

Acción larvicida de extractos alcohólicos de semilla de *Annona muricata* (guanábana) sobre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Larvicidal action of alcoholic extracts of the seed of Annona muricata (soursop) on Aedes aegypti y Aedes albopictus

Irma F. Agrela^{1*} & Flor Herrera¹

RESUMEN

Cada vez es más frecuente el reporte de resistencia de diferentes especies de vectores a los insecticidas usados en los programas de control; por ello existe un interés creciente en el desarrollo de productos eficaces, económicos y más amigables con el medio ambiente que permitan el control de los vectores de enfermedades como el dengue. Los extractos crudos obtenidos a partir de diferentes plantas han demostrado poseer actividades larvicidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad larvicida de dos extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) obtenidos a partir de las semillas de *Annona muricata* (guanábana) sobre *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) y *Ae. albopictus* exponiéndolas durante 24 h a diferentes diluciones de cada extracto. Las concentraciones letales (CL_{50}) fueron las siguientes: a) para *Ae. aegypti* 41,8 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =34,5-49,2 mg L⁻¹) con el extracto etanólico y 32,8 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =27,4-38,4 mg L⁻¹) con el extracto metanólico; y b) para *Ae. albopictus* 299,6 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =224,9-377,3 mg L⁻¹) con el extracto etanólico y 326,1 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =209,5-442,4 mg L⁻¹) con extracto metanólico. El análisis de los resultados demostró que el efecto tóxico de ambos extractos sobre las larvas de *Aedes* fue similar y depende de la especie y de la concentración utilizada. Los resultados apuntan a que los extractos alcohólicos obtenidos a partir de *A. muricata* son una alternativa para el control de las especies de *Aedes* presentes en Venezuela.

Palabras clave: dengue, *Aedes*, *Annona muricata*, larvicidas, concentración letal.

Aedes aegypti y *Aedes albopictus* son vectores reconocidos de diferentes arbovirosis; el control de las enfermedades transmitidas por estos artrópodos se fundamenta en el uso de larvicidas químicos e insecticidas organofosforados o piretroides para el control de los adultos (Georghiou *et al.*, 1987. *J. Med. Entomol.* **24**: 290-294); no obstante; el uso frecuente de estos productos ha generado resistencia en varias poblaciones de *Aedes* (Gómez *et al.*, 2011.

SUMMARY

Reports of resistance of different species of vectors to insecticides used in control programs are every time more frequent. Therefore, there is a growing interest to control harmful vectors (that transmit diseases such as dengue) by developing products that are effective, economical and environment friendly. Crude extracts obtained from different plants have demonstrated larvicidal activities. The objective of this research was to evaluate the larvicidal activity of two alcoholic extracts (ethanol and methanol) obtained from the seeds of *Annona muricata* (soursop) on *Ae. aegypti* (strain Rockefeller) and *Ae. albopictus*, exposed for 24 h to different dilutions of each extract. Lethal concentrations (LC_{50}) were as follows: a) For *Ae. aegypti* 41.8 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =34.5 to 49.2 mg L⁻¹) with ethanolic extract and 32.8 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =27.4 to 38.4 mg L⁻¹) with methanolic extract; and b) For *Ae. albopictus* 299.6 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =224.9 to 377.3 mg L⁻¹) with ethanolic extract and =326.1 mg L⁻¹ ($LC_{0,95}$ =209.5 to 442.4 mg L⁻¹) with methanolic extract. The analysis of the results showed that the toxic effect of both alcoholic extracts on *Aedes* was similar and depends on the species and the concentration used. The results suggest that the alcoholic extracts obtained from *A. muricata* are an alternative for control of *Aedes* species present in Venezuela.

Key words: dengue, *Aedes*, *Annona muricata*, larvicides, lethal concentration.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **106**: 993-996; Arslan *et al.*, 2016. *J Vector Borne Dis.* **53**: 136-143. Disponible en: <http://www.nimr.org.in/assets/532136.pdf>). Por esta razón existe gran interés en encontrar compuestos efectivos y más amigables con el medio ambiente a partir de plantas ya que la actividad toxica no se debe a un solo compuesto, sino mas bien a una mezcla de ellos que pueden actuar sinérgicamente y por ello el desarrollo de resistencia es menos probable.

