



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**TOXICIDAD *IN VIVO* DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ALBA*
SOBRE *RATTUS RATTUS***

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE

MÉDICO CIRUJANO

PRESENTADO POR

CRISTHIAN JESÚS CERVERA VARÍAS

ASESOR

DR. HEBER SILVA DIAZ

CHICLAYO, PERÚ

2021



**Reconocimiento - Compartir igual
CC BY-SA**

El autor permite a otros re-mezclar, modificar y desarrollar sobre esta obra incluso para propósitos comerciales, siempre que se reconozca la autoría y licencien las nuevas obras bajo idénticos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**TOXICIDAD *IN VIVO* DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ALBA*
SOBRE *RATTUS RATTUS***

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE

MÉDICO CIRUJANO

PRESENTADO POR

CRISTHIAN JESÚS CERVERA VARÍAS

ASESOR

DR. HEBER SILVA DIAZ

CHICLAYO, PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres quienes se encargaron, desde un inicio, de formarme como una mejor persona, acompañarme durante este largo camino, ser mi impulso día a día y haberme brindado sus muestras de apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Heber Silva por asesorarme a lo largo de este estudio, por su paciencia, brindarme su apoyo y orientarme de la mejor manera en la elaboración de este proyecto.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice	IV
Resumen	V
Abstract	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	3
III. RESULTADOS	6
IV. DISCUSIÓN	8
V. CONCLUSIONES	10
VI. RECOMENDACIONES	11
VII. FUENTES DE INFORMACIÓN	12
ANEXOS	

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la toxicidad *in vivo* del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) sobre *Rattus rattus*. **Materiales y métodos:** Estudio experimental controlado y aleatorizado. Se utilizaron 24 *Rattus rattus* variedad Long Evans las cuales se distribuirán en 4 grupos (1 grupo control y 3 grupos experimentales) que contendrán 6 ratas cada uno (3 hembras y 3 machos). El aceite esencial se le administró por vía tópica, en cola y almohadillas de las patas, una vez diaria durante 14 días. Las dosis probadas fueron 1000 mg/ml, 500 mg/ml y 125 mg/ml; el grupo control recibió aceite de oliva. Se evaluaron indicadores clínicos de toxicidad (muerte, convulsiones, piloerección y variación ponderal), y anatomopatológicos de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad (histopatología y enzima alanino aminotransferasa). **Resultados:** Se encontró que ningún animal murió, ni presentó convulsiones o piloerección a alguna concentración del aceite; del mismo modo, tampoco se observó hepatotoxicidad y nefrotoxicidad a las concentraciones de 500 y 125 mg/ml, sin embargo, a 1000 mg/ml se observó alteración grado 1. La variación ponderal y los valores de ALT, en los grupos expuestos al aceite esencial y control no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$). **Conclusión:** El aceite esencial de *Lippia alba* no produjo mortalidad ni manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad en los animales de experimentación. Los estudios anatomopatológicos mostraron ligera alteración a la mayor concentración del aceite.

Palabras clave: Lippia; Pruebas de Toxicidad; Ratas (**Fuente:** DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: To evaluate the in vivo toxicity of Lippia alba (pampa oregano) essential oil on Rattus rattus. **Materials and methods:** Randomized controlled experimental study. Twenty-four Rattus rattus variety Long Evans were used, which were distributed in 4 groups (1 control group and 3 experimental groups) containing 6 rats each (3 females and 3 males). The essential oil was administered topically on the tail and paw pads, once daily for 14 days. The doses tested were 1000 mg/ml, 500 mg/ml and 125 mg/ml; the control group received olive oil. Clinical indicators of toxicity (death, convulsions, piloerection and weight variation), and anatomopathological indicators of nephrotoxicity and hepatotoxicity (histopathology and alanine aminotransferase enzyme) were evaluated. **Results:** It was found that no animal died, nor presented convulsions or piloerection at any concentration of the oil; likewise, hepatotoxicity and nephrotoxicity were not observed at concentrations of 500 and 125 mg/ml, however, at 1000 mg/ml, grade 1 alteration was observed. The weight variation and ALT values in the groups exposed to the essential oil and control did not show significant differences ($p > 0.05$). **Conclusion:** Lippia alba essential oil did not produce mortality or clinical manifestations indicative of toxicity in experimental animals. The anatomopathological studies showed slight alteration at the highest concentration of the oil.

