



SETAC – Brazil

Efecto Toxicológico del “Sachayoco”, *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre Dos Controladores Biológicos de Plagas Agrícolas

J. IANNAONE,^{1,2*} L. ALVARIÑO,² J. C. SOTO² & C. SALCEDO²

¹Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú,

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú

(Received September 9, 2006; Accepted December 21, 2006)

RESUMEN

Paullinia clavigera Simpson (Sapindaceae) “Sachayoco” es usada como insecticida artesanal en la Amazonía Peruana. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico de *P. clavigera* procedente de Pucallpa, Perú, sobre *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustácea: Daphniidae), y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas: *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), y *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). En *D. magna* (CL₅₀ a 48 h de exposición), los mayores efectos se encontraron en los extractos clorofórmicos de hoja (CL₅₀ = 237 mg L⁻¹) y de corteza (CL₅₀ = 398 mg L⁻¹). En *C. koehleri* (CL₅₀ a 48 h y emergencia de adultos), solo los extractos hexánico de hoja (CL₅₀ = 145 mg L⁻¹; 38,9%) y de corteza (CL₅₀ = 298,6 mg L⁻¹; 16,8%) produjeron efectos sobre los adultos y sobre la emergencia de adultos, respectivamente. No se encontró efectos toxicológicos del extracto clorofórmico botánico de corteza sobre las larvas de *C. externa* (a 96 h de exposición). Los extractos hidroalcohólicos de *P. clavigera* tuvieron el mayor potencial para su uso en el manejo integrado de plagas (MIP) porque fueron menos tóxicos y selectivos para el control biológico y para *D. magna* en el ambiente acuático.

Palabras claves: bioensayo, *Chrysoperla*, *Copidosoma*, *Daphnia*, extracto botánico, plaguicidas naturales.

ABSTRACT

Toxicological effect of soapberry, *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) on *Daphnia magna* and on two biological control of agriculture pests

Soapberry, *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) is used as a craft insecticide in Peruvian Amazon. The aim of the current research was to evaluate the toxicological effect of *P. clavigera* proceeding of Pucallpa, Peru, on *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustacea: Daphniidae), and on two biological controls of agriculture pests: *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), and *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). In *D. magna* (LC₅₀ at 48 h exposure), the highest effects were found with leaves (LC₅₀ = 237 mg L⁻¹) and stem cortex (LC₅₀ = 398 mg L⁻¹) chlorophormic extracts. In *C. koehleri* (LC₅₀ at 48 h exposure and emergence of adults), only hexanic extracts of leaves (LC₅₀ = 145 mg L⁻¹; 38.9%) and stem cortex (LC₅₀ = 298.6 mg L⁻¹; 16.8%) produced effects on mortality and emergency of adults, respectively. Toxicological effects of stem cortex chlorophormic botanic extracts on larvae of *C. externa* (at 96 h of exposure) were not found. Leaves and stem cortex ethanolic extracts had the most potential for use in an integrated pest management (IPM) because they were less toxic and selective to biological control and for *D. magna* in the freshwater environment.

Key words: bioassays, botanical extracts, *Chrysoperla*, *Copidosoma*, *Daphnia*, natural pesticides.

*Corresponding author: José Iannacone, e-mail: joseiannacone@yahoo.es.

INTRODUCCIÓN

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan menor impacto y riesgo ambiental, que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas sintéticos, los cuales, por su elevado costo, representan una limitante en su uso. La degradación del habitat por efecto de los pesticidas es un campo de preocupación de los biólogos conservacionistas y de los toxicólogos ambientales (Hansen & Johnson, 1999; Iannacone & Alvaríño, 2002). La utilización de extractos vegetales para el control de plagas representa un alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente al conservar la biodiversidad (Castiglioni et al., 2002; De Oliveira et al., 2003). Las plantas se utilizan en extractos crudos o en algunos casos como productos naturales derivados (Iannacone & Lamas, 2003a). Podríamos mencionar que en el Perú entre los primeros plaguicidas botánicos usados tenemos a la nicotina, extraída del fruto de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae); a la piretrina, extraída del piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Benth & Hook (Asteraceae); a la rotenona, extraída de *Derris* spp. y *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae); a la sabatina, extraída de sabadilla, *Schoenoecaulon officinale* A. Gray ex Benth (Liliaceae); y a la rianodina, extraída de *Ryania speciosa* Monach (Flacuortiaceae) (Iannacone & Lamas, 2003b).

El género *Paullinia* está representado en la flora amazónica, con varias especies que tienen beneficios al hombre. *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) es una planta amazónica promisorio como biocida. Las poblaciones naturales de *P. clavigera* se localizan en ecosistemas de altura Amazónica, formando parte del bosque primario y en planicies que requieren de poca luminosidad, de moderada a alta humedad relativa y de altitudes de 150 a 2000 m. Esta especie prefiere suelos arcillosos. Su raíz se utiliza como ictiotóxico para la pesca, y presenta actividad antifúngica y molusquicida. El contenido de taninos (principalmente el ácido catecutánico y el catecol) es muy alto, por lo que provoca efectos en el sistema nervioso central. Asimismo presenta gran cantidad de cafeína, que varía de 3% a 5% del peso seco, y una saponina llamada timbonina con propiedades ictiotóxicas se encuentra en cantidades pequeñas. En la especie congénica *Paullinia pinnata* se han registrado actividades antioxidantes y molusquicidas contra *Biomphalaria glabrata*, hospedero intermediario de *Schistosoma mansoni* (Melendez & Carriles, 2002; Zamble et al., 2006). En *Paullinia cupana* "Guarana" se ha evaluado su importancia como remedio herbal natural y etnobotánico (Myerscough, 1998) y se ha evaluado la toxicidad del extracto acuoso sobre células de ovario de hamster y sobre la bacteria *Vibrio fisheri*, encontrándose que dosis altas pudieran ser dañinas para la salud humana (Santa María et al., 1998). Extractos acuosos de *P. cupana* han mostrado actividad genotóxica y mutagénica en células bacterias de *Escherichia coli* (da Fonseca et al., 1994). Altas concentraciones

