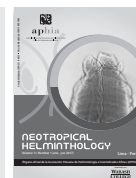




Neotropical Helminthology



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

TOXICITY OF FIVE BOTANICAL AQUEOUS EXTRACTS ON *PANAGRELLUS REDIVIVUS* (NEMATODA: PANAGROLAIMIDAE), *DAPHNIA MAGNA* (CRUSTACEA: DAPHNIIDAE), *LEMNA MINOR* (ARACEAE) AND *RAPHANUS SATIVUS* (BRASSICACEAE)

TOXICIDAD DE CINCO EXTRACTOS ACUOSOS BOTÁNICOS SOBRE *PANAGRELLUS REDIVIVUS* (NEMATODA: PANAGROLAIMIDAE), *DAPHNIA MAGNA* (CRUSTACEA: DAPHNIIDAE), *LEMNA MINOR* (ARACEAE) Y *RAPHANUS SATIVUS* (BRASSICACEAE)

Hildebrando Ayala¹; José Iannacone^{1,2} & Lorena Alvaríño¹

¹Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Escuela Profesional de Biología. Universidad Nacional Federico Villarreal,

²Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma.
E-mail: joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

The toxicological impact of botanical extracts in aquatic and terrestrial environments are emerging research areas globally. Five botanical extracts of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*, Myrtaceae), rue (*Ruta graveolens*, Rutaceae), nettle (*Urtica urens*, Urticaceae), muña (*Minthostachys mollis*, Lamiaceae) and castor (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae) with potential for pest control were evaluated on the oat microworm *Panagrellus redivivus*, the water flea *Daphnia magna*, duckweed *Lemna minor* and the radish *Raphanus sativus* in toxicological bioassays under laboratory conditions. *Daphnia magna*, in terms of LC₅₀ at 48 h exposure, was more sensitive to *E. globulus* and *R. communis*. *Panagrellus redivivus* at 96 h exposure was more sensitive to *R. communis*. Chlorosis of *L. minor* at 96 h exposure and inhibition of germination in terms of EC₅₀ to 96 h exposure on *R. sativus* were more sensitive to *R. graveolens*. *Minthostachys mollis* caused the lowest toxicity in all four biological models. The botanical extracts of eucalyptus and castor cause greater toxicity in the aquatic environment, and in the terrestrial environment the aqueous extract of rue produced greater toxic effect.

Keywords: *Eucalyptus* – *Minthostachys* – *Ricinus* – *Ruta* – *Urtica*

RESUMEN

El impacto toxicológico de extractos botánicos en el ambiente acuático y terrestre es un área de investigación emergente a nivel global. Cinco extractos botánicos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*, Myrtaceae), ruda (*Ruta graveolens*, Rutaceae), ortiga (*Urtica urens*, Urticaceae), muña (*Minthostachys mollis*, Lamiaceae) e higuierilla (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae) con potencial para el control de plagas fueron evaluados sobre el microgusano de la avena *Panagrellus redivivus*, la pulga del agua *Daphnia magna*, la lenteja de agua *Lemna minor* y el rábano *Raphanus sativus* en bioensayos toxicológicos bajo condiciones de laboratorio. *Daphnia magna* en términos de CL_{50} a 48 h de exposición fue más sensible a *E. globulus* y a *R. communis*. *P. redivivus* a 96 h de exposición fue más sensible a *R. communis*. La clorosis de *L. minor* a 96 h de exposición y la inhibición de la germinación en términos de CE_{50} a 96 h de exposición sobre *R. sativus* fueron más sensibles a *R. graveolens*. *Minthostachys mollis* ocasionó la menor toxicidad en los cuatro modelos biológicos. Los extractos botánicos de eucalipto e higuierilla causan una mayor toxicidad en el ambiente acuático y en el ambiente terrestre el extracto acuoso de ruda produjo mayor efecto tóxico.

Palabras clave: *Eucalyptus* – *Minthostachys* – *Ricinus* – *Ruta* – *Urtica*

INTRODUCCIÓN

El uso de insecticidas de síntesis química para el manejo de plagas ya no constituye el único método eficaz de control (Vergara, 2000). Estos compuestos químicos sintéticos suelen ser altamente tóxicos y tienen un espectro bastante amplio de actividad (Oliveira et al., 2006; Abe et al., 2013; Jaramillo et al., 2013). Además estas sustancias químicas pueden generar la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Silva et al., 2002; Tavares, 2002; Silva et al., 2003; Iannacone et al., 2004, 2005, 2006). Una alternativa para el manejo ecológico de las plagas (MEP) es la aplicación de extractos de origen vegetal en sustitución de los productos sintéticos (Bernays, 1998; Silva et al., 2002; Tavares, 2002; Ayala et al., 2007; Mancebo-Rodríguez et al., 2011). Cinco plantas (*Eucalyptus globulus* (Labill, 1799) (Myrtaceae) “eucalipto”; *Ruta graveolens* (Linnaeus, 1753) (Rutaceae) “ruda”; *Ricinus communis* (Linnaeus, 1753) (Euphorbiaceae) “higuierilla”; *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., 1874) (Lamiaceae) “muña”; *Urtica dioica* (Linnaeus, 1758) (Urticaceae) “ortiga”) fueron seleccionadas en base a su información etnobotánica, a su validación científica como plaguicida y a su accesibilidad como recurso vegetal en el Perú (Silva et al., 2002; Iannacone et al., 2004, 2006; Cárdenas et al., 2010; Mossi et al., 2011).

Eucalyptus globulus “eucalipto” ocasiona efectos sobre la germinación y el crecimiento de semillas de *Lactuca sativa* L. cv Great Lakes (Souto et al., 2001), sobre la mortalidad de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Carrizo et al., 2004) y repelencia frente a *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Mossi et al., 2011). Esta planta contiene ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, sesquiterpenos y taninos (García et al., 2002).

Ruta graveolens “ruda” produce efectos insecticidas en *Hypsipyla grandella* Zeller, 1848 (Mora & Salazar, 2000) y en *Aleurothrixus floccosus* Maskell, 1896 (Rodríguez, 1998). El aceite esencial de ruda está compuesto por ésteres, cetonas alifáticas, alcoholes, cumarinas y furanocumarinas (Alonso, 2004; Muñoz et al., 2007; Castro et al., 2011).

Ricinus communis “higuierilla”, se ha utilizado para controlar insectos plagas en varios cultivos (Vásquez, 2005). Ha demostrado actividad insecticida contra *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus, 1758) (Upasani et al., 2003), *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Tinzaara et al., 2006), *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758), *Aedes caspius* (Pallas, 1771), *Culiseta longiareolata* (Macquart, 1838), *Anopheles maculipennis* (Meigen, 1818) (Aouinty et al., 2006), *Acromyrmex lundi* (Guérin-Méneville, 1838) (Caffarini et al., 2008) y *Zabrotes subfasciatus* (Boleman, 1833) (Mushobozy et al.,

2009). Las semillas de esta planta contienen alcaloides, enzimas, carotenoides, carotenos, tocoferoles, ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos (Ortuño, 2006).

Mintostachys mollis “muña” protege los tubérculos almacenados contra la polilla de la papa (Alkire *et al.*, 1994) y es eficaz contra insectos vectores de enfermedades humanas (Ciccia *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2007). El aceite esencial de muña está compuesto por carvacrol, pulegona, mentona, isomentona, β-pineno, limoneno y mentol (Fournet *et al.*, 1996; Fuertes & Munguía, 2001).

Urtica dioica “ortiga” presenta actividad insecticida y de repelencia significativa sobre el gorgojo *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) (Jovanović *et al.*, 2007), sobre *S. zeamais* (Iannacone *et al.*, 2008) y contra insectos (Coleoptera: Chrysomelidae) en plantaciones de *Amaranthus* spp. (Ortega *et al.*, 2009). La planta contiene clorofilas, carotenoides, vitaminas, triterpenos y esteroides (Özen & Korkmaz, 2003).

