

ACTIVIDAD TOXICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE GUANÁBANA *ANNONA MURICATA* L. (ANNONACEAE) EN LARVAS DE MOSQUITO *Aedes Aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

GADIEL BERNABÉ-VILLANUEVA¹, PABLO RÍOS-ALVARADO¹, TEODORO BERNABÉ-GONZÁLEZ¹, JUAN PÉREZ-SALGADO¹ y ELÍAS HERNÁNDEZ-CASTRO^{2,3}

¹ Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria. Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Gro.

² Maestría en Sistemas de Producción Agropecuaria de la Universidad Autónoma de Guerrero, Campus Acapulco, Gro. Tel. 747 471 1034

³ Responsable de la publicación. eliashc_18@agropecstar.com.

ACTIVIDAD TOXICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE GUANÁBANA (*ANNONA MURICATA* L.) (ANNONACEAE) EN LARVAS DE MOSQUITO *Aedes Aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

RESUMEN: Se evaluó el efecto de los extractos acuosos de las hojas, ramillas y semillas de la guanábana (*Annona muricata* L.), tratadas en fresco, secadas al sol y a la sombra, sobre la mortalidad en larvas de cuarto estadio del mosquito *Aedes aegypti* L., en laboratorio. Los extractos en infusión y macerado, se prepararon en solución al 3.5% y se dejaron reposar durante 24 horas antes de su aplicación. Los bioensayos consistieron en colocar 20 larvas en un vaso de plástico con 100 ml de agua y se agregaron dosis de 40 u 80 ml de cada extracto preparado. Los porcentajes de mortalidad, se transformaron al arco-seno de la raíz cuadrada del porcentaje, y posteriormente, se realizó un análisis de varianza. Se establecieron como prometedores, los tratamientos que lograron una mortalidad mayor o igual al 30%. A las 24 horas después de la exposición de las larvas en los extractos, 15 de los 36 tratamientos, presentaron una mortalidad de 33.9 a 66.4%, y después de 48 horas, 20 tratamientos incluyendo los 15 anteriores, alcanzaron una mortalidad entre 32.1 y 85.3%. Se presentaron diferencias altamente significativas entre los factores en estudio. La mayor toxicidad se presentó en la semilla fresca, en el extracto en infusión y en la dosis a 80 ml.

PALABRAS CLAVE: extractos acuosos, *Aedes aegypti*, *Annona muricata*, mosquitos.

TOXIC ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF FROM CUSTARD APPLE *ANNONA MURICATA* L. (ANNONACEAE) ON LARVAE OF MOSQUITO *Aedes Aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

ABSTRACT: The effect of aqueous extracts from leaves, twigs and seeds of custard apple (*Annona muricata*) utilized in fresh, sun-dried and shade-dried were evaluated on the mortality of the four-instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in laboratory. Infusion y macerated were prepared at 3.5% and stayed quiet during 24 hours before its application. The bioassays consisted in placed 20 larvae in a plastic container with 100 ml of water with doses of 40 or 80 ml of each extract previously preparation. Mortality percentages were transformed in arc-sine of square root of percentages, and after of this, an analysis of variance was realized. Treatments that showed mortality rates equal or upper at 30% were considered promising. After 24 hours of exposition of larvae in the extracts, 15 of 36 treatments reaching mortality rates between 33.9 and 66.4%, and after 48 hours, 20 treatments are including the 15 preceding produced mortality rates between 32.1 and 85.3%. There were higher significant differences among the factors studied. The highest toxicity was presented in the seed fresh, extract in infusion and the dose at 80 ml.

KEY WORDS: water extracts, *Aedes aegypti*, *Annona muricata*, mosquitoes.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos constituyen uno de los problemas sanitarios más importantes para el hombre por ser vectores de organismos patógenos tales como plasmodios, filarias, y virus; los géneros de culícidos que destacan en la transmisión de estos organismos son *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* (Harwood y James, 1987; Ibáñez, 1989).

Estos insectos se encuentran en muchas zonas climáticas y su proliferación está relacionada con factores climáticos y geográficos que determinan la existencia de depósitos de agua naturales o artificiales. La población de mosquitos puede descender considerablemente bajo condiciones de estrés, así como también puede aumentar notablemente en condiciones climáticas favorables (Sazonova, 1992).

