

## Bioactividad de extractos foliares y de callo no embriogénico de *Moringa oleifera* (Moringaceae) en *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae)

### Bioactivity of leaf extracts and non-embryogenic callus extracts from *Moringa oleifera* (Moringaceae) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae)

Stefany Arocha <sup>1</sup>  Rafael Fernández Da Silva <sup>1</sup>  Elvira Alejandra Sánchez González <sup>1,2</sup>  Francys Pérez <sup>1</sup> 

#### RESUMEN

**Introducción:** La producción de compuestos fitoquímicos en plantas ha sido reconocida mundialmente por su amplia variedad de aplicaciones, entre ellas, como biopesticida para el control de mosquitos vectores de enfermedades. **Objetivo:** Evaluar el efecto insecticida de extractos etanólicos producidos a base del árbol *Moringa oleifera*, sobre larvas del tercer y cuarto instar, así como en pupas del mosquito *Aedes aegypti*. **Métodos:** Los extractos etanólicos se obtuvieron a partir de las hojas y de callos no embriogénicos (NE) cultivados in vitro de semillas inmaduras, suplementados con dos reguladores de crecimiento: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Ácido indolbutírico (IBA), cada uno en combinación con Bencilaminopurina (BAP). Los extractos etanólicos de hojas y de callos inducidos con las combinaciones de 2,4-D+BAP y de IBA+BAP fueron aplicados en larvas III y IV instar y en pupas de *Ae. aegypti* para registrar la mortalidad y la concentración letal  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ . **Resultados:** Se obtuvieron respuestas en la mortalidad de las larvas del III y IV con todos los extractos, la mayor mortalidad se observó con los extractos de callos inducidos con 1 mg/L y 2 mg/L de IBA+BAP y 1,5 mg/L de 2,4-D+BAP. Mientras que, en pupas, no se obtuvo mortalidad con el extracto foliar. Finalmente, se determinó la concentración letal  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  en larvas III con 1,5 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L y 1,5 mg/L de IBA. En las larvas IV las mejores  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  se obtuvieron con 1 mg/L y 1,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de IBA. **Conclusión:** Los resultados de este estudio sugieren abordar el potencial insecticida de la Moringa y su capacidad para deteriorar la alimentación y el desarrollo de las larvas de *Ae. aegypti*.

**Palabras clave:** *Aedes*, extracto etanólico, biopesticida, metabolitos secundarios, moringa.

#### ABSTRACT

**Introduction:** The production of phytochemical compounds in plants has been recognized worldwide for its wide variety of applications, among them, as a biopesticide for the control of mosquito vectors of diseases. **Objective:** To evaluate the insecticidal effect of ethanolic extracts produced from the *Moringa oleifera* on third and fourth-instar larvae, as well as pupae of the *Aedes aegypti* mosquito. **Methods:** Ethanolic extracts were obtained from leaves and in vitro cultured non-embryogenic callus from immature seeds, supplemented with two growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and indolbutyric acid (IBA), each in combination with benzylaminopurine (BAP). Ethanolic extracts of leaves and callus induced with the combinations of 2,4-D+BAP and IBA+BAP was applied on III and IV instar larvae and pupae of *Ae. aegypti* to record mortality and lethal concentration  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$ . **Results:** Mortality responses were obtained in III and IV larvae with all extracts, the highest mortality was observed with callus extracts induced with 1 mg/L and 2 mg/L of IBA+BAP and 1.5 mg/L of 2,4-D+BAP. While in pupae, no mortality was obtained with the foliar extract. Finally, the lethal concentration  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  were determined in larvae III with 1.5 mg/L of 2,4-D and 1 mg/L and 1.5 mg/L of IBA. In IV larvae, the best  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  were obtained with 1 mg/L and 1.5 mg/L of 2,4-D and 2 mg/L of IBA. **Conclusion:** The results of this study suggest addressing the insecticidal potential of Moringa and its ability to impair the feeding and development of *Ae. aegypti* larvae.


**Key words:** *Aedes*, ethanolic extract, biopesticide, secondary metabolites, Moringa.

#### INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera: Culicidae) es el principal vector de enfermedades provocadas por arbovirus como el dengue, zika, chikungunya y la fiebre amarilla, los cuales tienen un gran impacto en la salud humana principalmente en zonas con climas tropicales y subtropicales<sup>1,2,3,4</sup>. En las últimas décadas, los casos de enfermedades provocadas por arbovirus han incrementado en países de América Latina, África y Asia siendo un problema de salud pública<sup>5,6</sup>. La incidencia de estas arbovirosis está asociada con el papel vectorial del mosquito *Ae. aegypti*.

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Departamento de Biología, Universidad de Carabobo. Estado Carabobo, Venezuela.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Zoologia Universidade Estadual de Santa Cruz Ilhéus, Bahia, Brasil

**Autor de Correspondencia:** Stefany Arocha 

**e-mail:** stefanyarocha2009@gmail.com

**Recibido:** 22/11/2025

**Aprobado:** 09/03/2026

Para el control poblacional de *Ae. aegypti* se han implementado varias estrategias, entre las cuales se incluye la aplicación de compuestos químicos denominados plaguicidas, estas sustancias pueden producir la muerte del insecto en cualquiera de sus etapas de desarrollo (huevo, larva, pupa, o adulto) mediante el contacto, ingestión y/o inhalación<sup>7</sup>. Sin embargo, el uso intensivo de estas sustancias sintéticas ha provocado el desarrollo de resistencia en las poblaciones de *Ae. Aegypti*<sup>8,9,10</sup>. Al mismo tiempo, la composición química de los plaguicidas puede generar efectos nocivos sobre la salud de los organismos y la contaminación del ambiente<sup>11</sup>. Por este motivo se ha incentivado la búsqueda de productos alternativos para el manejo integral de los mosquitos, entre estos, están los bioplaguicidas obtenidos de las plantas.

Desde la antigüedad, las plantas han sido utilizadas con fines medicinales lo cual ha llamado la atención en las últimas décadas como una opción a los pesticidas sintéticos, debido a que son capaces de producir metabolitos secundarios para defenderse del ataque de patógenos, predadores y herbívoros como los insectos. Estos compuestos fitoquímicos son saponinas, taninos, alcaloides, di terpenos, entre otros, los cuales presentan actividad insecticida que se manifiesta generando la mortalidad, inhibiendo el crecimiento, la supresión del comportamiento reproductivo y reducción de la fertilidad.<sup>12,13,14</sup>

Entre las plantas con actividad insecticida podemos mencionar a *Moringa oleifera* Lam., un árbol que ha sido utilizado como alimento por su alto valor nutricional, también como planta medicinal y farmacéutica<sup>15,16,17,18</sup>, así como en aplicaciones agroindustriales, forrajeos, tratamiento de agua y en la producción de biocombustibles<sup>19</sup>. Además de los beneficios medicinales farmacéuticos, la actividad insecticida de *M. oleifera* también ha sido estudiada y se comprobó su efecto en insectos plaga pertenecientes a diferentes órdenes como lepidópteros, coleópteros y dípteros, además de plagas de arácnidos como los ácaros.<sup>20</sup>

