

Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia

Insecticidal activity of vegetal extracts on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) dengue vector in Colombia.

GABRIEL JAIME PARRA HENAO¹, CARLOS MARIO GARCÍA PAJÓN², JOSÉ MIGUEL COTES TORRES³
Forma de citar: Parra GJ, García CM, Cotes JM. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. Rev CES Med 2007; 21(1): 47-54

RESUMEN

Objetivo. Determinar la toxicidad de extractos etanólicos de *Annona muricata*, *Melia azedarach*, y *Ricinus communis* sobre larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti*.

Métodos. Mediante un diseño completamente al azar se realizaron bioensayos para determinar la toxicidad de diferentes concentraciones de extractos vegetales sobre *Ae. aegypti*.

Resultados. Los valores de LC_{50} (concentración letal media) hallados son: *A. muricata*, 900 ppm (IC 95%: 380-1300); *M. azedarach*, 1800 ppm (IC 95%:150-2100); *R. communis*, 860 ppm (IC 95%:451-1500).

Conclusiones. Los resultados de toxicidad se consideran promisorios por estar por debajo de la concentración máxima (5 000 ppm) recomendada por la Agencia de Cooperación Técnica Alemana

¹ Magister en Entomología. Investigador Laboratorio de Entomología, Instituto Colombiano de Medicina Tropical. E-mail: gparra@ces.edu.co

² PhD. Profesor Asociado. Investigador Grupo de Productos Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

³ PhD. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Lugar donde se realizó el trabajo: Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Sabaneta, Antioquia, Colombia.

Recibido: 10 septiembre / 2006. Revisado: 10 octubre / 2006. Aceptado: 10 diciembre / 2006

(GTZ). Es necesario evaluar las fracciones de los extractos para detectar posible actividad a concentraciones menores.

PALABRAS CLAVE

Aedes

Dengue

Insecticidas

Control Vectorial

Colombia

ABSTRACT

Objective. To determine the toxicity of vegetal extracts on Dengue's vectors *Ae. aegypti* larvae.

Methods. Following a completely randomised design, bioassays was done to detect toxicity of ethanolic extracts on *Ae. Aegypti* larvae.

Results. LC₅₀ values for each extract are: *A. muricata*, 900 ppm (CI 95%: 380-1300); *M.azedarach*, 1800 ppm (CI 95%:150-2100); *R. communis*, 860 ppm (CI 95%: 451-1500).

Conclusions. The toxicity results can be considered of good toxic effect on larvae because they are below the maximum accepted concentration (5 000 ppm). More research is necessary to test the fractions of the extracts to detect toxicity activity in low concentrations.

KEY WORDS

Aedes

Dengue

Insecticides

Vector Control

Colombia

INTRODUCCION

La incidencia del dengue se ha incrementado dramáticamente en la última década. Esta enfermedad se ha vuelto endémica en más de 100 países en donde más de 2,5 billones de personas se encuentran en riesgo de adquirirla, principalmente en África, Las Américas, Mediterráneo Occidental, Sur-Oriente de Asia y Pacífico Occidental (1). La prevalencia del dengue está asociada a su principal vector, el mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) pueden presentarse 50 millones de infecciones por dengue cada año. En el año 2002 se presentó la cifra más alta de casos en Las Américas, registrándose 1 019 196, de los cuales 17 363 fueron de dengue hemorrágico, presentándose 225 muertes (2).

El comportamiento del dengue clásico en Colombia ha sido endémico con brotes epidémicos. Alrededor de 20 millones de personas están en riesgo de sufrir la enfermedad. En 1999 fueron notificados 20 336 casos de dengue clásico y en el 2002, 81 831 casos, lo que implica un riesgo 4 veces mayor en este año con respecto a 1999. (Tabla 1, Figura 1). Para la semana epidemiológica número 35 del año 2006 se han presentado en Colombia 22 228 casos de dengue clásico y 3 384 casos de dengue hemorrágico.

Desde la detección del primer caso de dengue hemorrágico en 1989, en Puerto Berrío, Antioquia, se ha observado la tendencia al ascenso de casos, pasando de 1,4 casos por 100 000 habitantes en 1994 a 15,4 casos por 100000 habitantes en el 2001 (3) (Tabla 1, Figura 2).

El fallecimiento por dengue es considerado un evento prevenible. En Colombia la letalidad por dengue hemorrágico en el año de 1998 fue de 1,2 %; en 1999 de 1,3 % y en el 2000 de 5,1 %. En el año 2002 de 1 113 municipios del país, 20 notificaron muertes por dengue.

