

LA FLORA NATIVA DE CORDOBA (ARGENTINA) Y SU IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA
NATIVE FLORA OF CORDOBA (ARGENTINE) AND ITS IMPORTANCE IN PUBLIC HEALTH

Brenda Konigheim, Javier Aguilar, Gonzalo Batallan, Walter Almirón, Marta Contigiani.

RESUMEN

Introducción y objetivos: En la búsqueda de nuevos agentes naturales con actividad antiviral y biopesticidas, se estudiaron los efectos inhibitorios sobre diferentes virus de importancia en salud pública (Virus Junín **VJ**, Virus herpes simple Tipo-I **VHS-1**, Virus encefalitis de San Luis **VESL** y Virus encefalitis equina venezolana **VEEV**) y la acción larvícida contra el mosquito vector de la Encefalitis de Saint Louis (*Culex quinquefasciatus*), de diferentes extractos obtenidos a partir de plantas nativas de Córdoba: *Larrea cuneifolia*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Mintostachys mollis* y *Verbascum thapsus*.

Resultados: *L. cuneifolia* tuvo actividad inhibitoria contra VJ, en cambio *A. quebracho-blanco*, *V. thapsus* y *M. mollis* mostraron actividad inhibitoria sobre **VEEV** y **VHS-1**. Ninguna de las especies vegetales tuvo actividad sobre **VESL**.

En cuanto a la actividad pesticida, todas las especies mostraron efecto larvícida, destacándose *M. mollis* y *L. cuneifolia*.

Conclusión y discusión: Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la flora de Córdoba podría ofrecer alternativas a los métodos utilizados habitualmente para el tratamiento de enfermedades autóctonas. Además, servirían como antecedente para la formulación de nuevos insecticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana, en sustitución de los productos sintéticos.

Palabras Claves: *Larrea cuneifolia*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Mintostachys mollis* y *Verbascum thapsus*, actividad pesticida, actividad antiviral.

ABSTRACT

Introduction y objective: In the search for new natural products with antiviral and pesticide activity, we studied the inhibitory effects on different viruses of importance in health public (Junín virus **VJ**, herpes simplex type-I Virus **VHSV-1**, St. Louis encephalitis Virus **VESL** and Venezuelan equine encephalitis Virus **VEEV**) and the larvicide activity on *Culex quinquefasciatus* (St. Louis encephalitis virus vector) of different native plants: *Larrea cuneifolia*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Verbascum thapsus* and *Mintostachys mollis*.

Result: *L. cuneifolia* had inhibitory activity on VJ, however *A. quebracho-blanco*, *V. thapsus* and *M. mollis* showed inhibitory activity against VEE and HSV-1. None of the plants extracts had activity on ESL. Regarding pesticide activity, all species showed effect larvicidal, in particular *M. mollis* and *L. cuneifolia*.

Conclusions y discussion: The results of this study show that the flora of Cordoba could offer alternatives to methods for the treatment of autochthonous diseases. Would also serve to the formulation of new insecticide safer for the environment and human health, instead of synthetic products.

Key words: *Larrea cuneifolia*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Mintostachys mollis* y *Verbascum thapsus*, pesticide activity, antiviral activity

Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella, Facultad de Ciencias Medicas UNC
Centro de Investigaciones Entomológicas Córdoba (CIEC), Facultad de Ciencias Exactas físicas y Naturales,
Universidad Nacional de Córdoba.
Correspondencia: Biol. Brenda Konigheim. Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella,
Facultad de Ciencias Medicas Universidad Nacional de Córdoba Enfermera Gordillo Gómez S/N Ciudad Universitaria.
CP. 5016 TELEFONO: +54 351 4334022
contigia@cmefcm.uncor.edu

INTRODUCCION

La utilización de medicamentos para tratar enfermedades es una de las alternativas terapéuticas mas difundida y aceptada, tanto por los profesionales de la salud como por la población. Sin embargo, a pesar de los avances científicos tecnológicos, no hay soluciones a todas las necesidades terapéuticas, ya que existen aún patologías, sobre todo aquellas raras o huérfanas, sin un tratamiento farmacológico efectivo disponible ni medios para prevenirlas (1). En las dos ultimas décadas, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) han aparecido al menos 29 enfermedades nuevas que han producido la muerte de millones de personas. La mayor parte de estas enfermedades emergentes son causadas por virus.