de cafeína se han encontrado en *Paullinia yoco* y *P. cupana* (Schultes, 1994; Cipollini 2000). Plotkin (1988) señala a *P. cupana* como una fuente potencial de plaguicida biodegradable. Por ende, para una adecuada evaluación biológica de *P. clavigera*, se requiere el empleo de bioensayos toxicológicos (Nano et al., 2002). La toxicidad aguda y la mortalidad son parámetros ecotoxicológicos de gran importancia (Iannacone & Alvaríño, 2002).

Daphnia magna Strauss, 1820 (Crustácea: Daphniidae), es una especie partenogenética usada extensivamente en pruebas de toxicidad para evaluar sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, lixiviados, entre otros. Esto es debido a su: 1) importante papel en la comunidad zooplanctónica, 2) facilidad de cultivo y 3) corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías (Castillo, 2004; Kallqvist et al., 2006). En el Perú, el Manual Técnico Andino (26/2/2002) es la norma legal para el registro de plaguicidas de uso agrícola. Este manual indica como requerimiento realizar bioensayos ecotoxicológicos con *D. magna* para evaluar el riesgo ambiental acuático, a pesar que el crustáceo *D. magna* no es una especie neotropical. Sin embargo, Wernersson (2004) ha evaluado la ecotoxicidad de las aguas tropicales amazónicas en Ecuador empleando a *D. magna*.

Copidosoma koehleri Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), es una microavispa poliembriónica parasitoide obligatoria a nivel de huevo y larva, nativo de Sudamérica (Iannacone & Lamas, 2003a,b). Este parasitoide actúa preferentemente sobre huevecillos del complejo de polillas de la papa, como *Symmetrischema plaesiosema* (Turner, 1919), *Tuta absoluta* y *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Ramán et al., 1993).

Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) es un eficiente depredador en el manejo ecológico e integrado de plagas. Sus larvas y adultos son considerados depredadores muy voraces, oófagos y larvífagos, alimentándose de amplia diversidad de presas, tales como pulgones, moscas blancas, cochinillas, huevos y larvas de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782), *Tuta absoluta* Meyrick, 1917, *Helicoverpa zea* Boddie, 1850, *Heliothis virescens* Fabricius, 1777, *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) y *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856, en varios cultivos (Iannacone & Reyes, 2001). *C. externa* tiene amplia distribución en la costa y sierra del Perú con presencia de adultos a través de todo el año, fácil crianza en cautiverio, potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivos. En adición se ha evaluado su sensibilidad a varios plaguicidas (Schumuck, 1997; Iannacone & Lamas, 2002; Carvalho et al., 2002; Godoy et al., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico de *P. clavigera* procedente de Pucallpa, Perú, sobre *D. magna* y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas: *C. koehleri* y *C. externa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos toxicológicos se realizaron en el Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú, durante el 2005.

Extracto botánico

Las lianas de *P. clavigera* (PC) fueron colectadas del km 83 del Caserío "Señor de los Milagros", jurisdicción del distrito de Irazola, Provincia de Padre Abad, Ucayali, Perú, ubicada en el km 12,400. Las lianas de PC fueron secadas directamente al sol por espacio de dos semanas aproximadamente y se trituraron en un molino de martillo. Se prepararon los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico según los procedimientos descritos en el screening fitoquímico. Se prepararon las concentraciones empleando un factor de dilución de 0,5.

Screening fitoquímico

La preparación de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de la corteza y hoja de *P. clavigera* fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía "Gabriel de la Fuente Martín" de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). El screening fotoquímico de la corteza fue realizado en la UNAP y el de la hoja en el Laboratorio de análisis químico de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). A partir de 100 g de muestra seca y molida de *P. clavigera* se extrajo con hexano (solvente apolar) hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, después de eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida se obtuvo los extractos hexánicos. Al residuo se le adicionó cloroformo (CHCl_3) (solvente medianamente polar) y se extrajo hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, el solvente se eliminó hasta sequedad en rotavapor a presión reducida, de esta forma se obtuvo los extractos clorofórmicos. Finalmente, al residuo se adiciona etanol-agua (70:30), solventes polares, y se procedió como en los casos anteriores, obteniéndose los extractos hidroalcohólicos. Procedimientos estándares para la marcha fitoquímica fueron determinados para alcaloides (Dragendorff/Mayer), aminoácidos (Ninhidrina), saponinas (producción de espuma), esteroides (Liebermann Burchard), triterpenos (Liebermann Burchard), taninos (Gelatina/ FeCl_3), fenoles/leucoantocianidinas (Rosenheim), flavonoides (Shinoda), cumarinas (revelado con vainilla y ácido ortofosfórico) y quinonas (Borntrager). Se detectó su presencia en tres categorías: - = reacción negativa, \pm = reacción muy poco positiva y + = reacción positiva.