Key words: Lippia; Toxicity Test; Rats (**Source:** MeSH NLM).

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años han ido en aumento la aparición de nuevos casos de enfermedades transmitidas por vectores. Especialmente, en Sudamérica se ha podido observar el aumento de las arbovirosis transmitidas por el vector *Aedes aegypti*, los cuales son el dengue, el Chikungunya y el Zika (1-3).

En un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta que las enfermedades metaxénicas constituyen alrededor del 17 % de todas las patologías infecciosas, y que anualmente generan más de un millón de muertes, con más de 2 500 millones de personas en riesgo de contraer dengue (4), y ahora también Chikungunya y Zika (5).

En Perú, según los reportes del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC) hasta la semana epidemiológica 32 del año 2017, se han tenido 71 447 casos de dengue, 1 436 casos de Chikungunya y 6 242 entre casos sospechosos y confirmados de Zika (6).

Según datos a la semana epidemiológica 32 del 2017, Lambayeque es la sexta región más afectada a nivel nacional por el dengue, con un total de 1 606 casos autóctonos; en relación a Chikungunya, se reportaron 2 casos autóctonos y; con respecto a Zika, se han reportado 3 casos (6,7).

Una de las principales problemáticas es el control estas enfermedades, realizándose esfuerzos en buscar medidas de prevención efectivas (8). Ante ello, el uso de repelentes es una forma económica para prevenir enfermedades transmitidas por vectores y proporciona una alternativa a los métodos de control de vectores que utilizan insecticidas sintéticos (9-11).

Si bien los repelentes de origen sintético han demostrado, en diversos estudios, excelentes propiedades logrando un impacto del 30 % al 80 % de rechazo al mosquito (12-16); sin embargo, sus efectos adversos en la salud humana (afecciones dermatológicas, principalmente) y en el medio ambiente no son despreciables. Este contexto ha llevado a un aumento gradual de la investigación

sobre los repelentes derivados de otras fuentes (12,17–20), en reemplazo de este compuesto. Es aquí donde toman importancia las investigaciones sobre repelentes derivados de productos naturales como aceites esenciales, obteniéndose resultados favorables en cuanto al poder repelente; no obstante, los posibles efectos adversos requieren ser estudiados pues no se dispone de mucha información sobre el tema (18–23).

En el 2011, en un estudio realizado en Bolivia para evaluar la toxicidad *in vivo* de determinados extractos etanólicos obtenidos de plantas autóctonas de la región (*B. latifolia* y *B. papillosa*), se encontraron algunas reacciones adversas como piloerección o cambios en la temperatura corporal de ratones albinos suizos, pero que no resultaron ser mortales para los mismos (24).

En Perú, se realizó un trabajo en donde se determinó la toxicidad *in vivo* de un aceite esencial (*Aloysia triphylla*). Entre los resultados obtenidos no se encontraron cambios significativos, tanto en la variación ponderal como en los estudios anatomopatológicos, que indiquen algún grado de toxicidad en los animales de experimentación usados en la investigación (25).

El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la toxicidad *in vivo* del aceite esencial de *Lippia alba* sobre *Rattus rattus* para garantizar el uso seguro del mismo, a dosis establecidas y sin la presencia de efectos adversos que pueda condicionar su utilidad.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación fue un estudio experimental controlado y aleatorizado.

Diseño muestral

El aceite esencial de *Lippia alba* fue obtenido a partir de destilación por arrastre de vapor, el cual se ejecutó en un estudio previo realizado en los laboratorios de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y, posteriormente, donados para la realización de este proyecto.