Los problemas que plantean las infecciones virales endemoepidémicas emergentes y re-emergentes con la aparición de brotes de enfermedades sistémicas y/o neurológicas de diferente magnitud, forman parte de nuestra realidad cotidiana y constituyen una constante amenaza, no sólo para nuestro país sino para el resto de América y el mundo. Para Argentina, ejemplo de ello es la reciente aparición de virus Dengue y West Nile (WN), virus transmitidos por mosquitos (2, 3) y una variedad enzoótica del virus Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) que fue asociado a un cuadro febril similar al provocado al virus Dengue (4). Por otra parte, no debemos dejar de considerar las patologías virales endémicas que siguen afectando a nuestro país, como por ejemplo la Fiebre Hemorrágica Argentina, (5) y Encefalitis Saint Louis, cuyo virus está ampliamente distribuido en Argentina y el cual produjo en el año 2002 un caso de encefalitis en la ciudad de Córdoba, luego de 15 años de ausencia de casos en el país (6) y a principios del 2005 un brote inédito en la ciudad de Córdoba (7).

Los antecedentes descriptos muestran la necesidad de disponer de drogas antivirales efectivas para el tratamiento de estas patologías regionales, y desarrollar medidas preventivas para el control del vector de las enfermedades transmitidas por mosquitos (ESL, Dengue, WN, etc.).

La OMS estima que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo, tienen en las plantas su principal

fuelle de medicamentos siendo indispensables para la atención primaria de la salud. (8). Así mismo se observa una revalorización del uso de plantas como fuente de sustancias con propiedades insecticidas (9).

Antecedentes etnobotánicos demuestran que varios géneros de plantas pertenecientes a la región central de Argentina pueden ser seleccionados de acuerdo a su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades provocadas por microorganismos (virus, hongos y bacterias) o su uso como biopesticidas. Entre ellos, podemos destacar los géneros: *Aspidosperma*, *Larrea*, *Minthostachis* y *Verbascum* (10, 11, 12,13).

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar extractos obtenidos a partir de plantas nativas de Córdoba como potenciales agentes antivirales contra los virus Junín (VJ), VEEV, Encefalitis de San Luis (VESL) y Virus Herpes Simple I (VHS-I), y/o con actividad pesticida sobre *Culex quinquefasciatus* (vector de VESL).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de especies vegetales y obtención de los extractos

De la región serrana de la provincia de Córdoba se recolectaron partes aéreas de las especies: *Minthostachys mollis* (Griseb) ("peperina"), *Larrea cuneifolia* Cav. ("jarilla"), *Aspidosperma-quebracho blanco* Schltdl. ("quebracho") y *Verbascum thapsus* L. ("ambay").

Se obtuvieron extractos de diferentes polaridades (Hexano, Cloroformo, Metanol y agua) utilizando un extractor soxhlet para el caso de extractos orgánicos y maceración o decocción para los extractos acuosos. Los extractos acuosos fueron utilizados únicamente en los ensayos de actividad larvívica. En todos los casos para los estudios de bioactividades, los extractos fueron solubilizados en dimetil sulfoxido (DMSO).

Ensayos de evaluación de citotoxicidad

La citotoxicidad de los distintos extractos se evaluó sobre la línea celular Vero crecidas con Medio Esencial Mínimo (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina y gentamicina.

Para las pruebas biológicas se utilizó MEM suplementado con 2% (SFB), glutamina y gentamicina (MM).