Tabla 1. COMPORTAMIENTO DEL DENGUE CLÁSICO Y HEMORRÁGICO EN COLOMBIA. 1998 A 2004

Año	Dengue clásico		Dengue hemorrágico	
Año	No	Tasa x 100 000	No	Tasa x 100 000
1998	58 011	154	5 043	5,17
1999	20 336	51,6	1 093	2,64
2000	22 782	53,8	1 818	4,29
2001	55 286	128,36	6 624	15,4
2002	81 831	223,49	5 245	14,3
2003	58 335	130,9	5 026	11,3
2004	22 203	48,9	2 265	4,9

Figura 1. NÚMERO DE CASOS DE DENGUE CLÁSICO EN COLOMBIA 1980-2004

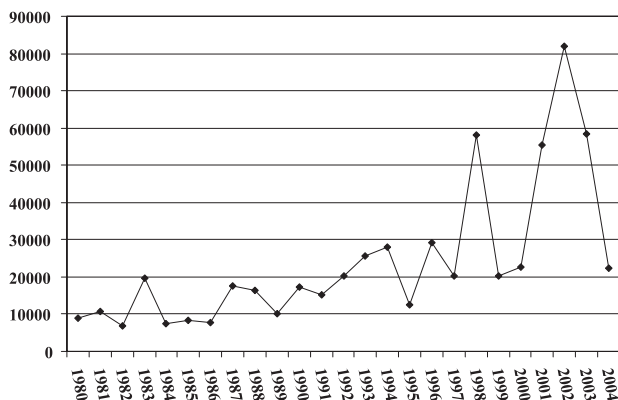
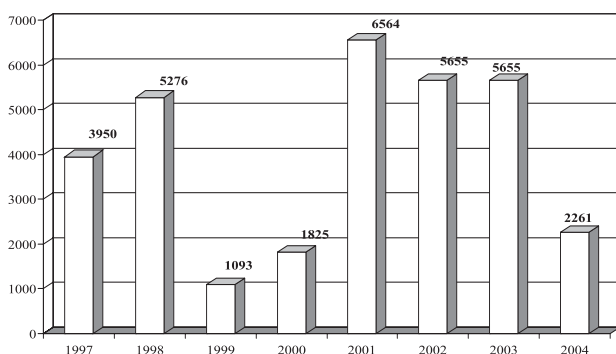


Figura 2. NÚMERO DE CASOS DE DENGUE HEMORRÁGICO EN COLOMBIA 1997-2004



En los países tropicales el mosquito *Ae. aegypti* es un vector importante de dengue, fiebre amarilla urbana y otras enfermedades virales. Una especie cercana, *Aedes albopictus*, también puede transmitir dengue (4).

Debido a la ausencia de un medicamento específico y de vacunas para su aplicación a gran escala, se ha considerado como una alternativa viable la interrupción de la transmisión de la enfermedad, controlando los vectores adultos mediante la aplicación de insecticidas piretroides de acción residual en paredes y sitios de reposo de los mosquitos adultos y de organofosforados, principalmente el Abate, aplicado mediante tratamiento focal y perifocal en los sitios de cría de las larvas.

En el marco de las iniciativas regionales, la aplicación casi excluyente de estos insecticidas como medio de control químico puede llevar al riesgo latente de desarrollo de fenómenos de resistencia (5), y contaminación ambiental (6). Para minimizar los riesgos, es necesario desarrollar otras estrategias de manejo y tecnologías que permitan obtener nuevas alternativas químicas o biológicas. En el año de 1992 la lista de especies de vectores resistentes a insecticidas incluía 56 especies de anofelinos, 39 especies de culicinos, 8 especies de pulgas, 9 especies de garrapatas, además de fenómenos de resistencia documentados para piojos del cuerpo, chinches de cama y triatominos (6). Actualmente, el Comité de Acción para la Resistencia a Insecticidas (IRAC) reporta la presencia de resistencia a insecticidas en 21 especies de *Aedes* y 63 especies de *Anopheles* (7). Una alternativa de control surge del concepto de manejo integrado de plagas, incluyendo controladores biológicos, manejo ambiental y la utilización de insecticidas de origen biológico que proporcionan modos de acción novedosos y reducen el riesgo de resistencia cruzada (8).