Se utilizaron ratas albinas (*Rattus rattus* var. Long Evans) hembras y machos proporcionados por el bioterio del Hospital Regional de Lambayeque. Los animales fueron alojados en un ambiente en condiciones estándar de temperatura y humedad, con alimento y agua *ad libitum* (a voluntad) y ciclos de 12 horas luz/oscuridad.

La muestra fue no probabilística por conveniencia. Se distribuyeron 4 grupos (1 grupo control y 3 grupos experimentales) los cuales contenían 6 ratas cada uno (3 hembras y 3 machos). El peso promedio de cada rata albina incluida en cada grupo presentaba un peso aproximado entre 140 a 180 gramos en hembras y 160 a 200 gramos en machos.

Para los **criterios de selección** se tuvieron en cuenta a las ratas de laboratorio (*Rattus rattus* var. Long Evans) hembras y machos proporcionados por el bioterio del Hospital Regional de Lambayeque que cumplan con el requisito de un peso aproximado entre 140 a 180 gramos en hembras y 160 a 200 gramos en machos. Asimismo, se excluyó a todas las ratas que presenten alguna patología o que ya hayan sido usadas en otras investigaciones previas.

Proceso de recolección de datos

Ensayo de toxicidad: Para el estudio de toxicidad se emplearon las metodologías descritas por la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Inicialmente se pesó a los animales y marcado correspondiente. Se dispuso por subgrupo un número de ratas a las cuales se administró por vía tópica (específicamente en las almohadillas de las patas y en la cola) una dosis diaria durante 14 días del aceite esencial de las siguientes dosis: 1000 mg/ml, 500 mg/ml y 125 mg/ml. Después de la administración de los extractos, se observaron a los 30, 60, 120, 480 minutos, 24 horas, octavo día y décimo cuarto día, se evaluaron los siguientes parámetros: convulsiones, piloerección, variación ponderal y mortalidad. Al grupo control se le administró por vía tópica aceite de oliva una vez al día durante 14 días en las mismas zonas descritas anteriormente para los grupos experimentales. Asimismo, la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad se midieron al décimo cuarto día de tratamiento post mortem en el laboratorio de anatomopatología del Hospital Regional de Lambayeque. De igual forma, se extrajo sangre para determinar el valor laboratorial de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) como marcador de hepatotoxicidad. El sacrificio de las ratas se efectuó empleando pentobarbital sódico (Halatal) a una dosis de 100 mg/kg vía intraperitoneal.

Todos los datos obtenidos fueron registrados en una ficha de recolección para su posterior análisis (anexo 1).

Validez y confiabilidad del instrumento

Se realizó una ficha de recolección de datos validada cualitativamente mediante un juicio de expertos (1 biólogo y 1 médico epidemiólogo), los cuales valoraron la claridad y pertinencia de cada ítem.

Técnicas estadísticas

Los resultados obtenidos se registraron y organizaron en Excel 2016, con la verificación correspondiente. Luego se utilizó el paquete estadístico Stata v14.0 para su análisis respectivo.

Los datos obtenidos de naturaleza cuantitativa fueron expresados como media y desviación estándar, las cuales se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Las medias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

Aspectos éticos

Se tuvo en cuenta el cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de los animales empleados en la investigación; además se contó con un ambiente físico y espacio de acuerdo al espécimen (*Rattus rattus* var. Long Evans), según los documentos publicados por la Organización Panamericana de la Salud, respecto al animal como sujeto de experimentación. En el manejo de las especies se tuvo en consideración el principio de las “tres erres”: reducir, reemplazar y refinar; esto con el propósito de generarle al animal de experimentación el menor sufrimiento o daño posible. El trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética para el uso de animales del Hospital Regional de Lambayeque.