La producción de proteínas y metabolitos secundarios en plantas puede ser potenciada a gran escala empleando técnicas de cultivos de tejidos in vitro. Estas técnicas son herramientas que permiten cultivar y manipular el crecimiento de las células en condiciones controladas y de asepsia<sup>21</sup>. Los tejidos de plantas y cultivos celulares son una herramienta importante para la producción de metabolitos secundarios mediante la regeneración de estructuras morfogénicas (Organogénesis) o la producción de callos (Callogénesis). Los callos son masas de tejido indiferenciado con células meristemáticas crecidas en medios de cultivos que son suplementados con un correcto balance de reguladores de crecimiento vegetal.<sup>21,22, 23</sup>

Por este motivo, el potencial insecticida de *M. oleifera* puede ser una importante alternativa a los plaguicidas sintéticos para el control de mosquitos vectores de enfermedades. Mientras que, con los cultivos de callos no embriogénicos producidos a partir de cualquier tejido de la planta, es posible obtener una gran concentración de metabolitos secundarios. En este sentido, en el presente estudio se evaluó el efecto insecticida de extractos etanólicos de hojas y de callos no embriogénicos (NE) cultivados in vitro e inducidos a partir de

semillas jóvenes de *M. oleifera* sobre las etapas inmaduras de *Ae. aegypti*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Para la preparación de los extractos se utilizaron dos diferentes explantes, hojas verdes y callos NE inducidos a partir de semillas inmaduras de *M. oleifera*. Las hojas y las semillas inmaduras fueron colectadas de un ejemplar joven crecido en ambiente natural, ubicado en la zona urbana de El Encanto (10° 14' 53.8"N 68° 00' 55.4"W) en el Municipio Naguanagua, Edo. Carabobo, Venezuela. Las semillas se desinfectaron el mismo día de la colecta con agitación constante (100 rpm) en una plancha de agitación magnética, dentro de una campana de flujo laminar vertical para mantener las condiciones de esterilidad adecuadas. Se realizaron dos lavados con una mezcla de agua destilada previamente esterilizada y jabón líquido comercial Ariel® por 2 min cada lavado. Después se realizó un lavado con alcohol etílico al 70% por 30 seg seguido de un lavado con agua destilada por 1 min. Luego se realizó un lavado con cloro comercial Nevex® (3,5% v/v de hipoclorito de sodio) y Tween 20 (10 gotas/100 ml) por 5 min y para retirar cualquier rastro de detergentes se realizaron tres lavados con agua corriente esterilizada por 1 min cada uno. Por último, el exocarpio y mesocarpio de las semillas fueron retirados para utilizar el endocarpio en la inducción de los callos NE.<sup>20,24</sup>

**Inducción de callos no embriogénicos:** El endocarpio de las semillas fue sembrado en medios de cultivo sólidos con las sales de Murashige & Skoog<sup>25</sup> suplementado con tiamina-HCL (1 mg/L) y piridoxina, (0,5 mg/L), glicina (2 mg/L), sacarosa al 3% p/v como fuente de carbono y agar al 0,8% como agente solidificador. Se ajustaron los medios hasta llegar a un intervalo de pH 5,85-5,87 y se autoclavaron a 121 °C, 15 Lb. Se utilizó como referencia los protocolos de Khalafalla et al.<sup>26</sup> y Pérez<sup>27</sup> para las combinaciones de reguladores de crecimiento empleados en la inducción de callos NE. Los medios se suplementaron con Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,5; 1,0; 1,5 y 2 mg/L) en combinación con 0,5 mg/L de 6-N-bencil-aminopurina (BAP), siendo identificados los medios como D1, D2, D3 y D4 respectivamente. Mientras que otros medios, fueron suplementados Acido 3-índol butílico (AIB) (0,5; 1,0; 1,5 y 2 mg/L) en combinación con 0,5 mg/L de BAP, identificados como I1, I2, I3, e I4.

**Preparación de los extractos etanólicos:** Se siguieron los protocolos de Fernández et al.<sup>20</sup> y Kala et al.<sup>28</sup> con ciertas modificaciones para la obtención de los extractos. Las hojas fueron lavadas con jabón líquido comercial y secadas en una estufa a 60 °C durante 24 h, seguidamente se molieron en una licuadora hasta obtener un polvo fino. Por otra parte, los callos NE se dividieron en grupos según la combinación de reguladores de crecimiento utilizada en la inducción y se llevaron a secar en la estufa a 55 °C por 24 h. Después del secado, los callos fueron molidos en un mortero estéril obteniendo un polvo fino.

El polvo de cada grupo de callos y de las hojas, fueron disueltos por separado con etanol al 75% en fioles de 100 ml (5 mL de etanol por cada 0,5 g de cada pulverizado

para una concentración final de 10% p/v), seguidamente se mantuvieron en agitación continua a 70-90 rpm en un agitador basculante por 48 h. La fase líquida se separó del sedimento mediante filtración con una gasa y centrifugación a 10.000 rpm por 10 min, para subsecuentemente evaporar el solvente a baño maría a una temperatura de 90 °C por 4 h. Luego de obtener los extractos concentrados se les añadió DMSO 0,25%, el extracto final obtenido fue tomado como la solución madre. A partir de la solución madre, se realizaron diluciones con agua destilada de los extractos para la evaluación de la actividad insecticida.

#### Captura de ejemplares de *Ae. aegypti* y evaluación de la mortalidad con los extractos etanólicos foliar y de callos NE:

Para la recolección de los huevos de *Ae. aegypti* se colocaron ovitrampas en una zona residencial de Paramacay (10°14'49.4"N 68°01'02.1"W) Municipio Naguanagua, Edo. Carabobo-Venezuela, siguiendo a Hernández *et al.*<sup>29</sup>. Posteriormente, los ejemplares fueron trasladados al Animalario del Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), Universidad de Carabobo (UC), donde fueron desarrollados hasta adultos mediante cría asociada, estos adultos fueron identificados utilizando la clave taxonómica pictórica de Rueda<sup>30</sup>, donde *Aedes aegypti* es diferenciado de otras especies de *Stegomyia* en su fase adulta, mediante la siguiente combinación de caracteres: Escudo negro o marrón con un par de franjas blancas submedianas-longitudinales, pero sin franja blanca media-longitudinal, con marcas blancas en forma de lira; porción anterior del fémur medio con franja blanca longitudinal; cípeo con escamas blancas. Una vez obtenidos los adultos se estableció la colonia de *Ae. aegypti* bajo condiciones controladas de laboratorio (Proyecto ZIKA *et al.*<sup>31</sup> y Martiradonna *et al.*<sup>32</sup>). Los ensayos de mortalidad con los extractos de *M. oleifera* se realizaron utilizando individuos a partir de la primera generación filial (F<sub>1</sub>).