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, sede Aragua. Universidad de Carabobo. Aragua, Venezuela

*Autor de correspondencia: agrelairma@hotmail.com; iagrela@uc.edu.ve

Los extractos crudos obtenidos a partir de semillas de *Annona muricata* (guanábana) han demostrado ser tóxicos para larvas de díptera (Bobadilla *et al.*, 2002. *Rev. Peru. Biol.* **9**: 64-73; Kamaraj *et al.*, 2011. *Indian J. Med. Res.* **134**: 101-106) y otros insectos de importancia médica (Parr-Henao *et al.*, 2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47**: 125-137). Las plantas de la familia Annonaceae son una extraordinaria fuente de acetogeninas las cuales han demostrado poseer propiedades contra bacterias (Vieira *et al.*, 2010. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **52**: 129-132), helmintos (Souza *et al.*, 2008. *An. Acad. Bras. Cienc.* **80**: 271-277) y protozoarios (Mohd Abd Razak *et al.*, 2014. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**(1): 492. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/492>). De igual manera, se ha demostrado que las acetogeninas ejercen efectos tóxicos sobre *Ae. aegypti* sin afectar a insectos no objetivo y ser de baja toxicidad sobre células humanas (Costa *et al.*, 2016. *Pest Manag Sci.* Disponible en: <http://http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.4350/epdf>). El propósito de la presente investigación fue evaluar la acción larvicida de dos extractos alcohólicos obtenidos a partir de las semillas de *A. muricata* guanábana sobre dos especies del género *Aedes*.

Para ello se prepararon dos extractos alcohólicos con las semillas de guanábana, éstas fueron lavadas con agua corriente y se dejaron secar a la sombra durante 10 d; una vez secas, 30 g de las semillas enteras fueron colocadas en 100 mL de etanol o bien 100 mL de metanol durante 7 d manteniendo el material a temperatura ambiente, protegido de la luz y agitando dos veces al día. De esta manera se obtuvo dos extractos uno etanólico (EE) y otro metanólico (EM). Una vez concluido el período de maceración se procedió a filtrar usando papel de filtro (Whatman N°1), luego el alcohol fue evaporado completamente en baño de María a 50°C y el residuo resultante fue pesado y disuelto totalmente en 20 mL de agua destilada a la misma temperatura de evaporación. Después de disolver el residuo se procedió a realizar diluciones seriadas las cuales fueron utilizadas en los bioensayos para evaluar su toxicidad sobre larvas de las especies *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) y *Ae. albopictus*, obtenidas por el “Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud”; (Maracay, estado Aragua).

Los bioensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones de WHO (1981. WHO/VBC/81.807 Geneva: World Health Organization p.7). Para el EE se probaron nueve diluciones (7,8-2.000 mg L⁻¹) mientras que para el EM se probaron 10 diluciones (3,9-2.000 mg L⁻¹). En un simple ensayo se realizaron cinco réplicas por cada dilución, utilizando un total de 100 larvas del mismo lote para cada dilución y se completó en el mismo día. De cada ensayo se hicieron tres repeticiones con lotes diferentes de larvas pertenecientes a ambas especies de *Aedes*. Como control o testigo se usaron cinco réplicas en cada repetición a los cuales no se agregó extracto.

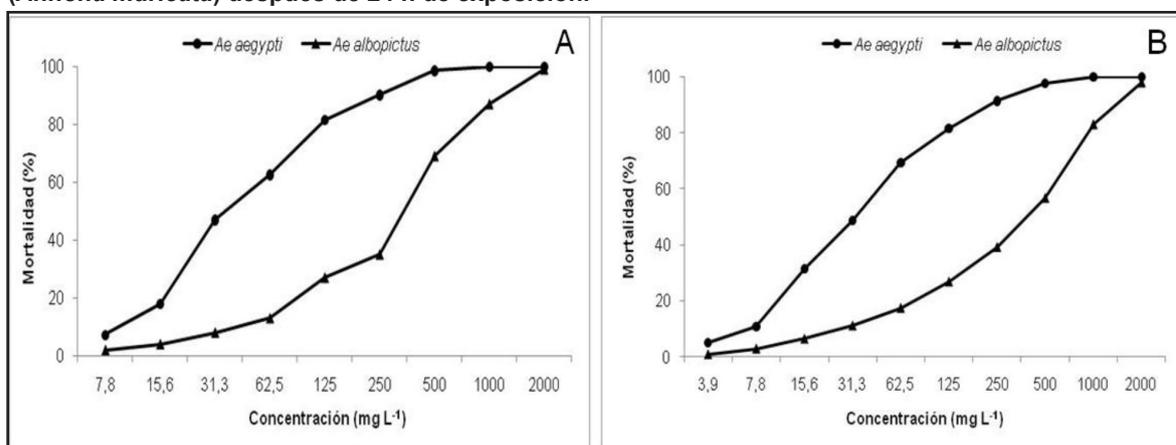
Las larvas fueron concentradas en una bandeja plástica con agua de chorro y de allí se seleccionaron al azar grupos de 20 larvas que fueron colocadas en vasos plásticos de 150 mL, a los cuales se añadieron previamente 90 mL de agua corriente y 10 mL de cada una de las diluciones del extracto a ensayar (Volumen final=100 mL). Los vasos controles de la prueba fueron preparados con 100 mL de agua de chorro y en ellos se colocaron 20 larvas por vaso. Todos los grupos se mantuvieron a una temperatura de 27 ± 2°C.