Las metodologías utilizadas fueron:

1) Observación de alteraciones morfológicas Monocapas de células Vero se incubaron con MM conteniendo diferentes concentraciones de los extractos. Se dejaron controles celulares (CC) con MM sin extracto. El ensayo se extendió por 3 días a 37°C. En todos los casos se consideraron citotóxicas aquellas concentraciones de la muestra problema que generaron alteraciones morfológicas tales como redondeamiento, retracción de la membrana y presencia de gránulos en el citoplasma visibles al microscopio óptico.

2) Evaluación de la viabilidad celular con rojo neutro (RN): El ensayo de citotoxicidad por RN es un ensayo basado en la capacidad de las células viables para incorporar el RN como marcador supravital (14). Monocapas confluentes de células Vero fueron mantenidas en cultivo y expuestas a diferentes concentraciones de los extractos, como CC se dejaron cultivos de células sin extractos. Al cabo de 48 horas, se eliminó el medio con los extractos y se agregó una solución de RN de 50 µg/ml en MEM durante 3 horas. Posteriormente el RN, extraído de las células con una solución de agua, etanol y ácido acético (50: 49: 1) se leyó a 540 nm. Se determinó la concentración citotóxica 50 (CC50) utilizando una curva de viabilidad vs. concentración.

Evaluación de la inhibición viral “in vitro”

Los ensayos de actividad inhibitoria se realizaron en células Vero empleando como modelos de virus ARN: Virus de Encefalitis San Luis (VESL) (flavivirus) cepa 78V6508, Virus Junín (VJ) (arenavirus) cepa XJCl₃ y Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) (alfavirus) cepa TC 83 y como modelo de virus ADN: Herpes simple 1 (HSV-1) cepa kos.

Determinación del título del stock viral: Se utilizó la prueba reducción de unidades formadoras de placa (ufp) bajo agarosa en monocapas de células Vero (15)

La actividad inhibitoria se determinó mediante 2 metodologías:

a) Tratamiento pre-inoculación (inhibición de las etapas tempranas de la interacción virus - célula): se mezclaron distintas concentraciones de los extractos con 100 ufp de cada uno de los virus, se inocularon inmediatamente sobre células Vero e incubaron 1 hora a 37°C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. Posteriormente se agregó medio semi-sólido (MEM con agarosa 0.5%) y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5%CO₂ durante 3 o 7 días dependiendo del modelo viral. La disminución de la actividad viral fue medida mediante el análisis de reducción de placa (16).

b) Tratamiento post-inoculación (inhibición de la replicación viral): monocapas confluentes de células Vero fueron inoculadas con 100 ufp de cada virus, y luego de 1 hora de incubación a 37° C en atmósfera húmeda y 5%CO₂ se agregó MM conteniendo distintas concentraciones de cada extracto. La disminución de la actividad viral se midió utilizando el método de captación de RN (17).

Cría de *Cx. quinquefasciatus*. La metodología de cría siguió las pautas generales de Gerber et al. (18). Los adultos fueron colectados en la Ciudad de Córdoba, se mantuvieron en jaulas entomológicas de 30 x 30 x 30 cm y fueron alimentados con agua azucarada al 10%. Se utilizaron codornices inmovilizadas como fuente de sangre para las hembras. Las larvas fueron criadas en bandejas plásticas de 1000 ml de capacidad y alimentadas diariamente con hígado en polvo (0.25 mg/larva/día). Las condiciones ambientales en el laboratorio fueron de 25 ± 2°C y fotoperíodo de 12 h luz. A partir de las colonias se obtuvieron las larvas y adultos hembras necesarias para cada ensayo.

