubo mortalidad de larvas en todos los extractos estudiados a 72 horas después de la aplicación; los máximos valores en los porcentajes de mortalidad se observan al final de la evaluación con el extracto por decocción y hidroalcohólico, el primero mostró un efecto letal progresivo, el segundo inició su actividad letal a partir de las 24 horas; el extracto que mostró un bajo efecto biocida es el extracto clorofórmico expresándose sólo al final de la evaluación. El extracto hidroalcohólico a las 72 horas indica un patrón de efectividad superior comparado con los demás tipos de extractos, el control del 50% (CL₅₀) de las larvas se logró con 66,21 mg L⁻¹ (Límites de confianza 5,68 - 98,60). La ausencia de concentraciones (CL₅₀) en el caso de los extractos que no presentan valores, no pudieron procesarse adecuadamente por el programa EPA Probit, por no registrar por lo menos tres valores de mortalidad para los cuatro tiempos de evaluación.

Cuadro 10. Efecto biocida de *P. clavigera* en la mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* a diferentes horas de evaluación.

TE ¹	Concentración (%)	Tiempo (horas)							
		12 h	Sig.	24 h	Sig.	48 h	Sig.	72 h	Sig.
D	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	10	a	10	a
	50	0	a	10	a	10	a	20	a
	75	10	a	10	a	10	a	70	b
	100	20	a	20	a	30	ab	80	b
	CL ₅₀	Ns		Ns		85,95		70,71	
	X ²	-		-		0,078		0,554	
Hi	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control alcohol	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	10	a
	50	0	a	0	a	0	a	40	ab
	75	0	a	0	a	10	a	60	b
	100	0	a	10	a	40	b	80	b
	CL ₅₀	-		-		106,49		66,21	
X ²	-		-		0,030		0,132		
Cl	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control clorof.	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	0	a
	50	0	a	0	a	0	a	0	a
	75	0	a	0	a	0	a	10	a
	100	0	a	0	a	0	a	30	ab
	CL ₅₀	-		-		-		-	
X ²	-		-		-		-		
He	Control agua	0	a	0	a	0	a	0	a
	Control hexano	0	a	0	a	0	a	0	a
	25	0	a	0	a	0	a	0	a
	50	0	a	0	a	0	a	10	a
	75	0	a	0	a	10	a	40	ab
	100	0	a	0	a	20	a	70	b
	CL ₅₀	-		-		-		84,68	
X ²	-		-		-		0,529		

¹ Tipo de extracto: D = Decocción, Hi = Hidroalcohólico, Cl = Clorofórmico y He = Hexánico

Sig. = Significancia: promedios en una misma línea vertical seguidos por la misma letra minúscula no difieren significativamente a P= 0,05. Prueba de Tukey (SAS, 1989)

CL₅₀ = Valor de la concentración letal media (CL₅₀) en mg L⁻¹ (peso seco / volumen de solución madre)

X² = Valores Chi cuadrado.

4.2.1 Mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* F. según el tiempo de evaluación

4.2.1.1 Mortalidad a las 12 horas

Los resultados de mortalidad a 12 horas después de la aplicación de los extracto de *P. clavigera* se muestran en el Cuadro 10. Al efectuarse el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos estudiados obteniendo un coeficiente de variabilidad de 6,29% (Cuadro 11). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto por decocción de *P. clavigera* al 100% causó una mortalidad de 20%, siendo superior a las demás concentraciones, y a la misma concentración con un 10% de mortalidad el extracto hidroalcohólico (Apéndice 2, 2.2, a).

Cuadro 11. Análisis de varianza en la mortalidad de *E. cyparissius*, después de 12 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,00428719	0,0633	NS
Bloques	5	0,00559198	0,0422	NS
Error	15	0,00200570		
Total	23			

C.V. (%) = 6,29

NS = No significativo

La Figura 6, muestra el inicio de la actividad letal a las 12 horas con el extracto por decocción en las dos primeras concentraciones (100% y 75%); en esta se observa que no hubo actividad biocida en los extractos hidroalcohólico, clorofórmico y hexánico.

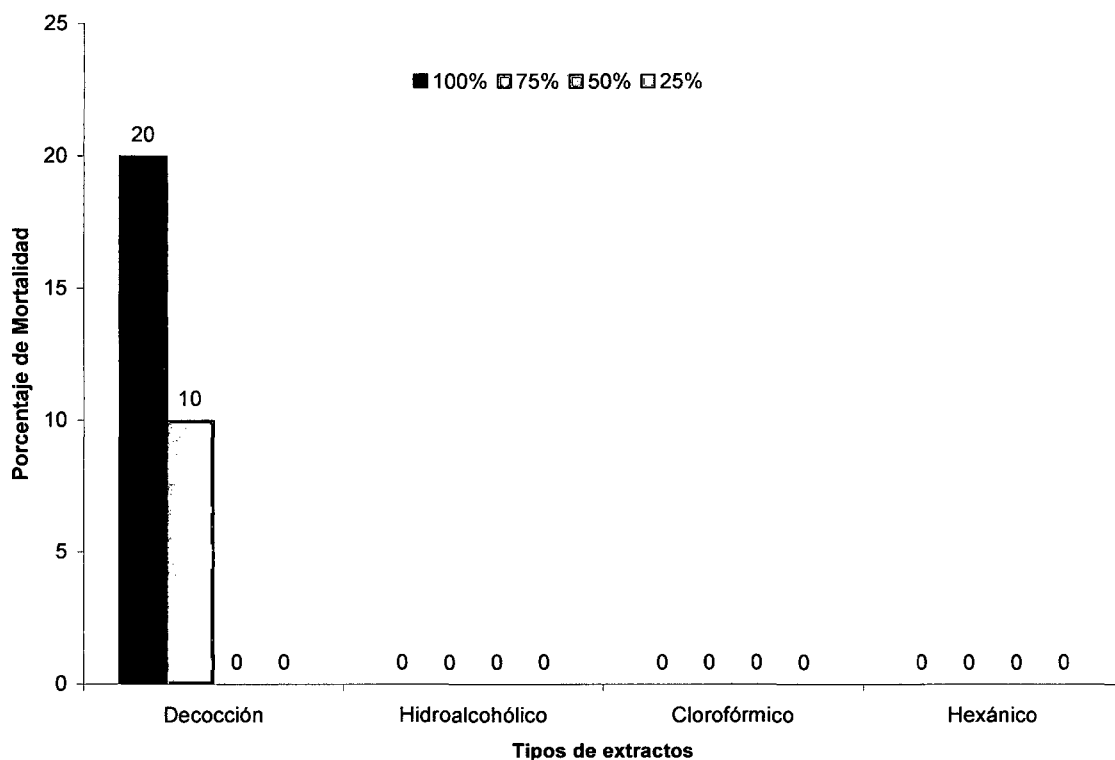


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* a 12 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.2.1.2 Mortalidad a las 24 horas

Los resultados de mortalidad a las 24 horas de exposición con los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* se muestran en el Cuadro 10. Al efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos estudiados obteniendo un

coeficiente de variabilidad de 9,95% (Cuadro 12). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto de *P. clavigera* por decocción al 100 y 75% de concentración mantenía la relación, iniciando su efecto la concentración al 50%, al igual que el extracto hidroalcohólico al 100% (Apéndice 2, 2.2, b).

Cuadro 12. Análisis de varianza en la mortalidad de *E. cyparissius*, después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,0172051	0,0066	S
Bloques	5	0,0528847	<,0001	NS
Error	15	0,0051429		
Total	23			

C.V. (%) = 9,95

S = Significativo

NS = No significativo

La Figura 7, muestra que las mortalidades a 24 horas después de la aplicación de los extractos, mantienen una relación de mortalidad en el extracto por decocción, iniciando su actividad letal el extracto hidroalcohólico al 100% de concentración, continuando sin actividad los extractos clorofórmicos y hexánico.

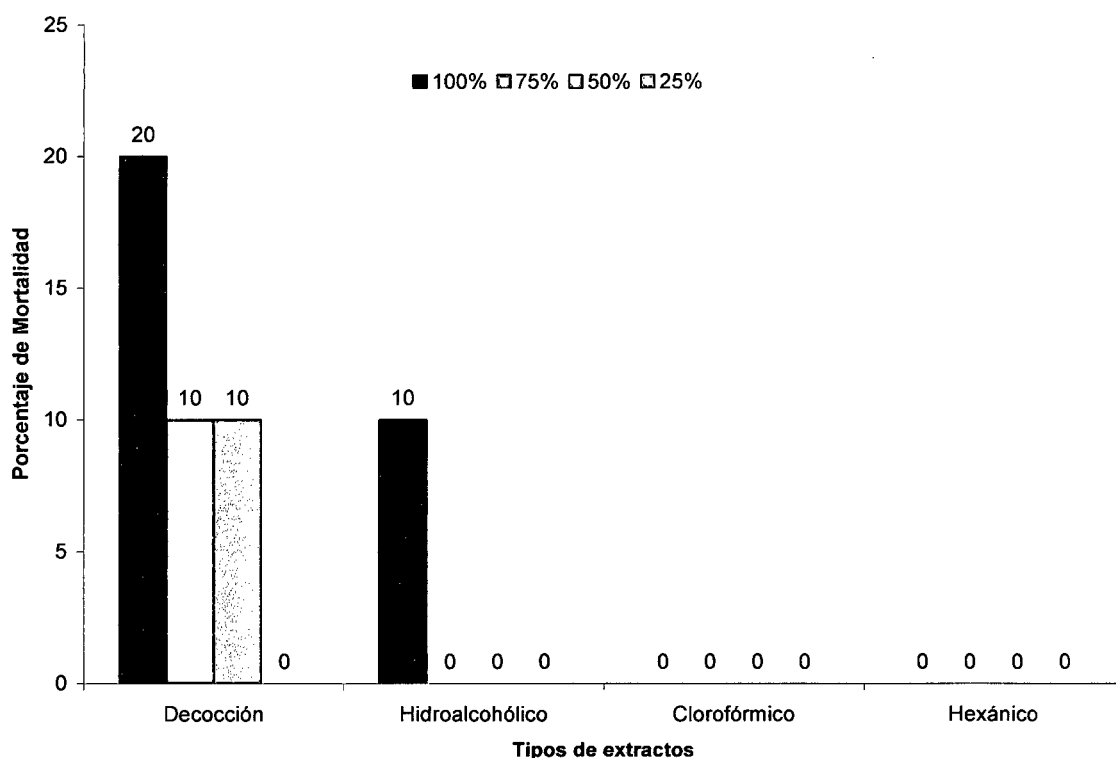


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.2.1.3 Mortalidad a las 48 horas

Los resultados de mortalidad a las 48 horas de exposición se muestran en el Cuadro 10. Al efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los bloques estudiados obteniendo un coeficiente de variabilidad de 12,69% (Cuadro 13). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* al 100% de concentración causó la mayor mortalidad larvaria (40%); el extracto por decocción al 100% causó una mortalidad del 30%; las

concentraciones de 75, 50 y 25% mantuvieron valores similares; el extracto hexánico inicia su actividad letal en forma descendente al 100 y 75% con mortalidades de 20 y 10% respectivamente, no existiendo actividad hasta este tiempo con el extracto clorofórmico (Apéndice 2, 2.2, c).

Cuadro 13. Análisis de varianza en la mortalidad de *E. cyparissius*, después de 48 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,01557064	0,1065	NS
Bloques	5	0,00828210	0,4026	AS
Error	15	0,00843015		
Total	23			

C.V. (%) = 12,69

AS = Altamente significativo NS = No significativo

En la Figura 8, se pueden observar las mortalidades a 48 horas, expresándose con mayor actividad letal el extracto hidroalcohólico; manteniendo el mismo comportamiento el extracto por decocción e iniciando su actividad letal el extracto hexánico; no existiendo mortalidad con el extracto clorofórmico.