III. RESULTADOS

Los datos tuvieron distribución no normal. En la Tablas 1 y 2, se muestran medianas y rangos intercuartílicos de la variación ponderal y valores de alanino aminotransferasa (ALT), respectivamente, en ratas de experimentación (*Rattus rattus* var. Long Evans), distribuida según grupos experimentales (control y concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* a 1000, 500 y 125 mg/ml). En cuanto a la comparación de ambos casos, tanto para la variación ponderal como para los valores de ALT, en los grupos expuestos al aceite esencial y control no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$).

Tabla 1. Comparación de la variación ponderal en *Rattus rattus* var. Long Evans expuestas a distintas concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba*.

Grupo	n	Me (RIC)	Valor de p*	Comparación
Control	6	7,85 (5,90-9,20)		A
T-1000	6	13,05 (10,20-24,40)	0,2396	A
T-500	6	15,80 (9,20-20,10)		A
T-125	6	17,25 (6,50-27,50)		A

Me: mediana; RIC: rango intercuartílico

*Prueba de Kruskal Wallis

Tabla 2. Comparación de los valores de alanino aminotransferasa (ALT) en *Rattus rattus* var. Long Evans expuestas a distintas concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba*.

Grupo	n	Me (RIC)	Valor de p*	Comparación
Control	6	68,65 (51,40-77,60)		A
T-1000	6	67,20 (64,20-80,30)	0,9419	A
T-500	6	80,50 (49,20-103,20)		A
T-125	6	63,35 (51,60-78,10)		A

Me: mediana; RIC: rango intercuartílico

*Prueba de Kruskal Wallis

En la tabla 3 se observan la mortalidad, variables clínicas (convulsiones y piloerección) e histopatología de *Rattus rattus* expuestas tópicamente al aceite esencial de *Lippia alba*. Ningún animal murió, ni presentó convulsiones o piloerección a alguna concentración del aceite; del mismo modo, tampoco se observó hepatotoxicidad y nefrotoxicidad a las concentraciones de 500 y 125 mg/ml, sin embargo, a 1000 mg/ml se observó alteración grado 1.

Tabla 3. Número de *Rattus rattus* var. Long Evans que murieron, presentaron convulsiones, piloerección, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.

Grupo	Mortalidad	Convulsiones	Piloerección	Hepatotoxicidad	Nefrotoxicidad
Control	0	0	0	0	0
T-1000	0	0	0	6 (G1)	6 (G1)
T-500	0	0	0	0	0
T-125	0	0	0	0	0

G1: alteración grado 1; G2: alteración grado 2

IV. DISCUSIÓN

Los compuestos naturales derivados de plantas constituyen una alternativa válida al ser usados como repelentes de insectos, especialmente sobre *Aedes aegypti*, el cual representa un problema de salud pública. En la elaboración de un bioproducto no solo es necesario tener en cuenta la capacidad para alejar determinados organismos sino también el riesgo de producir reacciones adversas.

En cuanto a la variación ponderal de las ratas de experimentación, se encontró que el aceite esencial de *Lippia alba* no tuvo un efecto tóxico significativo. Al respecto, estudios previos han descrito que los aceites esenciales obtenidos de la misma planta no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales antes y después del tratamiento (26).

Asimismo, otro estudio encontró que los extractos etanólicos extraídos de las especies *Bacharis latifolia* y *Bacharis papillosa* no modificaron significativamente el peso corporal de los ratones hasta los 14 días de observación (24).

Un hecho que contrasta este estudio es el de Bermúdez *et al.*, en donde se obtuvo que el peso como indicador de toxicidad, se mantuvo dentro los parámetros normales establecidos para la curva de crecimiento de la especie (27).

Respecto a la piloerección, ninguna de las ratas tratadas con el aceite esencial a diferentes concentraciones mostró este indicador de toxicidad. Hecho distinto ocurrió a lo reportado por Loza *et al.*, quien encontró que, luego de la administración por vía oral de determinados extractos etanólicos, las ratas de experimentación presentaron piloerección en las primeras 24 horas (24).

