

Efecto repelente y biocida de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Xanthosoma roseum*, *Bursera simaruba*, *Annona reticulata* y *Dysphania ambrosioides* sobre *Anopheles* spp

RESUMEN: Las enfermedades transmitidas por vectores como el mosquito, han provocado un problema de salud pública, además del desarrollo de resistencia causada por el uso constante y sostenido de insecticidas organosintéticos. Para encontrar una alternativa al problema anterior, este trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto repelente y tóxico de extractos metanólicos de neem (*Azadirachta indica*), malanga (*Xanthosoma roseum*), palo mulato (*Bursera simaruba*), anona (*Annona reticulata*) y epazote (*Dysphania ambrosioides*) en larvas, pupas y adultos de mosquito (*Anopheles* spp.). El material vegetal fue colectado de plantas sanas, triturado y macerado en metanol a temperatura ambiente por 24 hrs. Las larvas de mosquito se colectaron de aguas estancadas y se cultivaron bajo condiciones controladas. Se realizaron bioensayos de repelencia y de actividad biocida. Las pruebas de repelencia mostraron un efecto superior al 80% para los extractos de epazote, neem y anona. La mortalidad de larvas y pupas fue del 100 % para el extracto de anona.

Palabras clave: bioinsecticida, larvas, pupas, mosquito, metabolitos secundarios de plantas.



Colaboración

Nathaly del Carmen Sánchez Villegas; Elizabetha Hernández Domínguez; Alejandro G. Nila-Méndez; Francisco J. Gabino Roman, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan

ABSTRACT: Vector-borne diseases such as mosquito have caused a public health problem, in addition to the development of resistance caused by the constant and sustained use of insecticides organosynthetic. To find an alternative to the above problem, this study aimed to evaluate the repellent activity, and toxic effect of methanol extracts of neem (*Azadirachta indica*), malanga (*Xanthosoma roseum*), naked Indian tree (*Bursera simaruba*), custard apple (*Annona reticulata*) and epazote (*Dysphania ambrosioides*) against mosquitoes (*Anopheles* spp.) at different developmental stages (larvae, pupae and adults). The plant material was collected from healthy plants, crushed and macerated with methanol at room temperature for 24 hrs. Mosquito larvae were collected from stagnant water, and cultured under controlled conditions. Bioassay for mosquito repellency and biocidal activity were performed. Repellency tests showed a superior effect of 80% for epazote, neem and custard apple extracts. The larvae and pupae mortality was 100% when the custard apple extract was used.

Keywords: insecticide, larvae, pupae, mosquito, plant secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

La salud pública es un tema de gran importancia en nuestras sociedades. Un brote infeccioso inadvertido y no controlado puede provocar situaciones fuera de control que culminan en enfermedades a nivel de endemia, epidemia o pandemia. Entre los temas emergentes sobre salud pública destaca las enfermedades causadas al ser humano por los insectos vectores denominados con el nombre común de mosquitos [1]. El nombre mosquito refiere aproximadamente a 3000 especies identificadas mundialmente hasta el momento [2]. Las hembras de pocas de estas especies requieren adicionalmente en su alimentación de sangre obtenida de diversos animales vertebrados, incluyendo al ser humano. Debido

a esta situación, algunas especies de mosquitos que se alimentan de la sangre del ser humano se convierten en vectores de virus causantes de enfermedades. Por solo mencionar algunas, a *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Psorophora ferox*, *Aedes scapularis*, etc. Entre los agentes virales transmitidos por la picadura de mosquito se encuentran el DENV, el YFV, el WNV y el CHIKV causantes, respectivamente, de dengue [3, 4, 5], fiebre amarilla [6], fiebre del Nilo occidental [7] y chinkungunya [8, 9]. La demanda de niveles de control para aminorar, prevenir e incluso erradicar estas enfermedades es de preocupación mundial. Por ejemplo, se ha estimado que ocurren alrededor de 390 millones de casos de dengue a nivel mundial por año y, de ellos, 96 millones se vuelven casos clínicos [10].