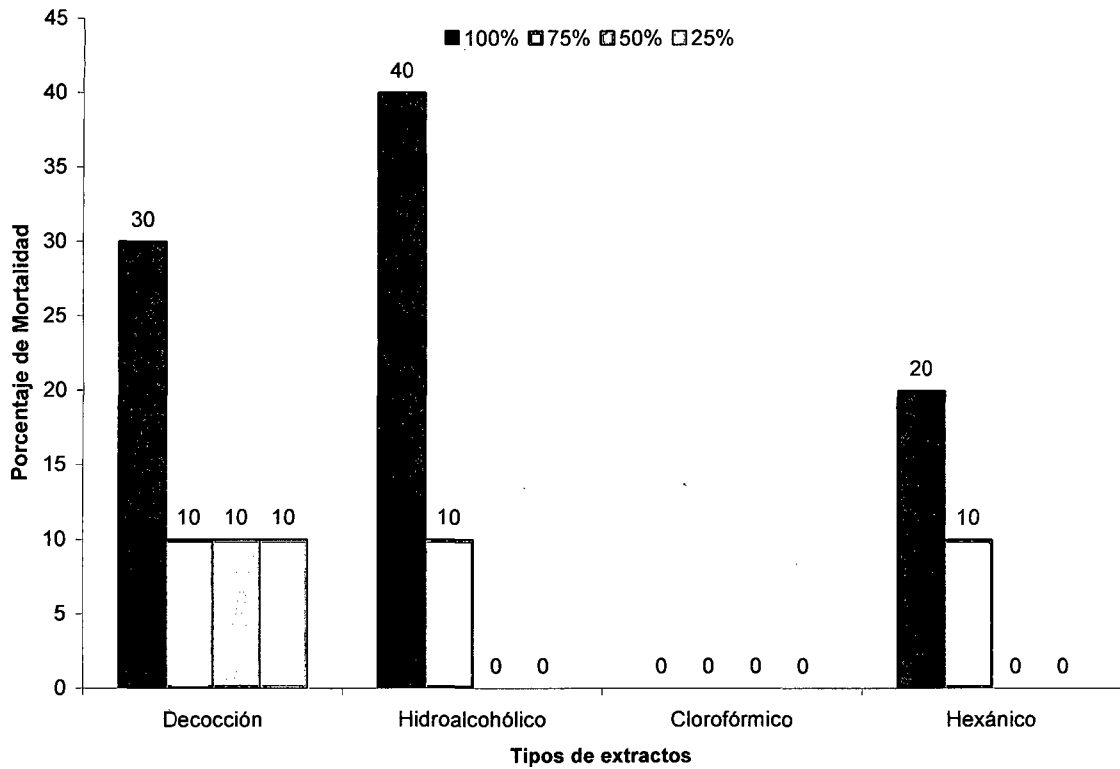


Figura 8. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* a 48 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.2.1.3 Mortalidad a las 72 horas

Evaluando los cuatro tipos de extractos a 72 horas, al momento de efectuarse el análisis de varianza se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los bloques y tratamientos obteniendo un coeficiente de variabilidad de 18,19%, mostrando una alta significación entre bloques (Cuadro 14). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto de *P. clavigera* por decocción y hidroalcohólico al 100% de concentración causaron el 80% de mortalidad larvaria, ambos con mortalidades decrecientes a 75, 50 y 25% de concentración; el extracto

hexánico es el tercero con mortalidades considerables, siendo mínima la actividad letal con el extracto clorofórmico al 100 y 75% con mortalidades de 30 y 10% respectivamente; todos los extractos en estudio mostraron actividad letal al final de la evaluación de los bioensayos con esta especie (Apéndice 2, 2.2, d).

Cuadro 14. Análisis de varianza en la mortalidad de *E. cyparissius*, después de 72 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,58601	<,0001	S
Bloques	5	0,43923	<.0001	AS
Error	15	0,02229		
Total	23			

C.V. (%) = 18,19

S = Significativo

AS = Altamente significativo

Los valores de mortalidad de los diferentes tipos de extractos, se representan gráficamente en la Figura 9; a 72 horas de evaluación hubo mortalidad larvaria con todos los extractos en estudio, no se alcanzó el 100% de mortalidad con el organismo en prueba, ya que se registraron valores de 80% de mortalidad en su máxima concentración para los extractos por decocción e hidroalcohólico y 70% de mortalidad para el extracto hexánico al 100% de concentración.

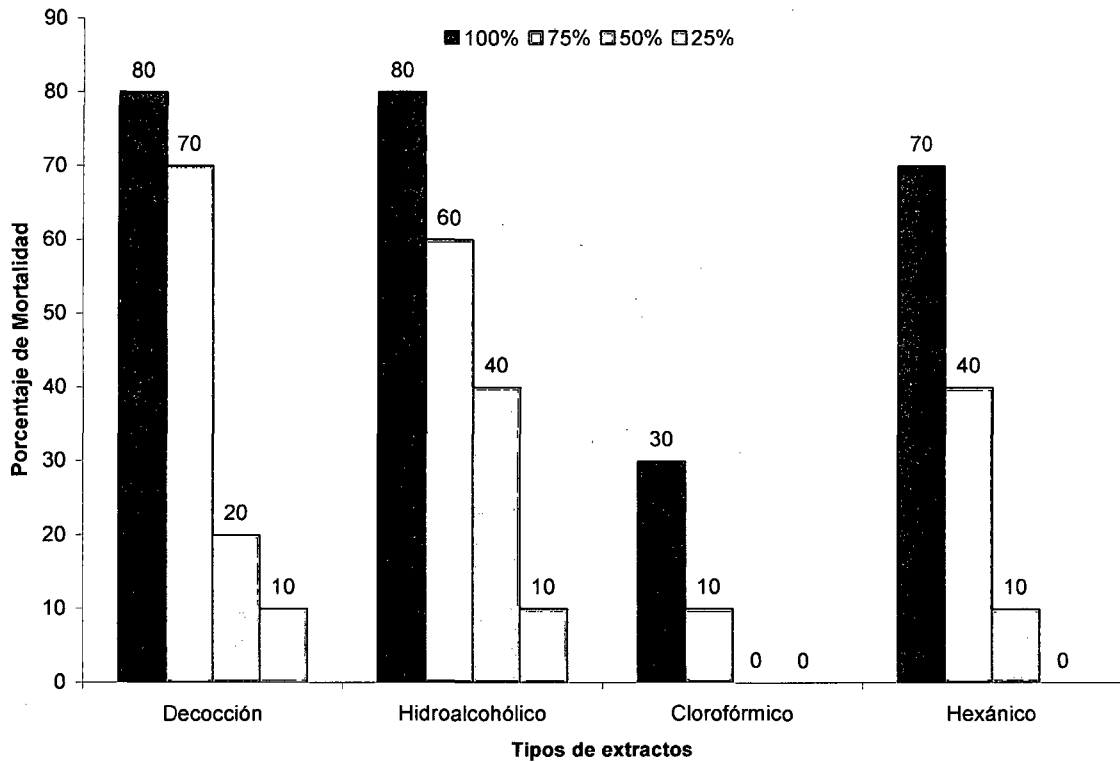


Figura 9. Porcentaje de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* a 72 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

En la Figura 10, se muestra el comportamiento de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera*. Se puede apreciar que las mortalidades se inician a 12 horas de exposición para el extracto por decocción; la concentración al 100% tiene la mayor mortalidad inicial para los extracto por decocción; sin embargo en el rango de 24 horas las concentraciones al 100 y 75% para el extracto hidroalcohólico mantiene su comportamiento. El que mostró una tendencia de mortalidad progresiva uniforme fue el extracto hidroalcohólico a partir de las 24 horas; los diferentes tipos de extracto no lograron controlar el total de la población expuesta.

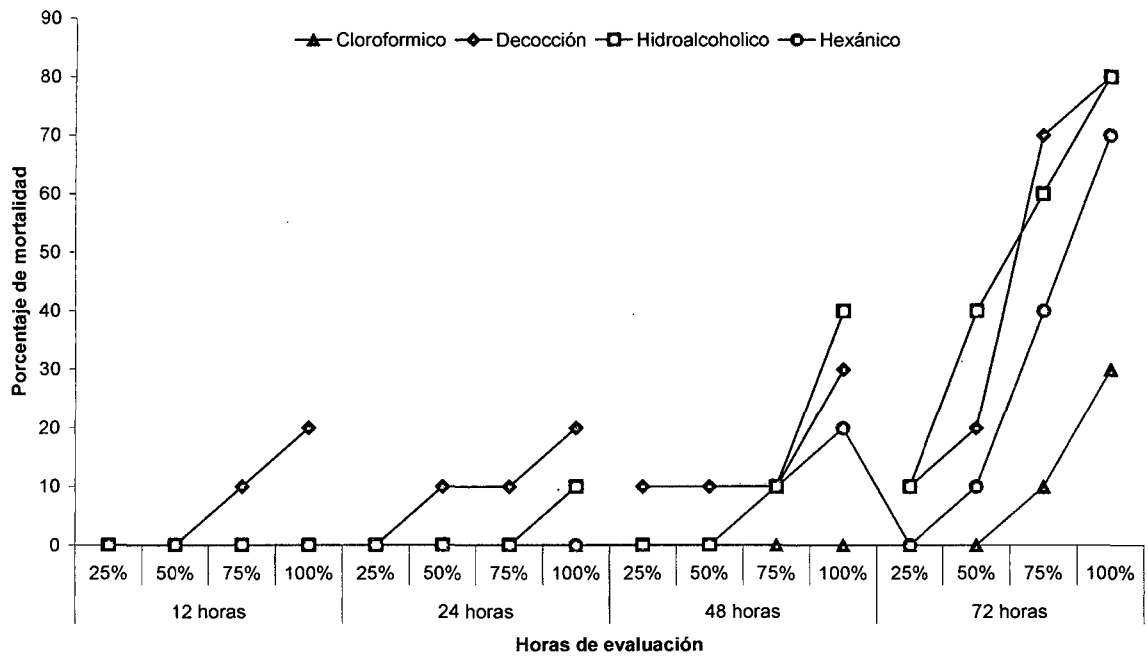


Figura 10. Comportamiento de mortalidad de larvas del II estadio de *E. cyparissius* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera*.

4.3. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) sobre nauplios del II estadio de *Artemia salina* K.

Los datos de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) se observan en el Cuadro 15, en este se observa que hubo mortalidad de larvas en todos los extractos estudiados a 24 y 48 horas después de la aplicación; los máximos valores en los porcentajes de mortalidad se observan al final de la evaluación con el extracto por decocción y hexánico, este último mostró un efecto letal progresivo; el extracto que mostró un bajo efecto biocida es el extracto hidroalcohólico. El extracto por decocción a las 48 horas indica un patrón de efectividad superior comparado con los demás tipos de extractos, controlando el total de los nauplios expuestos a 100 y 75% de concentración. Para la toxicidad letal aguda en términos de concentración letal media (CL₅₀) el extracto hexánico a 48 horas de exposición indica un mejor patrón de efectividad, 18,79 mg L⁻¹ (límites de confianza 7,64 – 26,96), seguidos en orden descendente por los extractos clorofórmico, decocción e hidroalcohólico con valores de 23,64 mg L⁻¹ (límites de confianza 6,25 – 35,38), con 23,82 mg L⁻¹ (límites de confianza 17,15 – 28,86) y 51,37 mg L⁻¹ (límites de confianza 42,22 – 60,15), respectivamente.

Cuadro 15. Efecto biocida de *P. clavigera* en la mortalidad de nauplios del II estadio de *Artemia salina* a diferentes horas de evaluación.

TE ¹	Concentración (%)	Tiempo (horas)			
		24 h	Sig.	48 h	Sig.
D	Control agua destilada	0	a	0	a
	25	35	a	57,5	ab
	50	52,5	ab	85	b
	75	72,5	b	100	b
	100	92,5	b	100	b
	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	40,88		23,82	
	X ²	3,445		2,77	
Hi	Control agua destilada	0	a	0	a
	Control con alcohol	0	a	0	a
	25	0	a	20	a
	50	12,5	a	42,5	ab
	75	22,5	ab	72,5	b
	100	52,5	b	87,5	b
	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	101,55		51,37	
X ²	1,998		1,499		
Cl	Control agua destilada	2.5 (0)	a	0	a
	Control con cloroformo	0	a	0	a
	25	7,3(7,5)	a	57,5	ab
	50	17,1 (17,5)	a	62,5	b
	75	32,3 (32,5)	ab	75	b
	100	62,2 (62,5)	b	90	b
	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	91,44		23,64	
X ²	1,246		2,903		
He	Control agua destilada	0	a	0	a
	Control con hexano	0	a	0	a
	25	5	a	62,5	ab
	50	17,5	a	82,5	b
	75	35	ab	92,5	b
	100	50	b	95	b
	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	102,34		18,79	
X ²	0,005		0,089		

¹ Tipo de extracto: D = Decocción, Hi = Hidroalcohólico, Cl = Clorofórmico y He = Hexánico

Sig.= Significancia: promedios en una misma línea vertical seguidos por la misma letra minúscula no difieren significativamente a P= 0,05. Prueba de Tukey (SAS, 1989)

CL₅₀ = Valor de la concentración letal media (CL₅₀) en mg L⁻¹ (peso seco / volumen de solución madre)

X² = Valores Chi cuadrado

4.3.1 Mortalidad de nauplios del II estadio de *A. salina* K. según el tiempo de evaluación

4.3.1.1 Mortalidad a las 24 horas

El análisis de varianza realizado entre los valores de CL_{50} de los cuatro tipos de extractos evaluados en *Artemia salina* a diferentes concentraciones mostró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre bloques y tratamientos obteniendo un coeficiente de variabilidad de 19,30% (Cuadro 16). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto *P. clavigera* por decocción mostró un comportamiento gradual con los valores mas altos, al igual que el extracto clorofórmico, en oposición el extracto hidroalcohólico mostró los valores mas bajos (Apéndice 2, 2.3, a).

Cuadro 16. Análisis de varianza en la mortalidad de *Artemia salina*, después de 24 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,2501	0,00833	AS
Bloques	5	0,7274	<,0001	AS
Error	15	0,0440		
Total	23			

C.V. (%) = 19,30

AS = Altamente significativo

La Figura 11, muestra la proporción de mortalidad de los nauplios de *A. salina* a 24 horas de la aplicación, donde el extracto por decocción mantiene una relación alta de mortalidad con relacion a los demás extractos, en este intervalo de tiempo se observa una muy buena actividad letal.