Los niveles de alanino aminotransferasa (ALT) encontrados en los animales de experimentación expuestos al aceite esencial no evidenciaron diferencias significativas con respecto al control. Por el contrario, Neira *et al.* halló niveles normales de aspartato aminotransferasas (AST) en suero después del

tratamiento oral con aceites esenciales de *Lippia alba*. No ocurrió lo mismo con los niveles de fosfatasa alcalina (FA) los cuales se encontraron elevados en dicho estudio lo que sugirió un posible daño hepático transitorio (26).

En lo concerniente a los indicadores anatomopatológicos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad se encontró que las ratas tratadas a concentraciones de 1000 mg/ml presentaron alteración grado 1, esto representa una leve alteración en la arquitectura orgánica, pero sin mayor importancia clínica. Lo encontrado en la microscopía se relaciona con los valores normales de ALT, en lo que se refiere a toxicidad hepática. Por otra parte, Neira *et al.* en su estudio para determinar la toxicidad *in vivo* de aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* sobre ratones demostró que en las biopsias hepática, renal y esplénica no se observaron alteraciones histopatológicas las cuales incluían presencia o ausencia de aglomeraciones capilares, fibrosis y necrosis en el hígado; formación de granulomas en el riñón y alteraciones en la arquitectura de las pulpas esplénicas (26).

Cabe resaltar que debido al escaso volumen de aceite esencial (el cual fue extraído en trabajos previos) no se pudo incluir en el estudio la concentración de 250 mg/ml del aceite.

Otra limitación fue la incapacidad de poder observar las 24 horas a los animales de experimentación y la probabilidad de que hayan experimentado algún indicador clínico de toxicidad durante ese periodo.

V. CONCLUSIONES

Los ejemplares de *Rattus rattus* tratadas tópicamente con 1000, 500 y 125 mg/ml de aceite esencial de *Lippia alba* no produjeron la muerte ni manifestaciones clínicas (peso, convulsiones y piloerección) de toxicidad aguda.

Las especies de *Rattus rattus* tratadas tópicamente con 500 y 125 mg/ml de aceite esencial de *Lippia alba* no mostraron evidencia de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad aguda, sin embargo, se observó ligera alteración tisular a la concentración de 1000 mg/ml.

En términos generales se puede concluir que el aceite esencial de *Lippia alba* es seguro en bajas concentraciones, pero se debe tener especial precaución a concentraciones altas pues ya se puso en evidencia que se pueden presentar cambios a nivel citológico.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios complementarios donde se evalúe toxicidad y citotoxicidad del aceite esencial de *Lippia alba*, *in vitro* e *in vivo*, y posteriormente realizar estudios clínicos en seres humanos para determinar la seguridad de este producto.

Se requiere continuar con estos trabajos de investigación para disponer de información sobre toxicidad crónica, modificación de parámetros bioquímicos e histológicos.

VII. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1423–1432. doi: 10.1056/NEJMra1110265.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504. doi: 10.1038/nature12060.
3. Silva NGR, Silva JDR. Impacto general de las fiebres del Zika y Chikungunya en Colombia y América del sur: Análisis general de los virus y su importancia. *Biociencias*. 2017;11(2):77–94. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6118643>
4. Organización Mundial de la Salud [Internet]. OMS; 2020 [citado el 3 de marzo del 2020]. Enfermedades transmitidas por vectores; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>
5. Rodríguez-Morales AJ. No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika. *Arch Med*. 2015;11(2):1-3. doi: 10.3823/1245
6. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Sala Situacional de Salud (Sem 32-2017) [Internet]. Lima: Dirección General de Epidemiología, MINSA; 2017 [citado 23 de septiembre de 2019]. Disponible en: http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=606
7. Gerencia Regional de Salud. Sala Situacional de Salud de Lambayeque (Semana 34) [Internet]. Ministerio de Salud; 2017. [citado 25 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.regionlambayeque.gob.pe/web/tema/detalle/715?&pass=NA=>
≡
8. World Health Organization. Guidelines for efficacy testing of spatial repellents. 2013 [citado 23 de septiembre de 2019]; Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78142/1/9789241505024_eng.pdf
9. Rodríguez SD, Drake LL, Price DP, Hammond JI, Hansen IA. The efficacy of some commercially available insect repellents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Insect Sci*. 2015;15(1):140. doi: 10.1093/jisesa/iev125.