Diversos estudios se han enfocado a la búsqueda de nuevos productos naturales, con actividad insecticida y larvicida, que puedan controlar la población de mosquitos, sin presentar riesgos al ser humano y otros animales domésticos. Por ejemplo, el insecticida Olyset Duo® contiene una novedosa mezcla de compuestos sintéticos (permetrina y piriproxifeno) en conjunción con IGR, un regulador de crecimiento en insectos [11].

En ese sentido las plantas revisten un gran interés, debido a que durante su evolución han desarrollado un mecanismo de respuesta ante el estrés biótico y abiótico, produciendo compuestos conocidos como metabolitos secundarios y que han sido utilizados para el control de insectos; tal es el caso de las piretrinas, producidas naturalmente por las flores del género *Pyrethrum*: *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Chrysanthemum coccineum*.

El presente trabajo muestra el efecto tóxico de los aceites esenciales de cinco plantas colectadas en la región sur de Veracruz, México, sobre larvas, pupas y adultos de *Anopheles* spp. El propósito consistió en determinar y comparar el potencial de los extractos etanólicos de aceites vegetales como fuente de compuestos que puedan ser útiles para combatir el crecimiento poblacional de mosquitos vectores, causantes de enfermedades infecciosas como las antes descritas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

El material biológico se recolectó en un radio de 20 km de la ciudad de Acayucan, Veracruz (17° 56' 54" N, 94° 54' 48" W).

La recolecta vegetal consistió en semillas de neem (*Azadirachta indica*) y hojas jóvenes de las siguientes especies: malanga (*Xanthosoma roseum*), palo mulato (*Bursera simaruba*), anona (*Annona reticulata*) y epazote (*Dysphania ambrosioides*). Inmediatamente a su llegada al laboratorio, el material vegetal fue deshidratado en un cuarto ventilado y protegido de la luz solar. La colecta de larvas de mosquito (*Anopheles* spp.) se realizó en aguas estancadas en diferentes zonas del municipio de Acayucan, Veracruz.

Preparación de los extractos

La extracción de aceites esenciales se realizó mediante un protocolo modificado propuesto por Castro 2010 [12]. Brevemente, el material deshidratado se trituró en un molino de aspas y el pulverizado obtenido se colocó en un matraz de 500 ml con metanol grado reactivo (Baker®, México) en una proporción 1:10 (20 gramos de pulverizado por 200 ml de solvente). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en un agitador orbital Mod. 311 DS (Labnet México), durante 24 h a 50 rpm. El extracto obtenido se filtró por gravedad utilizando papel Whatman® con un tamaño de poro de 0.45 µm. Posteriormente el filtrado, se destiló a presión reducida en un Rotavapor® R-100 (Buchi, México) a 40°C. El material obtenido se conservó en recipientes de vidrio de color ámbar y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

Cultivo de mosquitos.

El cultivo de mosquitos en fase adulta se realizó de acuerdo a lo reportado por Ávila 1993 [13] con modificaciones. Brevemente, se preparó un medio de cultivo rico para larvas y pupas (MCLP), el cual consistió en 1L agua de pozo artesiano suplementado con 3 g de la dieta formulada con 40% (p/p) de alimento para peces (Tetra GoldfishCrisps®, México), 30% (p/p) de complemento alimenticio (Nutralac®, México), 10% (p/p) de cereal de maíz en hojuelas (Corn Flakes de Kelloggs®, México), 10% (p/p) de extracto de levadura (Bioxon®, México) y 10% (p/p) de caseinato de calcio (ProWinner®, México). Las larvas colectadas de mosquito fueron transferidas a charolas de plástico con dimensiones de 25 x 15 x 10 cm, las cuales contenían 3.25 Lts., del medio MCLP descrito anteriormente. Este cultivo se mantuvo en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 días con el propósito de obtener pupas. Las pupas obtenidas fueron transferidas a un frasco de 10 cm de diámetro por 18 cm de altura, conteniendo 0.25 Lts., de MLCP. Los frascos con larvas fueron colocados dentro de una jaula entomológica de 35 x 35 x 35 cm. Al cabo de 5 días, se obtuvo una población homogénea de mosquitos en su fase adulta con los cuales se realizaron los ensayos de repelencia.