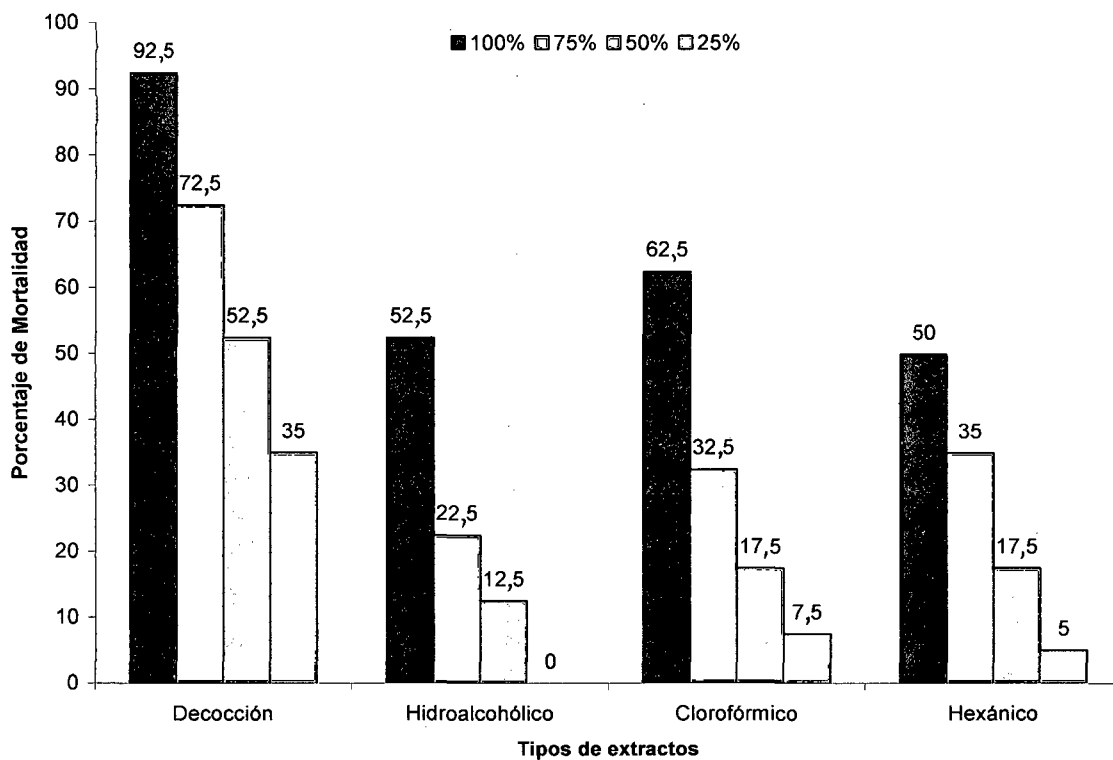


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de nauplios del II estadio de *Artemia salina* a 24 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

4.3.1.2 Mortalidad a las 48 horas

En este parámetro de evaluación al efectuarse el análisis de varianza también se encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los bloques y tratamientos obteniendo un coeficiente de variabilidad de 8,62% (Cuadro 17). Al realizar la prueba múltiple de promedios de Tukey ($p \leq 0,05$), el extracto por decocción de *P. clavigera* al 100 y 75% de concentración causó la mayor mortalidad, controlando la totalidad de los nauplios expuestos; el extracto hexánico con las mismas concentraciones también causó un comportamiento similar de mortalidad, llegando solo al 95% de mortalidad; el extracto que mostró un bajo índice de mortalidad en todas sus concentraciones fue el extracto hidroalcohólico (Apéndice 2, 2.3, b).

Cuadro 17. Análisis de varianza en la mortalidad de *Artemia salina*, después de 48 horas de aplicación, con los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera* (datos transformados a $\sqrt{y+0,5}$).

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Cuadrados medios	Pr > F	Significancia
Tratamientos	3	0,0711	0,01971	S
Bloques	5	1,4909	<,0001	AS
Error	15	0,0159		
Total	23			

C.V. (%) = 8,62

S = Significativo

AS = Altamente significativo

En la Figura 12, se puede observar las mortalidades a 48 horas de exposición, expresándose con mayor actividad letal al extracto por decocción, manteniendo el mismo comportamiento el extracto hexánico y clorofórmico; el extracto con los mas bajos indices de mortalidad fue el extracto hidroalcohólico.

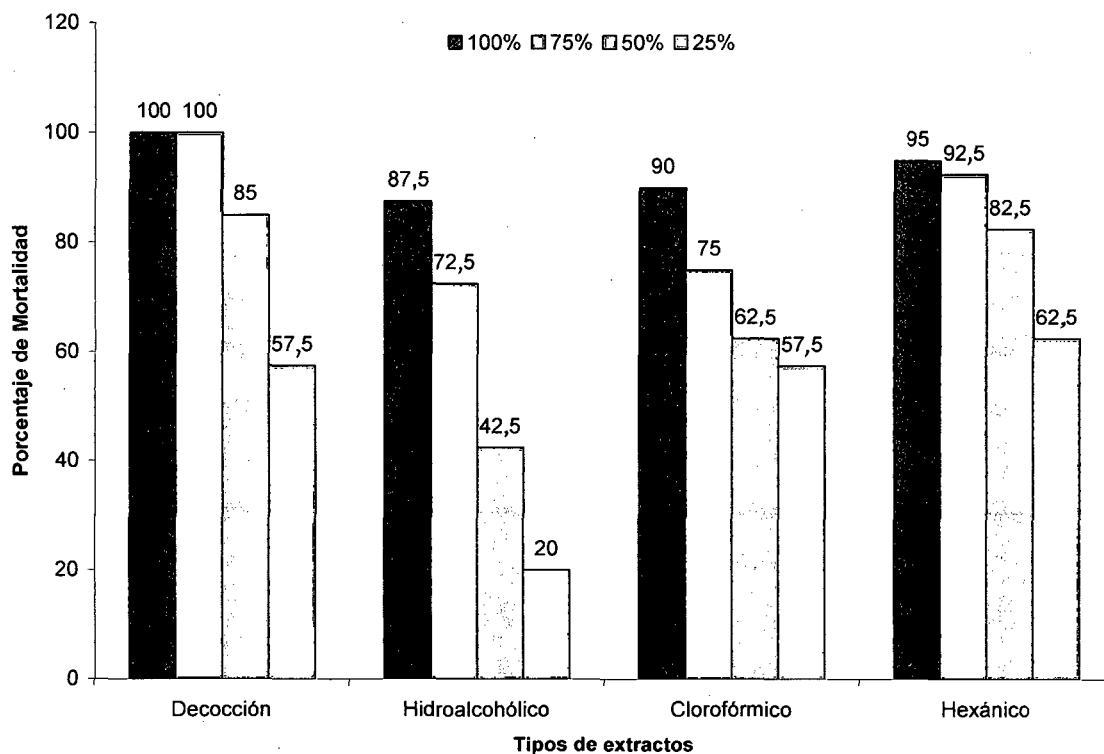


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de nauplios del II estadio de *Artemia salina* a 48 horas de la aplicación de diferentes concentraciones y tipos de extractos de *P. clavigera*.

En la Figura 13, se muestra el comportamiento de mortalidad de nauplios de *A. salina* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera*. Se puede apreciar el inicio de la actividad

letal a 24 horas de exposición en todos los extractos en estudio a diferentes concentraciones a excepción del extracto hidroalcohólico. El extracto por decocción tiene las mayores mortalidades iniciales y finales; sin embargo un comportamiento de mortalidad progresiva uniforme presenta el extracto hexánico manteniendo su efecto biocida en forma uniforme hasta las 48 horas, sin controlar el total de la población, pero con mortalidad alta (95 %).

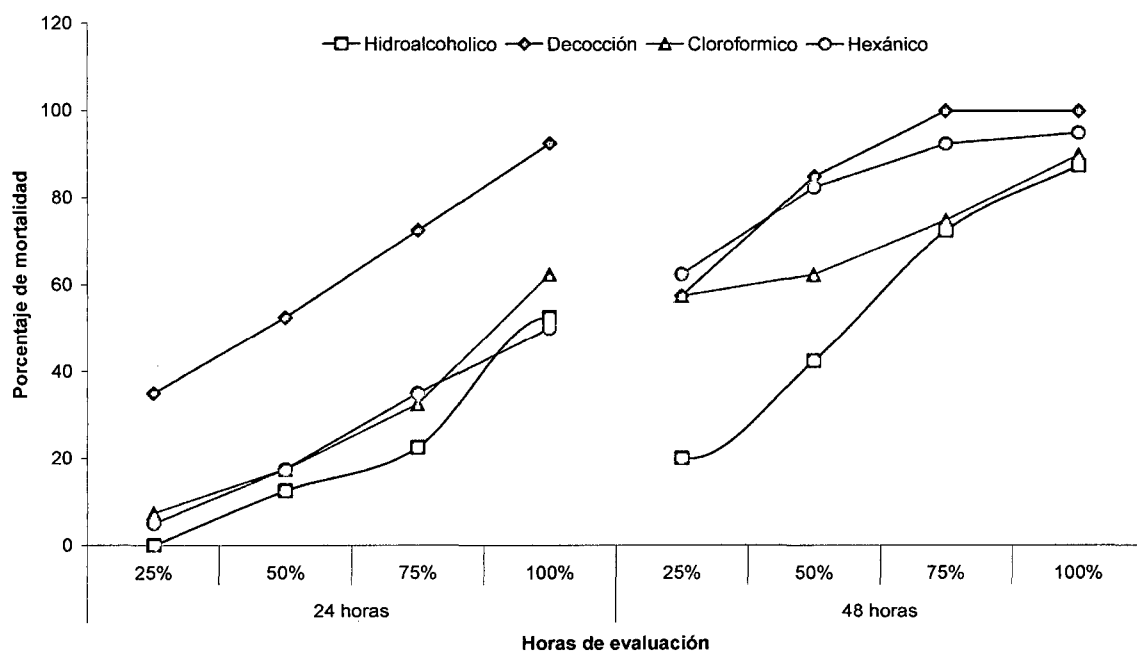


Figura 13. Comportamiento de mortalidad de nauplios del II estadio de *Artemia salina* frente al efecto biocida de los diferentes tipos de extracto de *P. clavigera*.

4.4. Análisis fitoquímico

En cuanto a los productos secundarios responsables de la acción biológica, las pruebas dieron como resultado la presencia de saponinas en casi todos los extractos; seguida de cumarinas, flavonoides, fenoles, triterpenos y quinonas, las cuales se muestran en el Cuadro 18.

Finalmente, se debe mencionar que debido a la presencia de más de un grupo de productos secundarios, es posible que también la acción biológica (mortalidad de larvas) haya sido causada por un sinergismo.

Cuadro 18. Características fitoquímicas de los diferentes tipos de extractos de *Paullinia clavigera* Var. 'Bullata' D.R. Simpsons.

Metabolitos secundarios	Tipos de extractos			
	Hexánico	Clorofórmico	Hidroalcohólico	Decocción
Masa a partir de 100 gramos	28,383	45,323	87,587	1000 mL
Alcaloides	-	-	-	-
Saponinas	-	±	+++	+
Esteroides	-	+	-	-
Triterpenos	++	-	-	-
Taninos	-	-	-	-
Fenoles	-	-	++	+++
Flavonoides	+	+	++	+++
Cumarinas	-	++	+±	+
Quinonas	±	±	++	-

- = Reacción negativa; ± = Reacción muy poco positiva; + = Reacción poco positiva; ++ = Reacción positiva; +++ = Reacción muy positiva.

V. DISCUSIÓN

5.1. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) sobre larvas del III estadio de *Rhynchophorus palmarum* L. y II estadio de *Eupalamides cyparissius* F.

Las mortalidades iniciales de larvas a 12 horas (Figura 2 y 7) probablemente estén influenciadas por los principios activos de *P. clavigera*, la cual es corroborada por HENRY *et al.* (1995), quienes mencionan que la toxicidad de esta especie biocida es producida por los triterpenos y saponinas existente en sus estructuras (Cuadro 18); además, el efecto rápido de mortalidad puede estar directamente relacionado al posible mecanismo de acción, el cual puede ser de contacto, mediante tres mecanismos interdependientes: transporte desde la cutícula al sitio de acción, inhibición enzimática y efecto sobre el sistema nervioso central, respiratorio u otro sistema involucrado, produciendo la muerte de las larvas; lo cual es corroborado por GUNTHER y JEPPSON (1962) y CISNEROS (1980).

Estas mortalidades altas también pueden deberse a la característica fisiológica de las larvas criadas en laboratorio que según CONSOLI (1994) y VELA (2003), todo organismo utilizado para pruebas biológicas no tiene mucho vigor como las que se desarrollan en criaderos naturales. Las cuales pueden haber sido afectadas rápidamente por los principios activos de los extractos, causando la mortalidad.