En México el mosquito *Aedes aegypti* es el vector del virus del dengue y representa un serio problema de salud (Montesano y Ruiz 1995). En el estado de Guerrero, a partir del año 1984 al 2000 se registraron más de 500 casos de dengue hemorrágico (Secretaría de Salud, 2001).

El control de este vector se ha basado principalmente en el uso de insecticidas, los cuales han tenido un papel fundamental en la lucha contra vectores de enfermedades tropicales durante casi medio siglo. Esto ha traído consigo el desarrollo de resistencia a insecticidas, aunado a la presión que el uso agrícola insecticidas ejerce sobre los mosquitos. En algunos vectores se ha registrado resistencia múltiple a un amplio número de insecticidas (Penilla *et al.*, 1998).

La búsqueda de nuevas moléculas insecticidas para el manejo de vectores sigue siendo atractiva, debido a su facilidad de aplicación e implicaciones comerciales para usuarios y fabricantes potenciales. Además, la tendencia actual es hacia la sustitución de los productos organosintéticos en la agricultura por aquellos de origen natural (Boeke *et al.*, 2004; George *et al.*, 2000).

Se calcula que deben existir aproximadamente 10,000 metabolitos secundarios en muchas especies

vegetales que actúan en contra de varios organismos como insectos, ácaros, nematodos, etc. Se conocen 2,400 plantas con este tipo de propiedad y una lista de 1,000 plantas más que se usan en problemas semejantes en medicina humana y veterinaria (Grainge y Ahmed, 1988). Recientemente, se han probado diversos extractos vegetales ya sea contra larvas o estados adultos de insectos vectores o agentes causales de enfermedades al humano. Se tienen reportes en los que se señala que el aceite del neem *Azadirachta indica* preparado en cremas es efectivo y protege contra las picaduras de los mosquitos *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (Rodríguez, 1986 y 1999). El aceite del epazote (*Teloxys ambrosioides*), los extractos crudos aislados de las semillas de *Erythrina americana* y los extractos acuosos de *Annona squamosa* (semilla), *A. muricata* (flor y hojas) e *Hibiscus sabdariffa* (flor y hojas), provocan alta mortalidad en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Rodríguez, 2000; García-Mateos *et al.*, 2001; Pérez-Pacheco *et al.*, 2001, 2004). Los principios activos de las anonas pertenecen a las acetogeninas y a los alcaloides y son entre otros anonacina, anonaina, asimisina, bulatacina, muricina y linoclina, los cuales se encuentran principalmente en la corteza y la semilla, aunque también se han encontrado en la raíz, el fruto y en las hojas (Rodríguez *et al.*, 2000).

Con base a lo anterior y considerando que existen posibilidades de utilizar extractos vegetales para el control de los mosquitos, en el presente estudio se planteó como objetivo determinar el efecto tóxico de extractos acuosos provenientes de las hojas, ramillas y semillas de la guanábana *Annona muricata* sobre larvas de cuarto instar del mosquito *A. aegypti* y así contribuir al conocimiento y uso de insecticidas botánicos, de fácil aplicación, con menor riesgo de contaminación y sobre todo, de bajo costo económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se realizaron en el laboratorio de biotecnología de la Unidad Académica de Ciencias

Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, México, la cual se ubica en las coordenadas 17°10' al Norte, al Sur 17° 10' de latitud; al Este 99° 23', al Oeste 100° 04' de Longitud. El clima es semicálido, siendo el más seco de los subhúmedos, con lluvias en verano y lluvia invernal menor al 5% del total anual según clasificación propuesta por Koppen y modificada por García (1981), con una precipitación pluvial promedio de 881.1mm y temperatura media de 21.9 °C (INEGI, 2001). El experimento se desarrolló a partir del mes de agosto de 2004 y culminó en enero de 2005.

Colecta de larvas y cría del mosquito: Las larvas de *A. aegypti* se colectaron del interior de una llanta usada localizada, en un terreno baldío de la ciudad de Chilpancingo. Las larvas, se colocaron en agua dentro de frascos de vidrio de boca ancha de 750 ml de capacidad y cubiertos con tela con orificios finos. Al transformarse en pupas, los frascos se instalaron dentro de una jaula entomológica de 55 x 33 x 25 cm, para la emergencia de adultos. En el interior de la jaula se pusieron platos de plástico de 19 x 13 x 3 cm, con agua para la oviposición de las hembras. Las hembras obtuvieron sangre de pollo, el cual se inmovilizó previamente y se introdujo por las noches a la jaula. Los huevecillos depositados en los platos de plástico se colocaron en frascos de vidrio de 2,000 ml para su eclosión y así continuar el ciclo biológico. Las larvas se alimentaron cada tercer día con croquetas para perro previamente molidas finamente (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004).