Organismos prueba

Daphnia magna

Hembras adultas de esta especie fueron obtenidas del acuario "Cleo" procedente del distrito de Lince, Lima, Perú,

y fueron llevadas al Laboratorio de Invertebrados en recipientes plásticos de 2 L de capacidad. Hembras partenogenéticas fueron colocadas en el medio nutritivo ADaM. La preparación del medio se realizó de la siguiente forma: 9,9 g de sales obtenidas por evaporación del agua de mar fueron adicionadas a 60 L de agua de grifo de clorinada (Tabla 1), reposadas y hiperoxigenada durante 24 h. Luego se agregó 138 mL de una solución de cloruro de calcio ($117,6 \text{ g L}^{-1}$), 132 mL de una solución de bicarbonato de sodio ($25,2 \text{ g L}^{-1}$) y 6 mL de una solución de óxido de selenio ($0,07 \text{ g L}^{-1}$) (Klüttgen *et al.*, 1994). Posteriormente se procedió a realizar dos análisis fisicoquímicos de medio ADaM (Tabla 1). Los cultivos parciales se mantuvieron a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un fotoperiodo aproximadamente de 12L:12O. El oxígeno disuelto tuvo una concentración sobre 6 mg L^{-1} (Castillo, 2004). Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se emplearon cohortes de neonatos ($< 24 \text{ h}$ de nacidos). La duración total de la prueba fue de 48 h de exposición. Las concentraciones empleadas fueron 625, 1250, 2500 y 5000 mg L^{-1} del extracto hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *P. clavigera*. Para todos los casos se empleó un control con la máxima concentración de solvente empleado para la dilución. Se empleó un factor de dilución de 0,5. A cada envase cuadrangular de $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ a los que se transfirieron diez neonatos de *D. magna*. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 15 s de 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 (Castillo, 2004).

Copidosoma koehleri

Microavispas de esta especie se obtuvieron de una colonia mantenida durante diez años del Programa Nacional de Control Biológico, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (PNCB-SENASA) ($12^\circ 01' 18'' \text{LS}$, $76^\circ 54' 57'' \text{LO}$). Las condiciones de cría para *C. koehleri* siguió lo descrito por Iannacone & Lamas (2003a). Se realizaron ensayos de toxicidad por inmersión para larvas momificadas de *P. operculella* parasitadas por *C. koehleri* y por contacto-residual para adultos. La temperatura del ensayo fue de $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Toxicidad por inmersión: Las características del ensayo por inmersión siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2003a). Se trataron 8 larvas parasitadas por concentración evaluada. Las concentraciones empleadas fueron 312,5, 625, 1250, 2500 y 5000 mg L^{-1} del extracto hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *P. clavigera*. Las lecturas se hicieron hasta la emergencia en el agua destilada y en el respectivo control de solvente de más del 65% de los adultos de *C. koehleri* de las larvas momificadas de *P. operculella*. El porcentaje de emergencia de *C. koehleri* se calculó contando el número de microavispas emergidas de una larva momificada de *P. operculella*, dividiéndolo por el número total de cámaras parasitadas.

Tabla 1 – Características físico-químicas del agua de grifo y del medio ADaM (Aachener Daphnien Medium) empleados en los bioensayos con *Daphnia magna*.

Parámetro Físico-químico	Agua de grifo	ADaM
	mg L ⁻¹	
pH ¹	7,2	8,15
CE ²	0,86	1,42
Calcio	123,6	148,4
Magnesio	15,3	13,7
Potasio	3,90	7,81
Sodio	4,70	20,5
Nitratos	3,10	0,62
Carbonatos	0	0,9
Bicarbonatos	216,5	184,2
Sulfatos	110,4	149,8
Cloruros	85,1	308,4
Boro	0,5	1,1
Fe	ND	0,02
Cu	ND	0,01
Zn	ND	0,05
Mn	ND	0,001
Dureza cálcica	362	ND

Los resultados indicados corresponden al promedio aritmético de dos análisis físico-químicos de agua. ¹ = no aplica unidades mg L⁻¹. ² = dS m⁻¹. ND = no determinado.

Toxicidad por contacto-residual para adultos: Las características del ensayo por contacto residual siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2003a). El tratamiento control consistió en agua destilada y en el solvente hexano. Se usaron 20 adultos por sustancia evaluada y un total de 5 adultos por repetición (Hassan, 1992). Las lecturas se continuaron siempre y cuando la mortalidad en el control no fuera superior a 20%. Las concentraciones empleadas fueron 312,5, 625, 1250, 2500 y 5000 mg L⁻¹ del extracto hexánico de *P. clavigera*.

Chrysoperla externa

Las condiciones de cría para *C. externa* para la obtención de larvas siguió lo descrito por Iannacone & Lamas (2002). Los adultos obtenidos se alimentaron bajo ocho dietas artificiales en envases cilíndricos de plástico de 30 cm de altura × 20 cm de diámetro (Tabla 2). La dieta estándar o dieta control (L) fue la utilizada por el PNCB-SENASA en la alimentación de adultos de *C. externa*. Las otras siete dietas variaron en su composición de maca, kiwicha y soya (Tabla 2). Luego de los

huevos obtenidos procedentes de los adultos de *C. externa* bajo las ocho dietas se obtuvieron las larvas, las cuales fueron empleadas en los bioensayos ecotoxicológicos.

Para los bioensayos, fue empleado el primer estadio larval obtenido de los adultos alimentados con las ocho dietas. Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con huevos de *S. cerealella*, pegados a cartulinas de 5 × 5 mm. Se emplearon cohortes de especímenes entre 24 y 48 h de edad. Las pruebas de sensibilidad se realizaron bajo condiciones de oscuridad, para evitar el efecto de fotólisis. El indicador para las pruebas de mortalidad fue el indicado por Iannacone & Lamas (2002).