De acuerdo con la mortalidad obtenida (Figura 5) las larvas de *R. palmarum* presentaron resistencia a los extractos hexánicos posiblemente por la ausencia de saponinas (Cuadro 18) y en los extractos clorofórmicos la ausencia de fenoles, ya que en los demás extractos las saponinas, fenoles y flavonoides pueden haber causado la letalidad para este organismo. Mientras que las larvas de *E. cyparissius* presentaron resistencia únicamente al extracto clorofórmico a 12, 24 y 48 horas de evaluación (Figura 10), debiéndose posiblemente a que los metabolitos actúan en sinergismo a medida que el tiempo avanza. Para ambos organismos los triterpenos no actúan como letales ya que según el análisis fitoquímico solo lo presenta el extracto hexánico (Cuadro 18).

5.2. Porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) sobre nauplios del II estadio de *Artemia salina* K.

El género *Paullinia* está representado en la flora amazónica con varias especies que brindan varios beneficios al hombre. Se ha encontrado que extractos hidroalcohólicos de *P. elegans* Cambess tienen efectos antiprotozoarios sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 y de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, pero no se encontraron efectos antimolusquidas sobre el vector de *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (TRUITI *et al.*, 2005). EKABO *et al.* (1996) señalan propiedades antifúngicas y molusquidas del "sacha yoco" *P. clavigera*, debido a la concentración de las saponinas. Lo cual

concuerta con las altas concentraciones de saponinas encontradas en el extracto hidroalcohólico (Cuadro 18). Asimismo, SCHULTES y RAFFAUF (1990) 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 ictiotóxica. En la especie congénérica a *P. clavigera*, *Paullinia pinnata* L. se han registrado actividades molusquicidas contra *B. glabrata*, hospedero intermediario de *S. mansoni* (MELÉNDEZ y CARRILES, 2002), posiblemente debido a flavonoides (ABOURASHED *et al.*, 1999). PÉREZ y IANNACONE (2004) señalan propiedades insecticidas del extracto acuoso de *P. clavigera* sobre formas larvianas de *A. benarrochi* (Diptera). En el presente estudio se encontró que el extracto por decocción y hidroalcohólico de *P. clavigera* tuvo alta actividad sobre el microcrustáceo *Artemia salina* (Cuadro 15) y en concordancia a reacciones positivas a saponinas, fenoles, flavonoides y quinonas (Cuadro 18).

Las propiedades tóxicas del material vegetal en estudio han evidenciado su actividad letal en *A. salina*. Este trabajo muestra una clara influencia por parte de los componentes fitoquímicos sobre la supervivencia de *Artemia* en los cuatro diferentes extractos empleados. Investigaciones realizadas con compuestos no fitoquímicos y con sustancias antimicrobianas han evidenciado resultados similares (BARAHONA y SÁNCHEZ, 1996), mostrando una vez más la ventaja del uso de *Artemia* como especie de invertebrado en la realización de bioensayos (LEE *et al.*, 1995, NIC *et al.*, 1995, PÉREZ *et al.*, 1996).

La evaluación de la biodiversidad de los bosques tropicales amazónicos pueden revelar nuevos principios fitoterapéuticos, pero estos estudios aún están en su inicio. La biodiversidad existente en la flora peruana es una fuente potencial de muchas moléculas nuevas bioactivas. Los resultados obtenidos en los bioensayos con esta especie de planta que se presentan naturalmente en el área estudiada demuestran que la flora local presenta un gran potencial biocida. Los extractos botánicos más eficientes deben ser priorizados para el fraccionamiento e identificación de sus principales componentes activos.

5.3. Análisis fitoquímico

Las principales características fitoquímicas semicualitativas para nueve componentes de los extractos por decocción, hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de la especie biocida estudiada muestran las reacciones positivas y negativas de estos; las saponinas, fenoles y flavonoides presentes muy positivamente en los extractos por decocción e hidroalcohólico (Cuadro 18) fueron los causantes de la mortalidad en larvas del II estadio de *R. palmarum* L. (Figura 5); mientras que en larvas del II estadio de *E. cyparissius* F. fueron los mismos metabolitos en ambos extractos, los responsables de la mortalidad además de los triterpenos presentes en el extracto hexánico (Figura 10); finalmente, *A. salina* K. fue muy susceptible a la mayoría de metabolitos secundarios presentes en los diferentes tipos de extractos (Figura 13), teniendo un mejor comportamiento el extracto hexánico por su letalidad gradual, atribuyendo a los triterpenos como metabolitos letales, dichas afirmaciones son

corroboradas por BOURGAUD *et al.* (2001) quienes mencionan sobre la letalidad de los metabolitos secundarios presentes en las sapindáceas, atribuyendo generalmente la actividad tóxica a las saponinas, fenoles, flavonoides, triterpenos y en algunos casos las cumarinas y quinonas.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se llevó a cabo el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los extractos por decocción (100%) e hidroalcohólico (40%) de *P. clavigera* tienen efecto biocida sobre larvas del III estadio de *R. palmarum* L., pero presentan tolerancia a los extractos hexánico y clorofórmico; mientras que los extractos por decocción (80%), hidroalcohólico (80%) y hexánico (70%) tienen efecto biocida sobre larvas del II estadio de *E. cyparissius* F. y presentan tolerancia al extracto clorofórmico; asimismo, el efecto biocida de los diferentes tipos de extractos de *P. clavigera* sobre nauplios del II estadio de *A. salina* K. mostraron muy buena actividad toxicológica, siendo el extracto hexánico (95%) el de resultados graduales y eficientes según la concentración y el tiempo.
2. La concentración letal media (CL₅₀) del extracto por decocción de *P. clavigera* al cabo de 72 horas en larvas del III estadio de *R. palmarum* L. es de 59.15 mg L⁻¹; mientras que la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos por decocción, hexánico e hidroalcohólico a las 72 horas en larvas del II estadio de *E. cyparissius* fue de 70,71 mg L⁻¹, 84,68 mg L⁻¹ y 66,21 mg L⁻¹, respectivamente; no pudiéndose determinar la

concentración letal media del extracto clorofórmico por no presentar mortalidades significativas.

3. La concentración letal media (CL_{50}) de los extractos hexánico, por decocción, clorofórmico e hidroalcohólico a las 72 horas en nauplios del II estadio de *A. salina* K. fue de 18,79 mg L⁻¹, 23,82 mg L⁻¹, 23,64 mg L⁻¹ y 51,37 mg L⁻¹, respectivamente.
4. Para los insectos en estudio, el extracto por decocción de *P. clavigera* al 100% de concentración tuvo mejor eficiencia insecticida en términos de mortalidad y CL_{50} a 72 horas de exposición; mientras que el extracto por decocción y hexánico al 100% de concentración presentó una muy buena actividad letal al cabo de 48 horas de exposición en *A. salina* K.
5. Posiblemente las saponinas, fenoles y flavonoides son los metabolitos secundarios responsables de la mortalidad de los organismos evaluados, sumándose a ello la actividad de los triterpenos presentes en el extracto hexánico, sin descartar la posible potenciación entre ellos.

VII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se considera interesante investigar sobre otros aspectos relacionados a los tipos de extractos de esta especie biocida y se propone:

1. Extender los estudios expuestos en esta tesis al estudio en campos de cultivo relacionados a los insectos prueba, mediante la utilización de cebos tóxicos u otras técnicas relacionadas.
2. Trabajar en mejorar las dosis de aplicación de los extractos hidroalcohólicos, hexánicos y clorofórmicos de ésta especie biocida en bioensayos de laboratorio.
3. Extender los estudios expuestos en esta tesis al estudio de otros tipos de insectos plagas y realizar evaluaciones del riesgo en ambientes acuáticos sobre la fauna benéfica.
4. Continuar con las investigaciones que puedan generar información básica acerca de los plaguicidas botánicos, determinando su toxicidad y así poder tomar todas aquellas medidas que contribuyan al bienestar de los usuarios y evitar casos severos de toxicidad.

VIII. RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), sede Pucallpa, Región Ucayali, Perú; con el objetivo de proporcionar información básica sobre el efecto biocida y concentración letal media (CL₅₀) de los extractos por decocción, hidroalcohólico, clorofórmico y hexánico de *Paullinia clavigera* var. 'Bullata' D.R. Simpson (Sapindaceae) en larvas de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Curculionidae), *Eupalamides cyparissius* Fabricius (Castniidae) obtenidas a partir de adultos y en nauplios del bioindicador *Artemia salina* Kellog (Artemiidae).

Se realizaron bioensayos en laboratorio, una por tipo de extracto utilizando 6 tratamientos con 10 repeticiones por cada tipo de extracto, incluido los controles (testigo solvente y testigo agua a excepción del extracto por decocción, solo agua), analizados por un DBCA de 6 x 10; la comparación de promedios se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Las extracciones se realizaron: por decocción a una proporción 1:10 (p/v), hidroalcohólico, clorofórmico y hexánico a 0,1 g L⁻¹. El efecto biocida cuya variable fue la mortalidad larvaria, fue evaluado a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación para *R. palmarum* y *E. cyparissius*; y a 24 y 48 horas para nauplios de *A. salina*. Se hizo el análisis fitoquímico para todos los extractos en estudio.

Según resultados, los mayores porcentajes de mortalidad a 72 horas después de la aplicación a la concentración más alta, fueron de 100% de mortalidad con extracto por decocción en *R. palmarum*, 80% de mortalidad para extractos por decocción y hidroalcohólico en *E. cyparissias* y 100% de mortalidad con extracto por decocción en *A. salina*. Al realizar el análisis Probit en términos de CL_{50} , el extracto por decocción mostró más eficiencia insecticida sobre *R. palmarum* con $59,15 \text{ g mL}^{-1}$ a 72 horas de evaluación; el extracto por decocción e hidroalcohólico con $70,71 \text{ g mL}^{-1}$ y $66,21 \text{ g mL}^{-1}$, respectivamente en *E. cyparissius*; extractos hexánico, por decocción, clorofórmico e hidroalcohólico a 72 horas de evaluación con valores de $18,79 \text{ g mL}^{-1}$, $23,82 \text{ g mL}^{-1}$, $23,64 \text{ g mL}^{-1}$ y $51,37 \text{ g mL}^{-1}$, respectivamente, para *A. salina*. Según el análisis fitoquímico y la actividad biocida mostrada en el estudio, las saponinas, flavonoides y fenoles podrían ser los metabolitos responsables de la letalidad en los organismos, sin descartar la posible actividad de los triterpenos presentes en el extracto hexánico y el sinergismo entre ellos.

Se concluye que, para estos organismos en estudio el extracto por decocción de *P. clavigera* al 100% de concentración mostró mejor eficiencia insecticida en términos de mortalidad y CL_{50} a 72 horas de exposición; recomendándose realizar mayores ensayos en laboratorio y campo, con la especie en estudio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADZET, T.; CAMARASA, J. y LAGUNA, J.C. 1987. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Nat. Prod.* París, Francia. Pp. 50-4, 612-17.
2. BARAHONA, M.V. y F.S. SANCHEZ. 1996. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Murcia, España. 56: Pp. 271-278.
3. BARTRA, P.C. 1994. Manual de crianza de algunos insectos benéficos a la agricultura peruana. Sociedad entomológica del Perú. Lima, Perú. p. 57.
4. BOBADILLA, M.; ZAVALETA, G.; FRANCO, G. y POLLACK, L. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller "chirimoya" y *A. muricata* Linnaeus "guanábana" sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. *Rev. Perú. Biol.* 9: Pp. 64 - 73.
5. BONILLA, P. 1993. Consideraciones generales y específicas para la obtención y utilización de los componentes activos de plantas con propiedades biocidas. Primer Taller Nacional: "Las plantas con propiedades biocidas al servicio del agricultor". RAAA, Perú. Pp. 59 - 203.

6. BOURGAUD, F. GRAVOT, A. MILESI, S. y GONTIER, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci. Vandoeuvre, Francia*. Pp. 161, 839-851.
7. BRAKO, L. y ZARUCCHI, J.L. 1996. Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú. *Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden. Missouri, USA*. Vol. 45. p. 1286.
8. BRIONES, R. A. 1991. Conocimiento campesino del uso de plantas insecticidas en el área del Proyecto Piloto de Ecosistemas Andinos. *Rev. de Agronomía. Lima, Perú* 39 (1): Pp. 63-72.
9. CALDERON, G. y CARVALHO, M. 1993. Pruebas de susceptibilidad de mosquitos adultos y larvas a los insecticidas y bioensayos de las aplicaciones residuales y espaciales usadas en el control de mosquitos vectores de malaria y dengue. *STC OPS/OMS. Paraiba, Brasil*. p. 55.
10. CALDERON, F.G. 2001. Pruebas de susceptibilidad de mosquitos adultos y larvas a los insecticidas y bioensayos de las aplicaciones residuales y espaciales usadas en el control de mosquitos vectores de malaria y dengue. *Manual de campo. DRSU. Programa de Control de Enfermedades Transmisibles y OEM. Lima, Perú*. p. 76.
11. CALOW, P. 1993. *Handbook of ecotoxicology. Blackwell Science Ltd., Sheffield, Ucrania*. Vol. I: p. 478.
12. CALZADA, B. 1982. *Métodos estadísticos para la investigación. Ed. Milagros. 5° Ed. UNALM. Lima, Perú*. p. 644.