Material vegetal: Las hojas, ramillas y semillas de la guanábana, se obtuvieron de árboles ubicados en huertas de traspatios en Chilpancingo. Parte de este material fresco, se fragmentó y utilizó de manera inmediata, mientras que otra parte se deshidrató en dos formas: una secada al sol durante 15 días y la otra, colocando el material sobre papel periódico a la sombra con suficiente ventilación durante 25 días. Una vez deshidratado,

se fragmentó y pulverizó guardándose en frascos de vidrio ámbar.

Se elaboraron por separado, extractos acuosos en infusión y macerado de las hojas, ramillas y semillas tanto del material fresco como del material deshidratado al sol y a la sombra. Los extractos se prepararon al 3.5%, agregando 35 g del material fragmentado o en polvo en 1,000 ml de agua. La infusión se preparó agregando el material vegetal al agua a punto de ebullición e inmediatamente se dejó enfriar. El macerado se preparó agregando el material vegetal al agua a temperatura ambiente y se agitó suavemente por tres minutos. Ambos extractos se dejaron 24 horas en reposo y después se filtraron para eliminar la parte sólida (Villanueva *et al.*, 1999; Pérez-Pacheco *et al.*, 2001, 2004).

Bioensayos: Se colocaron 20 larvas de *A. aegypti* de cuarto estadio temprano en vasos de plástico de 200 ml de capacidad, a los que previamente se les agregaron 100 ml de agua. Enseguida con la infusión o con el macerado, se aplicaron dosis de 40 y 80 ml, respectivamente. Además, se preparó un testigo al que no se le aplicó ningún tipo de extracto. La experimentación fue de plan trifactorial (9 x 2 x 2), completamente aleatorio. El factor **A** fueron los órganos de la planta con nueve niveles (hoja fresca, secada al sol, secada a la sombra, etc.). El factor **B** fue el extracto acuoso con dos niveles (infusión y macerado) y el factor **C**, fue la concentración y dosis de aplicación con dos niveles (40 y 80 ml), por lo que, se realizaron 36 tratamientos con cuatro repeticiones (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).

Registro y análisis de datos: La mortalidad de las larvas se registró a las 24 y 48 horas después de la aplicación de los extractos. No se realizó ninguna corrección en la mortalidad, ya que en los testigos no hubo larvas muertas. Para calcular el porcentaje de mortalidad por no presentar una distribución normal, se transformó al arco-seno de la raíz cuadrada del porcentaje (Steel y Torrie,

1980). Con estos valores se realizó el análisis de varianza y la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey, para $\alpha = 0.05$. Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SAS® (SAS, 1988). Se consideraron prometedores los tratamientos que ocasionaron una mortalidad mayor o igual al 30%, a las 24 y 48 horas de exposición de las larvas (Pérez-Pacheco *et al.*, 2001).

RESULTADOS

Mortalidad a las 24 horas de aplicación de los extractos

En 15 tratamientos la mortalidad fue mayor al 30% previamente establecido. Los valores fluctuaron entre 33.9 a 66.4%, en donde el análisis de varianza mostró que la hoja secada a la sombra en macerado a 80 ml, la hoja verde en infusión a 40 y 80 ml, la semilla secada a la sombra en infusión a 80 ml, y la semilla verde o fresca en infusión a 80 ml y macerado a 40 y 80 ml, formaron un grupo con los valores de medias más altos del porcentaje, sin diferencia significativa entre ellos. Los 21 tratamientos restantes, mostraron un porcentaje menor al establecido, sobre todo, las ramillas en todas sus formas tratadas (Cuadro 1).

Mortalidad a las 48 horas de aplicación de los extractos

A las 48 horas de exposición de las larvas a los extractos, a los 15 tratamientos anteriores, se unieron otros cinco más, que fueron: la hoja secada al sol en macerado a 40 y 80 ml, la hoja secada a la sombra en macerado a 40 ml, la semilla secada al sol en infusión a 40 ml, y la semilla secada a la sombra en macerado a 80 ml. Los valores de los porcentajes fueron entre 32.1 y 85.3%. De acuerdo al análisis de varianza, las mejores medias fueron para la hoja verde en infusión a 40 y 80 ml, sin diferencia significativa entre ellas, seguidas por el tratamiento formado por la semilla verde en macerado a 80 ml. (Cuadro 1).