Las especies usadas en los bioensayos acuáticos [*Daphnia magna* (Straus, 1820), invertebrado y *Lemna minor* (Griff, 1851), planta] y terrestres [*Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945), invertebrado y *Raphanus sativus* (Linnaeus, 1753), planta] que representan a las diferentes especies de fauna y flora en los ecosistemas acuáticos y terrestres se emplean generalmente para estudiar las propiedades biocidas de diferentes partes de las plantas (APHA, 1995; Ayala *et al.*, 2007; Iannacone & Lamas, 2003; Iannacone *et al.*, 2014). Estas cuatro especies biológicas son altamente sensibles a las sustancias bioactivas, fáciles de manipular, baratas, de amplio espectro, dan rápidos resultados y con adecuada relevancia ecológica (Iannacone *et al.*, 2014). Las cinco plantas seleccionadas al tener un gran potencial biocida podrían tener un efecto perjudicial en organismos no destinatarios del control de plagas. Por lo tanto usando los cuatro bioensayos se observará el impacto tóxico de estas cinco plantas (Iannacone *et al.*, 2004; Ayala *et al.*, 2007).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto toxicológico de cinco extractos acuosos botánicos sobre *P. redivivus*, *D. magna*, *L. minor* y *R. sativus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extractos botánicos

Se usaron las siguientes cinco plantas: *E. globulus*, *R. graveolens*, *U. dioica* y *R. communis*, las cuales fueron colectadas de Carapongo, Lurigancho Chosica, Lima, Perú y *M. mollis* de la ciudad de Huancayo, Junín, Perú. La Tabla 1 señala las cinco especies botánicas empleadas y los criterios y condiciones para obtener los extractos acuosos. Se tomaron hojas de cada especie, se secaron en estufa hasta obtener un peso constante por pérdida de agua. Posteriormente, las hojas fueron trituradas en un mortero (Halden-wanger®) y el producto fue cernido secuencialmente por dos tamices. Las muestras fueron envasadas en frascos de vidrio color ámbar, para evitar la fotólisis, se rotularon y almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en los bioensayos según lo señalado en la Tabla 1 (Iannacone & Lamas, 2003).

Para *D. magna*, *L. minor* y *R. sativus* se pesaron 250 g del producto de cada especie y se mezcló con 1 L de agua embotellada (Cielo®), la cual se dejó en reposo entre 24-48 h para obtener la solución madre. Solo para *L. minor* se mezclaron con 1 L de solución hidropónica diluida (1 mL solución hidropónica/40mL agua embotellada). Se prepararon concentraciones según lo indicado en la Tabla 1. Finalmente, para *P. redivivus* se pesaron 1953,13 mg del producto de cada especie y se mezcló con 1 L de agua embotellada (Cielo®), la cual se dejó en reposo entre 24-48 h para obtener la solución madre. Se prepararon concentraciones de acuerdo a lo señalado en la Tabla 1. Se prepararon alícuotas de 10 mL diluidas en medio M9Y (1,0 mL de muestra + 9,0 mL de medio M9Y).

Organismos biológicos

Panagrellus redivivus - El nemátodo *P. redivivus* variedad bq1 fue obtenido de la National Water Research Institute, Ontario, Canadá. Los cultivos masivos del nemátodo se mantuvieron en envases de vidrio de un litro, conteniendo el medio de cultivo harina-agua: 15 g de harina y 15 mL de agua destilada. Para empezar el cultivo se transfirió una población de nemátodos en el medio tampón fosfato M9 o M9Y a una mezcla de harina-agua. Los cultivos usados en la pruebas se mantuvieron en placas petri de vidrio usando el medio de cultivo harina-agua (Iannacone & Gutiérrez, 1999;

Granados, 2008; Luna, 2009).

Daphnia magna - Hembras adultas de la pulga de agua se obtuvieron de una casa comercial de venta de peces ubicada en el distrito de Lince, Lima, Perú. Las hembras partenogenéticas se colocaron en una pecera con agua sin cloro alimentadas con hojuelas de algas (*Arthrospira platensis* Sitzenberger ex Gomont, 1892). Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se emplearon cohortes de neonatos (< 24 h de nacidos) (APHA, 1995; Iannacone & Alvariano, 2002; Castillo, 2004).

Lemna minor - La lenteja de agua se adquirió en un acuario de la ciudad de Lima-Perú. Se cultivó masivamente durante dos semanas antes del inicio de la prueba, en un acuario de 60 cm largo x 30 cm de ancho x 30 cm de alto con sales nutritivas (Wang & Williams, 1990). Para 10 L de la solución de cultivo de *L. minor* en agua sin cloro se prepararon las soluciones nutritivas La Molina®. Se agregó 1 mL de la solución madre a 40 mL de agua sin cloro. La temperatura para las crianzas se mantuvo entre 25°C ± 1°C (Iannacone et al., 2000).

Raphanus sativus - Las semillas de rábano fueron obtenidas de una tienda comercial de Agroquímicos en Lima-Perú. Antes de su empleo en ensayos ecotoxicológicos, las semillas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad, a una temperatura aproximada de 6 °C para inhibir su germinación y mantener su fertilidad. Se descartaron las semillas dañadas y se utilizaron las de un mismo lote y tamaño (Wang & Williams, 1990).

Bioensayos

Panagrellus redivivus - Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron usando los juveniles 2 (J₂). El día anterior al bioensayo, se prepararon placas de agar. Las hembras adultas se transfirieron del cultivo madre a las placas de agar. El cultivo de agar en placa se llenó con tampón M9. Cada hembra produjo 10-20 recién nacidos (J₂) en un período de 12 h. Los juveniles J₂ se manipularon bajo el microscopio estereoscópico. En cada ensayo 10-12 J₂ fueron transferidos con la ayuda de una micropipeta a cada uno de los envases de 2,0 mL por un período de 96 h (Castillo, 2004). La temperatura de crecimiento estuvo entre 23±2°C. Después de 96 h, los envases fueron reabiertos y se

registró el número de sobrevivientes, el número de J₃, J₄ y adultos, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un ocular micrométrico. Se determinó la sobrevivencia de la población de *P. redivivus* (Granados, 2008).

Daphnia magna - Para evaluar la toxicidad aguda se colocaron 10 neonatos de *D. magna* en cada recipiente de plástico de 120 mL que contenía la solución a evaluar. Cada concentración tuvo cuatro repeticiones. La duración total de la prueba fue de 48 h de exposición. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a los 15 s de una estimulación con estilete con observación al microscopio estereoscópico. Antes de efectuar las lecturas se agitaron los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posaban inmóviles en el fondo (APHA, 1995; Iannacone & Alvariano, 2002; Castillo, 2004; Iannacone et al., 2014).

Lemna minor - Se evaluó en bioensayos subletales semiestáticos utilizando un total de 10 especímenes/envase, con cuatro repeticiones. Los especímenes a usar tuvieron dos hojitas o frondas de similar tamaño. Las pruebas se realizaron bajo condiciones de luz continua de 2150 o 4300 lux a superficie del agua y a una temperatura de 25±2°C. Se agregó 30 mL de la concentración del extracto a probar. La duración de la prueba fue de 48 h. La lectura final del efecto subletal fue la clorosis (Iannacone et al., 2008).