13. CISNEROS, V. 1980. Principios del control de las plagas agrícolas. UNALM. Edit. Pacific Press. Lima, Perú. p. 189.
14. CREMLYM, R. J. 1995. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica UTEHA. Noriega Ed. México. p. 863.
15. CUADRA, P.; FURRIANCA, M.; OYARZÚN, A.; YÁNEZ, E.; GALLARDO, A. y V. FAJARDO. 2005. Biological activity of some Patagonian plants. *Fitoterapia*. Punta Arenas, Chile. 76: Pp. 718-721.
16. DALE, E.W. 1994. Bases para el descubrimiento y utilización de productos naturales derivados de las plantas en el control de plagas. vol. XLIII. La Molina, Perú. p. 43.
17. DE LOS RÍOS, P. y G. GAJARDO. 2004. The brine shrimp *Artemia* (Crustacea: Anostraca): a model organism to evaluate management policies in aquatic resources. *Rev. Chil. Historia Nat.*. Antofagasta, Chile. 77: Pp. 3-4.
18. EKABO, O.; FARNSWOTH, N.; HENDERSON, T.; MAO, G. y MUKHERJEE, R. 1996. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *Journal of Natural Products*. ACS Publications. California, USA. 59: Pp. 431-435.
19. ESTRADA, J. y LÓPEZ, M. 1998. Los bioplaguicidas, Tecnología para la agricultura sostenible. RAAA. Lima, Perú. p. 39.
20. EVANS, S.R. y RAFFAUT, R. 1990. The healing forest. Medicinal and toxic plant of the Northwest Amazonia. Oregon, USA. p. 484.

21. GAJARDO, G.; CRESPO, J.; TRIANTAFYLLIDIS, A.; TZIKA, A.; BAXEVANIS, A.D.; KAPPAS, I. y T.J. ABATZOPOULOS. 2004. Species identificación of chilena *Artemia* populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *J. Biogeogr.* Osorno, Chile. 31: Pp. 547-555.
22. GUNTHER, A. y L. JEPSON. 1962. Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos. Compañía Editorial Continental S. A. México D. F. p. 358.
23. HELLPAP, C. 2000. El desarrollo de un plaguicida botánico. Pasos necesarios. *In* Arning, I. y H. Velásquez (Eds.). Plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos (RAAA). Lima, Perú. Pp. 75-82.
24. HENRY, Y.B.; GALDMEZ, C.; GARCÍA, G.J. y JIMÉNEZ R. 1995. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Mahabir P. G. (ed). Colombia. p. 243.
25. HLYWKA, J.J.; BECK, M.M. y L.B. BUILLERMAN. 1997. The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fumonisin B1 mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* USA. 35: Pp. 991-999.
26. HOSS, R. 1999. Recursos botánicos con potencial biocida: Conceptos básicos y métodos de análisis. Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos (RAAA). Lima, Perú. Pp. 80 - 310.

27. IANNACONE, J. 2000. La pulga del agua *Moina macrocopa* y el nemátode *Panagrellus redivivus* como modelos alternativos de bioensayos para la detección de sustancias biocidas fisiológicamente activas. In Arning, I. y H. Velásquez (Eds.). Plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos (RAAA). Lima, Perú. Pp. 13-26.
28. IANNACONE, J. 2001. Uso y perspectivas de insecticidas botánicos. Reviviendo y modernizando una antigua técnica con plaguicidas etnobotánicos. Resúmenes del Simposio Internacional de medioambiente y uso de recursos naturales para el desarrollo sustentable. Lima 15 – 19 de Noviembre, 2001. Lima, Perú. Pp. 46-47.
29. IANNACONE, J. y M. ALAYO. 2004. Efecto ecotoxicológico de dos formulaciones del metamidofos sobre *Porcellio laevis* (Isopoda: Porcellionidae). In: Resumos VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicología. Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC Brasil. 17 -20 Outubro. Florianópolis- SC. p. 229.
30. IANNACONE, J., ALVARIÑO, L. y MANSILLA, J. 2002a. Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Díptera: Chironomidae). Wiñay Yachay, Perú. 7: Pp. 56-71.

31. IANNACONE, J.A., ALVARIÑO, L. y LAMAS, G. 2002b. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida botánico rotenona empleando cuatro invertebrados de la biota animal. *In: XXIV Congreso Brasileiro de Zoología: A Zoología e os Ecossistemas Costeiros.* 17 a 22 de fevereiro de 2002. Itajaí – Santa Catarina. Mazzoleni, R.C.; Souto, F.X.; Lacava, L.A.; Braun, J.R.R. (Eds.). Brazil. p. 644.
32. KHAMBAY, B.P.S. 2000. Botanical insecticides: acceptability of established practices and challenges in developing new ones. Book of Abstracts I. XXI International Congress of Entomology. XVIII Brazilian Congress of Entomology. August 20th to 26th Brazil. p. 128.
33. LEE, G.; MARK, R.E.; GARY, F.K. y L.M. FOSTER. 1995. Predicting chronic lethality of chemicals to fishes from acute toxicity test data: multifactor probit analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* Missouri, USA. 14: Pp. 345-349.
34. LOCK, O. 1994. Investigación Fitoquímica: métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Perú. p. 300.
35. MACHERA, K.; COTOU, E. y P. ANASTASSIADOU. 1996. Fenbutatin acute toxicity on *Artemia nauplii*: effects sublethal concentrations on ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Atenas, Grecia. 56: Pp. 159-164.

36. MARIÑOS, C., CASTRO, J. y NONGRADOS, D. 2000. Efecto biocida de *Lonchocarpus utilis* (Smith, 1930) sobre *Anopheles benarrochi* (Gabaldón, 1941). Libro de Resúmenes del IV Congreso Peruano de Parasitología. Lima, Perú. p. 246.
37. MEXZÓN, R. G. 1994. Manejo integrado de artrópodos perjudiciales en el cultivo del pejibaye (*Bactris gasipaes* K.B.K) y sus enemigos naturales. En: Mora Urpi 1999. Palmito del Pejibaye. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Pp.138-145.
38. NIC, A.; RALI, T. y O. STICHER. 1995. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. *J. Ethnopharmacol.* Papua, Nueva Guinea. 49: Pp. 147-156.
39. NOVO, R.J.; VIGLIANCO, A. Y M. NASETTA. 1997. Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *Tribolium castaneum* Herbst. *Rev. Agriscientia*. Nordeste, Argentina. (14): Pp. 31-36.
40. PÉREZ, D.; IANNACONE, J.; ALAYO, M. y A. ARRASCUE. 2004. Efecto toxicológico de cuatro plantas con potencial biocida procedentes de la amazonía peruana sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera) – Pucallpa. Resumos VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 17-20 de Outubro Florianopolis- SC. Brazil. p. 108.
41. PÉREZ, D. y IANNACONE, J. 2006. Efectos toxicológicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus Calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae). Informe técnico. Lima, Perú. p. 42.

42. PEREZ, E.; IPARRAGUIRRE, D.; MILLÁN, B.; JURUPE, H.; CÁRDENAS, W.; LOCK DE UGAZ, O. y O. RIOFRÍO. 1996. Etapas en el estudio de plantas medicinales. Libro de Resúmenes del V ICBAR. Lima, Perú. p. 98.
43. PASCUAL - VILLALOBOS, M. J. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. INATAA. Madrid, España. p. 25.
44. POLO, O. y A. MUÑOZ. 1982. Meteorología y climatología de la amazonía. Informe, Vol. I. INIPA – CIPA. Perú. p.47.
45. RENGIFO, M. J. 1999. Estudio del control químico del barrenador de racimos y estipe (*Castnia daedalus* Cramer), en palma aceitera (*Elaeis guinnensis* Jacq.), en Tananta - Tocache. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. UNAP. Iquitos, Perú. p. 78.
46. SATO, V.; TERAZAWA, M. y K. KAINUMA. 1984. Guarana extract contained drow siness preventive sum. Shokuhin kp Gyo. Tokio, Japón. 27: Pp. 73-81.
47. SCHULTES, R.E. y R.F. RAFFAUF. 1990. The healing Forest. Discorides Press, Portland, Oregon, USA. p. 410.
48. SCHUILING, M. y B.M. VAN DINTHER. 1980. Ecology and control de *Castnia daedalus* a major pest of oilpalm in Brazil. Sonder - druck band. Brazil. 9: Pp. 161-174.

49. TEIXEIRA, J.; LAPA, A.; SOUCCAR, C. y J. VALLE. 1984. Timbos: ichthyotoxic plants used by Brazilians Indians. Journal of Ethnopharmacology. Brazil. 10: Pp. 311-318.
50. VARGAS, R.M. y A.F. UBILLO. 2001. Toxicidad de pesticidas sobre enemigos naturales de plagas agrícolas. *Agri. Téc.* (Santiago, Chile) 61: Pp. 35-41.
51. VELA, C. 2003. Efecto de diez extractos vegetales en laboratorio, para el control de *Castnia dedalus* Cramer. Insecto plaga en palma aceitera *Elaeis guineensis* J. y *Rhynchophorus palmarum* L. en pijuayo para palmito *Bactris gasipaes* H.B.K.- Pucallpa. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Ucayali, Perú. p. 162.
52. VICENTE, M.; BERNAL, H. y A. CÁCERES. 2000. Fundamentos de agrotecnología de cultivos de plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello (CAB). Santa Fé de Bogotá, D.C., Colombia. p. 524.
53. VILCAPOMA, S. G. 2000. Especies biocidas en el Perú. En: Arning I. y Velásquez, 2000. Plantas con potencial biocida, Metodologías y experiencias para su desarrollo. RAAA. Lima, Perú. Pp. 27-46.
54. VINCENT, D., SEGONZAE, G. y R. ISSANDU - CARLES. 1954. Action of purine alkaloids and caffeine containing drugs on hyaluronidase. C. R. Séance Soc. Biol. Ses. Philippines. 148: Pp. 10-75.

X. ANEXO

Apéndice 1. Ficha informativa de la planta con potencial biocida usada en el estudio.



I. Datos generales:

1. Lugar de colección: Carretera Federico Basadre km 83, caserío Unión, distrito de Irazola, provincia de Padre Abad.
2. Datos ambientales:
Clima: zonas tropicales, de moderada a alta humedad relativa, altitudes 0 a 2000 m.s.n.m.
Suelo: arcillosos, terrazas altas, tolerante a suelos con baja fertilidad.
Poblaciones naturales: se ubican en ecosistemas de altura, preferentemente en bosques residuales, requieren de poca luminosidad.
3. Fecha de colecta: 14-07-03
4. Nombre común: "Sacha yoco".

II. Ecología:

Liana endémica semileñosa con tallo triangular de 16 m de alto, fruto oscuro (vino-rojo). Amazónico, Andino, se encuentra formando parte del bosque primario y en las riberas.

III. Etnomedicina:

En la Amazonía Peruana se utiliza la infusión de la corteza y la raíz en lavados de micosis y heridas cutáneas. También puede tomarse vía oral previo macerado en aguardiente.

IV. Etnobiocida:

La raíz se utiliza como veneno durante la pesca.

V. Bioactividad:

Ictiotóxico, antifúngica y molusquicida. La toxicidad se observó en las saponinas aisladas, asimismo se menciona la presencia de triterpenos, de B-sitosterol y de aceites etéreos, atribuyéndoles a los primeros la actividad ictiotóxica.