Las larvas fueron expuestas a los extractos en estudio durante 24 h y éstas se consideraron muertas cuando no reaccionaban al ser tocadas con un puntero romo en la región cervical. Los ensayos se consideraron inválidos si más de 10% de las larvas empupaban y/o si la mortalidad de los controles superaba 10%.

Las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) y sus respectivos límites de confianza (LC_{0,95}) fueron determinados usando SPSS Statistics 9.0 versión para Windows. Finalmente, las diferencias entre las dos especies de *Aedes* al efecto de ambos extractos (etanólico y metanólico) de *A. muricata* fue evaluada mediante un análisis de varianza de dos vías y las diferencias significativas entre los tratamientos y/o entre las especies de *Aedes* fueron evaluadas usando la prueba de Tukey.

Con ambos extractos (EE y EM), el 100% de mortalidad se logró al exponer las larvas de *Ae. aegypti* a 1000 mg L⁻¹ del extracto durante 24 h; mientras que para lograr el 100% de mortalidad de las larvas de *Ae. albopictus* fue necesario exponerlas a 2000 mg L⁻¹ de los EE y EM durante el mismo

Fig. 1. Curvas dosis respuesta para larvas de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico (A) y metanólico (B) obtenido a partir de la semilla de guanábana (*Annona muricata*) después de 24 h de exposición.



periodo de tiempo (Fig. 1). En todos los casos la mortalidad en el grupo control (larvas no expuestas a los extractos) fue igual a cero.

Las concentraciones letales 50 (CL_{50}) y 90% (CL_{90}) sus respectivos límites de confianza ($LC_{0,95}$) muestran que ambos extractos causan la mortalidad de las larvas pertenecientes a ambas especies de *Aedes*; no obstante, los valores obtenidos son más bajos para *Ae. aegypti* que para *Ae. albopictus*; así mismo, las CL_{50} y CL_{90} obtenidas para cada uno de los extractos resultaron muy similares para ambas especies (Tabla I). El análisis de varianza demostró diferencias altamente significativas en la mortalidad ocasionada

por ambos extractos en relación con la especie de *Aedes* ($F=968,91$, $p=0,0001$) y concentración de extracto ($F=774,07$; $p=0,0001$) así se observó que a mayor dosis mayor efecto tóxico.

Los resultados antes presentados confirman los datos ya publicados por otros investigadores quienes han señalado el efecto letal de extractos obtenidos a partir de semillas de *A. muricata* sobre larvas de *Aedes* spp (Morales *et al.*, 2004. *Rev. Colomb. Entomol.* **30**: 187-192; Bobadilla *et al.*, 2005. *Rev. Peru. Biol.* **12**: 145-152; Amariles-Barrera *et al.*, 2013. *Rev. CES Med.* **27**: 193-203; Raveloson *et al.*, 2014. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**: 798-806).

Tabla I. Concentraciones letales 50 (CL_{50}) y 90 (CL_{90}), límites de confianza ($LC_{0,95}$), rectas de regresión y valor de r^2 obtenidas para los extractos ensayados.