Raphanus sativus - Se evaluaron los efectos subletales en el rábano (Navarro et al., 2006). Se emplearon placas petri de plásticos estériles. Se usó papel absorbente cortado en trozos de 44,18 cm², el cual se esterilizó por 15 min en una estufa a 60°C. Las semillas se evaluaron en bioensayos sin renovación de la solución tóxica se utilizó un total de 10 semillas por envase, con cuatro repeticiones. En cada envase se colocó un trozo de papel absorbente, y se añadió 5 mL del extracto con cada concentración de la planta por envase. La prueba se realizó bajo a condiciones de fotoperiodo de 12/12 de luz y oscuridad óptimas para la planta. La duración de la prueba fue de 96 h. Los indicadores para el bioensayo fueron germinación, peso fresco (mg), peso seco (mg), elongación de la raíz (cm) y elongación del tallo (cm) en comparación con el control.

Análisis estadísticos

Las pruebas de toxicidad de los extractos acuosos de *E. globulus*, *R. graveolens*, *U. urens*, *M. mollis* y *R. communis* sobre *D. magna*, *P. redivivus*, *L. minor* y *R. sativus* se evaluaron en cinco concentraciones más el control, con cuatro repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 6 x 4. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANDEVA), previa transformación de datos a arcoseno o ($\sqrt{x+0,5}$) antes del análisis para estabilizar el error de la varianza. Se calcularon los valores de CL₅₀ (Concentración Letal media) para la mortalidad (%) de *P. redivivus* y *D. magna*, CE₅₀ (Concentración Efectiva media) para la clorosis (%) de *L. minor* y germinación (%) de *R. sativus*. Finalmente, se determinaron NOEC (Concentración sin efectos observables) y LOEC (Concentración más baja de efectos observables) para peso fresco (mg), peso seco (mg), elongación de la raíz (cm) y elongación del tallo (cm) de *R. sativus*. Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20,00.

RESULTADOS

Las Tablas 2-6 nos muestran los efectos tóxicos de los extractos acuosos de *E. globulus*, *R. communis*, *R. graveolens*, *M. mollis* y *U. urens* en cuatro

modelos biológicos: *P. redivivus*, *D. magna*, *L. minor* y *R. sativus*.

R. communis ocasionó la mayor mortalidad en comparación a los otros extractos desde 195,31 mg·L⁻¹ a *P. redivivus* a 96 h de exposición (Tabla 2).

Los extractos acuosos de *E. globulus* y *R. communis*, produjeron la mayor mortalidad en *D. magna* a 24 h y 48 h de exposición (Tabla 3).

La Tabla 4 señala los porcentajes de clorosis de *L. minor* a los cinco extractos acuosos botánicos a 96 h de exposición. El extracto acuoso de *R. graveolens* mostró los mayores efectos en el porcentaje de clorosis desde 25 g·L⁻¹ en *L. minor* a 96 h de exposición (Tabla 4).

Los porcentajes de inhibición de la germinación de semillas de *R. sativus* a 48 h y 96 h de exposición a los cinco extractos acuosos botánicos se indican en la tabla 5.

Los extractos acuosos de *R. communis* y *R. graveolens* ocasionaron los mayores efectos en la inhibición de la germinación de *R. sativus* a 96 h de exposición. El extracto acuoso de *R. graveolens*, ocasionó los mayores efectos en la disminución del peso fresco, del peso seco, en la elongación de raíz y en la elongación de tallo de *R. sativus* a 96 h de exposición en base a los valores de LOEC (Tabla 6).

Tabla 1. Obtención de extractos acuosos botánicos y concentraciones estudiadas en los ensayos con *Panagrellus redivivus*, *Daphnia magna*, *Lemna minor* y *Raphanus sativus*. * = diluido en medio M9Y. ** = diluido en solución hidropónica.

Planta	Obtención del extracto acuoso botánico	Especie biológica empleada en el bioensayo	Concentraciones estudiadas en peso seco en g de la planta/volumen de agua (g·L ⁻¹)	Volumen a agregar del extracto patrón (solución madre) (mL) y enrasados a 100 mL de agua
<i>Eucalyptus globulus</i>	Hojas colectadas (g) 1500 Secado 60°C x 70 h	<i>Panagrellus redivivus</i>	97,66; 195,31; 390,63; 781,25 y 1562,5	5; 10; 20; 40 y 80*
<i>Ruta graveolens</i>	Cernido en tamices 250 y 500 µ Almacenamiento 25±3°C	<i>Daphnia magna</i>	12,5; 25; 50; 100; 200	5; 10; 20; 40 y 80
<i>Urtica urens</i>		<i>Lemna minor</i>	12,5; 25; 50; 100; 200	5; 10; 20; 40 y 80**
<i>Minthostachys mollis</i>		<i>Raphanus sativus</i>	12,5; 25; 50; 100; 200	5; 10; 20; 40 y 80
<i>Ricinus communis</i>				

Tabla 2. Efecto tóxico de extractos acuosos de cinco plantas en *Panagrellus redivivus* a 96 h de exposición.

	Concentración mg·L ⁻¹	96 h % Mortalidad	Sig.
Eucalipto <i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i>	Control	0	a
	97,66	2,8	a
	195,31	2,8	a
	390,63	16,7	b
	781,25	58,3	c
	1562,5	100	d
	CL ₅₀	707,95	
	F	335,21	
	Sig.	0,000	
Ruda <i>Ruta</i> <i>graveolens</i>	97,66	0	a
	195,31	0	a
	390,63	33,3	b
	781,25	44,4	c
	1562,5	100	d
	CL ₅₀	831,76	
	F	844,41	
Sig.	0,000		
Ortiga <i>Urtica</i> <i>urens</i>	97,66	5,6	a
	195,31	5,6	a
	390,63	30,6	b
	781,25	58,3	c
	1562,5	100	d
	CL ₅₀	758,58	
	F	288,00	
Sig.	0,00		
Muña <i>Minthostachys</i> <i>mollis</i>	97,66	2,8	ab
	195,31	11,1	ab
	390,63	11,1	ab
	781,25	13,9	ab
	1562,5	16,7	b
	CL ₅₀	>1562,5	
	F	4,19	
Sig.	0,011		
Higuerilla <i>Ricinus</i> <i>communis</i>	97,66	16,7	a
	195,31	58,3	b
	390,63	69,4	b
	781,25	88,9	c
	1562,5	100	d
	CL ₅₀	177,83	
	F	81,53	
Sig.	0,000		

Promedio en una misma columna en sentido vertical seguidos por la misma letra minúscula, no difieren significativamente a $P > 0,05$ a 96 h de exposición. Prueba de Tukey (SPSS, versión 20). Sig.=Significancia. F = Estadístico de Fisher. Valores de mortalidad de *P. redivivus* están corregidos por la fórmula de Abbott. CL₅₀ = Concentración letal media.

Tabla 3. Efecto tóxico de extractos acuosos de cinco plantas en la mortalidad de *Daphnia magna* a 24 h y 48 h de exposición.