Para la evaluación de la actividad insecticida de los extractos de callos y del extracto foliar se realizaron ensayos con las concentraciones: 1,0 %, 1,5%, 2,0%, 2,5% y 3,0%. Se utilizaron 30 individuos de *Ae. aegypti* de cada fase a evaluar: III instar, IV instar y pupas. Los ejemplares de cada fase se colocaron en frascos de vidrio con 40 mL de agua potable y 3 mL de la concentración del extracto a evaluar y se cubrieron con tela de Doppio velo para permitir la circulación de aire. Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento y un control para cada tratamiento conformado por 40 mL de etanol al 75%.

**Evaluación de la mortalidad de las larvas y pupas:** Para la evaluación de la mortalidad de las larvas del III instar, IV instar y pupas, se calculó el porcentaje de mortalidad a las 3, 24, 48 y 72 horas de haber comenzado el experimento para cada tratamiento y etapa de desarrollo, utilizando la siguiente ecuación según Camacho *et al.*<sup>33</sup>: % mortalidad = (N° de muertes/ N° total de individuos) \* 100.

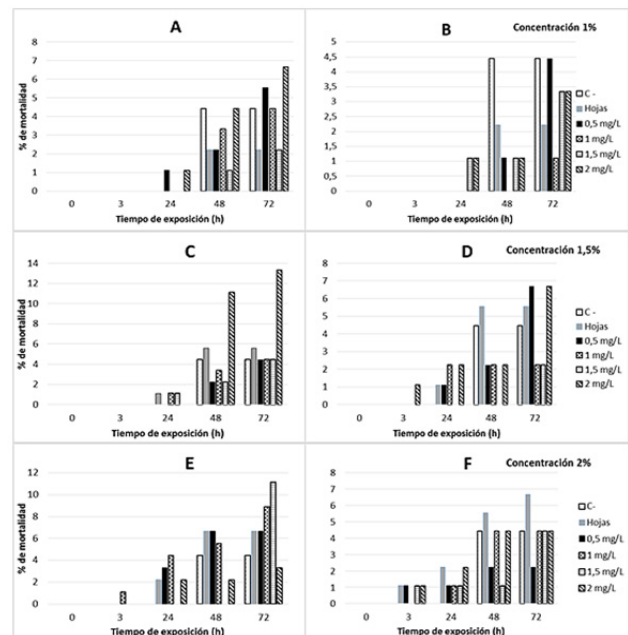
**Concentración letal al 50% (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>):** Se evaluó la concentración letal de ambos extractos para el 50% y 90% de mortalidad (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) de cada estadio, con la aplicación del modelo Probit<sup>34</sup> con un nivel de confianza de 95%, utilizando el programa IBM SPSS Statistic 25.020<sup>35</sup>. Con

este modelo, se realizó una estimación de la concentración del extracto en la que se obtendrá una mortalidad del 50% y 90% de los organismos.

**Análisis estadístico:** Los resultados de la mortalidad del extracto foliar y del extracto de callos fueron evaluados en el programa estadístico PAST versión 3.22<sup>36</sup>. Se comparó la mortalidad en las larvas con los extractos foliares y los extractos de callos no embriogénicos aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni (p<0,05) para corroborar las diferencias que existen entre los tratamientos.<sup>20,34</sup>

## RESULTADOS

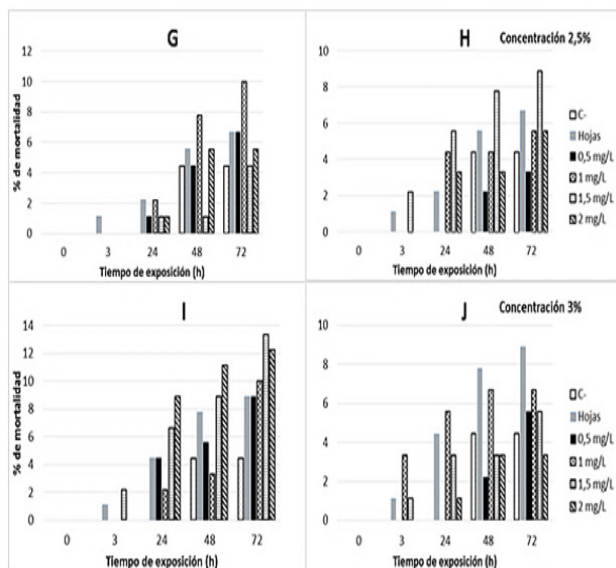
**Evaluación de la mortalidad de las larvas III instar:** La actividad larvicida de *Moringa* se evidenció en larvas del III y IV instar de *Ae. aegypti* al mostrar susceptibilidad a los extractos de hojas y de callos inducidos con 2,4-D e IBA en cada una de sus concentraciones y con variaciones entre los extractos. Para las larvas del III instar, la mortalidad alcanzó entre 7% y 14% con las concentraciones más bajas de los extractos de callos inducidos con 2,4-D: 1% (1 mg/mL), 1,5% (1,5 mg/mL) y 2% (2 mg/mL), a las 72 h de exposición (Figura 1.A, 1.C y 1.E). Mientras que con el extracto de callos inducidos con 2 mg/L de IBA al 1,5%, se obtuvo una mortalidad del 7%, entre las concentraciones de los extractos más bajas (Figura 1.B, 1.D y 1.F). Por parte del extracto de hojas y el control con etanol no se observó mortalidad hasta las 24 h. A medida que se aumentaron las concentraciones de los extractos, se registraron mayores porcentajes de mortalidad en menos tiempo de exposición.



**Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de las larvas del III instar de *Ae. Aegypti* con los extractos de hojas, callos de 2,4-D (A, C y E), callos de AIB (B, D y F) y el control con etanol al 70%, al 1% (1 mg/mL), 1,5% (1,5 mg/mL) y 2% (2 mg/mL) por horas de exposición a los extractos.

Cabe destacar que, con la concentración de 2% se obtuvo una mortalidad del 1% en las larvas III instar durante las primeras 3 h de haber comenzado los ensayos, con el

extracto 1 mg/L de 2,4-D. Para este mismo tiempo de exposición, los extractos de callos de 2 mg/L de IBA mostraron una mortalidad del 1% en las larvas a partir de la concentración 1,5%, manteniendo este comportamiento en la concentración del 2%. Para las concentraciones de extractos más altas de 2,5% y 3%, se observó una mortalidad mayor al 1% a las 3 h con los extractos de 1,5 mg/L de 2,4-D, 1 mg/L y 1,5 mg/L de IBA y de hojas, el control con etanol no mostró una mortalidad en este tiempo. Luego de haber transcurrido 24 h, los extractos de 2,4-D al 2,5% y 3% de concentración superaron el 10% de mortalidad por encima del extracto de hojas a excepción del extracto de 0,5 mg/L 2,4-D (Figuras 2.G y 2.I). Por su parte, el extracto de 1,5 mg/L de IBA alcanzó el 9% de mortalidad por encima del extracto de hojas que llegó a un 6% con la concentración de 2,5 mg/L, mientras que los demás extractos de IBA se mantuvieron por debajo del 7% a las 72 h (Figuras 2.H y 2.J).