Prueba de repelencia y actividad biocida

Para realizar las pruebas de repelencia se modificó el protocolo propuesto por Áviles 2013, [14]. Brevemente, los brazos y manos de voluntarios fueron lavadas con jabón neutro y enjuagadas abundantemente con agua. Posteriormente, éstos se cubrieron con cada uno de los 5 extractos y un tratamiento control (Autan®, SC Johnson, México) sin diluir y se introdujeron dentro de la jaula entomológica por 5 minutos. Durante este tiempo, se contabilizaron los mosquitos que se suspendieron sobre la piel, empleándose para ello tres observadores. El porcentaje de repelencia se estimó de acuerdo a lo reportado por Salazar y Soto 2012 [15] empleando la siguiente fórmula: $%R = (MB/MT) \times 100$, donde %R, MB y MT representan % de repelencia, mosquitos parados en el blanco y mosquitos en el tratamiento, respectivamente.

Para evaluar la actividad biocida en larvas y pupas, se prepararon diluciones con agua destilada de los extractos que mostraron un mayor efecto como repelente (neem, anona y epazote), las cuales correspondieron a concentraciones de 0.03, 0.015 y 0.003 mg. de tejido vegetal/ml. A la par, se realizó un tratamiento control sólo con metanol. Después de 24 h de la aplicación de los tratamientos, los organismos se consideraron muertos al no observar ningún tipo de movimiento cuando se les tocó el mesotórax con aguja de disección. Cuando el porcentaje de mortalidad del tratamiento control fue de 4 a 12 %, éste se corrigió de acuerdo a la ecuación de Abbott, 1925 [16]: $MC = \left[\frac{X - Y}{100 - Y} \right] \times 100$, donde MC, X y Y representan la mortalidad corregida (%), la mortalidad en el tratamiento (%) y la mortalidad en el testigo (%).

Todos los ensayos en este trabajo fueron realizados por triplicado. La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por un análisis de varianza (ANOVA) con una comparación de medias de Tukey y con un nivel de significancia α del 0.05%, empleando Minitab® 17 como software estadístico.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Cultivo de mosquitos

Para el desarrollo de los ensayos de repelencia y actividad biocida fue necesario obtener una población de mosquitos representativos de la región de Acayucan. Mediante el empleo del medio de cultivo MCLP y condiciones descritas en la sección de materiales y métodos se logró caracterizar los cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto, presentados en la figura 1.

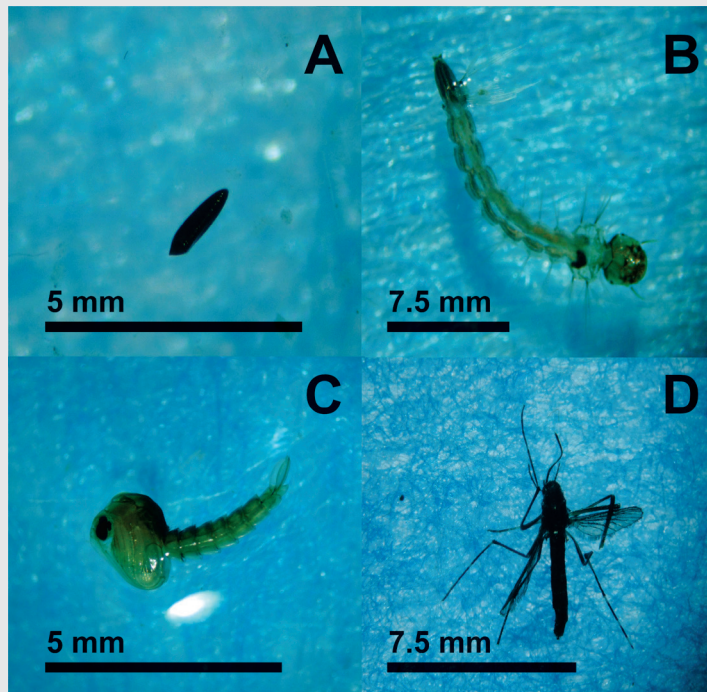


Figura 1. Ciclo de vida del mosquito cultivados in vitro en MCLP. A). Huevo, B). Larvas, C). Pupa y C). Adulto.