	Concentración g·L ⁻¹	24 h		48 h	
		% Mortalidad	Sig.	% Mortalidad	Sig.
Eucalipto <i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i>	Control	0	a	0	a
	12,5	13,2	b	19,4	b
	25	44,7	c	94,4	c
	50	100	d	100	c
	100	100	d	100	c
	200	100	d	100	c
	CL ₅₀	26,63		16,03	
	F	235,62		276,92	
	Sig.	0,000		0,000	
Ruda <i>Ruta</i> <i>graveolens</i>	12,5	26,3	b	27,8	b
	25	26,3	b	27,8	b
	50	31,6	b	44,4	c
	100	86,8	c	88,9	d
	200	100	d	100	e
	CL ₅₀	41,05		36,04	
	F	144,18		688,27	
	Sig.	0,000		0,000	
Ortiga <i>Urtica</i> <i>urens</i>	12,5	21,1	b	25	b
	25	26,3	b	27,8	b
	50	31,6	b	36,1	b
	100	60,5	c	80,6	c
	200	100	d	100	d
	CL ₅₀	52,87		41,66	
	F	120,41		345,60	
	Sig.	0,000		0,000	
Muña <i>Minthostachys</i> <i>mollis</i>	12,5	5,3	ab	5,6	a
	25	5,3	ab	8,3	a
	50	18,4	b	30,6	b
	100	36,8	c	44,4	b
	200	73,7	d	86,1	c
	CL ₅₀	126,18		88,09	
	F	58,26		80,96	
	Sig.	0,000		0,000	
Higuerilla <i>Ricinus</i> <i>communis</i>	12,5	23,7	b	27,8	b
	25	36,8	b	44,4	c
	50	73,7	c	86,1	d
	100	100	d	100	e
	200	100	d	100	e
	CL ₅₀	26,80		22,61	
	F	119,94		414,82	
	Sig.	0,000		0,000	

Promedio en una misma columna en sentido vertical seguidos por la misma letra minúscula, no difieren significativamente a $P > 0,05$ a 24 h y 48 h de exposición. Prueba de Tukey (SPSS, versión 20). Sig.=Significancia. F = Estadístico de Fisher. Valores de mortalidad de *D. magna* están corregidos por la fórmula de Abbott. CL₅₀= Concentración letal media.

Tabla 4. Efecto tóxico de extractos acuosos de cinco plantas en la clorosis de *Lemna minor* a 96 h de exposición.

	Concentración g·L ⁻¹	96 h % Clorosis	Sig.
Eucalipto <i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i>	Control	0	a
	12,5	5	a
	25	10	a
	50	45	b
	100	100	c
	200	100	c
	CE ₅₀	45,17	
	F	90,95	
Sig.	0,00		
Ruda <i>Ruta</i> <i>graveolens</i>	12,5	15	a
	25	85	b
	50	95	b
	100	95	b
	200	100	b
	CE ₅₀	18,63	
	F	38,56	
Sig.	0,00		
Ortiga <i>Urtica</i> <i>urens</i>	12,5	25	b
	25	30	b
	50	85	c
	100	95	c
	200	100	c
	CE ₅₀	26,69	
	F	47,13	
Sig.	0,00		
Muña <i>Minthostachys</i> <i>mollis</i>	12,5	15	b
	25	20	b
	50	20	b
	100	30	bc
	200	50	c
	CE ₅₀	>200	
	F	19,56	
Sig.	0,00		
Higuerilla <i>Ricinus</i> <i>communis</i>	12,5	20	b
	25	25	b
	50	50	c
	100	80	d
	200	100	e
	CE ₅₀	40,52	
	F	279,78	
Sig.	0,00		

Promedio en una misma línea, seguidos por la misma letra minúscula, no difieren significativamente a $P > 0,05$. Prueba de Tukey (SPSS, versión 20). Sig.=Significancia. F = Estadístico de Fisher. CE₅₀ = Concentración efectiva media.

Tabla 5. Efecto tóxico de extractos acuosos de cinco plantas en la inhibición de la germinación de *Raphanus sativus* a 48 h y 96 h de exposición.

	Concentración g·L ⁻¹	48 h % Inhibición germinación	Sig.	96 h % Inhibición germinación	Sig.
Eucalipto <i>Eucalyptus globulus</i>	Control	10	a	5	a*
	12,5	5	a	0	a
	25	10	a	0	a
	50	45	b	0	a
	100	100	c	17,5	b
	200	100	c	100	c
	CE ₅₀	45,17		120,77	
	F	260,49		230,54	
	Sig.	0,000		0,000	
Ruda <i>Ruta graveolens</i>	12,5	12,5	a	0	b
	25	87,5	b	15	a
	50	95	bc	82,5	c
	100	95	bc	95	d
	200	100	c	100	d
	CE ₅₀	18,8		37,87	
	F	78,32		137,13	
	Sig.	0,000		0,000	
Ortiga <i>Urtica urens</i>	12,5	25	b	0	a
	25	32,5	b	10	b*
	50	85	c	10	b*
	100	97,5	d	95	c
	200	100	d	100	c
	CE ₅₀	25,81		61,47	
	F	172,08		160,92	
	Sig.	0,000		0,000	
Muña <i>Minthostachys mollis</i>	12,5	15	ab	10	ab
	25	22,5	b	12,5	b
	50	22,5	b	12,5	b
	100	27,5	b	10	a
	200	50	c	10	a
	CE ₅₀	>200		>200	
	F	20,24		2,97	
	Sig.	0,000		0,04	
Higuerilla <i>Ricinus communis</i>	12,5	17,5	a	2,5	a
	25	25	ab	20	b
	50	50	b	40	b
	100	80	c	80	c
	200	100	d	100	d
	CE ₅₀	41,43		45,91	
	F	48,78		101,77	
	Sig.	0,000		0,000	

Promedio en una misma columna en sentido vertical seguidos por la misma letra minúscula, no difieren significativamente a $P > 0,05$ a 48 h y 96 h de exposición. Prueba de Tukey (SPSS, versión 20). Sig.=Significancia. F= Estadístico de Fisher. CE₅₀= Concentración efectiva media.

Tabla 6. Efecto tóxico de cinco extractos acuosos de plantas en el peso fresco, peso seco, elongación de raíz y tallo de *Raphanus sativus* a 96 h de exposición.

	Concentración g.L ⁻¹	Peso fresco (mg)	Sig.	96h		Elongación de la raíz (cm)	Sig.	Elongación del tallo (cm)	Sig.
				Peso seco (mg)	Sig.				
Eucalipto <i>Eucalyptus globulus</i>	Control	131,4	a	6,9	a	4,46	a*	4,52	a
	12,5	113,8	a	7,1	a	5,23	b	4,46	a
	25	90,0	b	7,2	a	4,82	ab	4,64	a
	50	58,2	c	3,8	b	1,60	c	2,19	b
	100	6,8	d	1,6	c	0,24	d	0,12	c
	200	0,0	d	,0	d	0,00	d	0,00	c
	F	154,74		70,72		180,37		199,46	
	Sig.	0,000		0,000		0,000		0,000	
	NOEC	12,5		25		>12,5		25	
	LOEC	25		50		12,5		50	
Ruda <i>Ruta graveolens</i>	12,5	132,6	a	11,1	b	4,35	a	3,26	b
	25	61,7	b	4,5	c	1,62	b	1,17	c
	50	3,7	c	1,6	d	0,03	c	0,00	d
	100	1,0	c	0,3	d	0,00	c	0,00	d
	200	0,0	c	0,0	d	0,00	c	0,00	d
	F	231,06		77,09		185,05		257,09	
	Sig.	0,000		0,000		0,000		0,000	
	NOEC	12,5		>12,5		12,5		>12,5	
	LOEC	25		12,5		25		12,5	
	Ortiga <i>Urtica urens</i>	12,5	124,6	a	6,9	a	4,54	a	4,53
25		71,6	b	2,6	b	5,11	a	4,11	a
50		71,0	b	2,0	b	1,92	b	1,19	b
100		1,1	c	0,4	c	0,01	c	0,00	c
200		0,0	c	0,0	c	0,00	c	0,00	c
F		97,22		80,26		126,67		217,09	
Sig.		0,000		0,000		0,000		0,000	
NOEC		12,5		>12,5		25		25	
LOEC		25		12,5		50		50	
Muña <i>Mimhostachys mollis</i>		12,5	131,2	a	6,8	a	4,42	a	4,52
	25	125,8	a	6,5	a	4,15	ab	3,35	ab
	50	74,2	b	3,8	b	3,15	ab	2,98	b
	100	64,7	b	3,3	b	3,00	b*	2,33	bc
	200	64,8	b	3,3	b	1,79	c	1,88	c
	F	25,12		19,66		10,52		15,32	
	Sig.	0,000		0,000		0,000		0,000	
	NOEC	25		25		50		25	
	LOEC	50		50		100		50	
	Higuerilla <i>Ricinus communis</i>	12,5	104,5	b	6,3	a	4,82	a	4,18
25		73,8	b	6,0	a	3,98	a	3,71	a
50		23,9	d	1,5	b	0,67	b	0,93	b
100		6,9	de	1,7	b	0,31	b	0,29	bc
200		0,0	e	0,0	b	0,00	b	0,00	c
F		104,32		47,65		84,55		86,45	
Sig.		0,000		0,000		0,000		0,000	
NOEC		>12,5		25		25		25	
LOEC		12,5		50		50		50	

Promedio en una misma línea, seguidos por la misma letra minúscula, no difieren significativamente a $P > 0,05$. Prueba de Tukey (SPSS, versión 20). Sig.=Significancia. F = Estadístico de Fisher. NOEC = Concentración más alta donde no se observan efectos. LOEC = Concentración más baja de efectos observables.