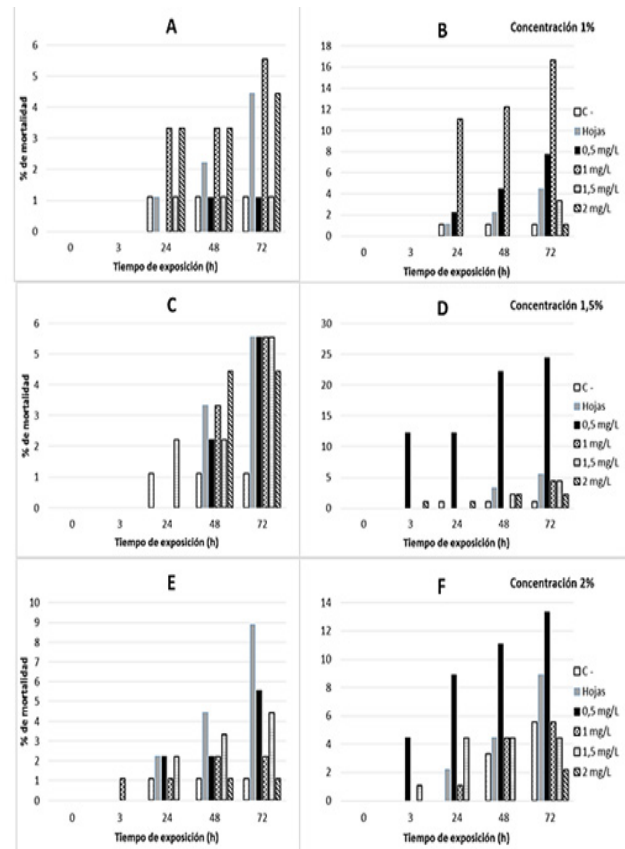


**Figura 2.** Porcentaje de mortalidad de las larvas del III instar de *Ae. Aegypti* con los extractos de hojas, callos de 2,4-D (G e I), callos de IBA (H y J) y el control con etanol, al 2,5% (2,5 mg/mL) y 3% (3 mg/mL) por horas de exposición a los extractos.

**Evaluación de la mortalidad de las larvas IV instar:** En el caso de las larvas de IV instar, se observó una mayor susceptibilidad a los extractos de callos de 2,4-D, IBA y de hojas en comparación con las larvas del III instar, a excepción del control con etanol el cual mostró 1% de mortalidad a las 72 h de exposición. No obstante, el incremento de la mortalidad fue seguido por una disminución a medida que aumentaron las concentraciones de los extractos.

Para la concentración de 1%, se observó el incremento de la mortalidad superando el 4% con los extractos de 1 mg/L y 2 mg/L de 2,4-D y con el extracto de hojas (Figura 3.A), mientras que con los extractos de 0,5 mg/L y 1 mg/L de IBA se alcanzó el 7% y 16% de mortalidad (Figura 3.B). Sin embargo, después de aumentar la concentración de los extractos a 1,5% y 2%, se observó una disminución de la mortalidad a 5,5% con el extracto de 1 mg/L de IBA y un aumento que supera el 10% con el extracto de 0,5 mg/L de IBA (Figuras 3.D y 3.F).

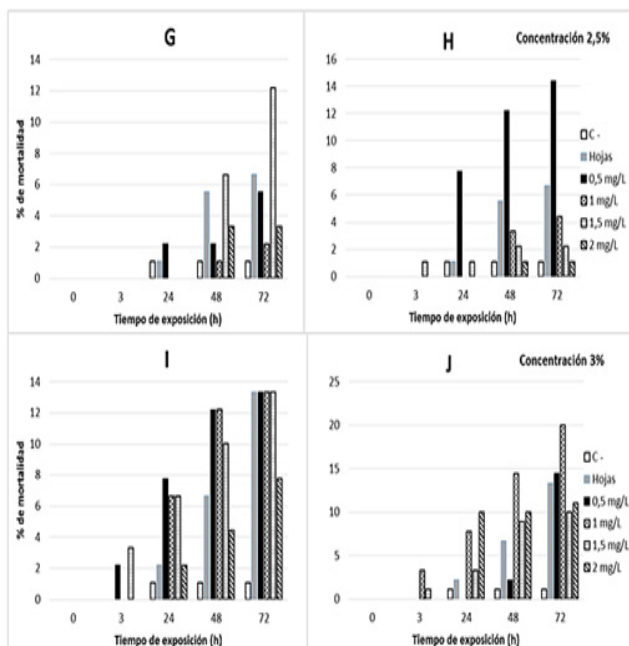
Por otra parte, al aumentar la concentración de los extractos de 2,4-D a 1,5% se obtuvo un incremento de la mortalidad que supera el 5% con todas las concentraciones de esta hormona, seguido por una disminución de la mortalidad por parte de 1 mg/L y 2 mg/L de 2,4-D al 2% de concentración (Figuras 3.C y 3.E).



**Figura 3.** Porcentaje de mortalidad de las larvas del IV instar de *Ae. Aegypti* con los extractos de hojas, callos de 2,4-D (A, C y E), callos de IBA (B, D y F) y el control con etanol, al 1% (1 mg/mL), 1,5% (1,5 mg/mL) y 2% (2 mg/mL), por horas de exposición a los extractos.

Con las concentraciones más altas de los extractos (2,5% y 3%), los porcentajes de mortalidad para las larvas IV instar fueron mayores que en las larvas III instar y a su vez, fueron más altos en comparación con las concentraciones más bajas durante las primeras 3 h de exposición. Se observó una mortalidad mayor al 1% con los extractos de 1,5 mg/L de IBA y extracto de hojas al 2,5% de concentración (Figura 4.G y 4.H) y con los extractos de 1,5 mg/L de 2,4-D, 1 mg/L de IBA y extracto de hojas al 3% de concentración (Figura 4.I y 4.J).

Finalmente, para los tiempos de 48 h y 72 h de exposición, la mortalidad incrementó de manera exponencial hasta alcanzar el 13% con el extracto de 1,5 mg/L de 2,4-D al 2,5% de concentración (Figura 4.G y 4.H) y los extractos de hojas, 0,5 y 1 mg/L de 2,4-D al 3% (Figura 4.I y 4.J). Sin embargo, los extractos de 0,5 mg/L y 1 mg/L de IBA provocaron una mortalidad mayor al 14% a las 72 h superando a los extractos de hojas y de 2,4-D.