El uso de insecticidas botánicos es una alternativa de control accesible y de bajo costo para los campesinos y comunidades, debido a que varias especies vegetales que poseen actividad insecticida reconocida, como la que presentan algunas especies

de las familias Anacardiaceae, Euphorbiaceae y Meliaceae crecen con facilidad o son endémicas de estas áreas geográficas, además la obtención de los extractos activos no requiere de metodologías complejas (9). Los insecticidas de origen vegetal tienen la ventaja de ser más biodegradables que sus contrapartes sintéticas; son de disponibilidad inmediata, bajo costo, ya que los extractos se pueden preparar mediante tratamientos caseros y ser aplicados de forma inmediata sin requerir de la utilización de aspersores o implementos costosos (10). Los resultados de investigaciones recientes han mostrado que los insecticidas botánicos son blanco específicos, no afectando por lo tanto la fauna benéfica (11).

En Colombia son pocas las investigaciones orientadas a la evaluación del potencial insecticida de las especies vegetales sobre *Ae. aegypti* (12). Debido a que los productos de origen natural pueden ser considerados en el control de insectos (11,13) y con el objetivo de hacer una aproximación bioracional al control del mosquito vector del dengue, de acuerdo a la información etnobotánica, hemos evaluado el potencial insecticida de los extractos provenientes de tres especies vegetales mediante la realización de bioensayos para determinar su toxicidad. En esta investigación se presentan y analizan los resultados de las evaluaciones realizadas bajo condiciones de laboratorio con los extractos etanólicos obtenidos de las semillas de *Annona muricata* (Annonaceae) y de los frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) y *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) mediante evaluaciones de toxicidad sobre larvas de *Ae. aegypti* de cuarto estadio y sobre nauplios de *Artemia salina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Entomología del Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES (ICMT-CES) y los Laboratorios de Química de los Productos Naturales y los Alimentos

de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Todos los solventes empleados fueron grado analítico y se redestilaron antes de ser utilizados. La evaluación de toxicidad en *Ae. aegypti* se realizó con larvas de la cepa susceptible Rockefeller obtenida del Laboratorio de Entomología del ICMT-CES.

Las semillas de *A. muricata* se obtuvieron de frutos comerciales en la ciudad de Medellín y los frutos completos de *R. communis* y *M. azedarach* se recolectaron en los predios de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, procedentes de árboles sanos.

Preparación de los extractos vegetales totales

Los extractos vegetales se prepararon a partir de 500 gramos del material vegetal seco y triturado de cada especie, el cual se sometió a extracción exhaustiva mediante percolación con 3 litros de etanol al 95%, el extracto obtenido se filtro y se destiló a presión reducida en un rotaevaporador a temperatura controlada de 40°C, el material obtenido se recogió en botellas de vidrio de color ámbar y se almacenó refrigerado a 4°C.

Para la determinación de la concentración (partes por millón: ppm) de los extractos se tomó de la solución madre (extracto total) una muestra de 0,5000 gramos de cada extracto homogenizado, los cuales fueron adicionados a cápsulas de papel aluminio que previamente se habían pesado secas y vacías en una balanza analítica ($\pm 0,0001$ g). A cada cápsula se le adicionaron 0,5000 gramos del extracto homogenizado y se llevó a estufa a 90°C durante 10 minutos, una vez eliminado el solvente se volvió a pesar. Las mediciones descritas se realizaron por triplicado para cada especie y se calculó la concentración promedio. Las evaluaciones de actividad biológica se llevaron a cabo con el volumen restante de cada extracto que había sido refrigerado a 4°C.

Evaluaciones de actividad biológica de los extractos totales

Bioensayos con *Artemia salina*

Para este bioensayo se utilizó la metodología propuesta por McLaughlin *et al* (14).

Se preparó agua de mar artificial con agua destilada y sal de mar en una proporción de 2.0 g por litro. La solución se filtró y aireó durante 12 horas con un aireador, el pH se ajustó a 7.0.

Los quistes de *A. salina* se dejaron eclosionar durante 48 horas y los nauplios se colectaron en el área iluminada.

Se realizó una preevaluación con rangos de concentración amplios: 1, 10, 100 y 1 000 ppm con tres repeticiones.

Las evaluaciones de toxicidad se realizaron en 5 viales de vidrio de 10 ml que contenían cada uno 10 nauplios en 5 ml de agua de mar artificial a los cuales se les adicionó la cantidad de extracto necesaria. Cada ensayo incluyó un control, el cual sólo contenía agua de mar y un blanco con los frascos impregnados con el solvente (agua o etanol). Los conteos de mortalidad se realizaron a las 24 horas. Con los datos obtenidos se estrecharon los rangos de concentración cercanos a la concentración letal media (LC₅₀). Los valores de LC₅₀ se obtuvieron mediante la metodología PROBIT.