DISCUSIÓN

Panagrellus redivivus

Ricinus communis ocasionó la mayor mortalidad en comparación a los otros cuatro extractos a *P. redivivus* a 96 h de exposición. Diversos investigadores muestran efectos tóxicos de plantas en nematodos de vida libre. Cunha *et al.* (2003) muestran que el extracto de *E. globulus* a una concentración de 200 mg·L⁻¹ produjo una mortalidad significativa en *P. redivivus* a las 24 y 48 h de exposición. Los extractos acuosos de hojas de *R. graveolens* ocasionaron efectos tóxicos agudos en el nematodo *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 de 41,73% a 24 h de exposición (Sánchez, 2002). Los extractos de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch, Allg. Gartenzeitung (Euphorbiaceae) y de *R. communis* a una concentración de 200 mg·L⁻¹ presentaron en *P. redivivus* una mortalidad de 0,36% y 3,85% a 24 h de exposición (Cunha *et al.*, 2003). El extracto etanólico de las ramas de *Triadica sebifera* (L.) Small (Euphorbiaceae) a una concentración de 5 mL·L⁻¹ presentó en *P. redivivus* una mortalidad de 43% y 62% en 24 y 48 h de exposición, respectivamente (Hong *et al.*, 2007). *Panagrellus redivivus* ha sido empleado como una microbioprueba representativa para evaluar el efecto de extractos de productos naturales (Maršálek & Blába, 2000; Aoki *et al.*, 2005).

Daphnia magna

Los extractos acuosos de *E. globulus* y *R. communis* produjeron la mayor mortalidad en *D. magna* a 24 h y 48 h de exposición. Se han realizado bioensayos con los aceites esenciales y con los extractos etanólicos y acuosos de las hojas de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden (híbrido de *E. grandis* & *E. urophylla*) (Myrtaceae) en *Daphnia similis* (Claus, 1876) (Araujo *et al.*, 2010; Pains *et al.*, 2010). En nuestro caso se obtuvo del extracto acuoso de las hojas de *E. globulus* en *D. magna* valores numéricamente más altos, lo cual podría explicarse por el tipo de extracto acuoso que en general es menos tóxico que los aceites esenciales y los extractos etanólicos usados en la literatura sobre otras especies de *Daphnia*. En el extracto acuoso de *E. grandis*, los triterpenos y fenoles estarían relacionados con la toxicidad en *D. similis* (Cortes, 2005).

El extracto etanólico de *Decatropis bicolor* (Radlk, 1886) (Rutaceae) y el extracto orgánico de las raíces de *Zanthoxylum chalybeum* (Engl, 1896) (Rutaceae) presentaron efectos tóxicos en *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) a 24 h de exposición (Cortes, 2005; Nguta *et al.*, 2011). En el presente trabajo, *R. graveolens* fue la tercera planta más tóxica a *D. magna* a 48 h de exposición. Los terpenos, los sesquiterpenos y los compuestos aromáticos de *R. graveolens* podrían estar asociados a sus propiedades tóxicas como se ha observado en otras especies de artrópodos (Nguta *et al.*, 2011; Kováts *et al.*, 2014). Los aceites esenciales y saponinas de *M. mollis* evidenciaron efectos tóxicos en *A. salina* a 48 h de exposición (Figuerola *et al.*, 1995; Fuertes & Munguía, 2001; Olivero-Verbel *et al.*, 2009).

La literatura científica muestra investigaciones de efectos tóxicos de plantas de la familia Euphorbiaceae en organismos acuáticos. El extracto etanólico de *Jathropa dioica* Sessé (Euphorbiaceae) presentó toxicidad en *A. salina* (Cortes, 2005). El extracto de *R. communis* obtuvo un valor de CL₅₀ de 0,86 g·L⁻¹ en las larvas de *A. aegypti* (Parra *et al.*, 2007). El extracto hidroalcohólico de *R. communis* presentó toxicidad en *A. salina* a 24 h de exposición (Krishnarajua *et al.*, 2005). En el presente trabajo, *R. communis* fue la segunda planta más tóxica a *D. magna* a 48 h de exposición.

Lemna minor

El extracto acuoso de *R. graveolens* mostró los mayores efectos en la clorosis en *L. minor* a 96 h de exposición. En otras especies de la familia Rutaceae, como *Skimmia laureola* (dc.) Siebold & Zucc Ex Walp y *Zanthoxylum armatum* Dc. se han encontrado efectos fitotóxicos inhibitorios sobre *L. minor* (Dzoyem *et al.*, 2011). Nwauzoma *et al.* (2013) observaron que en las hojas de *Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle y *Citrus x paradisi* Macfad. (Rutaceae) se han visto efectos inhibitorios del crecimiento en extractos hexánicos y con acetato de etilo sobre *L. minor*. En el caso de *M. mollis* se vio menor efecto sobre *L. minor*. Opuestamente, en una planta de la misma familia de *M. mollis*, en *Callicarpa macrophylla* Vahl (Lamiaceae) se observó efectos fitotóxicos significativos (Ibrar *et al.*, 2014). Rehmanullah *et al.* (2014) encontraron potencial de fitotoxicidad sobre *L. minor* de dos plantas de la familia

Euphorbiaceae a la cual pertenece *R. communis*. La fitotoxicidad usando *L. minor* mostró un efecto moderado de crecimiento inhibitorio bajo la acción de los extractos de *Chassalia kolly* (Schumach.) Hepper (Rubiaceae) (Onocha & Ali, 2010), de *Diospyros canaliculata* De Wild (Ebenaceae) (Barka, 2012) y de *Calendula arvensis* L. (Asteraceae) (Ullah et al., 2012). La actividad toxicológica de estos extractos vegetales se debe a la presencia de los fenoles, aldehídos y alcoholes (Sacchetti et al., 2005; Oliveira et al., 2013).

Raphanus sativus

Los extractos de *R. communis* y *R. graveolens* en el presente trabajo ocasionaron los mayores efectos en la inhibición de la germinación de *R. sativus* a 96 h de exposición. El extracto acuoso de *R. graveolens*, produjo en esta investigación los mayores efectos en la disminución del peso fresco, del peso seco, en la elongación de raíz y en la elongación de tallo de *R. sativus* a 96 h de exposición. Ayala et al. (2007) señalaron que el extracto acuoso al 20% de *R. graveolens* aplicado durante el crecimiento de *R. sativus* no produjo efecto negativos comparados al control. En experimentos realizados en invernadero las hojas y raíces de *Stauranthus perforatus* Liebm (Rutaceae) incorporados a suelo, disminuyeron el crecimiento de malezas (Anaya et al., 2001). Esto puede estar asociado con los metabolitos secundarios de *R. graveolens* como los alcaloides, los cuales se han demostrado que presentan efectos tóxicos (Sánchez, 2002; Trujillo, 2008; Jorge et al., 2009).