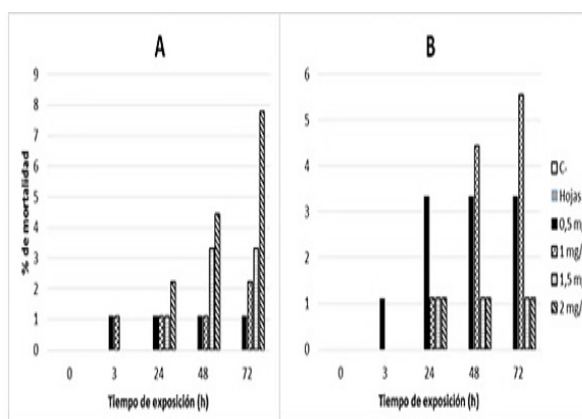
**Figura 4.** Porcentaje de mortalidad de las larvas del IV instar de *Ae. Aegypti* con los extractos de hojas, callos de 2,4-D (G e I), callos de AIB (H y J) y el control con etanol, al 2,5% (2,5 mg/mL) y 3% (3 mg/mL), por horas de exposición a los extractos.

Al comparar la mortalidad en larvas del III instar entre los extractos de hojas y de callos de 2,4-D, no se detectaron diferencias significativas entre los extractos a las 24 h ( $H=0,8252$ ,  $p>0,05$ ), a las 48 h ( $H= 5,426$   $p>0,05$ ) y a las 72 h ( $H= 0,7994$ ,  $p>0,9364$ ) de exposición. En cuanto a los extractos de hojas y de callos de AIB, no se detectaron diferencias significativas a las 24 h ( $H= 5,361$ ,  $p>0,05$ ), a las 48 h ( $H= 6,88$ ,  $p>0,05$ ) y a las 72 h ( $H= 3,006$ ,  $p>0,05$ ) de exposición. De modo que se puede afirmar que el efecto de los extractos de callos fue similar al del extracto foliar durante los periodos de exposición de las larvas 3er estadio. En cuanto a la comparación entre los extractos de callos de 2,4-D e AIB, no se detectaron diferencias significativas a las 24 h ( $H= 5,750$ ,  $p>0,05$ ), a las 48 h ( $H=11,610$ ,  $p>0,05$ ) y a las 72 h ( $H=9,309$ ,  $p>0,05$ ) de exposición.

Para la mortalidad de las larvas del IV instar con los extractos foliares y de callos de 2,4-D, el estadístico no detectó diferencias significativas a las 24 h ( $H= 0,8215$ ,  $p>0,05$ ), a las 48 h ( $H=1,854$ ,  $p>0,05$ ) y a las 72 h ( $H= 2,889$ ,  $p>0,05$ ). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre la mortalidad provocada por el extracto de hojas y los extractos de callos de AIB en larvas 4to estadio obteniendo a las 24 h ( $H= 2,775$ ,  $p= 0,505$ ) y a las 48 h ( $H=7,183$ ,  $p>0,05$ ). No obstante, se obtuvo una diferencia significativa al comparar la mortalidad a las 72 h ( $H= 12,2$ ,  $p<0,05$ ) entre los extractos de 1,5 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BAP, 2 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BAP y 1,0 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BAP.

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en la mortalidad en larvas 4to estadio provocada por los extractos de callos de 2,4-D y de callos de AIB, a las 24 h ( $H=3,833$ ,  $p>0,05$ ) y a las 48 h ( $H=9,128$ ,  $p>0,05$ ). Mientras que a las 72 h de exposición se encontraron diferencias significativas en la mortalidad de las larvas ( $H=15,1$ ,  $p<0,05$ ).

**Evaluación de la mortalidad de las pupas.** En el caso de las pupas de *Ae. Aegypti*, solo se evaluó la mortalidad con la concentración del 3% debido a que su corto tiempo de desarrollo dificultó la obtención de individuos necesarios para los ensayos (Figura 5). Se obtuvo mortalidad en las pupas con los extractos de callos de 0,5 mg/L, 1 mg/L y 1,5 mg/L de 2,4-D y los extractos de 0,5 mg/L, 1 mg/L y 2 mg/L de AIB, por lo tanto, se evidenció que *M. oleifera* puede tener un efecto insecticida en pupas de *Ae. aegypti*, a su vez no se detectó mortalidad en las pupas con el extracto de hojas y el control. El primer registro de mortalidad ocurrió a las 3h de exposición con un 1% para los extractos de 0,5 mg/L y 1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de AIB, la mortalidad aumentó después de las 24h con el extracto de 1 mg/L de AIB alcanzando el porcentaje más alto de 5,5%, seguido por los extractos de 1,5 mg/L de 2,4-D (3,3%) y 0,5 mg/L (3,3%) de AIB.



**Figura 5.** Porcentaje de mortalidad de pupas de *Ae. Aegypti* con los extractos de hojas, callos de 2,4-D (A), callos de AIB (B) y el control con etanol al 3% (3 mg/mL) por horas de exposición a los extractos

**Concentración letal del extracto al 50 % y 90% de mortalidad ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ) en las fases inmaduras:** Las larvas del III instar mostraron una mayor sensibilidad al extracto de callos I2 (1,0 mg/L de AIB +0,5 mg/L de BAP), seguido por el extracto de callos D3 (1,5 mg/L de 2,4-D+0,5 mg/L de BAP) y el extracto I3 (1,5 mg/L de AIB +0,5 mg/L de BAP) (Tabla 1). Los demás extractos de callos de 2,4-D (D1, D2 y D4), callos de AIB (I1 e I4) y el extracto de hojas obtuvieron una  $CL_{50}$  y  $CL_{90}>10$  mg/mL, indicando que se requiere de una concentración mayor a este valor para provocar una mortalidad del 50% y 90%.

En cuanto a las larvas IV instar, se obtuvieron valores más bajos de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  indicando que tuvieron una mayor sensibilidad a los extractos que las larvas III instar. Los valores más bajos para obtener el 50% y 90% de mortalidad de las larvas IV se obtuvieron con el extracto D3, seguido por el extracto I4 (2 mg/L AIB+0,5 mg/L AIB) y el extracto D1 (0,5 mg/L 2,4-D+0,5 mg/L AIB) (Tabla 1). No obstante, la concentración letal para el 90% de mortalidad de los extractos mencionados anteriormente obtuvieron una  $CL_{90}>10$  mg/mL. En el caso del extracto I2, no se obtuvieron valores  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  debido a que la mortalidad de las larvas no incrementó de manera proporcional con la concentración de este extracto.

**Tabla 1.** Valores de concentración letal al 50% y 90% en mg/mL de larvas del III y larvas IV

Extracto	III instar		IV instar	
	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
Hojas	10,922	18,133	7,457	12,297
D1	10,520	16,785	5,703	8,617
D2	19,906	33,551	9,888	16,250
D3	6,108	8,677	5,115	7,710
D4	14,853	25,913	16,757	27,355
I1	23,563	36,997	8,535	15,602
I2	6,214	9,067	-	-
I3	5,595	7,894	9,684	15,561
I4	21,458	34,802	5,679	8,128

## DISCUSIÓN

Una amplia variedad de especies vegetales produce metabolitos secundarios como compuestos activos que desempeñan un papel importante en el mecanismo de defensa contra los insectos como los mosquitos. Se ha comprobado que los compuestos fitoquímicos producidos por *M. oleifera* tienen actividad larvicida, repelente, controladores del crecimiento en artrópodos y poseen un comportamiento disuasorio<sup>35</sup>. La actividad larvicida de *Moringa* se evidenció en larvas del III y IV instar de *Ae. aegypti* al mostrar susceptibilidad a los extractos de hojas y de callos inducidos con 2,4-D e AIB en cada una de sus concentraciones y con variaciones entre los extractos.