Evaluación de actividad larvicida. Se probaron 3 concentraciones (0.5, 0.25 y 0.1 mg/ml) de cada extracto vegetal, los cuales

se aplicaron en bandejas plásticas que contenían 30 larvas del III estadio en 100 ml de agua destilada. Se utilizó un fotoperiodo de 12 h luz a 25 ± 2 °C. Las larvas se alimentaron diariamente con hígado en polvo (0.25 mg/larva/día). Se utilizaron como controles bandejas con 3 concentraciones de DMSO (0.5, 0.25, y 0.1ml/ml) y con agua solamente. Se realizaron 5 réplicas para cada tratamiento y se registró la mortalidad larval cada 24 h. Para evaluar el efecto larvicida de los extractos se realizó un ANAVA y como test a posteriori se usó el test de Duncan ($\alpha = 5\%$). Para los extractos que provocaron una mortalidad del 100% a la mayor concentración, se estimó la dosis letal 50 (DL₅₀) y la dosis letal 90 (DL₉₀) utilizando una regresión Probit.

RESULTADOS

En la tabla I se muestran los resultados de citotoxicidad obtenida para cada extracto de todas las especies vegetales, expresados como CC50. A partir de estos valores se calcularon las concentraciones de cada extracto utilizado en los ensayos antivirales, asegurando que la cantidad de extracto utilizada no resultara tóxica para la célula huésped.

Se pudo observar que ningún extracto, independientemente de la especie vegetal, tuvo acción sobre VESL. VJ solo fue inhibido cuando se utilizó el ensayo de pre-tratamiento, con *L. cuneifolia* (Cloroformo 90%, Metanol 100%) ninguna de las otras especies vegetales fue capaz de inhibir al VJ en las condiciones metodológicas empleadas. VEEV fue inhibido únicamente en el pretratamiento por *V.thapsus* (Hexano 60%). Con el post-tratamiento fue inhibido por *A. quebracho-blanco* (cloroformo 50-70%), *M. mollis* (cloroformo y metanol 50-100%) y *V. thapsus* (metanol 70%). Sobre HSV- I se pudo determinar que ninguna de las 4 especies fueron capaces de inhibirlo cuando se utilizó el pre-tratamiento. *A. quebracho-blanco* (hexano 50-60%, cloroformo 50-70%), *M. mollis* (Cloroformo 60-80%, metanol 60-100%) y *V.thapsus* (hexano 60%, metanol 100%) fueron capaces de inhibir al virus con el post-tratamiento. Cabe destacar que los extractos hexánicos de *L. cuneifolia* y *M. mollis*, y metanólico de *A. quebracho-blanco* no mostraron actividad sobre ninguno de los virus ensayados.

En referencia a la actividad pesticida *A. quebracho-blanco* mostro que el mayor efecto larvicida se obtuvo con el extracto clorofórmico y el hexánico a la concentración más alta, ocasionando un 99 y 85 % de mortalidad respectivamente. Las mortalidades observadas a la concentración de 0,25 mg/ml fueron del 73 y 57 % para ambos extractos respectivamente. A su vez las mortalidades registradas a la menor concentración fueron bajas (< 46%). El extracto metanólico no mostró actividad larvicida.

L. cuneifolia mostró una elevada actividad larvicida a las 3 concentraciones empleadas del extracto clorofórmico, siendo la mortalidad del 100% para las dos concentraciones más altas y del 95,33% para 0.1 mg/ml. El extracto obtenido con metanol presentó buena actividad solo a la concentración de 0,5 mg/ml, ocasionando una mortalidad del 83,3%. Los extractos acuosos mostraron baja actividad larvicida con mortalidades que oscilaron entre 29,33 y 1% para las 3 concentraciones probadas. Para *M. mollis* la mortalidad fue del 100% con las concentraciones más altas de los extractos de hexano y cloroformo a las 24 h de su aplicación, en tanto que a 0,1mg/ml fue del 43% y 38%, para ambos extractos respectivamente. El extracto metanólico produjo bajos porcentajes de mortalidad (8-28%) con las tres concentraciones empleadas.