La germinación *in vitro* de *Amaranthus retroflexus* L. (Amaranthaceae) y *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) fue completamente inhibida por el aceite esencial de *E. globulus* a concentraciones iguales o superiores al 0,7%. El aceite esencial de *E. citriodora* controló la germinación de *Amaranthus viridis* L. (Amaranthaceae) y *Echinochloa crus-galli* L. (Poaceae), pero también causó daños en trigo, maíz, rábano y arroz (Verdeguer et al., 2009). El extracto acuoso de *E. globulus* fue el cuarto en el orden de toxicidad en la inhibición de la germinación de *R. sativus*. La actividad mostrada por el aceite esencial de *E. camaldulensis* fue mucho mayor que la de su extracto acuoso, debido a que controló totalmente la germinación de cuatro de las cinco especies sobre las que se ensayó, mientras que el extracto acuoso solo controló totalmente dos de ellas

(Verdeguer et al., 2009). La actividad de los aceites de “eucalipto” en las plantas reduce la supervivencia de las células y el contenido en clorofila, ARN y carbohidratos (Verdeguer et al., 2009).

Los tratamientos con extractos de la raíz de *Cecropia pachystachya* (Trécul, 1847) (Urticaceae) sobre las raíces de la lechuga presentaron pelos más gruesos en comparación con el control (Maraschin & Alves, 2006). El extracto de la raíz de *C. pachystachya* causó una mayor inhibición que los extractos de otras partes de la planta sobre la germinación de semillas de *Panicum máximum* Jacq. (Poaceae) en todas las concentraciones (Hernández et al., 2007). Un extracto al 4% de *Sapium glandulosum* (L.) Morong (Euphorbiaceae) aplicado durante 96 h a semillas de *L. sativa* mostró que el porcentaje de germinación no es diferente al control, pero se observó que las raíces son más gruesas (Maraschin & Alves, 2006). El extracto metanólico de *Hyeronima* sp. (Euphorbiaceae) a una concentración de 31,25 mg·L⁻¹ presentó un 86,25 % de inhibición de las semillas de *L. sativa* a 120 h de exposición y mostró una reducción de la radícula del 99,73% con respecto al control (Hernández et al., 2007).

Los extractos de hojas de higuera en diferentes concentraciones muestran resultados que indican un efecto alelopático mayor con dosis crecientes en el crecimiento de las plántulas lechuga (De Souza et al., 2007). En este trabajo se encontró que los extractos acuosos de *R. communis* ocasionaron inhibición de la germinación de *R. sativus*. La actividad biológica de *R. communis* se debería a la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, fenoles y aceites esenciales. Por lo cual podría usarse como un potencial herbicida (Gatti et al., 2004).

Al emplearse extractos acuosos botánicos de *E. globulus*, *R. graveolens*, *U. urens*, *M. mollis* y *R. communis*, formulación más común, tal como se emplea en el Perú desde una perspectiva etnobotánica, en los cuales se observa el efecto de la mezcla de sus metabolitos secundarios, no es posible incriminar a un solo metabolito o ingrediente activo individual como el causante único de la toxicidad observada en las cuatro diferentes especies biológicas representativas de

los ecosistemas acuáticos y terrestres. La toxicidad de los extractos botánicos es altamente dependiente de la duración, frecuencia, intensidad de exposición, formulación y la susceptibilidad del organismo evaluado (Iannacone *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2005).

En conclusión, el extracto de *E. globulus* fue el más tóxico en el bioensayo con *D. magna*. El extracto de *R. communis* fue el más tóxico en el bioensayo con *P. redivivus*. El extracto de *R. graveolens* fue el más fitotóxico en la clorosis con *L. minor* y en el bioensayo de inhibición de la germinación con *R. sativus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, FR, Machado, AA, Coleone, AC, Cruz, C & Machado-Neto, JG. 2013. *Acute toxicity and environmental risk of diflubenzuron and temephos to fish Hyphessobrycon eques (Actinopterygii, Perciformes)*. Revista de Toxicología, vol.30, pp. 87.
- Alkire, B, Tucker, A & Maciarelo, M. 1994. *Tipo, Minthostachys mollis (Lamiaceae): an Ecuadorian mint*. Economic Botanic, vol. 48, pp. 60-64.
- Alonso, J. 2004. *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. 1° Ed. Editorial Corpus Libros. Rosario, Argentina. pp. 939-944.
- Anaya, A, Espinoza, F & Cruz, R. 2001. *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Instituto de Ecología y Editorial Plaza y Valdés SA de CV. México.
- Aoki, MK, Encarnación-Dimayuga, R & Cortés, ARA. 2005. *Evaluación toxicológica de productos naturales usando microtécnicas*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol.36, pp.11-17.
- Aouinty, B, Outara, S, Mellouki, F & Mahari, S. 2006. *Évaluation préliminaire del activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (Ricinus communis L.) et du bois de thuya (Tetraclinis articulata (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: Culex pipiens (Linné), Aedes caspius (Pallas), Culiseta longiareolata (Aitken) et Anopheles maculipennis (Meigen)*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, vol. 10, pp. 67-71.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). 1995. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th American Health Association. Washington, D.C.
- Araujo, F, Rietzler, A, Pains, L, De Fatima, G, Carazza, F & Vieira, S. 2010. *Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de Eucalyptus urograndis (Myrtaceae)*. Quimica Nova, vol. 33, pp. 1510-1513.
- Ayala, H, La Rosa, R, Romero, O & Villafuerte, M. 2007. *Efecto alelopático de tres extractos vegetales sobre el desarrollo de Raphanus sativus (Brassicaceae) en el Perú*. Revista Encuentro Científico Internacional, vol. 4, pp. 1-3.
- Barka, T. 2012. *Pharmacognosy of Skimmia laureola (dc.) Siebold & Zucc Ex Walp and Zanthoxylum armatum Dc, Family Rutaceae*. PhD. Thesis. University of Peshawar, Peshawar.
- Bernays, E. 1998. *Evolution of feeding behavior in insect herbivores*. Bioscience, vol. 48, pp. 35-44.
- Caffarini, P, Carrizo, P, Pelicano, A, Roggero, P & Pacheco, J. 2008. *Effects of acetonic and water extracts of Ricinus communis, Melia azedarach and Trichillia glauca on black common cutting ant (Acromyrmex lundi)*. Idesia, vol. 26, pp. 59-64.
- Cárdenas, R, Lugo, L & Rozo, A. 2010. *Efecto tóxico del extracto acuoso de Ruta graveolens L. (Rutaceae) sobre larvas de Anopheles albimanus Wiedemann, 1820 y Culex quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae), en condiciones experimentales*. Entomotropica, vol. 25, pp. 11-18.
- Carrizo, P, Pelicano, A & Caffarini, P. 2004. *Evaluación de extractos cetónicos de paraíso, eucalipto y ricino sobre Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 36: 47-52.
- Castillo, G. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Estandarización, intercalibración,