VI. Cultivo:

Propagación:

Tipo de semilla:

Botánica (x)

Estacas (x)

Cormos ()

Esquejes ()

Otros ()

Apéndice 2. Prueba de comparación de promedios de Tukey

2.1. Comparación de medias según Prueba de Tukey en *R. palmarum* L.:

a. Prueba Tukey para X1 (12 h)

Alfa	5,000000e-02
Error de grados de libertad	1,500000e+01
Error mínimos cuadrados	7,433654e-04
Valor crítico de desviación estándar	4,075974e+00

Diferencia mínima de significancia 0.04536876

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,70711	0,00000000
2 - 6	0,70711	0,00000000
3 - 6	0,70711	0,00000000
4 - 6	0,73995	0,02226156

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,7399500
a	1	0,7071100
a	2	0,7071100
a	3	0,7071100

b. Prueba Tukey para X2 (24 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,000709043
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0,04430901

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,7271100	0,00000000
2 - 6	0,7071100	0,00000000
3 - 6	0,7883583	0,01124833
4 - 6	0,7911983	0,02177944

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,7911983
a	3	0,7883583
ab	1	0,7271100
b	2	0,7071100

c. Prueba Tukey para X3 (48 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,001867238
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0.07190443

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,7399500	0,02226156
2 - 6	0,7071100	0,00000000
3 - 6	0,8286200	0,03957747
4 - 6	0,8424467	0,02006242

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,8424467
a	3	0,8286200
ab	1	0,7399500
b	2	0,7071100

d. Prueba Tukey para X4 (72 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,001867238
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0,1203688

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,8233367	0,06649211
2 - 6	0,8099500	0,02226156
3 - 6	0,8877483	0,07559503
4 - 6	0,8411116	0,07891024

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	3	0,8877483
ab	4	0,8411116
b	1	0,8233367
b	2	0,8099500

2.2. Comparación de medias según Prueba de Tukey en *E. cyparissius* F:

a. Prueba Tukey para X1 (12 h)

Alfa	5,000000e-02
Error de grados de libertad	1,500000e+01
Error mínimos cuadrados	7,433654e-04
Valor crítico de desviación estándar	4,075974e+00

Diferencia mínima de significancia 0,04536876

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,70711	0,00000000
2 - 6	0,70711	0,00000000
3 - 6	0,70711	0,00000000
4 - 6	0,73995	0,02226156

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,7399500
a	1	0,7071100
a	2	0,7071100
a	3	0,7071100

b. Prueba Tukey para X2 (24 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,000709043
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0.04430901

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,7271100	0,00000000
2 - 6	0,7071100	0,00000000
3 - 6	0,7883583	0,01124833
4 - 6	0,7911983	0,02177944

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,7511983
a	3	0,7183583
a	1	0,7071100
a	2	0,7071100

c. Prueba Tukey para X3 (48 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,001867238
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0.07190443

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,8199500	0,02226156
2 - 6	0,7871100	0,00000000
3 - 6	0,8286200	0,03957747
4 - 6	0,8424467	0,02006242

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	0,8424467
a	3	0,8286200
a	1	0,8199500
ab	2	0,7871100

d. Prueba Tukey para X4 (72 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,001867238
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0,1203688

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	0,8233367	0,06649211
2 - 6	0,8099500	0,02226156
3 - 6	0,8877483	0,07559503
4 - 6	0,8511116	0,07891024

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	3	0,8877483
a	4	0,8511116
b	1	0,8233367
b	2	0,8099500

2.3. Comparación de medias según Prueba de Tukey en *A. salina* K.:

a. Prueba Tukey para X1 (24 h)

Alfa	0,05000000
Error de grados de libertad	15,00000000
Error mínimos cuadrados	0,04398290
Valor crítico de desviación estándar	4,07597372

Diferencia mínima de significancia 0,3489777

Repetición .6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	1,0509720	0,1497413
2 - 6	0,9259000	0,2110498
3 - 6	0,9861667	0,1488702
4 - 6	1,3830620	0,2325824

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
a	4	1,3830620
ab	1	1,0509720
b	3	0,9861667
b	2	0,9259000

b. Prueba Tukey para X2 (48 h)

Alfa	0,050000000
Error de grados de libertad	15,000000000
Error mínimos cuadrados	0,000709043
Valor crítico de desviación estándar	4,075973722

Diferencia mínima de significancia 0.2099109

Repetición 6

Tratamientos:

N	Medias	Error estándar
1 - 6	1,546443	0,2668360
2 - 6	1,522545	0,2408808
3 - 6	1,503592	0,2270746
4 - 6	1,570837	0,2750414

Medias seguidas con la misma letra no difieren significativamente

Comparación de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Medias
ab	4	1,570837
b	1	1,546443
b	2	1,522545
b	3	1,503592

Apéndice 3. Modelos de tabla de evaluación de los bioensayos

Cuadro 19. Evaluación de bioensayos (en el ejemplo, *R. palmarum* L. con el extracto por decocción de *P. clavigera* y sus diferentes concentraciones)

HORA EVAL.	100										75										50										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	11:00am	28,0
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:00am	29,5
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	02:00pm	31,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	06:00pm	30,0
12	V	M	V	V	V	M	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:00pm	27,0
24	V	-	M	V	Vm	-	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	10:00am	28,5
48	V	-	-	M	V	-	M	V	M	V	Vm	M	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	M	V	V	Vm	V	M	V	Vm	10:00am	29,0
72	M	-	-	-	M	-	-	V	-	M	V	-	M	V	M	V	Vm	M	V	M	V	V	-	V	V	V	M	-	V	V	10:00am	28,0
Observaciones	A la 1h de evaluación solo giraban alrededor del alimento, empezaron a alimentarse a la 4h.										A la 1h de evaluación las larvas iniciaron su alimentación girando el alimento.										Todas las larvas se alimentaron desde el inicio del ensayo.											
HORA EVAL.	25										testigo										-----										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V											11:00am	28,0
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V											12:00am	29,5
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V											02:00pm	31,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V											06:00pm	30,0
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V											10:00pm	27,0
24	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V											10:00am	28,5
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V											10:00am	29,0
72	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V											10:00am	28,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.																					

Concentrac.	T°(°C)	Conduct(mV)	pH
100%	25,8	42,2	7,41
75%	25,5	44,1	7,18
50%	29,7	42,6	6,92
25%	29,5	41,0	6,85
Testigo	30,0	40,0	7,05
Disolvente	-	-	-

Fecha de ensayo: 27/01/2006
Hora de inicio : 10:00:00 a.m. 26,7 °C
Extracción : De cocción - acuosa (corteza)
Peso de extracto: 100 gr./Lt de agua.
Disolvente : ---
Estado Biológico: larva III
Vol. Solucion : 125 ml.
Peso alimento : 3,5 g.(1,3g/día)
Tiempo de inbibición: 30 segundos
Leyenda: V : Vivo
O : Moribundo
M : Muerto
Vm : Muda al IV estadio

Cuadro 20. Evaluación de bioensayos (en el ejemplo, *R. palmarum* L. con el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* y sus diferentes concentraciones).

HORA EVAL.	100										75										50										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:30am	22,5
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:30am	24,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:30am	28,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:30pm	26,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30pm	22,0
24	V	M	V	V	V	V	M	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	20,5
48	V	-	V	V	V	V	-	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	22,0
72	V	-	M	M	M	M	-	M	M	V	M	M	V	V	V	M	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	23,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											
HORA EVAL.	25										testigo										Disolvente										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:30am	22,5
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:30am	24,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:30am	28,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:30pm	26,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30pm	22,0
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	20,5
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	22,0
72	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	23,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											

Concentrac.	T°(°C)	Conduct(mV)	pH
100%	27,1	0,07	7,70
75%	27,5	0,05	7,20
50%	26,2	0,04	7,11
25%	26,9	0,02	6,98
Testigo	26,7	0,00	7,02
Disolvente	26,3	0,01	6,90

Fecha de ensayo: 21/02/2006
Hora de inicio : 08:30:00 a.m. 20,5 °C
Extracción : Hidroalcohólico(corteza)
Peso de extracto: 1gr./Lt de agua.
Disolvente : 11 gotas de alcohol
Estado Biológico: larva III
Vol. Solucion : 125 ml.
Peso alimento : 3,5 g.(1,3g/día)
Tiempo de inhibición: 30 segundos
Leyenda: V : Vivo
O : Moribundo
M : Muerto
Vm : Muda al IV estadio

Cuadro 21. Evaluación de bioensayos (en el ejemplo, *R. palmarum* L. con el extracto clorofórmico de *P. clavigera* y sus diferentes concentraciones).

HORA EVAL.	100										75										50										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:30am	22,5
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:30am	24,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:30am	28,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:30pm	26,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30pm	22,0
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	20,5
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	22,0
72	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	08:30am	23,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											
HORA EVAL.	25										testigo										Disolvente										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:30am	22,5
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:30am	24,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:30am	28,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:30pm	26,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30pm	22,0
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	20,5
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:30am	22,0
72	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vm	V	08:30am	23,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											

Concentrac.	T°(°C)	Conduct(mV)	pH
100%	24,8	39,6	7,40
75%	23,2	37,8	7,28
50%	20,3	40,0	7,20
25%	24,1	38,9	7,93
Testigo	22,5	39,1	7,02
Disolvente	22,3	41,2	6,93

Fecha de ensayo: 21/02/2006
Hora de inicio : 08:30:00 a.m. 20,5 °C
Extraccion : Cloroformico(corteza)
Peso de extracto: 1gr./Lt de agua.
Disolvente : 14 gotas de cloroformo
Estado Biológico: larva III
Vol. Solucion : 125 ml.
Peso alimento : 3,5 g.(1,3g/día)
Tiempo de inhibicion: 30 segundos
Leyenda: V : Vivo
O : Moribundo
M : Muerto
Vm : Muda al IV estadio

Cuadro 22. Evaluación de bioensayos (en el ejemplo, *R. palmarum* L. con el extracto hexánico de *P. clavigera* y sus diferentes concentraciones).

HORA EVAL.	100										75										50										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:00am	27,0
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:00am	28,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:00am	30,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:00pm	28,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00pm	22,5
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	25,0
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	23,5
72	V	Vm	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	24,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											
HORA EVAL.	25										testigo										Disolvente										hora	Temperatura(°C)
1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	09:00am	27,0
2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	10:00am	28,0
4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	12:00am	30,0
8	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	04:00pm	28,5
12	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00pm	22,5
24	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	25,0
48	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	23,5
72	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	08:00am	24,0
Observaciones	Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.										Todas las larvas de este tratamiento se alimentaron al inicio de la prueba.											

Concentrac.	T°(°C)	Conduct(mV)	pH
100%	28,0	73,0	6,45
75%	27,5	76,3	6,20
50%	27,5	76,1	6,03
25%	27,0	78,7	6,11
Testigo	27,0	48,2	6,99
Disolvente	27,5	63,9	6,78

Fecha de ensayo: 06/03/2006
Hora de inicio : 08:00:00 a.m. 20,5 °C
Extraccion : Hexanico(corteza)
Peso de extracto: 1gr./Lt de agua.
Disolvente : 12 gotas de Hexano
Estado Biológico: larva III
Vol. Solucion : 125 ml.
Peso alimento : 3,5 g.(1,3g/dia)
Tiempo de inibicion: 30 segundos
Leyenda: V : Vivo
O : Moribundo
M : Muerto
Vm : Muda al IV estadio

Apéndice 4. Iconografías de las actividades realizadas.

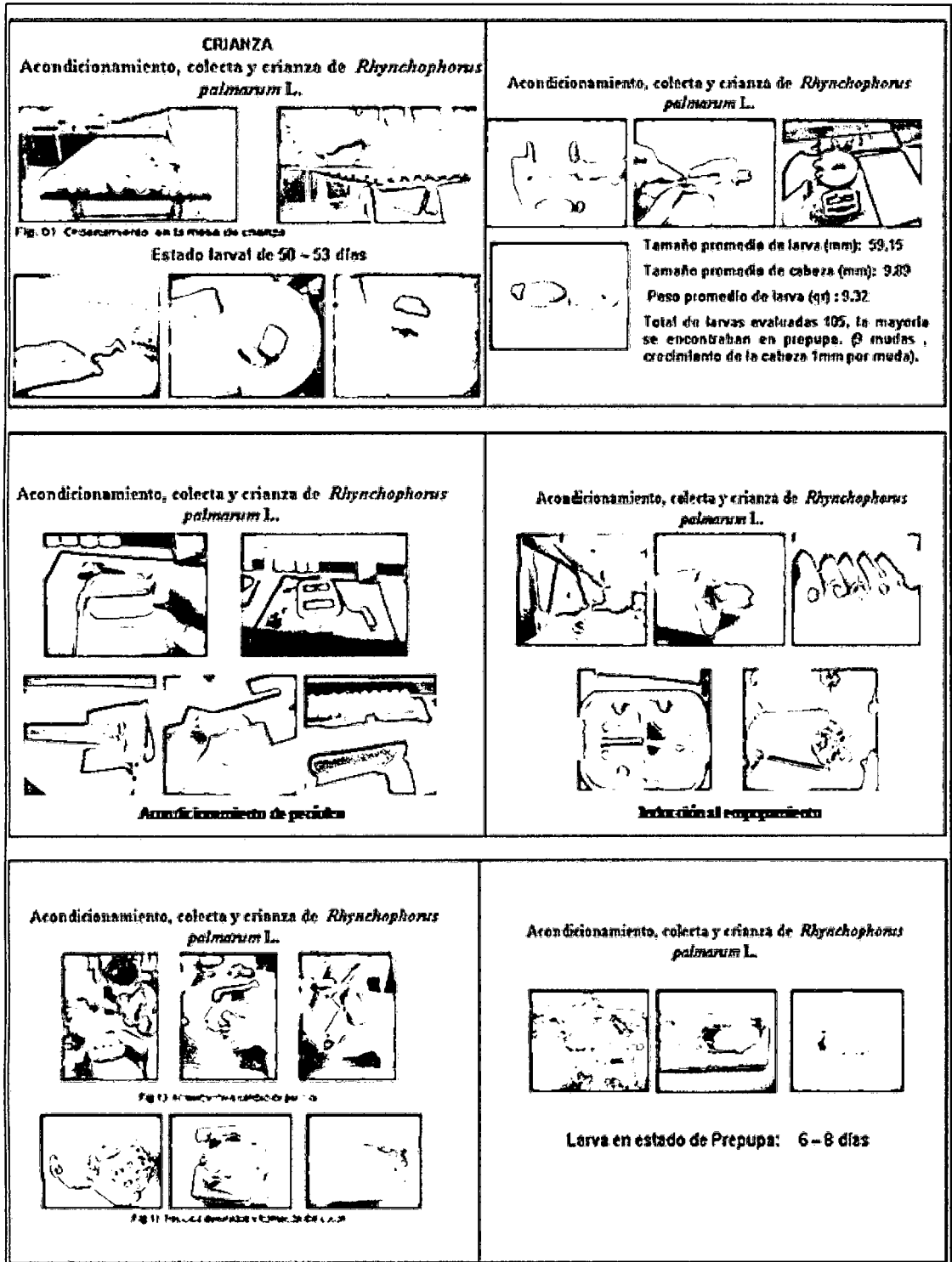


Figura 14. Proceso de acondicionamiento y crianza de *R. palmarum* L.