		Extracto etanólico	Extracto metanólico
<i>Aedes aegypti</i>	CL_{50}	41,8 mg L ⁻¹	32,8 mg L ⁻¹
	$LC_{0,95}$	34,5-49,2 mg L ⁻¹	27,4-38,4 mg L ⁻¹
	CL_{90}	195,8 mg L ⁻¹	186,7 mg L ⁻¹
	$LC_{0,95}$	173,2-223,4 mg L ⁻¹	162,5-217,7 mg L ⁻¹
	r^2	0,98	0,99
<i>Aedes albopictus</i>	CL_{50}	299,6 mg L ⁻¹	326,1 mg L ⁻¹
	$LC_{0,95}$	224,9 -377,3 mg L ⁻¹	209,5-442,4 mg L ⁻¹
	CL_{90}	1219,9 mg L ⁻¹	1635,6 mg L ⁻¹
	$LC_{0,95}$	909,4-1891,5 mg L ⁻¹	1105,5-3307,6 mg L ⁻¹
	r^2	0,95	0,95

Por otra parte, se observó que la susceptibilidad de *Ae. aegypti* resultó significativamente mayor en comparación con la susceptibilidad de *Ae. albopictus*; probablemente vinculado al hecho de que la cepa de *Ae. aegypti* utilizada (cepa Rockefeller) es una cepa de laboratorio que no ha sido expuesta a los productos usados en los programas de control, los cuales pueden generar resistencia cruzada.

Los valores de CL_{50} y CL_{90} obtenidos en este estudio para *Ae. aegypti* son más bajos que los obtenidos por Morales *et al.* (2004. *Rev. Colomb. Entomol.* **30**: 187-192) y Bobadilla *et al.* (2005. *Rev. Peru. Biol.* **12**: 145-152); esta diferencia puede estar relacionada con el origen de la cepa de *Ae. aegypti* utilizada, los autores antes mencionados trabajaron con una población natural de esta especie de mosquito. Raveloson *et al.* (2014. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**: 798-806) demostraron que extractos obtenidos a partir de *A. squamosa* y *A. muricata* tienen efectos tóxicos sobre las larvas de *Ae. albopictus*; sin embargo la CL_{50} obtenidas por estos investigadores fue superior a la obtenida durante el desarrollo de esta investigación.

Es importante tener en cuenta que los ingredientes activos presentes en insecticidas de origen vegetal pueden variar tanto en composición como en concentración en las mismas especies de plantas según la variedad y la parte de la planta empleada, así como también la etapa de crecimiento de la planta y las condiciones climáticas y de suelo en las que se obtuvo el material vegetal usado para preparar los extractos; esto podría explicar las diferencias observadas en la CL_{50} obtenida aquí y aquella obtenida por otros investigadores.

Otra variable que puede influir en el efecto tóxico de insecticidas de origen vegetal es el solvente utilizado en la preparación del extracto; de acuerdo con la información disponible, la solubilidad de las acetogeninas pueden variar desde muy polar (agua y etanol) a no polar (hexano) (Murray & Seffrin, 2014. *In Advances in Plant Biopesticides*. Singh D. (ed) Springer India. Disponible en: <http://www.springer.com/us/book/9788132220053>); Morales *et al.*, (2004. *Rev. Colomb. Entomol.* **30**: 187-192) estudiaron el efecto de extractos polares y no polares obtenidos a partir de las semillas de guanábana sobre larvas de *Ae. aegypti* y obtuvieron CL_{50} más altas para el extracto no polar, lo que sugiere que los extractos polares son

más efectivos. En este estudio ambos extractos fueron obtenidos usando solventes polares y los valores de CL_{50} y CL_{90} obtenidas para ambos extractos fueron similares y los $LC_{0,95}$ coinciden hasta cierto punto, lo que sugiere que los componentes presentes en ambos extractos son similares o probablemente son los mismos; sin embargo, debido a que el etanol es más aceptado en agricultura por su baja toxicidad es probablemente que el extracto etanólico sea más útil en los programas de control que el extracto metanólico.

Los resultados antes presentados apuntan a que los extractos alcohólicos obtenidos a partir de *A. muricata* son una alternativa para el control de las especies de *Aedes* presentes en Venezuela; sin embargo, su uso en el control de las enfermedades transmitidas por estos artrópodos requerirá de la evaluación de su toxicidad, residualidad y relación costo-beneficio.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Jesús González y a la Economista Karen Flores del Laboratorio de Resistencia a Insecticidas de la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio del Poder Popular para la Salud, por facilitar el material biológico utilizado durante el desarrollo de estos ensayos. La ejecución de este trabajo de investigación fue posible gracias al financiamiento del Fondo Nacional para la Ciencia, Investigación y Tecnología (FONACIT) a través de Misión Ciencia, Sub-proyecto (N° 2008000911-1): Nuevas alternativas tecnológicas para la prevención y el control del dengue con la participación ciudadana.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

Recibido el 04/02/2015
Aceptado el 15/11/2016