- resultados y aplicaciones. IMTA. México.
- Castro, A, Juárez, J, Ramos, N, Suárez, S, Retuerto, F & Gonzales, S. 2011. *Structural elucidation of essential oil of Ruta graveolens L. Ruda, antioxidant activity and cytotoxicity bio-assay*. Ciencia e Investigación, vol.14, pp. 25-28.
- Ciccía, G, Coussio, J & Mongelli, E. 2000. *Insecticidal activity against Aedes aegypti larvae of some medicinal South American plants*. Journal of Ethnopharmacology, vol. 72, pp.185–189.
- Cortes, J. 2005. *Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo*. Tesis de licenciatura de biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de ciencias básicas e ingeniería.
- Cunha, R, Oliveira, D & Campos, V. 2003. *Extratos vegetais com propriedades nematocidas e purificação do princípio ativo do extrato de Leucaena leucocephala*. Fitopatologia Brasileira, vol. 28, pp.438-441.
- De Souza, C, Copstein, CR, Maculan, K, Da Silva, M & Bobrowski, V. 2007. *Alelopatia do extrato de folhas secas de mamona (Ricinus communis L.)*. Revista Brasileira de Biociências, vol. 5, pp. 47-749.
- Dzoyem, JP, Kechia, FA, Kuete, V, Pieme, AC, Akak, CM, Tangmouo, JG & Lohue, PJ. 2011. *Phytotoxic, antifungal activities and acute toxicity studies of the crude extract and compounds from Diospyros canaliculata*. Natural Product Research, vol. 25, pp. 741-749.
- Figueroa, D, Estévez, T & Giménez, T. 1995. *Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas*. Biofarbo, vol. 4, pp. 51-56.
- Fournet, A, Rojas de Arias, A, Charles, B & Bruneton, J. 1996. *Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chaga's disease vectors*. Journal of Ethnopharmacology, vol. 52, pp.145-149.
- Fuertes, C & Munguía, Y. 2001. *Estudio comparativo del aceite esencial de Minthostachys mollis (Kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas*. Ciencia e Investigación, vol. 4, pp. 23-39.
- García, BL, Rojo, DDM, García, GLV & Hernández, A. 2002. *Plantas con propiedades antiinflamatorias*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, vol. 21, pp. 214-216.
- Gatti, A, Peres, S & Lima, M. 2004. *Atividade alelopática de extratos aquosos de Aristolochia esperanzae O. Kuntze na germinação e no crescimento de Lactuca sativa L. e Raphanus sativus L.* Acta Botanica Brasilica, vol. 18, pp. 425-430.
- Granados, Y. 2008. *Ensayo de toxicidad con el nemátodo Panagrellus redivivus*. Leído en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap10.pdf> el 15 de mayo del 2014.
- Guerra, P, Molina, I, Yábar, E & Gianoli, E. 2007. *Oviposition deterrence of shoots and essential oils of Minthostachys spp. (Lamiaceae) against the potato tuber moth*. Journal of Applied Entomology, vol. 131, pp. 134-138.
- Hernández, M, Morais, L, Londe, G, Nascimento, E & Chang, R. 2007. *Ação alelopática de extratos de embaúba (Cecropia pachystachya) no crescimento de capim-colonião (Panicum maximum)*. Planta daninha, vol. 25, pp. 763-769.
- Hong, L, Li, G, Zhou, W, Wang, X & Zhang, K. 2007. *Screening and isolation of a nematocidal sesquiterpene from Magnolia grandiflora L.* Pest Management Science, vol. 63, pp. 301-305.
- Iannacone, J & Alvaríño, L. 2002. *Evaluación del riesgo ambiental del insecticida cartap en bioensayos con tres invertebrados*. Agricultura Técnica, vol. 62, pp. 366-374.
- Iannacone, J, Alvaríño, L, Caballero, C & Sánchez, J. 2000. *Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos*. Gayana, vol. 64, pp. 139-146.
- Iannacone, J, Ayala, H, Alvarez, J, Leyva, O & Bajalque, E. 2004. *Cuatro plantas biocidas sobre Sitophilus zeamais Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) y Stegobium paniceum (Linnaeus, 1761) (Coleoptera: Anobiidae), en el Perú*. Wiñay Yachay (Perú), vol. 8, pp. 16-27.
- Iannacone, J, Ayala, H & Román, A. 2005. *Efectos*

- toxicológicos de cuatro plantas sobre el gorgojo del maíz Sitophilus zeamais Motschulsky 1855 (Coleoptera: Curculionidae) y sobre el gorgojo de las galletas Stegobium paniceum (Linnaeus 1761) (Coleoptera: Anobiidae) en Peru. Gayana*, vol. 69, pp. 234-240.
- Iannacone, J, Ayala, H, Román, A, Carrillo, R, Soto, JC, Salcedo, C, Escalante, C, Vallejos, M & Pérez, D. 2006. *Efecto insecticida de cinco plantas sobre el gorgojo del maíz Sitophilus zeamais Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) en Perú. Scientia (Lima)*, vol. 8, pp. 197-206.
- Iannacone, J. & Gutiérrez, A. 1999. *Ecotoxicidad de los agroquímicos Lindano y Clorpirifos sobre el nematodo Panagrellus, la microalga Chlorella y el ensayo con Allium. Agricultura Técnica*, vol. 59, pp. 85-95.
- Iannacone, J & Lamas, G. 2003. *Efectos toxicológicos de extractos de molle (Schinus molle) y lantana (Lantana camara) sobre Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae), Trichogramma pintoi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y Copidosoma koehleri (Hymenoptera: Encyrtidae), en el Perú. Agricultura Técnica*, vol. 63, pp. 347-360.
- Iannacone, J, Wong, YS, Alcántara, P & Rodríguez, R. 2008. *Actividad insecticida y repelente de plantas en el gorgojo del maíz Sitophilus zeamais. Scientia (Lima)*, vol. 10, pp. 171-180.
- Iannacone, JA, Ayala, H, Alvariano, L, Paredes, C, Villegas, W, Alomia, J, Santos, S, Nolzco, N & Cruces, L. 2014. *Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, Hura crepitans (Euphorbiaceae). Revista de Toxicología*, vol. 31, pp. 50-62.
- Ibrar, BM, Nafees, M, Rauf, A & Khan, H. 2014. *Cytotoxic, acute toxicity and phytotoxic activity of Callicarpa macrophylla in various models. American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*, vol. 3, pp.1-4.
- Jaramillo, BE, Duarte, E & Pino, N. 2013. *Actividad repelente de aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Piperaceae del Departamento de Chocó, Colombia. Revista de Toxicología*, vol. 30, p. 86.
- Jorge, T, Lenartovicz, V, Andrade, M, Bonafin, T, Giordani, M, Bueno, N & Schneider, D. 2009. *Pediculicidal activity of hydroethanolic extracts of Ruta graveolens, Melia azedarach and Sambucus australis. Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 28, pp. 457-459.
- Jovanović, Z, Kostic, M & Popović, Z. 2007. *Grain-protective of herbal extracts against the bean weevil Acanthocelides obtectus Say. Industrial Crops and Products*, vol. 26, pp. 100-104.
- Kováts, N, Ács, A, Refaey, M & Baán, ZS. 2014. *Medical use and toxic properties of rue (Ruta graveolens) and peppermint (Mentha piperita)*. En : http://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=holTRwgAAA&AJ&citation_for_view=holTRwgAAA&AJ:YsMSGLebci4C leído el 15 de diciembre del 2014.
- Krishnarajua, A, Raoa, T, Sundararajua, D, Vanisreeb, M, Tsayb, H & Subbarajua, G. 2005. *Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (Artemia salina) lethality assay. International Journal of Advanced Science and Engineering Research*, vol. 3, pp. 125-134.
- Luna, J. 2009. *Nematodo de vida libre Panagrellus redivivus (Goodey, 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. Investigación y Ciencia*, vol. 45, pp. 4-11.
- Mancebo-Rodríguez, A, Estrada-Ortiz, J, González-Triana, C, González-Torres, Y, González-Navarro, B & Bada-Barro, AM. 2011. *Evaluación ecotoxicológica de dos derivados del Nim en lombriz de tierra y abejas. Revista de Toxicología*, vol. 28, pp. 147-151.
- Maraschin, F & Alves, M. 2006. *Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de Lactuca sativa L. (Asteraceae). Acta Botanica Brasilica*, vol. 20, pp. 61-69.
- Maršálek, B & Bláha, L. 2000. *Microbiotest for cyanobacterial toxins screening. Contribution 58. In: New Microbiotest for routine screening and biomonitoring. Persoone, G.; Janssen, C. & De Coen, W. (eds). Kluwer Academic / Plenum*