Toxicidad por contacto-residual: Los ensayos se llevaron a cabo para las larvas de primer estadio, alimentadas previamente con huevos de *S. cerealella* y obtenidos de los adultos alimentados con la dieta 1. En *C. externa* solo se evaluó el extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera*, disuelto en agua destilada y aplicado sobre envases plásticos de 4 × 3.5 × 3 cm, esparcido en forma homogénea en el interior. Las características del ensayo por contacto residual siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2002).

Toxicidad por incorporación en la dieta: Se realizó aplicaciones tópicas por inmersión sobre huevos de *S. cerealella* con los que se alimentó a las larvas del primer estadio de *C. externa* procedentes de cada una de las ocho dietas artificiales para la alimentación de los adultos. Las características del ensayo por incorporación en la dieta siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2002). Se utilizó 56 larvas del primer estadio de *C. externa* para cada tipo de dieta, ocho larvas por concentración, haciendo un total de 448 larvas para las ocho dietas. Se observó la mortalidad acumulada a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición (Iannacone y Lamas, 2003a).

Para los bioensayos de toxicidad por contacto-residual y de incorporación en la dieta, se preparó una solución madre de 1 g del extracto de *P. clavigera* en 1 ml del solvente (cloroformo al 96% de pureza), el cual finalmente se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Posteriormente, para *C. externa* se preparó cinco concentraciones 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ de extracto con factor de dilución de 0,5. En adición, se preparó dos controles, uno con agua destilada y otro con el respectivo solvente a la más alta concentración empleada.

Análisis de datos

Las pruebas de toxicidad de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y hoja de Sachayoco sobre *D. magna* se evaluó en cuatro concentraciones más el control de agua destilada y el solvente, con cuatro

repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 6 × 4. En *C. koehleri*, para evaluar los porcentajes de emergencia y la mortalidad de los adultos, se evaluó en cinco concentraciones más el control de agua destilada y del solvente, con cuatro repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 7 × 4. En *C. externa* para evaluar la mortalidad larvaria por contacto-residual y de incorporación en la dieta se evaluó en cinco concentraciones más el control de agua destilada y del solvente, así como el efecto de las ocho dietas, en un diseño Factorial de Bloque Completo al Azar (DBCA): 7 × 4 × 8. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizó mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando sea menor al 20% (Macedo *et al.*, 1997). La Concentración Letal media (CL₅₀) se calculó usando el programa computarizado Probit versión 1,5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (versión 12,0). Se empleó la clasificación toxicológica de la IOBC para determinar el efecto en los porcentajes de mortalidad y de reducción de la emergencia de *C. koehleri* (Hassan, 1992).

Tabla 2 – Dietas artificiales para alimentación de adultos de *Chrysoperla externa*.

Ingredientes	Dietas (g)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	L	L+M	L+S	L+K	M+S	M+K	S+K	M+S+K
Maca (<i>Lepidium peruvianum</i>)		17,5			8,75	8,75		7
Kiwicha (<i>Amaranthus caudatus</i>)				17,5		8,75	8,75	7
Soya (<i>Glycine max</i>)			17,5		8,75		8,75	7
Levadura de cerveza	35	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21
Polen	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	3,5
Miel	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21
Agua	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21

Para la preparación de las ocho dietas se usó como medida una cucharadita de aproximadamente 3,5 g. L = levadura de cerveza; M = maca; S = soya; K = kiwicha. La dieta estándar para adultos de *C. externa* usada en el PNCB-SENASA es la n° 1.

RESULTADOS

El screening fitoquímico de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de corteza y de hoja de *P. clavigera* obtuvo los resultados señalados en la Tabla 3. El extracto hexánico de corteza y hoja presentó triterpenos. Solo el extracto hexánico de corteza tuvo flavonoides y quinonas. El extracto clorofórmico de corteza y hojas presentó esteroides. Solo el extracto clorofórmico de corteza presentó saponinas, cumarinas, flavonoides y quinonas. En cambio, el extracto clorofórmico de hoja solo tuvo triterpenos. Los extractos hidroalcohólico de corteza y hoja presentaron fenoles-antocianidinas y flavonoides (Tabla 3).

Se encontró la siguiente secuencia en orden descendente de toxicidad aguda (CL_{50} en $mg L^{-1}$) de los extractos de *P. clavigera* sobre *D. magna* a 24 y 48 h de exposición: cloroformo de hoja > cloroformo de corteza > hidroalcohol de hoja > hexánico de hoja > hexánico de corteza > hidroalcohol de corteza (Tabla 4).

No existieron diferencias significativas en el promedio del número de cámaras de *C. koehlerii* expuestas a los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y de hoja *P. clavigera* evaluados por concentraciones ($F = 0,25-1,51$; $P = 0,19-0,95$) y por repeticiones ($F = 0,28-1,78$; $P = 0,12-0,94$) (Tabla 5). Con relación al porcentaje de emergencia de *C. koehlerii* expuestos a los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y hoja *P. clavigera* evaluados por concentración, solo

existieron diferencias significativas en los dos extractos hexánicos entre $5000 mg L^{-1}$ y el control ($F = 5,16-8,53$; $P = 0,00$) (Tabla 5). Estos dos extractos hexánicos a $5000 mg L^{-1}$ fueron considerados según la IOBC como ligeramente peligrosos (categoría 2). En cambio, los extractos clorofórmicos e hidroalcohólicos fueron catalogados como de menor peligrosidad (categoría 1). En adición, no existieron diferencias significativas en relación a las repeticiones ($F = 0,92-2,70$; $P > 0,05$) (Tabla 5).