Efecto repelente de los extractos

El efecto repelente de los extractos metanólicos de las cinco especies de plantas evaluadas comparado contra un repelente comercial (Autan®) se presenta en la figura 2, en ella se observó que todos los tratamientos mostraron un efecto repelente mayor al 45%, destacándose entre ellos los tratamientos correspondientes a anona, neem y epazote los cuales no fueron estadísticamente significantes con respecto al control (100% de repelencia), lo que significó que fueron tan efectivos como el repelente comercial.

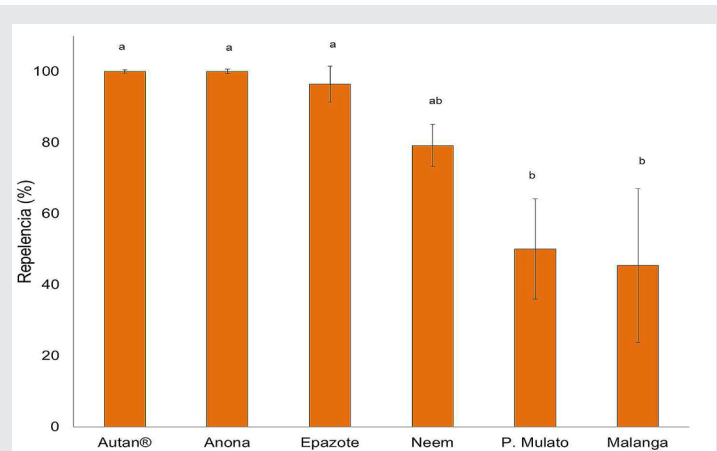


Figura 2. Efecto de repelencia de diferentes extractos metanólicos sobre tejido humano expuesto a mosquitos adultos. Letras distintas denotan una diferencia estadística significativa a un $\alpha=0.05$

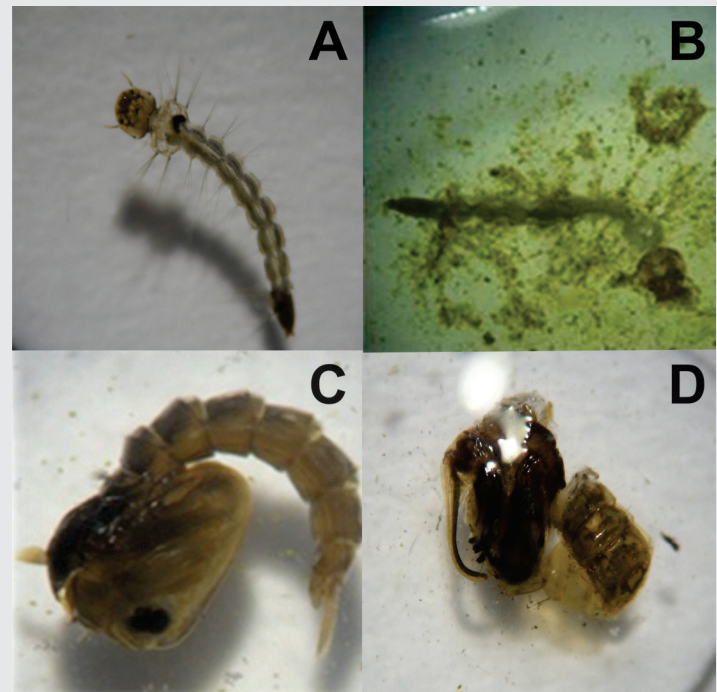


Figura 3. Observación del efecto biocida de los extractos metanólicos: A). Larvas antes del tratamiento. B). Después del tratamiento. C). Pupa antes del tratamiento y D). Después del tratamiento.

Un efecto menor de repelencia fue observado con los extractos de malanga y palo mulato cuya repelencia fue menor al 50%, siendo estos significativamente diferentes con respecto al control y a los extractos de anona, neem y epazote.