- Publishers. pp. 519-525.
- Mora, G & Salazar, R. 2000. *Efecto de extractos vegetales sobre larvas de Hypsipyla grandella*. Escuela de Postgrado, CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Mossi, A, Astolfi, V, Kubiak, G, Lerin, L, Zanella, C, Toniazzo, G, Oliveira, D, Treichel, H, Devilla, I, Cansian, R & Restello, R. 2011. *Insecticidal and repellency activity of essential oil of Eucalyptus sp. against Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 91, pp. 273-277.
- Muñoz, K, Londoño, J, Arango, G, Sierra, J & Bravo, K. 2007. *Effect of extraction technique of Ruta graveolens on antityrosinase activity and correlation amongst inhibitory activity, phenolic compounds content and cytotoxicity*. Vitae, vol. 14, pp. 78-83.
- Mushobozy, DMK, Nganilevanu, G, Ruheza, S & Swella, GB. 2009. *Plant oils as common bean (Phaseolus vulgaris L.) seed protectants against infestations by the Mexican bean weevil Zabrotes subfascistus (Boh.)*. Journal of Plant Protection Research, vol. 49, pp. 35-39.
- Navarro, AR, Arrueta, RG & Maldonado, MC. 2006. *Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria*. Revista de Toxicología, vol. 23, pp. 125-129.
- Nguta, J, Mbaria, J, Gakuya, D, Gathumbi, P, Kabasa, J & Kiama, S. 2011. *Biological screening of kenyan medicinal plants using Artemia salina L. (Artemiidae)*. Pharmacology online, vol. 2, pp. 458-478.
- Nwauzoma, AN, Choudhary, MI, Zulfiqar, A & Olaiya, CO. 2013. *Biological activity of crude extracts of Citrus species from Nigeria*. Natural Science, vol. 11, pp. 135-139.
- Oliveira, D, Leitao, G, Santos, S, Bizzo, DP, Alviano, CS & Alviano, DS. 2006. *Ethnopharmacological study of two Lippia species from Oriximiná, Brazil*. Journal of Ethnopharmacology, vol. 108, pp. 103-108.
- Oliveira, FA, Reis, LP, Pinto, MCL, Soto-Blanco, B, Moyano, MR, Molina, AM & Melo, MM. 2013. *Carbamates detection in fish caught in the Sao Francisco river*. Revista de Toxicología, vol. 30, pp. 92.
- Olivero-Verbel, J, Güette-Fernandez, J & Stashenko, E. 2009. *Acute toxicity against Artemia franciscana of essential oils isolated from plants of the genus Lippia and Piper collected in Colombia*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, vol. 8, pp. 419-427.
- Onocha, PA & Ali, SM. 2010. *Insecticidal, antimicrobial, phyto- and cytotoxicity of Chassalia kolly plant extract*. Archives of Applied Science Research, vol. 2, pp. 151-156.
- Ortega, R, Dayaaleth, A & Alban, R. 2009. *Urtica base purines (Urtica dioica), a natural alternative for the coleopterus insect control*. Revista Brasileira de Agroecologia, vol. 4, pp. 53-55.
- Ortuño, M. 2006. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Madrid. Editora Aiyana, SA.
- Özen, T & Korkmaz, H. 2003. *Modulatory effect of Urtica dioica L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzymes systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice*. Phytomedicine, vol. 10, pp. 405-415.
- Pains, L, Cunha, R, Da Silva, D, Maciel, M, De Araújo, F, Rietzler, A, Oliveira, F & Vieira, S. 2010. *Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico de extratos de folhas de Eucalyptus urograndis*. Revista de Ciências del Departamento de Química, vol 1, pp. 19-26.
- Parra, G, García, C & Cotes, J. 2007. *Actividad insecticida de extractos vegetales sobre Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia*. CES Medicina, vol. 21, pp. 47-54.
- Rehmanullah, SD, Shah, S & Muhammad, Z. 2014. *Pharmacological evaluation of Euphorbia helioscopia L. and Euphorbia hirta L.* International Journal of Biosciences, vol. 4, pp. 20-26.
- Rodríguez, HC. 1998. *Recetas de plantas contra mosca blanca* pp. 49-62. In Rodríguez, HC (ed.) *Memorias de: Simposio Internacional y IV Nacional sobre Substancias vegetales y minerales en el combate de plagas*. Colegio de Postgraduados Campus Puebla.

- Acapulco. México.
- Sacchetti, G, Maietti, S, Muzzoli, M, Scaglianti, M, Manfredini, S, Radice, M & Bruni, R. 2005. *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Food Chemistry, vol. 91, pp. 621-632.
- Sánchez, J. 2002. *Efecto de extractos de Ruta graveolens (Rutaceae) sobre Radopholus similis e identificación de nematodos asociados al cultivo de plátano Musa spp.* Tesis para optar el grado de maestro en ciencias. Universidad de Colima.
- Silva, G, Lagunes, A & Rodríguez, J. 2003. *Control de Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado*. Ciencia e investigación agraria, vol. 30, pp. 153-160.
- Silva, G, Lagunes, A, Rodríguez, J & Rodríguez, D. 2002. *Insecticidas vegetales; una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, vol. 66, pp. 4-12.
- Souto, XC, Bolano, JC, Gonzalez, L & Reigosa, MJ. 2001. *Allelopathic effects of tree species on some soil microbial populations and herbaceous plants*. Biologia Plantarum, vol. 44, pp. 269-275.
- Tavares, GCM. 2002. *Bioatividade da erva-de-santa maria, Chenopodium ambrosioides L. (Chenopodiaceae), em relação a Sitophilus zeamais Mots., 1885 (Col: Curculionidae)*. Tesis de Dissertação (Mestrado). Piracicaba: Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Usp. Brazil.
- Tinzaara, W, Tushemereirwe, W, Nankinga, CK, Gold, CS & Kashaija, I. 2006. *The potential of using botanical insecticides for the control of the banana weevil, Cosmopolites sordidus (Coleoptera: Curculionidae)*. African Journal of Biotechnology, vol. 5, pp. 1994-1998.
- Trujillo, F. 2008. *Determinación de la actividad alelopática de extractos vegetales sobre Lactuca sativa*. Tesis de licenciatura de tecnóloga en química. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Escuela de Tecnología Química Pereira.
- Ullah, R, Ibrar, M, Shah, S & Hameed, I. 2012. *Phytotoxic, cytotoxic and insecticidal activities of Calendula arvensis L.* Indian journal of biotechnology and pharmaceutical research, vol. 3, pp. 104-111.
- Upasani, S, Kotkar, H, Mendki, S & Maheshwari, V. 2003. *Partial characterization and insecticidal properties of Ricinus communis L. foliage flavonoids*. Pest Management Science, vol. 59, pp. 1349-1354.
- Vásquez, R. 2005. *Evaluación de extractos vegetales en el control de insectos plaga a nivel de huerto familiar*. Memoria de residencia. ITAO. No. 23 Oaxaca. México. 35 p.
- Verdeguer, M, Blázquez, M & Boira, H. 2009. *Phytotoxic effects of Lantana camara, Eucalyptus camaldulensis and Eriocephalus africanus essential oils in weeds of Mediterranean summer crops*. Biochemical Systematics and Ecology, vol. 37, pp. 362-369.
- Vergara, RR. 2000. *Retos y posibilidades del control etológico en la agricultura sostenible*. Control Etológico – Seminario Internacional. Lima, Perú, 71 p.
- Wang, W & Williams, J. 1990. *The use of phytotoxicity tests (common duckweed, cabbage and millet) for determining effluent toxicity*. Environmental Monitoring and Assessment, vol. 14, pp. 45-58.

Received November 15, 2016.
Accepted January 30, 2017.