Al encontrarse efectos significativos en la emergencia de adultos de *C. koehlerii* con los extractos hexánicos de corteza y hoja de *P. clavigera*, se procedió a realizar bioensayos de mortalidad de adultos de *C. koehlerii* a 48 h de exposición solo con estos dos extractos, y se observó diferencias significativas con el control desde la concentración más baja de los extractos a $312,5 mg L^{-1}$ (Tabla 6). A 48 h de exposición, el extracto hexánico de corteza presentó en términos de CL_{50} mayor toxicidad que el hexánico de hoja (Tabla 6). Estos dos extractos hexánicos a $5000 mg L^{-1}$ fueron considerados según la IOBC como peligrosos (categoría 4).

Al evaluar la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición a las cinco concentraciones utilizadas del extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* se observó que estas no produjeron ningún efecto de mortalidad sobre las larvas de primer estadio de *C. externa*, tanto en los bioensayos por incorporación a la dieta provenientes de adultos alimentados con ocho dietas a base de maca, kiwicha y soya, así como en los bioensayos de contacto residual.

Tabla 3 – Características fitoquímicas de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de la corteza y hoja de *Paulinia clavigera*.

Características fitoquímicas	Extracto de corteza			Extracto de hoja		
	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico
Prueba de						
Alcaloides	–	–	–	–	–	–
Saponinas	–	±	+	ND	ND	ND
Esteroides	–	+	–	+	+	–
Triterpenos	+	–	–	+	+	–
Taninos	–	–	–	–	–	–
Fenoles/Antocianidinas	–	–	+	–	–	+
Flavonoides	+	+	+	–	–	+
Cumarinas	–	+	+	ND	ND	ND
Quinonas	±	±	+	–	–	–
Aminoácidos	ND	ND	ND	–	–	+

Leyenda: reacción: – = negativa; ± = muy poco positiva; + = positiva.

Tabla 4 – Toxicidad aguda de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de *Paullinia clavigera* procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú, sobre *Daphnia magna* a 24 y 48 h de exposición.

Concentración (mg del extracto L ⁻¹)	Hexano corteza (%)*		Hexano hoja (%)*		Cloroformo corteza (%)*		Cloroformo hoja (%)*		Hidroalcohol corteza (%)*		Hidroalcohol hoja (%)*	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	Control: H ₂ O destilada solvente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
625	2,8	6,8	1,5	20,4	0	17,5	0	47,7	0	0	4,8	40,8
1250	13,7	32,3	28,1	31,8	13,1	62,9	42,0	65,1	2,5	33,9	25,9	55,6
2500	62,2	77,4	62,7	85,8	49,3	71,1	45,4	86,9	23,1	57,9	62,9	85,2
5000	86,5	88,7	84,0	97,2	81,9	95,9	82,9	95,6	64,1	100	94,7	100
CL ₅₀	2272	1697	2097	1384	874	398	747	237	3979	1912	1918	956

* = Porcentaje de mortalidad.

Tabla 5 – Promedio de número de cámaras y porcentajes de emergencia de *Copidosoma koehleri* con los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de *Paullinia clavigera*.

mg extracto L ⁻¹	N ^o cámaras		Emergencia (%)	
	X	DE	X	DE
Hexano corteza				
Control H ₂ O destilada	61,0a	22,8	86,4a	15,4
Control hexano	52,8a	21,9	79,5a	32,8
312,5	47,3a	9,7	75,5a	16,9
625	47,0a	21,3	88,1a	8,5
1250	46,9a	22,0	83,1a	16,3
2500	42,4a	16,4	78,4a	13,0
5000	58,9a	20,1	38,9b	30,9
Hexano hoja				
Control H ₂ O destilada	61,0a	22,8	86,4a	15,4
Control hexano	52,8a	21,9	79,5a	32,8
312,5	48,0a	9,8	69,8a	25,7
625	44,6a	18,8	78,5a	17,6
1250	63,3a	26,1	85,4a	13,8
2500	55,5a	29,1	66,7a	37,3
5000	55,7a	21,2	16,8b	11,8
Cloroformo corteza				
Control H ₂ O destilada	26,4a	10,7	67,9a	31,4
Control cloroformo	36,5a	10,2	72,1a	31,7
312,5	32,7a	11,2	87,4a	9,9
625	30,5a	15,2	81,9a	25,5
1250	28,0a	10,5	80,3a	11,7

Tabla 5 – (Continuación).

mg extracto L ⁻¹	Nº cámaras		Emergencia (%)	
	X	DE	X	DE
Cloroformo corteza				
2500	34,8a	13,0	79,1a	25,9
5000	31,4a	12,8	78,1a	15,9
Cloroformo hoja				
Control H ₂ O destilada	26,4a	10,7	67,9a	31,4
Control cloroformo	36,5a	10,2	72,1a	31,7
312,5	28,3a	10,8	67,1a	38,2
625	24,0a	9,9	42,1a	34,7
1250	33,6a	11,3	67,7a	30,6
2500	26,8a	13,9	67,3a	36,3
5000	27,9a	12,7	66,8a	22,9
Hidroalcohol corteza				
Control H ₂ O destilada	31,0a	13,8	74,4b	32,6
Control etanol	29,0a	9,7	86,4a	14,3
312,5	30,3a	11,7	70,1a	33,4
625	25,9a	8,5	79,9a	18,8
1250	35,6a	11,6	77,2a	17,4
2500	36,3a	16,0	84,0a	18,6
5000	41,6a	12,8	81,9a	18,7
Hidroalcohol hoja				
Control H ₂ O destilada	31,0a	13,8	74,4b	32,6
Control etanol	29,0a	9,7	86,4a	14,3
312,5	31,8a	10,8	72,6a	33,6
625	34,1a	15,3	93,6a	3,9
1250	34,4a	14,5	70,8a	34,6
2500	35,1a	11,4	83,6a	16,7
5000	31,4a	9,2	76,0a	10,4

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales.