En cuanto a *V. thapsus* solo se probaron el extracto metanólico y los extractos acuosos. La mayor actividad larvicida se detectó con el extracto metanólico a la mayor concentración, registrándose una mortalidad del 83,33%. Los extractos acuosos no mostraron efecto larvicida ocasionando bajas mortalidades (<15%).

Las DL₅₀ y DL₉₀ estimadas para aquellos extractos que presentaron actividad larvicida, se detallan en la tabla II.

DISCUSIÓN y CONCLUSION

La OMS estima que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo, tienen en las plantas su principal fuente de medicamentos siendo indispensable su empleo en la atención primaria de la salud.

En el presente estudio se evaluaron actividades biológicas (antiviral y pesticida) de 4 especies vegetales pertenecientes a la flora autóctona argentina: *Larrea cuneifolia*,

Mintostachys mollis, *Verbascum thapsus* y *Aspidosperma quebracho-blanco*. Los resultados obtenidos indican que estas especies mostrarían potencial para ser empleadas tanto como insecticidas o antivirales.

Los estudios etnobotánicos realizados en nuestro país son escasos y poco se conoce sobre las propiedades antivirales de la flora autóctona. Sin embargo varios géneros de plantas de nuestro país pueden ser seleccionados de acuerdo a su uso en la medicina folclórica para resolver problemas de enfermedades provocadas por virus.

En la tabla I, donde se observan los valores de CC_{50} obtenidos para cada extracto de cada especie vegetal, se puede destacar que *Mintostachys mollis* mostró ser la planta menos tóxica, en tanto que el extracto clorofórmico de *Verbascum thapsus* fue el más tóxico con una CC_{50} de 8 µg/ml.

Los extractos de *Larrea cuneifolia*, principalmente el clorofórmico, demostraron poseer actividad sobre VJ cuando se utilizó el pre-tratamiento, y esto sugiere que la acción producida podría ser sobre alguna etapa temprana de la relación virus célula, por ejemplo durante la adhesión del virus a los receptores celulares. Estudios previos realizados por nuestro grupo con extractos de *Larrea divaricata*, especie relacionada y con igual distribución geográfica que *L. cuneifolia*, demuestran actividad antiviral contra VJ (16). Con el resto de las plantas no observamos inhibición sobre VJ.

Para HSV-I, excepto *L. cuneifolia*, todas las plantas tuvieron algún efecto sobre este virus, observándose que *A. quebracho-blanco*, *V. thapsus* y *M. mollis* inhibieron solamente al virus en el post-tratamiento, sugiriendo que la actividad inhibitoria ocurre principalmente sobre etapas posteriores al ingreso del virus a la célula, como por ejemplo en la síntesis de proteínas virales, entre otras. No existen antecedentes previos de esta actividad biológica para *A. quebracho blanco*, para la cual también se detectó actividad inhibitoria en el post-tratamiento sobre VEEV al igual que, *M. mollis* y *V. thapsus*, de las cuales tampoco se conocía actividad sobre este virus.

Cabe destacar que ninguna especie vegetal, tuvo efecto sobre el VESL.

En cuanto a la actividad pesticida de las plantas analizadas se observó que en

líneas generales los extractos acuosos generaron baja o nula mortalidad de larvas, mientras que los extractos clorofórmicos y hexánicos de todas las especies vegetales presentaron elevada actividad larvicida (mortalidad de larvas $\geq 80\%$).

Son numerosas las especies de plantas provenientes de diferentes regiones del mundo que presentan actividad pesticida en culícidos (19, 20, 21, 22, 23,24). Sin embargo, la información respecto a esta actividad en plantas autóctonas de nuestro país es escasa. No existen estudios previos sobre el efecto larvicida de ninguna de las especies probadas en este trabajo. Hasta el momento solo se ha reportado la actividad repelente del aceite esencial de *M. mollis* sobre *Aedes aegypti* (20). Los resultados obtenidos en este trabajo son particularmente interesantes ya que se observó efecto larvicida de algunos extractos de especies autóctonas de la provincia de Córdoba, resultando potencialmente efectivos para el control de *Cx. quinquefasciatus*,.