Cuadro 1

Porcentaje de larvas muertas a las 24 y 48 horas en larvas de cuarto estadio de *A. aegypti*, con extractos en infusión y macerado a 40 y 80 ml, de las hojas, ramillas y semillas de la guanábana *A. muricata*.

Tratamientos	24 horas %	48 horas %
Hsol-Inf-40	6.46ij	15.6mnopq
Hsol-Inf-80	17.0fghij	21.5lmno
Hsol-Mac-40	18.1fghij	32.1ijklm
Hsol-Mac-80	23.7efgh	36.1hijkl
Hsom-Inf-40	41.3bc	67.8abcd
Hsom-Inf-80	54.5ab	62.6bcd
Hsom-Mac-40	28.9cdef	54.8cdefg
Hsom-Mac-80	56.9a	63.0bcde
Hver-Inf-40	62.6a	85.3a
Hver-Inf-80	62.6a	85.3a
Hver-Mac-40	17.0fghij	21.5lmno
Hver-Mac-80	22.6efgh	28.1jklmn
Rsol-Inf-40	9.6hijk	14.3nopq
Rsol-Inf-80	11.0ghijk	16.7mnopq
Rsol-Mac-40	9.6hijk	12.9nopq
Rsol-Mac-80	19.2efghi	22.6klmno
Rsom-Inf-40	6.4ijk	9.6opq
Rsom-Inf-80	6.4ijk	12.9nopq
Rsom-Mac-40	9.6hijk	12.9nopq
Rsom-Mac-80	6.4ijk	9.6opq
Rver-Inf-40	6.4ijk	9.6opq
Rver-Inf-80	14.3fghijk	17.8mnop
Rver-Mac-40	0.0k	0q
Rver-Mac-80	3.2jk	3.2pq
Ssol-Inf-40	26.4cdefg	52.2defgh
Ssol-Inf-80	39.8bcd	69.3abcd
Ssol-Mac-40	33.9cde	48.6efghi
Ssol-Mac-80	52.3ab	70.9abc
Ssom-Inf-40	53.7ab	66.7bcd
Ssom-Inf-80	57.6a	67.5bcd
Ssom-Mac-40	34.5cde	43.5fghij
Ssom-Mac-80	25.6defg	39.9ghijk
Sver-Inf-40	54.5ab	58.4cdef
Sver-Inf-80	58.4a	68.8abcd
Sver-Mac-40	56.9a	67.5bcd
Sver-Mac-80	66.4a	78.9ab

H, R y S = hojas, ramillas y semillas; sol, som y ver = secado al sol, secado a la sombra y verde o fresco. Inf-40 = infusión, con 40 ml. Mac-80 = macerado, con 80 ml. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey $\alpha = 0.05$. Valores en negritas indican los mejores tratamientos con porcentaje mayor al 30%.

Efecto de los factores órgano, extracto, dosis e interacción

En la mortalidad tanto a las 24 como 48 horas, hubo diferencias altamente significativas entre los factores órgano, extracto y dosis. El mejor órgano fue la semilla verde o fresca, seguida por la hoja secada a la sombra. El extracto en infusión resultó ser mejor que el macerado, y la mejor dosis de concentración fue a 80 ml (Cuadros 2 y 3).

En la interacción órgano*extracto, en algunos casos se incrementó la mortalidad con la infusión, mientras que en otros fue al contrario; por lo que, el extracto depende de determinado órgano. En la interacción órgano-dosis, en la mayoría de los órganos aumentó la mortalidad al incrementar la dosis de concentración; sin embargo, algunos órganos mostraron mayor efecto en la mortalidad que otros. En la interacción extracto-dosis, la diferencia no fue significativa; la infusión y el macerado se comportaron de manera similar con las dosis de 40 y 80 ml. Los extractos incrementaron el porcentaje de mortalidad al aumentar la dosis de concentración. Por último, en la interacción órgano-extracto-dosis, a las 24 horas, la diferencia fue sólo significativa, ya que en la mayoría de los órganos y en los extractos tanto en infusión como en macerado, la mortalidad aumentó al mismo tiempo que se incrementó la dosis de concentración. Mientras que a las 48 horas, la diferencia no fue significativa; por lo que, en cada

Cuadro 2

Efecto del factor órgano de la guanábana (*A. muricata*) en el porcentaje de mortalidad acumulado a las 24 y 48 horas de exposición de las larvas de cuarto instar de *A. aegypti*, en los extractos acuosos.