DISCUSIÓN

Los insectos depredadores y parasitoides, así como la fauna no destinataria del ambiente acuático, pudieran ser afectados por las aplicaciones de plaguicidas en muchas formas. Los controladores biológicos pudieran exponerse a los plaguicidas indirectamente por alimentarse de presas

contaminadas o directamente por la aspersion de un plaguicida o por el contacto residual con la planta tratada. La fauna acuática no destinataria puede ser afectada cuando los plaguicidas llegan al ambiente dulceacuícola (Medina *et al.*, 2003). En este estudio evaluamos el efecto y la compatibilidad del uso de seis extractos botánicos de *P. clavigera* para el control de plagas con *D. magna*, *C. koehleri* y *C. externa*.

Tabla 6 – Efecto de los extractos hexánico de corteza y hoja de *Paullinia clavigera* sobre la mortalidad de adultos de *Copidosoma koehleri* a 48 h de exposición.

mg extracto L ⁻¹	% mortalidad	
	Extracto hexano corteza	Extracto hexano hoja
Control: H ₂ O destilada	0a	0a
solvente	0a	0a
312,5	81,2b	52,3b
625	87,5bc	85,7bc
1250	100c	91,4c
2500	100c	96,7c
5000	100c	100c
CL ₅₀	145,4	298,6

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales.

La efectividad de los insecticidas vegetales es dependiente de algunos factores extrínsecos, tales como la especie y variedad de la planta, época de recolección, parte cosechada y forma de preparación, extracción y aplicación (Iannacone *et al.*, 2002). Amadiola (2000) señala que las diferencias en la toxicidad de diferentes extractos pudieran deberse a la solubilidad de sus compuestos activos en los solventes, a la presencia de inhibidores activos en los solventes o a la presencia de inhibidores de principios insecticidas. En el presente estudio, se emplearon extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos precedentes de la corteza y hoja de *P. clavigera*.

Se ha encontrado que el extracto hidroalcohólico de *Paullinia elegans* Cambess tiene efecto sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 y de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. En adición, no se encontró en este extracto efecto antimolusquicida sobre el vector de *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Truiti *et al.*, 2005). En la especie *Paullinia pinnata* L. se han registrado actividades molusquicidas contra *B. glabrata*, hospedero intermediario de *S. mansoni*, posiblemente debido a flavonas glicosiladas (Meléndez & Carriles, 2002). Nuestros resultados indican efectos de los extractos clorofórmicos de corteza y hoja de *P. clavigera* sobre *D. magna*.

Pérez & Iannacone (2004) señalan propiedades antifúngicas y molusquicidas del Sachayoco, *P. clavigera*, debido a la concentración de las saponinas. Probablemente las saponinas encontradas en el extracto clorofórmico de corteza contribuyeron a los efectos tóxicos sobre *D. magna* (Tabla 3). Con relación a los artrópodos acuáticos, Pérez & Iannacone (2004) señalan propiedades insecticidas del extracto acuoso de *P. clavigera* sobre formas larvianas de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941 (Diptera). En adición,

se ha encontrado que el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* tuvo alta actividad sobre *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Perez *et al.*, 2004). Se ha encontrado toxicidad del extracto etanólico de *Magonia pubescens* Trunk (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Arruda *et al.*, 2003). En el presente trabajo se ha observado que las hojas y corteza de cloroformo tuvieron mayor efecto toxicológico agudo sobre *D. magna* en comparación a los otros cuatro extractos, posiblemente por la presencia de reacciones positivas a esteroides (Tabla 3). La toxicidad del insecticida nim (*Azadirachta indica* A.Juss) y de las plantas acuáticas *Ruppia maritima* L. and *Potamogeton natans* L. (Potamogetonaceae) ha sido evaluada sobre *D. magna* (Cangiano *et al.*, 2002; Iannacone *et al.*, 2002). Una especie congénérica *Daphnia pulex* ha sido explorada como alternativa a *Artemia salina* para la evaluación biológica fitoquímica (Morrow *et al.*, 2001).

La toxicidad aguda y subaguda observada en el extracto hexánico de corteza y hoja de *P. clavigera* sobre la mortalidad y la emergencia de adultos de *C. koehleri* pudiera deberse a la presencia de triterpenos, los cuales no se encontraron en los extractos hidroalcohólicos de *P. clavigera* (Tablas 3, 4 y 6). Asimismo, Schultes & Raffaui (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. Iannacone & Lamas (2003a) encontraron que los extractos hexánicos de molle, *Schinus molle* L., y de lantana, *Lantana camara* L., tuvieron efectos en la emergencia de adultos de *C. koehleri* en comparación a los extractos acuosos y acetónicos y al control. En adición, el extracto acuoso de *P. clavigera* produjo efectos significativos en comparación con el control sobre la mortalidad y repelencia larvaria de *Rhynchophorus palmarum* L. a 24 h de exposición (Perez & Iannacone, 2006).