Los resultados de este estudio coinciden con lo observado por otros investigadores en *Ae. aegypti* y otras especies de insectos. En sus resultados, Alves et al.<sup>37</sup> evaluaron la actividad insecticida entre extractos de flores, hojas, ramas, raíces y semillas de *M. oleifera* a 50 mL L<sup>-1</sup> (concentración de 10%), logrando evidenciar una mortalidad del 30% a las 24h de exposición y una LC50= 28 mL L<sup>-1</sup> en larvas III de *Ae. aegypti*. Mientras que Afolabi & Olonisakin<sup>38</sup>, obtuvieron una mortalidad del 83% en mosquitos *Culex sp.* con una concentración baja de 5% del extracto foliar a las 4 h de exposición.

En cuanto a la diferencia de mortalidades entre los estadios de las larvas, la mayor mortalidad observada en larvas IV puede estar relacionada con una mayor filtración por parte de los individuos más grandes, de esta manera ingieren más partículas de alimento y de extracto que los individuos más pequeños. Durante los instares III y IV, aumentan las necesidades metabólicas de las larvas por lo que requieren de una mayor cantidad de alimento.<sup>39</sup>

La actividad insecticida de *M. oleifera* observada en las larvas del presente estudio puede estar asociada a los metabolitos secundarios producidos en las hojas y las semillas. En el caso de las hojas, se ha reportado que contienen compuestos bioactivos como flavonoides, saponinas, taninos, catecol taninos, antraquinonas y alcaloides, que pueden tener valor antinutricional para los insectos.<sup>40</sup>

En cuanto a la actividad insecticida de *M. oleifera* observada en las pupas, Ati et al.<sup>41</sup>, afirman que los flavonoides actúan como toxinas respiratorias al ingresar al sistema respiratorio de las pupas de *Ae. aegypti* afectándolo de manera negativa, también pueden llegar al sistema nervioso dañándolo lo que aumenta la mortalidad en estas etapas de desarrollo.

Por otra parte, Pereira et al.<sup>42</sup> reportaron una mayor eficacia bioinsecticida en la fase pupal en comparación con la fase larval de *Ae. aegypti* al emplear extractos de *Cnidocolus phyllacanthus*, *Ricinus communis* y *Coutarea hexandra*. Los autores atribuyeron esta selectividad a las diferencias morfológicas entre ambos estadios, sugiriendo que el mecanismo de acción es por contacto o asfixia y no por ingestión, dado que el estadio de pupa es una fase no alimentaria. En este contexto, otros estudios corroboran la susceptibilidad pupal en culicidos; por ejemplo, Nathan<sup>43</sup> determinó una mortalidad del 92,3% en *Anopheles stephensi* utilizando extractos de hojas y semillas de *Melia azedarach* (20.000 ppm), Nathan<sup>44</sup> evidenció una mortalidad del 88% en pupas de *Anopheles stephensi* a partir de un extracto foliar extracto de *Eucalyptus tereticornis* (160ppm) y atribuyó estos resultados al posible ingreso del extracto al sistema traqueal generando a la vez toxicidad química.

Cabe destacar que la mortalidad observada en las larvas y pupas con el extracto etanólico de hojas dependió de la concentración aplicada. Esta relación entre mortalidad y concentración coinciden con lo reportado por Ogonna et al.<sup>45</sup>, quienes demostraron que al aumentar la dosis de un extracto foliar de *M. oleifera*, la mortalidad en insectos también aumenta de manera proporcional a medida que transcurre el tiempo de exposición al extracto.

Por otro lado, el efecto larvicida observado con los extractos de callos pudo ser provocado por las lectinas y hemaglutininas, unas proteínas bioactivas que contienen las semillas de moringa<sup>46,47</sup>. Al ser ingeridas por los mosquitos, las lectinas actúan en el epitelio intestinal medio, a través de diferentes mecanismos de acción: con la inhibición de enzimas digestivas glicolisadas, la unión de las lectinas a los receptores glicolisados de las membranas de células epiteliales que regulan las vías relacionadas con la proliferación celular y/o la apoptosis y la unión de las lectinas a la quitina que constituye a la membrana peritrófica, la cual protege a las células epiteliales digestivas del contenido del lumen, lo que conlleva a una disminución en la eficiencia de digestión del alimento y susceptibilidad a infecciones por microorganismos.<sup>48,49</sup>

Mientras que las hemaglutininas, son lectinas que tienen la capacidad de aglutinar células como los eritrocitos, linfocitos, fibroblastos, bacterias y glucoconjugados<sup>50</sup>. La toxicidad de las lectinas y hemaglutininas de las semillas de moringa fue reportada por Agra-Neto et al.<sup>10</sup> con extractos de lectinas solubles en agua y lectinas coagulantes demostrando su capacidad para alterar la actividad enzimática en el intestino de larvas de *Ae. aegypti*. Otros investigadores como Silva et al.<sup>14</sup> comprobaron la actividad insecticida del 50% de un extracto rico en lectinas a la concentración de 0,6 mg/mL, además observaron una notable alteración el tejido epitelial y en las enzimas digestivas de larvas.

Otro componente bioactivo con actividad insecticida que está presente en las semillas de moringa son los inhibidores de la actividad de proteasas. Cuando los insectos las ingieren, estas moléculas se unen de manera competitiva al sitio activo de las tripsinas, unas enzimas proteolíticas digestivas, inhibiendo su actividad causando efectos nocivos en la digestión y absorción de nutrientes, así como en la reducción de la disponibilidad de aminoácidos esenciales. Al interferir con los procesos digestivos, los mosquitos pueden morir por inanición debido a la falta de nutrientes y aminoácidos<sup>51,52</sup>. Se ha reportado que los inhibidores de proteasas también pueden perjudicar la fisiología y el crecimiento de las larvas de *Ae. aegypti* provocando un retraso en el desarrollo larval y el aumento de su mortalidad.<sup>53</sup>

Todos estos mecanismos conducen a un deterioro en el crecimiento, desarrollo y potencial reproductivo, así como la reducción de la metamorfosis y actividad alimentaria lo que conlleva a la disminución de la capacidad de supervivencia del insecto<sup>50</sup>. En este contexto, se puede inferir que los metabolitos secundarios de los extractos de callos no tuvieron un efecto letal directo en las larvas, sino que actuaron dificultando la absorción de nutrientes y el correcto funcionamiento del sistema digestivo, al mismo tiempo retrasaron la transición de un estadio a otro y disminuyendo su viabilidad, lo cual podría explicar la mortalidad después de transcurrir las 24 h y 48 h de exposición incluso en concentraciones bajas de los extractos. Según afirma Pavela<sup>54</sup>, una exposición breve de las larvas y adultos a aceites esenciales puede aumentar la mortalidad a lo largo del tiempo y causar una disminución de adultos viables, así como una reducción significativa de la fecundidad y fertilidad. Los nutrientes en la dieta de las larvas y mosquitos son esenciales para su comportamiento y desarrollo, de manera que un cambio en su nutrición puede afectar de manera significativa su supervivencia, comportamiento alimentario, ovoposición y tolerancia a condiciones adversas.<sup>55</sup>