El presente estudio tiene gran importancia ya que hemos encontrado que diferentes especies nativas tienen capacidad para inhibir virus de importancia médica como VJ, VHS I y VEEV, en este sentido, los resultados obtenidos justifican la planificación de trabajos futuros con el fin de identificar los metabolitos responsables de la actividad observada, como así también profundizar el estudio para evaluar su posible uso como medicamentos fitoterápicos.

Por otro lado no hemos encontrado plantas con actividad contra el VESL, sin embargo algunas de ellas presentaron actividad larvicida contra su vector (*Cx. quinquefasciatus*) por este motivo sería conveniente realizar estudios de campo para confirmar los resultados obtenidos y evaluar la factibilidad de su uso en el control de estos mosquitos de gran importancia sanitaria.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fontana D, Uema S, Mazzieri M. Medicamentos huérfanos: Una revisión necesaria para un problema sanitario no resuelto. Act. Farm. Bonaerense; 2005, 24: 1- 7.

- 2) Aviles G., Rangen G., Vorndam V., Briones A., Baroni P., Enria D. and M.S. Sabattini. Dengue reemergence in Argentina. *Emerg.Infect.Dis*; 1999, 5: 575–578.
- 3) Diaz A, Komar N, Visintin A, Dantur Juri MJ, Stein M, Lobo Allende R, Spinsanti L, Konigheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón W and Contigiani M. West Nile Virus in birds, Argentina. *Emerg.Infect.Dis*; 2008,14: 689-691.
- 4) Contigiani MS, Basualdo M, Camara A, Ramirez A, Diaz G, Gonzalez D, Medeot S, Osuna D. Presencia de anticuerpos contra virus de la Encefalitis Equina Venezolana subtipo IV en pacientes con enfermedad febril aguda. *Rev. Arg. Microbiol.*; 1993, 25: 212-220.
- 5) Enria D, Briggiler A, Feuillade M. An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentinean hemorrhagic fever. *Bull. Inst. Pasteur*; 1998, 96: 103 – 114.
- 6) Spinsanti L, Basquiera A, Bulacio S, Stephano C, Kim H, Somale V, Ré V, Rabbat D, Zárate A, Palacio S, Zlocowski J, Quiroga Mayor C and Contigiani M. St. Louis Encephalitis in Argentina: the First Case Reported in the Last Seventeen Years. *Emerg.Infect.Dis*; 2003, 9: 271-273.
- 7) Spinsanti L, Diaz A, Glatstein N, Arselan S, Morales A, Farias A, Fabbri C, Aguilar J, Ré V, Frías M, Almirón W, Hunsperger E, Siirin M, Travassos da Rosa A, Tesh B, Enría D and Contigiani M. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina (2005). *J. Clin. Virol.*; 2008, 42: 27-33.
- 8) Farnsworth N.R.: Screening plants for new medicines. In: *Biodiversity*, Ed. E.O. Wison. Washington D.C. National Academic Press. 1988
- 9) Mareggiani G. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*; 2001, 60: 22 - 30.
- 10) Sorauf S. B. and Bandoni A. L. In: *Plantas de la Medicina Popular Argentina*. Ed. Albatros, Buenos Aires, Argentina. 1978
- 11) Toursakissian, M. In: *Plantas medicinales de la Argentina, sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica*. Hemisferio Sur, Buenos Aires 1980.
- 12) Núñez C. & J.J. Cantero. In: *Las plantas medicinales del sur de la Provincia de Córdoba*. Ed. Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto. 2000. -40-
- 13) Goleniowski M, Bongiovanni G, Palacio L, Nuñez C. and Cantero J. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107: 324-341.
- 14) Borenfreund E and Puerner J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*; 1985, 24: 119 – 129.
- 15) Contigiani M y Sabattini M. Virulencia diferencial de cepas de virus Junín por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina*; 1977, 37: 244 -251.
- 16) Konigheim B, Golenioswki M, Contigiani M. Citotoxicity and antiviral activity of a lignan extracted from *Larrea divaricata*. *Drug Design Reviews*; 2005, 2: 81 – 83
- 17) Valdés García S, Barrio Alonso G, Gutiérrez Gaitén Y, Morier Díaz L. Evaluación preliminar de la actividad del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS – 1. *Rev. Cubana Med. Trop.*; 2003, 55:169 -73.
- 18) Gerber E, Barnard D, Ward R.. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Bull. J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 1994, 1: 1-98.
- 19) Pavela R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.*; 2008, 102: 555–559.
- 20) Gillij Y, Gleiser R, Zygadlo J. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technol.*; 2007. 99, 2507–2515
- 21) Cetin H. and Yanikoglu A. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. *J. Vect. Ecol.*; 2006, 31: 118-122
- 22) Silva O, Prophiato J, Nogared J, Kanis L, Emerick S, Blazius R and Romao P. Larvicidal effect of Andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.*; 2006, 22: 699-701.
- 23) Vatandoost H and Vaziri V. Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*; 2004, 10:573-581.
- 24) Ansari M, Vasudevan P, Tandon M and Razdan R.. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technol.*; 2000, 71: 267-271.