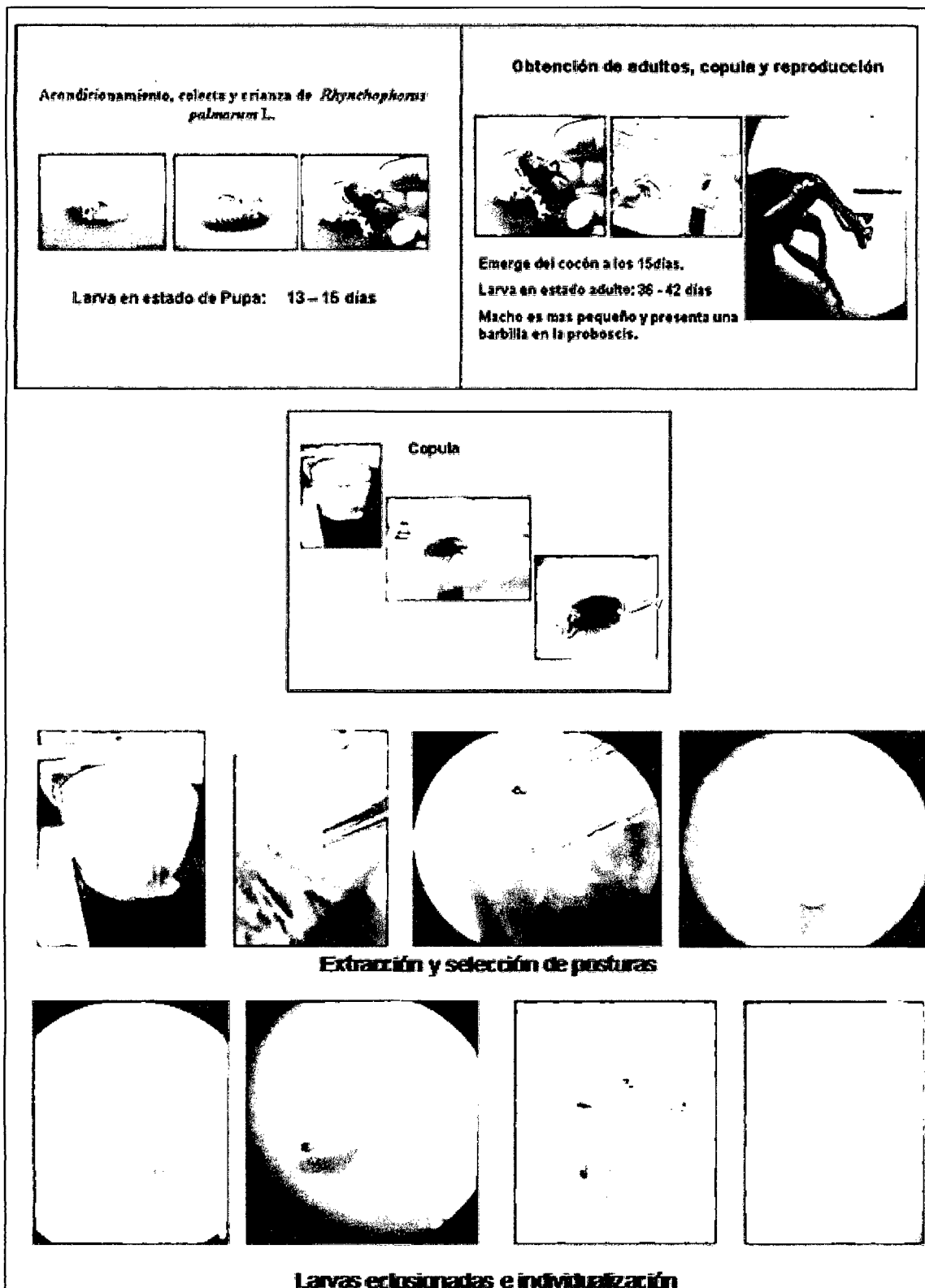


Figura 15. Obtención de adultos, apareamiento, eclosión de huevos y obtención de larvas de *R. palmarum* L.

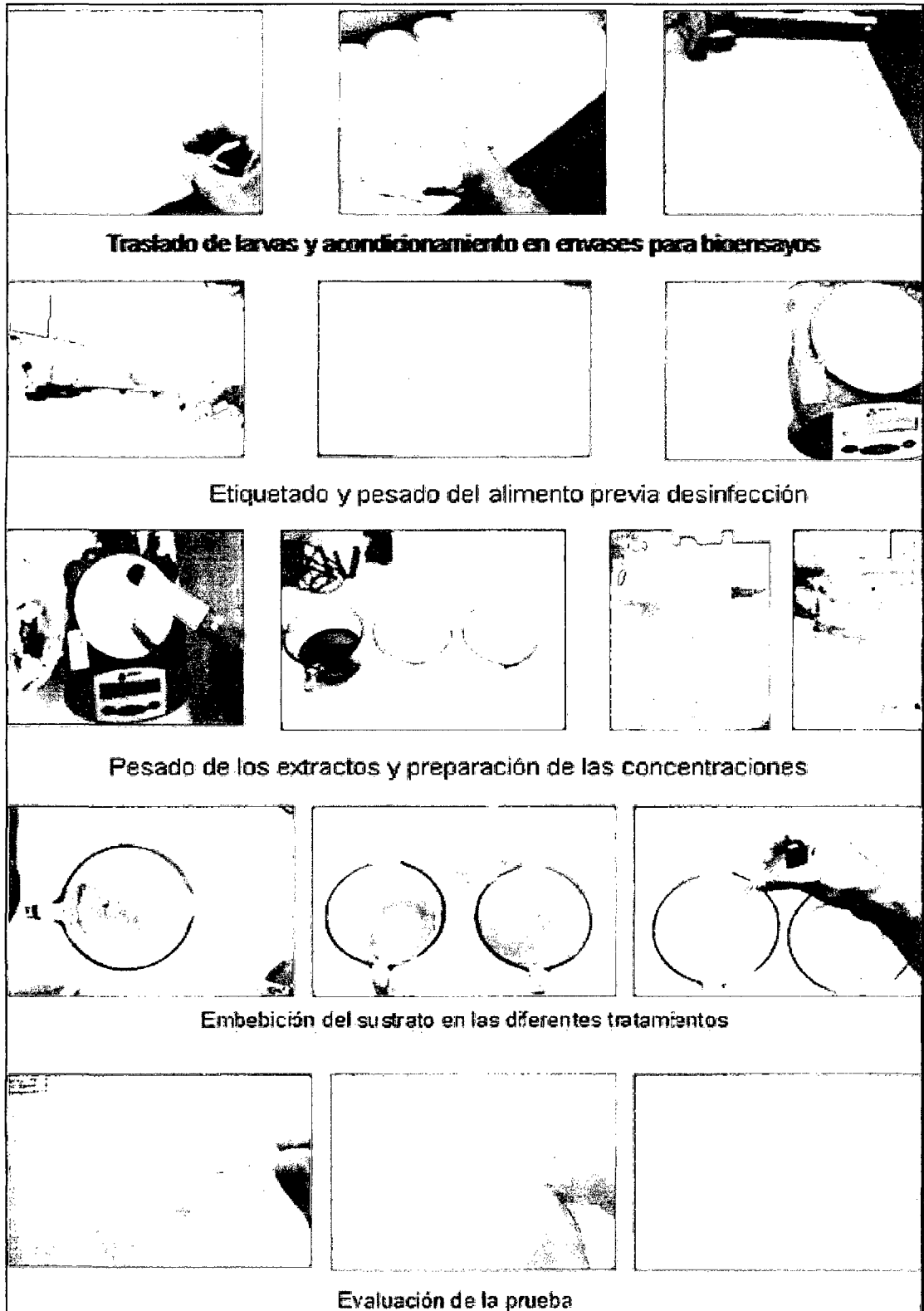


Figura 16. Acondicionamiento del material biológico para la ejecución de bioensayos con *R. palmarum* L.

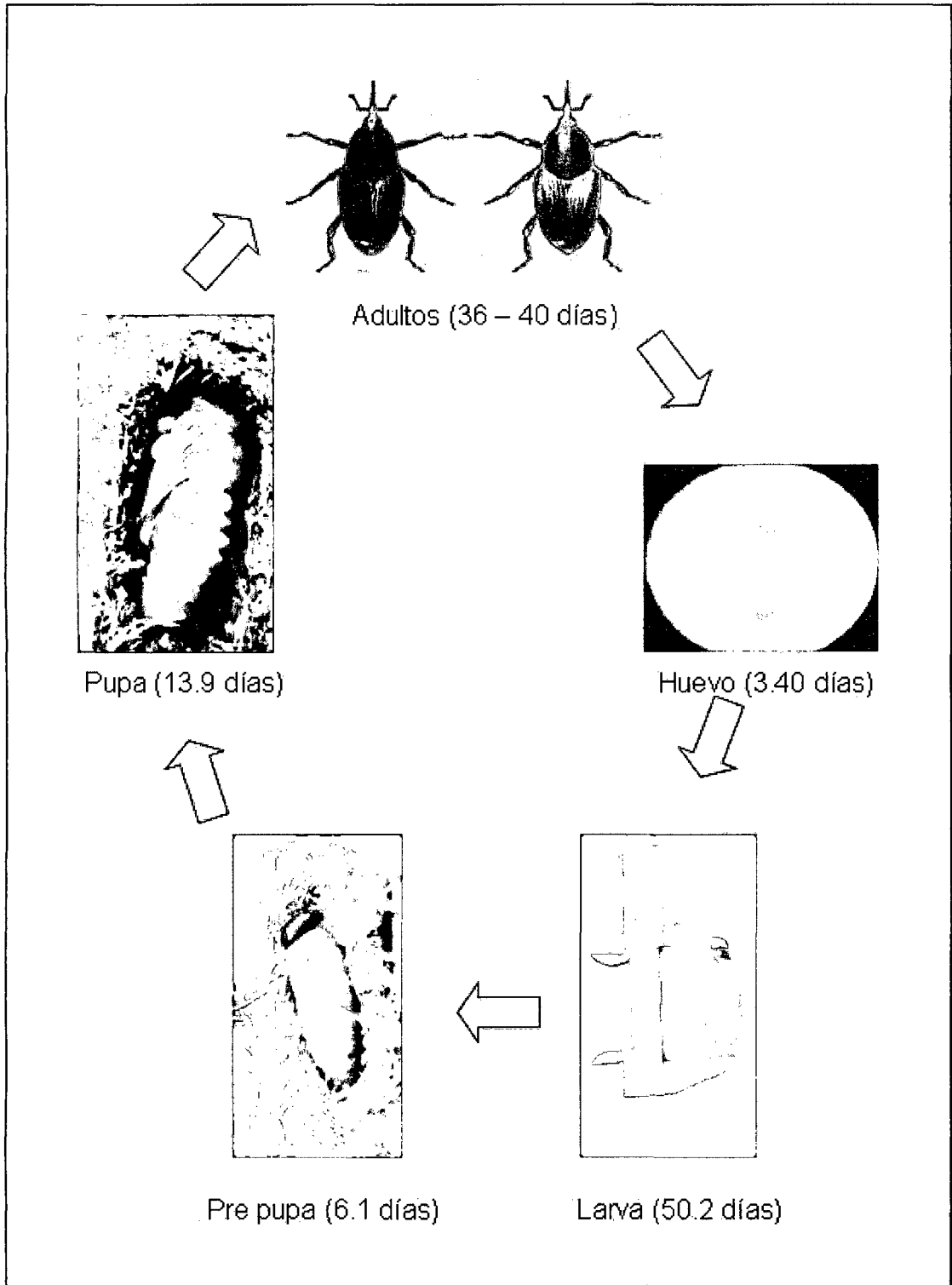


Figura 17. Ciclo biológico de *Rhynchophorus palmarum* L. (111.6 días).