Sin embargo, los análisis estadísticos indicaron que no hubo diferencias significativas entre los extractos de callos y de hojas, lo cual difiere con lo esperado en cuanto a una mayor mortalidad por parte de los extractos de callos. Esta baja mortalidad puede ser consecuencia de varios factores inherentes al método de extracción como el tipo de solvente utilizado y las altas temperaturas.<sup>56,57</sup>

De igual manera, se pudo evidenciar la producción de metabolitos secundarios con actividad insecticida en callos no embriogénicos inducidos con 2,4-D e AIB en combinación con BAP, lo cual puede significar una ventaja novedosa para la producción de un biopesticida sin requerir de una gran cantidad de biomasa vegetal. El cultivo de callos in vitro de moringa puede ser llevado a gran escala mediante cultivos de suspensiones celulares en agitación o biorreactores para incrementar la producción constante de metabolitos secundarios deseados y mejorar el rendimiento. De esta manera, se disminuye la exposición a factores ambientales como el clima, la variación estacional, plagas y limitaciones geográficas<sup>58</sup>. Al mismo tiempo, se reduce la obtención de semillas para la propagación y la extracción de metabolitos secundarios, y el espacio requerido para las siembras de árboles, además de evitar el tiempo de cosecha de semillas y disminuir el daño a la planta madre.<sup>59</sup>

Finalmente, el presente estudio demuestra la capacidad bioinsecticida de los extractos foliares y de callo no embriogénico de *M. oleifera* sobre los estadios inmaduros de *Aedes aegypti*. La principal novedad de esta investigación radica en la evaluación comparativa entre extractos de plantas silvestres y biomasa obtenida mediante cultivo de tejidos in vitro, destacando la inducción de efectos antinutricionales y una marcada disminución en la eficiencia digestiva de las larvas, así como la efectividad por contacto y asfixia en el estadio de pupa. Si bien las tasas de mortalidad registradas no fueron elevadas, estos hallazgos constituyen un antecedente relevante que valida la bioactividad de *M. oleifera* y abre nuevas vías de investigación. Se requieren estudios futuros para caracterizar los metabolitos secundarios específicos involucrados y optimizar los métodos de obtención de extractos, con el fin de mejorar la efectividad de las concentraciones para consolidar a *M. oleifera* como una alternativa sostenible y biotecnológica en los programas de control integrado de vectores.

**Agradecimiento:** A los compañeros y profesores del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo, Venezuela) por el apoyo y contribución en esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Mustaq I, Sarwar M, Munzoor I. A comprehensive review of Wolbachia-mediated mechanisms to control dengue virus transmission in *Aedes aegypti* through innate immune pathways. *Front. Immunol.* 2024; 15: 1434003.
2. Carneiro T, Rocha M, Nogueira F, Lourenço R. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14: e0008527.
3. Soghigian J, Soria A., Robert V, Le Goff G, Failloux A, Powell J. Genetic evidence for the origin of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, in the southwestern Indian Ocean. *Molecular Ecology.* 2020; 29: 3593-360.
4. Mejía M, Correa F, González C, Dávalos E, Peralta J, Martínez A, et al. El mosquito del dengue en la Ciudad de México. Invasión incipiente de *Aedes aegypti* y sus potenciales riesgos. *Gaceta médica de México.* 2020; 156: 388-395.
5. Pernalet M, Flores K, Pulido N, Camacho D, Pérez L, Herrera F. Co-circulación viral de Dengue y Chikungunya en mosquitos *Aedes aegypti* infectados naturalmente en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* 2020; 60: 38-48.
6. Bingyi Y, Borgert B, Alto B, Boohene C, Brew J, Deutsch K, et al. Modelling distributions of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using climate, host density and interspecies competition. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021; 15: 1-21.
7. Gan S, Leong Y, bin Barhanuddin M, Wong S, Wong S, Mak J, Ahmad R. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasites Vectors.* 2021; 14: 315.
8. Corbel V, Kont M, Ahumada M, Andréo L, Bayili B, Bayili K, et al. A new WHO bottle bioassay method to assess the susceptibility of mosquito vectors to public health insecticides: results from a WHO-coordinated multi-centre study. *Parasit Vectors.* 2023; 16: 21.