Bioensayos con larvas de *Ae. aegypti*

Se establecieron bioensayos para evaluar la toxicidad de los extractos utilizando un diseño completamente al azar.

Para todos los bioensayos se usaron larvas de *Ae. aegypti* de 4° estadio con el mismo tiempo en el estadio. Las muestras utilizadas en las evaluaciones de actividad se prepararon mediante dilución a partir del extracto etanólico concentrado. Los extractos crudos usados en los bioensayos se aplicaron a

concentraciones lo suficientemente altas para permitir detectar el efecto de los constituyentes menores. Las concentraciones usadas fluctuaron en el rango de 0 a 4 000 ppm.

En el bioensayo de toxicidad sobre larvas de *Ae. aegypti* se realizaron tres repeticiones, estando conformada la unidad experimental por 30 larvas de 4° estadio en vasos de precipitado de 600 ml, previamente esterilizados en autoclave. Los conteos de mortalidad se realizaron a las 24 horas.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SAS System v 8.2. Los bioensayos de toxicidad se analizaron mediante el procedimiento PROBIT para la determinación de la concentración letal media (LC₅₀) de los extractos evaluados.

RESULTADOS

La relación entre el peso de material fresco y material seco expresado como porcentaje obtenido para las especies vegetales fue de: 56 % para *A. muricata*, 44 % para *M. azedarach* y 40 % para *R. communis*. El rendimiento de la extracción expresado en % ppm fue de 28 % para *A. muricata*, 10 % para *M. americana*, 48,58 % para *M. azedarach* y 70,84 % para *R. communis*.

En la evaluación de toxicidad con *A. salina* se observó que los extractos de las cuatro especies vegetales ocasionan la mortalidad del 50 % de los nauplios a la concentración de 100 ppm y se alcanzó la mortalidad del 100 % a la concentración de 250 ppm.

Toxicidad de los extractos vegetales sobre *Ae. aegypti*.

La tabla 2 y la figura 3 presentan los datos de LC₅₀ obtenidos con los extractos etanólicos de las especies vegetales sobre *Ae. aegypti*.

Los extractos evaluados produjeron mortalidad en las larvas de *Ae. Aegypti* a las 24 horas. En la eva-

luación de toxicidad se observó que el extracto de *R. communis* es el más activo con una concentración letal media de 860 ppm (IC 95 %: 450-1400), seguido por el extracto de *A. muricata* con una LC₅₀ de 900 ppm (IC 95 %: 380-1300).

Tabla 2. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC₅₀) OBTENIDA PARA CADA ESPECIE VEGETAL SOBRE LARVAS DE *Ae. aegypti*

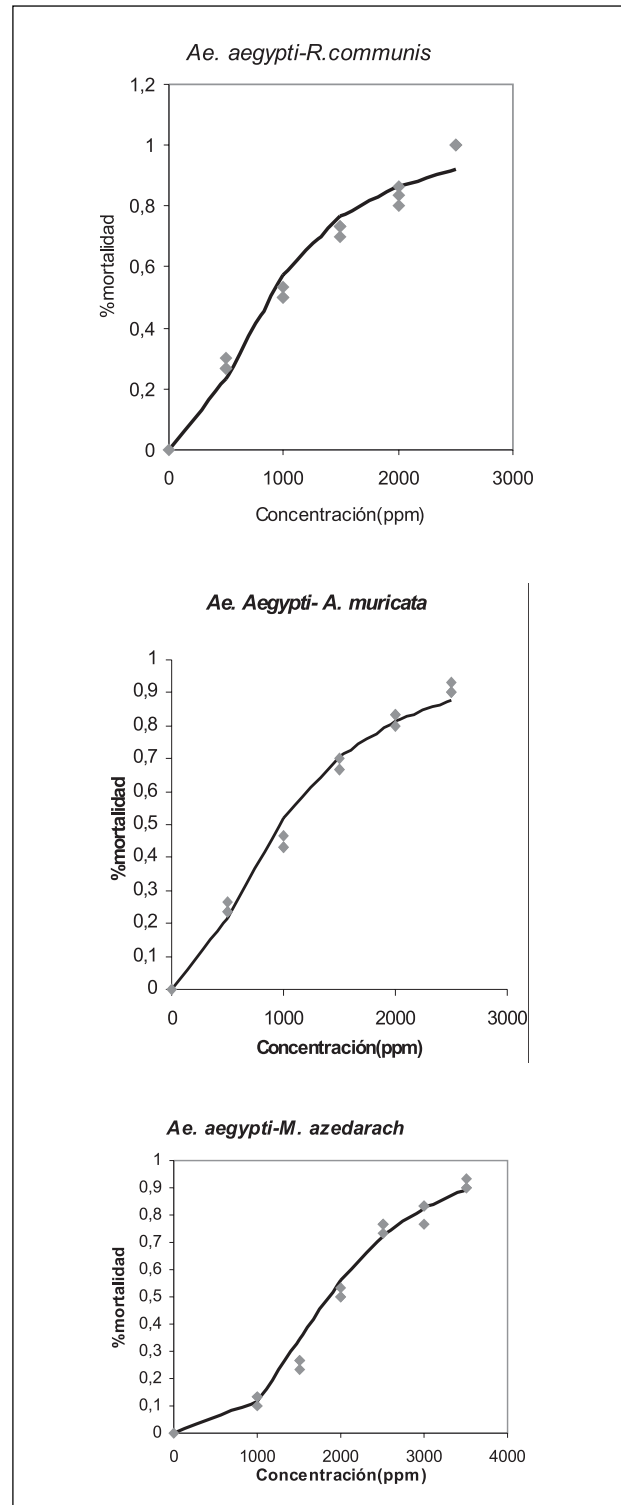
Especie vegetal	<i>Ae.aegypti</i>	
	LC ₅₀ (ppm)	IC* 95%
<i>A. muricata</i>	900	380-1 300
<i>M. azedarach</i>	1 800	1 500-2 100
<i>R. communis</i>	860	45,1-1 500