Actividad biocida

Para evaluar la letalidad de los extractos sobre larvas y pupas de *Anopheles* spp., solo se consideraron aquellos extractos que presentaron una repelencia mayor al 50% (anona, neem y epazote). Cuando se expusieron las pupas y larvas a estos extractos se observó mortalidad como la mostrada en la figura 3 B y D.

Como se puede observar de manera general en la figura 4, los tratamientos mostraron entre ellos una diferencia estadísticamente significativa en la actividad biocida en pupas. En el caso de anona, la letalidad de los extractos en pupas de *Anopheles* spp a concentraciones de 0.03, 0.015 y 0.003 mg., de anona/ml., no presentaron una diferencia significativa, lo que mostró 100% de letalidad en todos los tratamientos evaluados. Con respecto a neem, se obtuvieron valores promedio de letalidad de 86, 57 y 16% a concentraciones de 0.03, 0.015 y 0.003 mg. de neem/ml., respectivamente. Por otro lado, el extracto de epazote mostró el menor efecto letal sobre pupas, obteniendo valores promedio de 83, 47 y 2% a concentraciones de 0.03, 0.015 y 0.003 mg. de epazote/ml., respectivamente.

Los resultados presentados en la figura 4 demuestran que para obtener una mortalidad de pupas superior al 80% es posible utilizar extractos metanólicos de anona, neem y epazote a concentraciones superiores a 0.03 mg/ml. De acuerdo a lo presentado en la figura 4, el extracto de anona puede utilizarse hasta concentraciones de 0.003 mg/ml. y seguir teniendo un efecto letal del 100%.

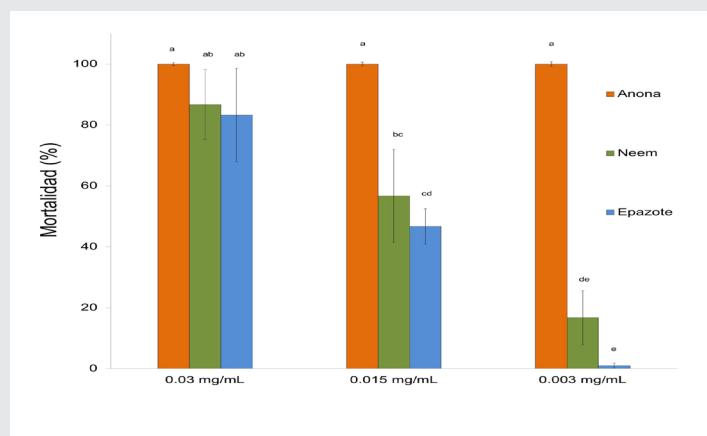


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de pupas de *Anopheles* spp., expuestas a diferentes concentraciones de extractos (anona, neem, epazote). Letras distintas denotan una diferencia estadística significativa a un $\alpha=0.05$

El efecto letal sobre larvas se muestra en la figura 5, los resultados indican de manera general un comportamiento similar con respecto a la letalidad en pupas. La letalidad con extractos de anona no mostró una diferencia significativa en función de las tres concentraciones evaluadas y ésta se mantuvo al 100%. Este mismo comportamiento se presentó en los extractos de neem; sin embargo, la letalidad promedio fue del 67 %. Con respecto a los extractos de epazote, la letalidad cambió en función de la concentración. Cabe mencionar que este extracto fue el que presentó la actividad biocida más baja (30%).