9. Meier C, Rouhier M, Hillyer J. Chemical Control of Mosquitoes and the Pesticide Treadmill: A Case for Photosensitive Insecticides as Larvicides. *Insects*. 2022; 13: 1093.
10. Agra-Neto A, Napoleão T, Viana E, De Lima N, De Andrade L, Fontes C, et al. Effect of Moringa oleifera lectins on survival and enzyme activities of Aedes aegypti larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasitol Res*. 2014; 113:175–184.
11. Estrada J, Umaña R, Sancho C, Orozco M. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas con potencial de degradación de los plaguicidas clorotalonil y clorpirifos. *Uniciencia*. 2023; 37: 481-496
12. Souto A, Sylvestre, Tölke E, Tavares J, Barbosa J, Cebrián G. Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules*. 2021; 26: 4835.
13. Tlak I, Dar S. Plant Allelochemicals as Sources of Insecticides. *Insects*. 2021; 12: 189.
14. Silva L, Fernandes K, Miranda F, Cabral S, Barroso L, Ferraz D, et al. Exposure of mosquito (Aedes aegypti) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of Moringa oleifera seeds impairs their development and future fecundity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019; 183: 1-7.
15. Sharma K, Kumar M, Waghmare R, Suhag R, Gupta P, Lorenzo J, et al. Moringa (Moringa oleifera Lam.) polysaccharides: Extraction, characterization, bioactivities, and industrial application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022; 209: 763-778.
16. Velázquez M, Peón I, Zepeda R, Jiménez M. Moringa (Moringa oleifera Lam.): usos potenciales en la agricultura, industria y medicina. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2016; 22: 95-116.
17. Anzano A, Ammar, Papaiani M, Grauso L, Sabbah M, Capparelli R, Lanzotti V. Moringa oleifera Lam.: A Phytochemical and Pharmacological Overview. *Horticulturae*, 2021; 7: 409.
18. González F. Un estudio transversal de Moringa oleifera Lam. (Moringaceae) Revisión. *Dominguezia*. 2018; 34: 5-25.
19. Heinz Q, Arredondo R, Ordaz S, Méndez H, Hernández A, Chacón J. Bioacaricidal Potential of Moringa oleifera Ethanol Extract for Tetranychus merganser Boudreaux (Acari: Tetranychidae) Control. *Plants*. 2021; 10: 1-10.
20. Fernández R, Salomón J, Reyes D. Efecto antibacteriano de hojas y callo de Azadirachta indica A. Juss en microorganismos de interés alimentario. *Rev Salus UC*. 2020; 24: 27-34.
21. Krasteva G, Georgiev V, Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Eng Life Sci*. 2020; 21: 68–76. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7923559/>
22. Norouzi O, Hesami M, Dutta A, Jones A. In vitro plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Sci Rep*. 2022; 12: 5038.
23. Hamany C, Steenkamp P, Piater L, Madala N, Dubery I. Habituated Moringa oleifera callus retains metabolic responsiveness to external plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019: 1-16.
24. Artigas M, Fernández Da Silva R. Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de Azadirachta indica A. Juss. *Acta biol Colomb*. 2015; 20: 73-83.
25. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
26. Khalafalla M, El Gaali E, Abbas F, Ali H. Neem (Azadirachta Indica A. Juss) callus induction and its larvicidal activity against Anopheles Mosquito. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2007; 3: 83-92.
27. Pérez F. Establecimiento del sistema de regeneración en Moringa oleifera Lam., acoplado al estudio del efecto antimicrobiano de extractos de callo no embriogénico sobre las bacterias de interés clínico Enterobacter aerogenes y Proteus vulgaris. Tesis de grado. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. 2021.
28. Kala S, Vijayalakshmi M, Khalivulla S, Mallikarjuna K. Phytochemical and Antimicrobial Analysis of Callus Extracts of Biophytum sensitivum (Linn) DC. *British Microbiology Research Journal*. 2014; 4: 869-884.
29. Hernández M, Piña M, Soto-Vivas A, Rangel M, Irija J. Primer registro de Aedes albopictus (Skuse, 1984) (Diptera: Culicidae) en el Estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. 2015; 19: 39-41.
30. Rueda. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 2004; 589.
31. Proyecto ZIKA AIRS & ZAP. Manual práctico para el funcionamiento de un insectario: Procedimientos de cría de la especie Aedes aegypti y principios básicos de bioseguridad. 1ra ed. Abt Associates. Maryland. 2019; p. 20-47.
32. Martiradonna G, Berti J, Guerra L, Salazar M, Escobar C, Gómez J. Efecto del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de La Pedrera, Maracay, estado Aragua, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2014; 54: 208-219.
33. Camacho O, Barrios S, Lozano E, García L. Actividad larvicida de extractos hidroalcohólicos de Pala scholaris (L.) Roberty sobre larvas de estadio III de Aedes aegypti. *Journal of Negative and No Positive Results*. 2019; 4: 1022-1031.
34. Finney D. Probit Analysis. 3ra ed. Cambridge University Press. London. 1971; 38.
35. Rodríguez J, Sánchez E, Reyes D, Fernández R. Efecto biocontrolador de Azadirachta indica (Meliaceae) sobre Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Rev Salus UC*. 2020; 24: 08-12.
36. Hammer Ø, Harper D, Ryan P. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 2001; 4: 9.
37. Alves A., Da Silva T, De Azevedo F, Cândido E, Virgulino R, Costa C. & Feitosa J. Larvicidal Activity in vivo of Ethanol and Aqueous Extracts From Moringa (Moringa oleifera Lam.) on Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Agricultural Science*. 2019; 11: 129.
38. Afolabi O, Olonisakin A. Moringa oleifera (Lam.) and Momordica charantia (Lam.) as Potential Larvicides and Fumigants of Culex Mosquitoes. *GU J Sci*. 2022; 9: 87-95.
39. Steinwascher K. Competition among Aedes aegypti larvae. *PLoS ONE*. 2018; 13: e0202455.
40. Kashyap P, Kumar S, Riar C, Jindal N, Baniwal P, Guiné R, et al. Recent Advances in Drumstick (Moringa oleifera)

- Leaves Bioactive Compounds: Composition, Health Benefits, Bioaccessibility, and Dietary Applications. *Antioxidants* (Basel). 2022; 11: 402.
41. Ati V, Meye E, Refli R, Dima A, Amalo D, Jebatu. Moringa leaf (*Moringa oleifera* L.) flavonoids utilization in suppressing growth of *Aedes aegypti* larvae. *Jurnal Ilmiah Berkala: Sains dan Terapan Kimia*. 2022; 16: 64-74.
  42. Pereira CL, Cavalcanti MT, Barbosa E. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013; 46:420-425.
  43. Nathan SS. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial Vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol* 2006; 97:1316-1323
  44. Nathan SS. The use of *Eucalyptus Tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol* 2007; 98:1856-1860.
  45. Ogbonna C, Okonkwo N, Nwankwo E, Alo M, Egbuche C, Ezemuoka L, Irikannu K, Ukonze C. Aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf in the management of insect pest of cabbage plant both in the laboratory and field. *International Journal of Entomology Research*. 2022; 6: 88-98.
  46. Coelho L, Silva P, Lima V, Pontual E, Paiva P, Napoleão T, Correia M. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017:1594074.
  47. Nath H, Samtiya M, Dhewa T. Beneficial attributes and adverse effects of major plant-based foods anti-nutrients on health: A review. *Human Nutrition & Metabolism*. 2022; 28: 200147.
  48. De Oliveira C, De Moura M, Napoleão T, Paiva P, Coelho L, Macedo M. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2017: 1-11.
  49. Napoleão Ta, Albuquerque L, Santos N, Nova I, Lima T, Paiva P, Pontual E. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*. 2019; 75: 1212-1222.
  50. Napoleão Tb, Santos A, Luz L, Pontual E, Paiva P, Coelho L. *Moringa oleifera*: a powerful source of environmentally, medicinally and biotechnologically relevant compounds. En: Teodor R, editor. *Advances in Applied Science and Technology*. West Bengal: Book Publisher International. 2019. p. 58-77
  51. Paiva P, Pontual E, Coelho L, Napoleã T. Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. En: Méndez A, editor. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Editorial Formatex Research Centre. 2013; 641-649.
  52. Shamsi T, Parveen R, Ahmad A, Samal R, Kumar S, Fatima S. Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. *Acta Ecologica Sinica*. 2018; 38: 325-328.
  53. Pontual E, De Lima N, De Moure M, Barroso L, Ferraz D, Napoleão T, Guedes P. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitol. Res*. 2014; 113: 727-733.
  54. Pavela, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*. 2009; 30: 311-315.
  55. Conway M, Haslitt D, Swarts B. Insecticidas de última generación para combatir el metabolismo de *Aedes aegypti* . *Viruses* 2023; 15: 469.
  56. De Oliveira A., Silva L, Lima T, Pontual E, Santos N, Coelho L, et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. *Process Biochemistry*. 2016; 51: 1683-1690.
  57. Coelho J, Santos N, Napoleão T, Gomes F, Ferreira R, Zingali R, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*. 2009; 77: 934-938.
  58. Efferth T. *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures*. *Engineering*. 2019; 5: 50-59.
  59. Hassanein A, Salem J, Faheed F, El-Nagish A. Some important aspects in *Moringa oleifera* Lam. Micropropagation. *Acta agriculturae Slovenica*. 2019: 13-2.