Una reducción significativa de la emergencia de adultos en *C. koehleri* fue observada bajo la acción de 5000 mg L⁻¹ de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*. Estos dos extractos hexánicos ocasionaron mortalidad prematura de los parasitoides al inhibir la emergencia, por estar en contacto con la superficie externa de la larva momificada parasitada por *C. koehleri*. En adición, algunos adultos del parasitoide se intoxican y no terminan de emerger, esto se produce cuando tratan de emerger y de cortar la cubierta externa de la larva momificada expuesta al extracto con sus mandíbulas y al examinar la superficie externa con sus antenas. Esta reducción en la emergencia de adultos concuerda con los obtenidos en los himenópteros parasitoides *Diaretiella rapae* McIntosh y *Aphidius matricariae* Hal bajo la acción del insecticida sintético deltametrina (Desneux et al., 2006). En cambio, los extractos clorofórmicos y hexánicos de corteza y hoja de *P. clavigera* no produjeron efectos significativos en la emergencia de adultos en *C. koehleri*. Los resultados aquí presentados con estos últimos cuatro extractos botánicos sobre el parasitoide *C. koehleri* pueden ser útiles tanto en evaluaciones regulatorias para el futuro registro de *P. clavigera* como plaguicida botánico en el Perú cuanto en la selección de los extractos con efectos plaguicidas para su integración en el manejo integrado de plagas.

Efectos en la mortalidad de los adultos de *C. koehleri* fueron observados bajo la acción de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*. Estos dos extractos tendrían efecto sobre los parasitoides adultos cuando al buscar su plaga hospedera caminan sobre las hojas tratadas con estos dos extractos. En adición se observó en *C. koehleri*, a concentraciones entre 312,5 y 625 mg L⁻¹ de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*, un incremento en el acicalamiento al irritar los mecanorreceptores y quimiorreceptores corporales (Tran et al., 2004). En los himenópteros parasitoides *D. rapae* y *A. matricariae* bajo la acción del insecticida sintético deltametrina se han encontrado efectos significativos sobre la supervivencia de los adultos (Desneux et al., 2006).

El extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* no produjo ningún efecto de mortalidad de las larvas de primer estadio de *C. externa*, tanto en los bioensayos por incorporación a la dieta como en los de contacto residual. Posiblemente, las bajas concentraciones entre 6,25 y 100 mg L⁻¹ de extracto empleadas en comparación con las concentraciones entre 312,5 y 5000 mg L⁻¹ de extracto usadas sobre *C. koehleri*, explicarían la ausencia de efectos observada. En *C. externa* se ha encontrado que la azadiractina y la rotenona produjeron efectos significativos de mortalidad larvaria por contacto en comparación con el control. Sin embargo, no se observaron efectos significativos en la mortalidad cuando se evaluó la azadiractina y la rotenona en bioensayos por incorporación en la dieta (Iannacone & Lamas, 2002). Sin embargo, tampoco

se puede excluir que el rol metabólico del extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* entre *C. koehleri* y *C. externa* pueda ser diferente (Medina et al., 2003).

En los ensayos se evaluó la actividad de extractos crudos de *P. clavigera* que contienen numerosos compuestos, algunos de los cuales pueden ser comunes en los extractos hexánicos, hidroalcohólicos y clorofórmicos (Tabla 3). Finalmente, los resultados muestran que a las concentraciones (mg L⁻¹) evaluadas los extractos hexánicos y clorofórmicos tuvieron efectos no selectivos sobre *D. magna* y *C. koehleri*, por lo que estas formulaciones no deberían ser empleadas cuando estas especies se encuentren presente en los ambientes dulceacuícolas y en el campo agrícola, respectivamente. Los extractos hidroalcohólicos mostraron buena selectividad hacia los organismos no destinatarios, por lo que pudieran ser considerados prioritarios en programas MIP. Sin embargo, más investigación se necesita para evaluar los efectos colaterales contra diferentes estados de desarrollo de *D. magna*, *C. koehleri* y *C. externa*. En adición, los experimentos de laboratorio deben ser verificados bajo condiciones de campo.

Agradecimiento — A la Universidad Ricardo Palma (URP) por el financiamiento de la presente investigación durante el 2005. A la Mg. Diana Pérez, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) por el apoyo con los extractos botánicos de *P. clavigera*. Este trabajo fue presentado en el IX Congreso Brasileiro de Ecotoxicologia – SETAC Brasil, 3-6 de julio del 2006, São Pedro, São Paulo, Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADIOLA, A. C., 2000, Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadiracta indica*. *Crop Protection*, 19: 452-460.
- ARRUDA, W., CAVASIN, O. G. M. & GARCIA DA SILVA, I., 2003, Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36: 17-25.
- CANGIANO, T., DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A., ISIDORI, M., MONACO, P. & ZARRELLI, A., 2002, Effect of *ent*-Labdane diterpenes from Potamogetonaceae on *Selenastrum capricornutum* and other aquatic organisms. *J. Chemical Ecol.*, 28: 1091-1102.
- CARVALHO, G. A., CARVALHO, C. F., SOUZA, B. & ULHOA, J. L. R., 2002, Selectividade de insecticidas a *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomol.*, 31: 615-621.
- CASTIGLIONI, E., VENDRAMIN, J. D. & TAMAI, M. A., 2002, Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari, Tetranychidae). *Agrociencia*, 6: 75-82.
- CASTILLO, G., 2004, *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IMTA, México, 189p.
- CIPOLLINI, M. L., 2000, Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptative functions. *Rev. Chil. hist. Nat.*, 73: 421-440.
- DA FONSECA, C. A., LEAL, J., COSTA, S. S. & LEITAO, A. C., 1994, Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat. Res.*, 321: 165-173.