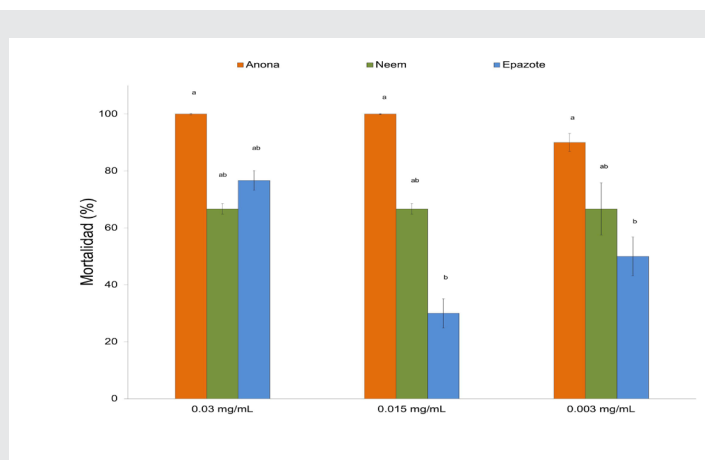


Figura 5. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Anopheles* spp., expuestas a diferentes concentraciones de extractos (anona, neem, epazote). Letras distintas denotan una diferencia estadística significativa a un $\alpha=0.05$

En este trabajo se demostró que los cinco extractos estudiados exhibieron actividad de repelencia a diferentes concentraciones. Los extractos de anona, neem y epazote tuvieron la misma efectividad de repelencia que el repelente comercial (100%). Además de que exhibieron un efecto biocida sobre larvas y pupas, resultados similares sobre la actividad biocida sobre mosquitos han sido reportados por otros autores [12, 17, 18, 19]. Por otra parte, se ha propuesto que las acetogeninas presentes en la anona, podrían ser los compuestos responsables de esta actividad biocida [19].

Estudios sobre la actividad insecticida de anona, neem y epazote ya han sido reportados por otros autores [20, 21, 22, 23, 24]. Sin embargo, el uso de diferentes métodos de extracción, tipo tejido utilizados como materia prima (semilla, hojas), etc., dan como resultado una diferencia en el porcentaje de letalidad entre los extractos obtenidos, lo que hace difícil la comparación de un extracto a otro; aún siendo obtenidos de la misma especie. Por ejemplo, para el género anona, la extracción de los componentes activos se ha realizado por diferentes métodos así como utilizando distintas mezclas de solventes [12, 24].

Desde el punto de vista ecológico, los biocidas de origen natural pueden constituir una alternativa a los sin-

téticos. Es por ello que es necesario contar con una gama amplia de compuestos con propiedades biocidas que coadyuven a la sostenibilidad de las actuales estrategias de control integrado de plagas. En consecuencia, es necesario realizar mayores estudios in vitro utilizando diferentes partes del vegetal, además de realizar un screening o tamizaje fitoquímico para las diferentes especies de plantas e insectos.

Dada la dificultad de comparar el potencial insecticida de estos extractos, es necesario estandarizar y, finalmente optimizar los métodos de extracción para obtener la mayor letalidad posible a la menor concentración. Estudios posteriores requerirán identificar químicamente los componentes activos de los extractos y su posible escalamiento a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Petrić, D., Boase, C., Lane, J., Zgomba, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control* (Vol. 2, pp. 25-40). Heidelberg: Springer.

[2] Kwon, Y-S., Bae, M-J., Chung, N., Lee, Y-R., Hwang, S., Kim, S-A., Choi, Y. J. & Park, Y-S. (2015). *Modeling occurrence of urban mosquitos based on land use types and meteorological factors in Korea*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 13131-13147.

[3] García-Rejón, J., Loroño-Pino, M., Farfán-Ale, J., Flores-Flores, L., López-Urbe, M., Najera-Vazquez, M. & Eisen, L. (2011). *Mosquito infestation and dengue virus infection in Aedes aegypti females in schools in Merida, Mexico*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84(3), 489-496.

[4] Sanchez, L., Vanlerberghe, V., Alfonzo, L., Marquetti, M. D. C., Guzman, M. G., Bisset, J. & Van Der Stuyft, P. (2006). *Aedes aegypti larval indices and risk for dengue epidemics*. *Emerging Infect. Dis.*, 2(5), 800-806.

[5] Gustavo, K. (2006). *El dengue, un problema creciente de salud en las Américas*. *Rev. Panam. Salud Públ.*, 19(3), 143-145.

[6] Robertson, S.E., Hull, B.P., Tomori, O., Bele, O., LeDuc, J.W. & Esteves, K. (1996). *Yellow fever: a decade of reemergence*. *The J. Amer. Med. Assoc.*, 276(14), 1157-1162.