10. Rodriguez SD, Chung H-N, Gonzales KK, Vulcan J, Li Y, Ahumada JA, et al. Efficacy of Some Wearable Devices Compared with Spray-On Insect Repellents for the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *J Insect Sci.* 2017;17(1):1-6. doi: 10.1093/jisesa/iew117.
11. Debboun M, Strickman D. Insect repellents and associated personal protection for a reduction in human disease. *Med Vet Entomol.* 2013;27(1):1–9. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01020.x.
12. Mamood SNH, Hidayatulfathi O, Budin SB, Rohi GA, Zulfakar MH. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. *Bull Entomol Res.* 2017;107(1):49–57. doi: 10.1017/S0007485316000614
13. Nguyen NM, Whitehorn JS, Hue TLT, Thanh TN, Xuan TM, Xuan HV, et al. Physicians, primary caregivers and topical repellent: all under-utilised resources in stopping dengue virus transmission in affected households. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(5):e0004667. doi: 10.1371/journal.pntd.0004667.
14. Chou JT, Rossignol PA, Ayres JW. Evaluation of commercial insect repellents on human skin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1997;34(6):624–630. doi: 10.1093/jmedent/34.6.624.
15. Cliek JE, Petersen JL, Hallmon CE. Comparative efficacy of IR3535 and deet as repellents against adult *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004;20(3):299–304. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15532931/>
16. Fradin MS, Day JF. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med.* 2002;347(1):13–18. doi: 10.1056/NEJMoa011699.
17. Rajkumar S, Jebanesan A. Prevention of Dengue fever through plant based mosquito repellent *Clausena dentata* (Willd.) M. Roem (Family: Rutaceae) essential oil against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) mosquito. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010;14(3):231–234. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20391964/>
18. Kumar S, Wahab N, Warikoo R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):85–88. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60001-4.

19. Mathew N, others. Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. *Parasitol Res.* 2017;116(2):821–825. doi: 10.1007/s00436-016-5351-4.
20. Tisgratog R, Sanguanpong U, Grieco JP, Ngoen-Kluan R, Chareonviriyaphap T. Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. *Acta Trop.* 2016;157:136–144. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.024.
21. Warikoo R, Wahab N, Kumar S. Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Parasitol Res.* 2011;109(4):1125–1131. doi: 10.1007/s00436-011-2355-y.
22. Misni N, Nor ZM, Ahmad R. New candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2016;32(2):117–123. doi: 10.2987/moco-32-02-117-123.1.
23. Misni N, Nor ZM, Ahmad R. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. *J Vector Borne Dis.* 2017;54(1):44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28352045/>
24. Loza R, Neri L, López Y, Mamani M, Arias J, Almanza G, et al. Evaluación de la toxicidad de los extractos etanólicos de *Baccharis latifolia* y *Baccharis papillosa* en animales de experimentación. *BIOFARBO.* 2011; 19(1): 22-27. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100004&script=sci_arttext
25. Rojas J, Palacios O, Ortiz J, López L. Evaluación de la toxicidad del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) y de la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* del citral, in vivo. *An Fac med.* 2015;76(2):129-34. doi: /10.15381/anales.v76i2.11137.
26. Neira L, Mantilla J, Stashenko E, Escobar P. Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-*Leishmania* de aceites esenciales obtenidos de cuatro quimiotipos del género *Lippia*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2018;17(1): 68 – 83. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-915131>

27. Bermúdez D, Monteagudo E, Boffill M, Díaz L, Roca A, Betancourt E, et al. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. Redvet. 2007;8(3):1-7. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613302006>