* Intervalo de confianza al 95%

DISCUSIÓN

Se halló que los extractos que presentan mayor actividad sobre las larvas de *Ae. aegypti* son en su orden el de *R. communis* (LC₅₀ 860 ppm); *A. muricata* (LC₅₀ 900 ppm) y *M. azedarach* (LC₅₀ 1800 ppm). Estos resultados indican que los extractos de las especies vegetales evaluadas se pueden considerar promisorios para el control biológico de larvas de *Ae. aegypti* atendiendo las recomendaciones de la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ) debido a que los valores de LC₅₀ obtenidos en estas evaluaciones se encuentran por debajo de la concentración máxima (5 000 ppm) recomendada para condiciones de laboratorio (15). Teniendo en cuenta que las evaluaciones de toxicidad se llevaron a cabo a partir de extractos totales, donde las concentraciones de los metabolitos secundarios es bastante baja y puede resultar apantallada por otra clase de sustancias presentes en altas concentraciones pero de actividad despreciable (tales como clorofilas, xantofilas, carotenos y otras sustancias con carácter lipídico), es necesario refinar estos extractos para mejorar la actividad biológica al incrementar la concentración de los metabolitos acti-

Figura 3. MORTALIDAD DE *Ae. aegypti* OBSERVADA Y ESPERADA EN LAS EVALUACIONES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA REALIZADAS CON LOS EXTRACTOS DE *R. communis*(A), *A. muricata* (B), y *M. azedarach* (C).



vos y por ende, como una aproximación a la caracterización de tales sustancias.

En los frutos de la especie vegetal *R. communis* se ha reportado la presencia del alcaloide ricinina y de la toxoalbúmina ricina, los cuales presentan una toxicidad muy alta para humanos, mamíferos e insectos (16). Posteriores fraccionamientos del extracto total pueden ayudar a dilucidar los metabolitos responsables de dicha actividad insecticida. En estudios realizados por diferentes autores con extractos acuosos obtenidos a partir de las hojas de *R. communis*, Upasani *et al* (17) encontraron una actividad insecticida muy alta al aplicarlos sobre *C. chinensis* L (Coleoptera: Bruchidae). A partir de este extracto se aislaron varios flavonoides que mostraron actividad insecticida, ovicida e inhibición de la oviposición en *C. chinensis*.