Órgano de <i>A. muricata</i>	24 horas Media %	48 horas Media %
Semilla verde o fresca	59.1a	68.4a
Hoja secada a la sombra	45.4b	62.1ab
Semilla secada a la sombra	42.8bc	54.4c
Hoja verde o fresca	41.2bc	55.1bc
Semilla secada al sol	38.1c	60.3bc
Hoja secada al sol	16.3d	26.3d
Ramilla secada al sol	12.4de	16.6e
Ramilla secada a la sombra	7.2ef	11.3ef
Ramilla verde o fresca	5.9f	7.6f

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey $\alpha = 0.05$.

uno de los tratamientos las diferencias de medias fueron similares tanto en los extractos como en las dosis de aplicación.

DISCUSIÓN

Se observó que la mortalidad acumulada a las 48 horas de exposición de las larvas a los extractos fue

Cuadro 3

Efecto de los factores extracto y dosis de la guanábana (*A. muricata*) en el porcentaje acumulado a las 24 y 48 horas de exposición, en los extractos acuosos sobre las larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

Tipo	Extracto		ml	Dosis	
	24 horas Media %	48 horas Media %		24 horas Media %	48 horas Media %
Infusión	32.7a	44.6a	80	33.2a	43.0a
Macerado	26.9b	35.9b	40	26.4b	37.4b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey $\alpha = 0.05$.

mayor a la observada a las 24 horas. Sin embargo los resultados del presente estudio difieren de los obtenidos por Pérez-Pacheco *et al.* (2001), en donde al evaluar varios extractos vegetales, entre los que estuvieron los de *A. muricata* y *A. squamosa*, la mortalidad que estos presentaron a las 24 y 48 horas fue mayor a las encontradas en esta investigación; esto puede deberse a la diferencia en el preparado y concentración de los tratamientos.

Al parecer, los órganos secados a la sombra y algunos tratados en verde o fresco, mantienen una concentración de sustancias activas más o menos similar. Las partes de la planta secados al sol fueron menos eficientes, debido a que la luz solar inactivó en parte a las sustancias activas, excepto en la semilla, tal vez porque su cubierta actuó como barrera contra los rayos solares.

En el extracto, la infusión resultó mejor, debido tal vez, a que las sustancias activas fueron más solubles en agua caliente. La dosis a 80 ml, fue más efectiva por tener el doble de concentración de sustancias activas que la dosis a 40 ml. Por otro lado, es importante mencionar que estos plaguicidas botánicos, además de ser más baratos que el producto activo puro, al ser una mezcla de componentes puede retrasar la aparición de fenómenos de resistencia (Castañera, 1998).

CONCLUSIÓN

Se determinó que en 15 de los 36 tratamientos, a las 24 horas de observación, y en 20 tratamientos a las 48 horas, los extractos acuosos en infusión y/o macerado de las hojas y semillas de la guanábana, tuvieron efecto tóxico contra las larvas de cuarto estadio del mosquito *A. aegypti*, no así las ramillas, cuyos porcentajes de mortalidad fueron bajos.

El análisis de varianza indicó que los órganos con mayor efecto a las 24 y 48 horas fueron la semilla verde seguida por la hoja secada a la sombra. El mejor extracto fue la infusión y la mejor dosis fue a 80 ml.

Con los resultados obtenidos se tiene la posibilidad de combatir al mosquito *A. aegypti*, con los extractos de los órganos estudiados de la guanábana, no sin antes realizar otro tipo de extracciones y evaluar el efecto que se tendría al realizar su aplicación a los cuerpos de agua.