ANEXOS

Anexo 1: Ficha de recolección de datos

Aceite esencial: *Lippia alba*

Grupo N.º _____ Medición N.º: _____

Toxicidad Clínica

Dosis:	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
Variación ponderal	Pre:	Pre:	Pre:	Pre:	Pre:	Pre:
	Post:	Post:	Post:	Post:	Post:	Post:
Piloerección						
Convulsiones						
Mortalidad						

Toxicidad Patológica

Dosis:	Peso del órgano	Hallazgo
Hepatotoxicidad		
Nefrotoxicidad		

Dosis:	Resultado
Alanino aminotransferasa (ALT)	

Anexo 2: Imágenes del experimento en el laboratorio

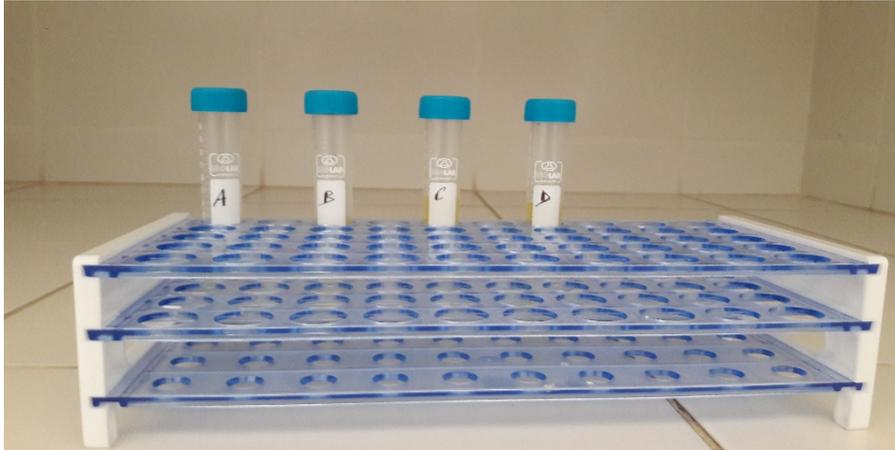


Imagen 1. Diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* (1000, 500 y 125 mg/ml) y control (aceite de oliva).



Imagen 2. Colocación de aceite esencial sobre torunda de algodón antes de su aplicación sobre *Rattus rattus*.



Imagen 3. Aplicación de aceite esencial en cola de *Rattus rattus*.

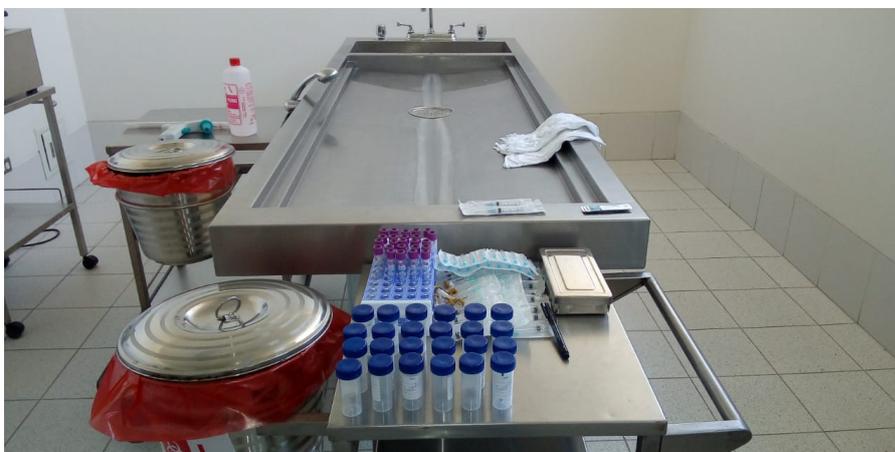


Imagen 4. Ambiente de laboratorio destinado a sacrificio de *Rattus rattus* 14 días post exposición a aceite esencial de *Lippia alba*.