Especie Vegetal	Extractos	CC ₅₀ (? g/ml)	Pre - tratamiento (% Inhibición viral)				Post -tratamiento (% Inhibición viral)			
			VJ	VES L	VEEV	HSV-I	VJ	VES L	VEEV	HSV-I
<i>Larrea cuneifolia</i>	Hexano	55	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND
	Cloroformo	27	90%	-	-	-	ND	ND	ND	ND
	Metanol	98	100 %	-	-	-	ND	ND	ND	ND
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>	Hexano	11	-	-	-	-	-	-	20-30 %	50-60 %
	Cloroformo	18	-	-	-	-	-	-	50-70 %	50-70 %
	Metanol	141	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mintostachys mollis</i>	Hexano	231	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cloroformo	290	-	-	-	-	-	-	50-100%	60-80 %
	Metanol	800	-	-	-	-	-	-	50-100%	60-100%
<i>Verbascum thapsus</i>	Hexano	47	-	-	60%	-	-	-	30%	60%
	Cloroformo	8	-	-	-	-	-	-	20%	30%
	Metanol	36	-	-	30%	-	-	-	70%	100%

Tabla I. Tabla comparativa de citotoxicidad mediante la metodología de captación de Rojo Neutro y de actividad inhibitoria (pre y post –tratamiento) de los extractos de las diferentes especies vegetales sobre: **VJ** (Virus Junín), **HSV-I** (Herpes simple tipo 1); **VESL** (Virus Encefalitis San Luis), **VEEV** (Virus Encefalitis Equina Venezolana).

(-): Sin Actividad (**ND.**): No determinado.

Extracto Botánico	DL ₅₀ (95%CL)	DL ₉₀ (95%CL)	Ecuación de Regresión	Chi cuadrado
<i>M. mollis</i>				
Hexano	0.137 (0.127-0.149)	0.207 (0.191-0.228)	$y = 18.465x - 2.539$	11.656
Cloroformo	0.166 (0.155-0.177)	0.227 (0.213-0.244)	$y = 20.841x - 3.448$	10.815
<i>L. cuneifolia</i>				
Cloroformo	0.062 (0.044-0.08)	0.130 (0.107-0.172)	$y = 18.814x - 1.166$	50.179
<i>A. quebracho-blanco</i>				
Cloroformo	0.138 (0.112-0.165)	0.350 (0.308-0.411)	$y = 6.051x - 0.839$	20.172

Tabla II: DL₅₀ y DL₉₀ estimadas para los extractos que presentaron actividad larvica.