LITERATURA CITADA

- BOEKE, S. J., I. R. BAUMGART, J. J. A. VAN LOON, A. VAN HUIS, M. DICKE AND D. K. KOSSOU. 2004. Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against (*Callosobruchus maculatus*). *J. Stored Products Res.* 40: 423-438
- CASTAÑERA, D. P. 1998. Protección natural de plantas contra plagas: metabolitos secundarios. *Memorias del I Simposio Internacional y IV Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas.* Rodríguez H. C. (Ed). Acapulco, Gro., México. p 174-187.
- GARCÍA, E. 1981. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen.* Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F. 244 p.
- GARCÍA-MATEOS, R., R. PÉREZ-PACHECO, C. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, M. SOTO-HERNÁNDEZ. 2001. Evaluación de la toxicidad de (*Erythrina americana*) (Fabaceae) en larvas de mosquitos (*Culex quinquefasciatus*) (Diptera: Culicidae). *Memorias del II Simposio Internacional y VII Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas.* Rodríguez H. C. (Ed). Querétaro, Qro., México. p 35-41.
- GRAINGE M. AND S. AHMED. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. *John Wiley & Sons. New York, USA.* 470p.
- GEORGE, J., H. P. BAIS Y G. A. RAVISHANKAR. 2000. Biotechnological Production of Plant-Based Insecticides *Critical Reviews in Biotechnology* 20: 49-77.
- HARWOOD, R. F. Y M. T. JAMES. 1987. *Entomología médica veterinaria.* Ed. Limusa. México, D. F. pp 201-272
- INEGI, 2001. Cuaderno Estadístico municipal, de Chilpancingo de los Bravos. Estado de Guerrero. México.
- IBÁÑEZ, B. S. 1989. Los dípteros hematófagos de México. En IV Simposium Nacional de Entomología Médica Veterinaria. Memoria. Oaxtepec, Morelos. p 81-98
- LAGUNES-TEJEDA, A., J. A. VILLANUEVA-JIMÉNEZ. 1999. *Toxicología y manejo de insecticidas.* Colegio de Postgraduados en Ciencia Agrícolas. México. 264 pp.
- MONTESANO-CASTELLANOS Y R, RUIZ-MATUS C. 1995. Vigilancia epidemiológica del dengue en México. *Salud Pública Mex.* 37 (Supl):64-76.
- PENILLA, R. P., RODRÍGUEZ, A. D., HEMINGWAY J., TORRES, J. L., ARREDONDO-JIMÉNEZ J. AND RODRÍGUEZ, M. H. 1998. Resistance management strategies in malaria mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 12:217-233.

- PÉREZ-PACHECO, R., C. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R. MONTES-BELMONT, J. LARA-REYNA. 2001. Evaluación de extractos vegetales sobre larvas de mosquito (*Culex quinquefasciatus*) (Díptera: Culicidae). *Memorias del II Simposio Internacional y VII Nacional sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas*. Rodríguez H. C. (Ed). Querétaro, Qro., México. p 87-96.
- PÉREZ-PACHECO, R., C. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J. LARA-REYNA, R. MONTES B., G. RAMÍREZ V. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* 20 (1): 141-152.
- RODRÍGUEZ, A. T.; MORALES D. Y RAMÍREZ, M. A. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *In Vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*. Volumen 21 Número 2. 79-82 pp.
- RODRÍGUEZ, H. C. 1986. Actividad tóxica de *Centrum spp.* (Solanaceae) en larvas del mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Méx. 83p.
- RODRÍGUEZ, H. C. 1999. Recetas de Nim *Azadirachta indica* (Meliaceae) contra plagas. *Memorias del V Simposio Nacional sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas*. Rodríguez H. C. (Ed). Aguascalientes, Ags., México. p 39-59.
- RODRÍGUEZ, H. C. 2000. Propiedades plaguicidas del epazote *Telexys ambrosioides* (Chenopodiaceae). *Memorias del VI Simposio Nacional sobre Substancias y Minerales en el Combate de Plagas*. Rodríguez H. C. (Ed). Acapulco, Gro., México. p 95-110.
- SAS. 1988. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Ed. SAS Institute Incorporation, Cary, NC. USA. 1028 p.
- SAZONOVA, O. N. 1992. The role of bloodsucking mosquitoes in ecosystems. Review *Entomological*. 71:48-49.
- SECRETARÍA DE SALUD. Sistema único de información y vigilancia 2001. Casos por entidad federativa de enfermedades transmisibles por vector. Vigilancia Epidemiológica. Semana 52, 2001, cuadro 7.1. Secretaría de Salud, México, D.F.
- STEEL, R. G. D., J. H. TORRIE. 1980. *Principles and procedure of statistics. A biometrical approach*. Mc Graw-Hill Kogasusha, LTD. 633 p.
- VILLANUEVA, J. J. A., J. C. RODRÍGUEZ M., A. LAGUNES T. 1999. Extractos acuosos de frutos vegetales sobre larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Memorias del V Simposio Nacional sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas*. Rodríguez H. C. (Ed). Aguascalientes, Ags., México. p 71-79.