[7] Murray, K. O., Mertens, E., & Desprès, P. (2010). *West Nile virus and its emergence in the United States of America*. *Vet. Res.*, 41(6), 67.

[8] Pialoux, G., Gaüzère, B., Jauréguiberry, S. & Strobel, M. (2007). *Chikungunya, an epidemic arbovirolosis*. *Lancet. Infect. Dis.*, 7(5), 319-327.

[9] Mardekian, S. K. & Roberts A. L. (2015). *Diagnostic Options and challenges for dengue and chikungunya viruses*. *BioMed. Res. Int.*, 2015, 1-8.

[10] Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., y Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J.J. & Hay, S. I. (2013). *The global distribution and burden of dengue*. *Nature*, 496(7446), 504-507.

[11] Djèntonin, A., Alou, L. P. A., Koffi, A., Zogo, B., Duarte, E., N'Guessan, R., Moiroux, N. & Pannetier, C. (2015). *Insecticidal and sterilizing effect of Olyset Duo®, a permethrin and pyriproxyfen mixture net against pyrethroid-susceptible and -resistant strains of Anopheles gambiae: a release-recapture assay in experimental huts*. *Parasite*, 22, 1-8.

[12] Castro, L., Alzate, M. & Guerrero, G. (2010). *Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de Annona cherimolia de la familia Annonaceae*. *Scientia Et Technica*, 1(44), 326-330.

[13] Avila, J., Segnini, S. & Rossel, O. (1993). *Metodología para la cría de Anopheles nuneztovari Gabaldón 1940, (Diptera: Culicidae)*. *Bol Entomol Venez*, 9(1), 19-31.

[14] Avilés M., Flores R., Flores G., Flores P. & Charcas A. (2013). *Estudio del efecto repelente y biocida de un extracto oleoso obtenido a partir de especies silvestres (Ricinus communis/Datura stramonium) contra Aedes aegypti insecto hematófago transmisor del dengue*, Sucre 2012. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*. Colombia, 7(8), 465-470.

[15] Salazar, M. & Soto, R. (2012). *Estudio de la actividad biopesticida in vitro de los extractos polares de las semillas de Annona squamosa frente a Culex quinquefasciatus*. Tesis, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

[16] Abbott, W. S. (1925). *A method of computing the effectiveness of an insecticide*. *J. Econ. Entomol*, 18(2), 265-267.

[17] Henao, G., Pajón, C. & Torres, J. (2007). *Actividad insecticida de extractos vegetales sobre Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia*. *CES Medicina*, 21(1), 47-54.

[18] Morales, C., González, R. & Aragón, R. (2004). *Evaluación de la actividad larvicida de extractos polares y no polares de acetogeninas de Annona muricata sobre larvas de Aedes aegypti y Anopheles albimanus (Diptera: Cu-*

licidae). *Revista colombiana de Entomología*, 30(2), 187-192.

[19] Colom, O. A., Barrachina, I., Mingol, I. A., Mas, M. C. G., Sanz, P. M., Neske, A., & Bardon, A. (2008). Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *J. Pest Sci.*, 81(2), 85-89.

[20] Leyva, M., Marquetti, M. C., Tacoronte, J. E., Scull, R., Tiomno, O., Mesa, A., & Montada, D. (2009). Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *Rev Biomed*, 20, 5-13.

[21] Zebitz, C. P. (1984). Effect of some crude and azadirachtin-enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 35(1), 11-16.

[22] George, S., & Vincent, S. (2005). Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes. *Journal of vector borne diseases*, 42(4), 159.

[23] Jaswanth, A., Ramanathan, P., & Ruckmani, K. (2002). Evaluation of mosquitocidal activity of *Annona squamosa* leaves against filarial vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Indian journal of experimental biology*, 40(3), 363-365.

[24] Magadula, J. J., Innocent, E., & Otieno, J. N. (2009). Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *J Med Plants Res*, 3(9), 674-680.



Tierra,
Medio Ambiente
y Energía

Ingeniantes

Instituto Tecnológico Superior de Misantla