- DE OLIVEIRA, J., DJAIR, J., RIBEIRO, J. & BARBOSA, J., 2003, Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera Curculionidae). *Ciência e Agrotecnia*, 27: 1231-1236.
- DESNEUX, N., RAMIREZ-ROMERO, R. & KAISER, L., 2006, Multistep bioassay to predict recolonización potential of emerging parasitoid after a pesticide treatment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2675-2682.
- GODOY, M. S., CARVALHO, G. A., MORAES, J. C., COSME, L. V., GOUSSAIN, M. M., CARVALHO, C. F. & MORAIS, A. A., 2004, Seletividade de seis inseticidas utilizados em citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomol.*, 33: 359-364.
- HANSEN, L. J. & JOHNSON, M. L., 1999, Conservation and toxicology: integrating the disciplines. *Conserv. Biol.*, 13: 1225-1227.
- HASSAN, S. A., 1992, Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of test methods. IOBC/WPRS. *Bulletin*, 1992/15/3.
- IANNACONE, J. & ALVARIÑO, L., 2002, Evaluación del riesgo ambiental del insecticida cartap en bioensayos con tres invertebrados. *Agric. Téc.* (Chile), 62: 366-374.
- IANNACONE, J., ALVARIÑO, L. & MANSILLA, J., 2002, Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay* (Perú), 6: 56-71.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2002, Efectos de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65: 92-101.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2003a, 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. *Agri. Téc.* (Chile), 63: 347-360.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2003b, Plantas biocidas usadas en el control de la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Rev. Per. Ent.*, 43: 79-87.
- IANNACONE, J. & REYES, M., 2001, Efecto en las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) por los insecticidas botánicos Rotenona y Neem en el cultivo de Tomate en el Perú. *Rev. Col. Entomol.*, 27: 147-152.
- KALLQUIST, T., GRUNG, M. & TOLLEFSEN, K. E., 2006, Chronic toxicity of 2,4,2', 4'-Tetrabromodiphenil ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 1657-1662.
- KLÜTTGEN, B., DÜLMER, U., ENGELS, M. & RATTE, H. T., 1994, ADaM, an artificial freshwater for culture of zooplankton. *Water Res.*, 28: 743-746.
- MACEDO, M. E., CONSOLI, R. A., GRANDE, T. S., DOS ANJOS, A. M., DE OLIVEIRA, A. B., MENDES, N. M., QUEIROZ, R. O. & ZANI, C. L., 1997, Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 565-570.
- MEDINA, P., SMAGGHE, G., BUDIA, F., TIRRY, I. & VIÑUELA, E., 2003, Toxicity and absorption of azadirachtin, diflubenzuron, pyrifoxifen, and tebufenozide after topical application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 32: 196-203.
- MELLENDEZ, P. A. & CARRILES, V. A., 2002, Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 96: 209-218.
- MORROW, D., CORRIGAN, D. & WALDREN, S., 2001, Development of a bioassay for phytochemicals using *Daphnia pulex*. *Planta Med.*, 67: 843-846.
- MYERSCOUGH, M., 1998, Herbal remedies. How much do you know? *Aust. Fam. Physician.*, 27: 1037-1040.
- NANO, G. M., BINELLO, A., BIANCO, M. A., UGAZIO, G. & BURDINO, S., 2002, *In vitro* tests to evaluate potential biological activity in natural substances. *Fitoterapia*, 73: 140-146.
- PÉREZ, D. & IANNACONE, J., 2004, Efecto insecticida de Sacha yoco (*Paullinia clavigera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. *Ecol. Apl.*, 3: 64-72.
- PÉREZ, D. & IANNACONE, J., 2006, Efectividad de extractos botánicos de 10 plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., insecto plaga del pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. *Agric. Tec.* (Chile), 66: 21-30.
- PLOTKIN, M., 1988, The outlook for new agricultural and industrial products from the tropics: Natural pesticides. pp. 111-112. In: E. O. Wilson (ed.), *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, D.C.
- RAMAN, K. V., PALACIOS, M. & MUJICA, N., 1993, *Control biológico de la polilla de la papa Phthorimaea operculella por el parasitoide Copidosoma koehleri*. Boletín de Capacitación CIP 3:28p. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- SANTA MARIA, A., LOPEZ, A., DIAZ, M. M., MUNOZ-MINGARRO, D. & POZUELO, J. M., 1998, Evaluation of the toxicity of guarana with *in vitro* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 39: 164-167.
- SCHULTES, R. E., 1994, Amazonian ethnobotany and the search for new drugs. *Ciba Found Symp.*, 185: 106-112; *discussion* 112-115.
- SCHULTES, R. E. & RAFFAUF, R. F., 1990, *The healing forest: medicinal and toxic plant of the Northwest Amazonia* (Historical, Ethno- & Economic Botany, Vol. 2). Portland, Oregon, USA. 484 p.
- SCHUMUCK, R., 1997, Effects of Euparen® Mon honey bees and selected beneficial arthropods-information about the use of the pesticide during blossom and in IPM cultures. *Pflanz.-Nachr. Bayer*, 50: 233-246.
- TRAN, D. H., TAKAGI, M. & TAKASU, K., 2004, Effects of selective insecticides on host searching and oviposition behavior of *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a larval parasitoid of American serpentine leafminer. *Appl. Entomol. Zool.*, 39: 435-441.
- TRUITI, M. C., FERREIRA, I. C., ZAMUNER, M. L., NAKAMURA, C. V., SARRAGIOTTO, M. H. & SOUZA, M. C., 2005, Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 1873-1878.
- WERNERSSON, A. S., 2004, Aquatic ecotoxicity due to oil pollution in the Ecuadorian Amazon. *Aquat. Ecosyst. Health Managem.*, 7: 127-136.
- ZAMBLE, A., CARPENTIER, M., KANDOUSSI, A., SAHPAZ, S., PETRAULT, O., OUK, T., HENNUYER, N., FRUCHART, J. C., STAELS, B., BORDET, R., DURIEZ, P., BAILLEUL, F. & MARTIN-NIZARD, F., 2006, *Paullinia pinnata* extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 47: 599-608.