Con la especie *A. muricata* se detectó igualmente actividad insecticida sobre las larvas de *Ae. aegypti*. En las plantas del género *Annona* han sido halladas acetogeninas bistetrahidrofuránicas y monotetrahidrofuránicas que presentan actividad biológica, Rupprecht *et al.*, (18). Feras *et al.*, (19) reportan la toxicidad de las acetogeninas de *A. muricata* sobre cucarachas (*Blattella germanica*) resistentes a insecticidas tradicionales. Morales *et al.*, (12) encontraron que las larvas de *Ae. aegypti* y *Anopheles albimanus* son susceptibles a los extractos polares, no polares y a las mezclas de acetogeninas de *A. muricata*. En los estudios realizados obtuvieron valores de toxicidad media LC₅₀ de 74.7, 236.2 y 20.3 ppm respectivamente. Ohsawa *et al.*, (20) reportaron la actividad de los extractos de *Annona glabra*, *A. montana*, *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. chirimolia* y *A. reticulata* sobre *Callosobrochus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) y observaron porcentajes de mortalidad variables al actuar por contacto.

Posiblemente los extractos evaluados actúan por ingestión, para comprobar esta hipótesis habría que diseñar una metodología diferente para precisar el mecanismo de acción de los extractos.

Los resultados obtenidos en esta investigación son promisorios para el control de larvas de *Ae. aegypti* y posiblemente para el control de larvas de otras especies de mosquitos de la familia Culicidae. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la respuesta de cada especie de mosquito puede ser variable con respecto a las dosis diagnósticas halladas para *Ae. aegypti*.

De otro lado, la alta toxicidad observada con los extractos evaluados en condiciones de laboratorio, amerita el fraccionamiento de estos extractos y en posteriores trabajos la realización de evaluaciones a pequeña escala en condiciones de campo, en donde se pueda evaluar la estabilidad de los productos y su posible impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wandscheer CB, Duque JE, DaSilva MA, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, et al. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 2004; 44(8): 829-835.
2. <http://www.paho.org/dengue-cases-2002>. Organización Panamericana de la Salud. Number of reported cases of dengue & Dengue Hemorrhagic fever region of Americas (by country and subregion) [en línea] [consultado junio 15 de 2003] Disponible en <http://www.paho.org/dengue-cases-2002>
3. SIVIGILA. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica 52 2002: 2-5
4. Rozendaal JA. Vector Control. Methods for use by individuals and communities. Geneve: World Health Organization; 1997.
5. Zerba E. Past and present of chagas vector control and future needs. World Health Organization; 1999.

6. Organización Mundial de la Salud (OMS),. WHO Expert Comité on vector biology and control. Vector Resistance to pesticides: fifteenth report of the Expert committee on vector Biology and Control. WHO Organization Technical Report Series 1992 818, 1992; 1-62.
7. Fonseca I, Quiñones M. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. Revista Colombiana de Entomología. 2005; 31(2):107-115.
8. Arnanson JT, Philogéne BJR, Morand P. Insecticides of plant origin (Acs. Symposium series). USA: Oxford University press;1988.
9. Masler EP, Miyamoto J, Thompson DG. Phytochemicals for peste control. Usa: Oxford University Press; 1997.
10. Parra GJ. Evaluación de la actividad insecticida de algunos extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens*. En: Jaramillo N, Parra G, Triana O, Eds. Memorias VIII Curso Internacional Ecoepidemiología de la Enfermedad de Chagas y Métodos para su Estudio. Medellín, Colombia: Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES, Universidad de Antioquia; 10-15 de octubre de 2005. p. 102-107.
11. Nathan SS, Savitha G, George DK, Narmodha A, Suganya L, Cheng PG. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Bioresource Technology, 2006; 97(11):1316-1323.
12. Morales CA, González R, Aragón R. Evaluación de la actividad larvica de extractos polares y no polares de acetogeninas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología 2004,30(2):187-192.
13. Bowers WS, Ohta T, Cleere JS, Marsehla PA. Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science 1976; 193(4253):542-547.
14. McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. En: AU Rahman AU. Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier; 1991. p. 383-409.
15. Hellpap, C. 1993. Steps for developing botanical pesticidas. Manuscrito G.T.Z.
16. Farias Brito M, Tokarnia CH. Intoxicacao experimental pelas sementes trituradas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) em coelhos. Pesq Vet Bras 1996;16(4): 1-7.
17. Upasani SM, Kotkar HM, Mendki PS, Maheshwari VL. Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L foliage flavonoids. Pest Manag Sci 2003; 59(12): 1349-1354.
18. Ruppretch JK, Huí YH, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins: a review. J Nat Prod 1990; 53(2): 237-278.
19. Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL. Annonaceous acetogenins recent progress. J Nat Prod 1999; 62(3): 504-540.
20. Ohsawa K, Kato S, Honda H, Yamamoto I. Pesticidal active substances in tropical plants: insecticidal substance from the seeds of Annonaceae. J Agric Sci 1990; 34: 253-258.