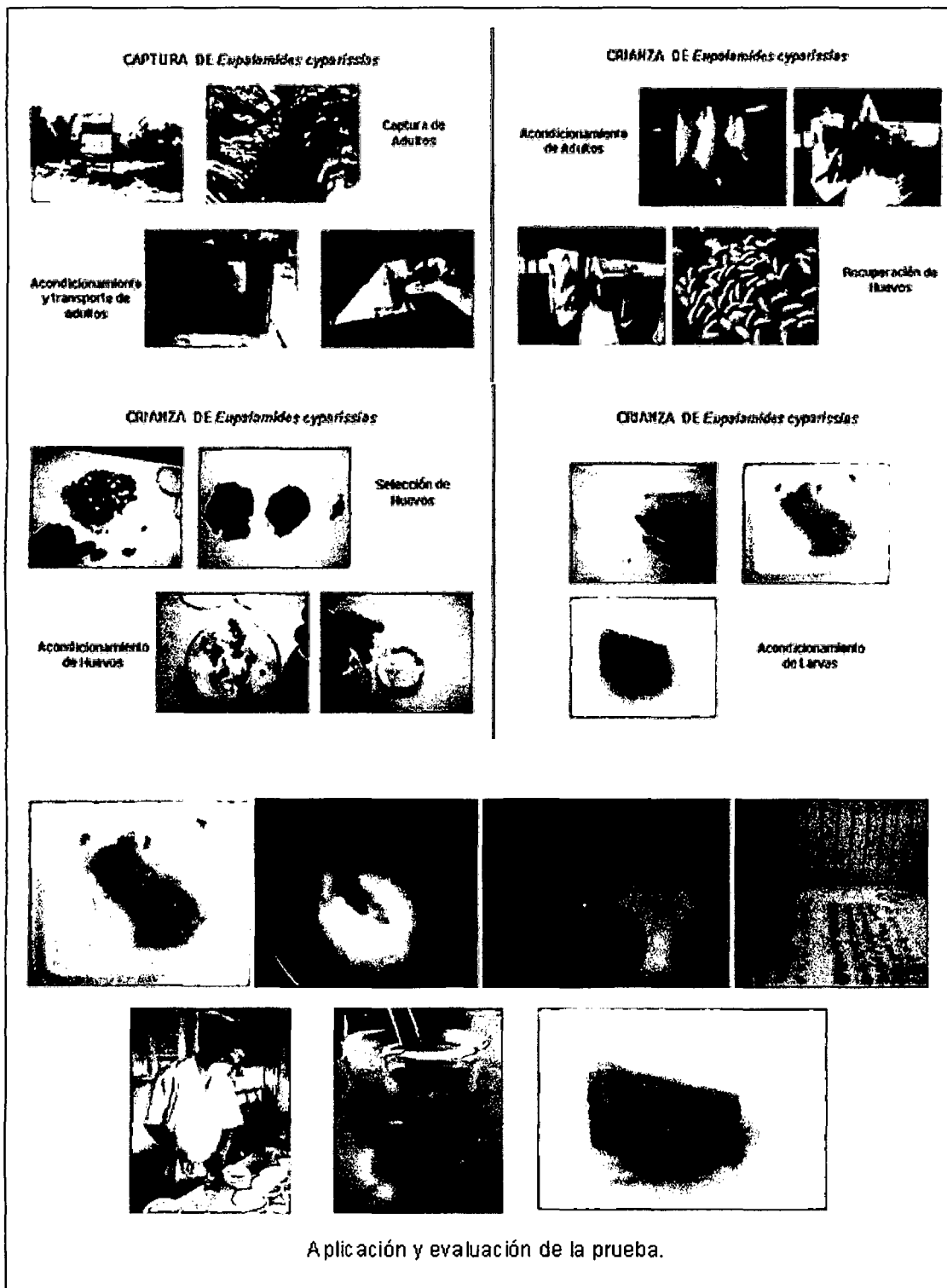


Figura 18. Colecta de adultos, obtención de huevos, obtención de larvas y bioensayos con *E. cyparissius* F.

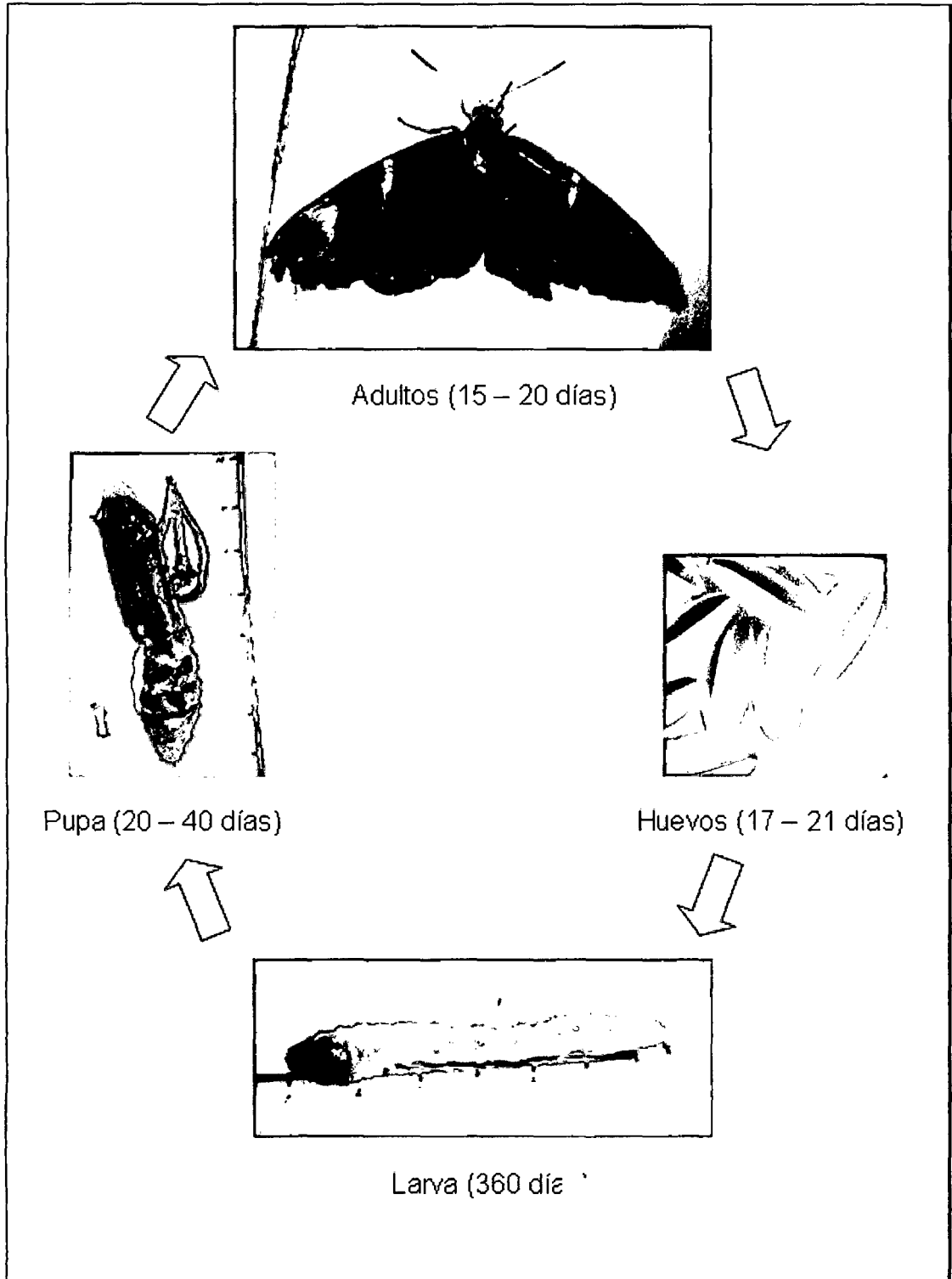


Figura 19. Ciclo biológico de *Eupalamides cyparissias* F. (401 días).

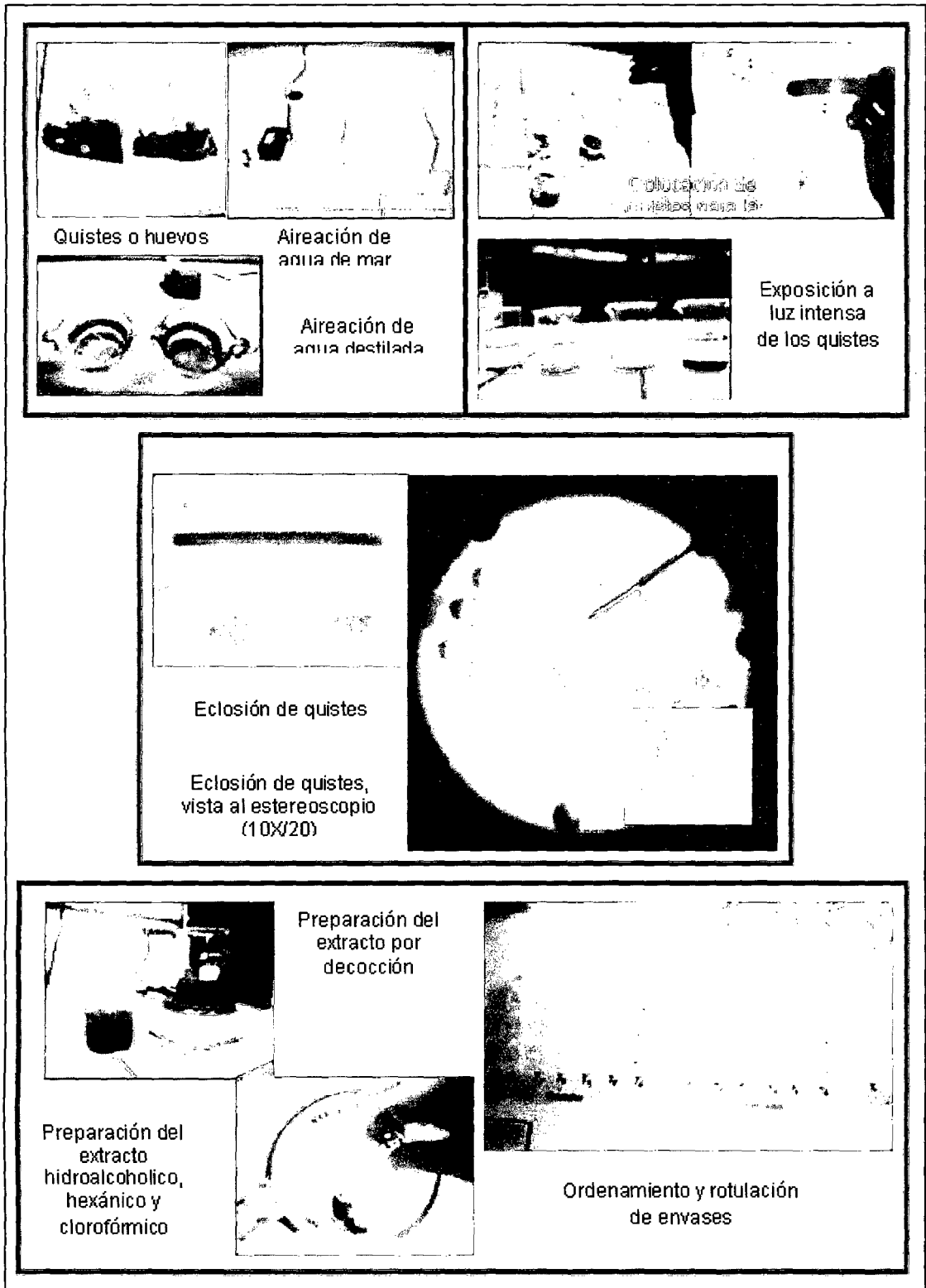


Figura 20. Eclosión de quistes y pruebas biológicas de *Artemia salina* K.

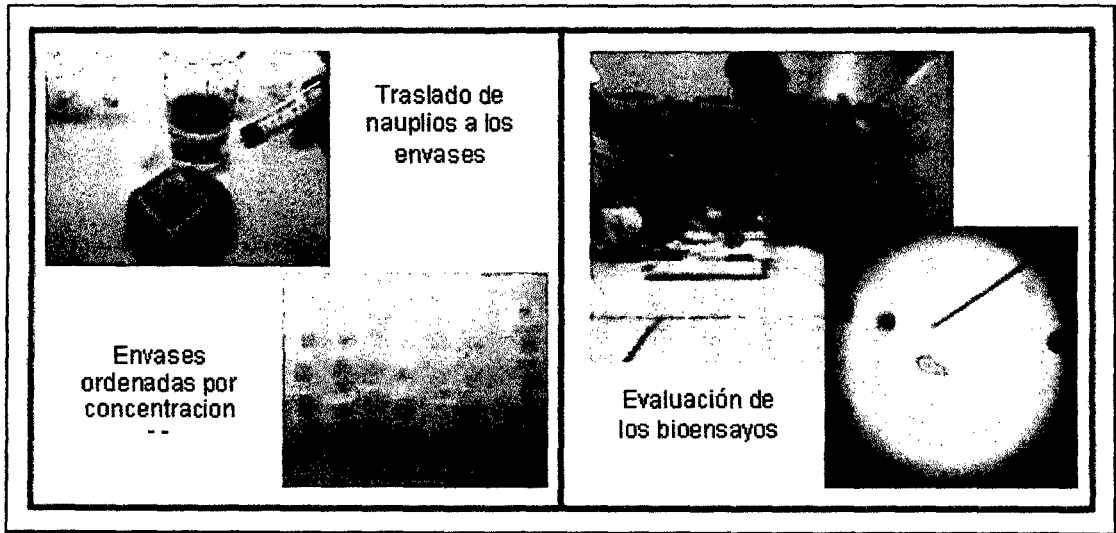


Figura 21. Acondicionamiento de envases y evaluación de bioensayos con *Artemia salina K.*