

POLVOS Y EXTRACTOS DE *Annona muricata* L Y *Annona squamosa* L, PARA CONTROL LARVARIO DE *Aedes aegypti* L.

POWDERS AND EXTRACTS OF *Annona muricata* L, AND *Annona squamosa* L, FOR LARVARY CONTROL OF *Aedes aegypti* L.

Emigdio De la Cruz De la Cruz¹, Alejandra López Mancilla², Pascuala Hernández Rivera², Lorena Casanova Pérez¹, Florencia García Alonso¹.

¹Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, Huejutla de Reyes, Hidalgo, México 43000. emigdio.delacruz@uthh.edu.mx

²Tecnológico Nacional de México Campus Huejutla, Huejutla de Reyes, Hidalgo, México 43000.

RESUMEN. *Aedes aegypti* L. es vector de enfermedades virales, entre las que destaca el dengue, enfermedad epidémica muy común en regiones tropicales y subtropicales, como la Huasteca. La eliminación de criaderos y el control del vector, se encuentran entre las medidas en la lucha contra la enfermedad. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad de polvos vegetales y extractos, a base de semillas de *Annona muricata* L y *Annona squamosa* L, para el control en estadio larvario, del mosquito *Aedes aegypti* L. En todos los bioensayos, se utilizó agua destilada como testigo. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones, usando frascos de un litro como unidad experimental, colocando cinco larvas de tercer estadio por frasco; condiciones de laboratorio con temperaturas entre 28 y 30 °C. La variable respuesta fue la mortalidad de las larvas 24, 48 y 72 horas, después de la aplicación de los tratamientos. Los datos obtenidos se analizaron en el programa estadístico SAS, para realizar análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$). Los resultados mostraron que el polvo de semillas, de ambas especies de *Annona*, a partir de concentraciones del 5 %, lograron la mortalidad del 100 % de las larvas en el periodo de 24-48 horas, sin observar diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Los extractos de las dos especies de *Annona*, obtenidos con los tres solventes evaluados en concentraciones del 5%, lograron eliminar el 100 % de las larvas después de 72 horas. Los extractos obtenidos con alcohol etílico alcanzaron el 100 % de mortalidad a las 24 horas, aunque en la mortalidad final, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$). Los polvos y extractos vegetales a base de semillas de *A. muricata* L y *A. squamosa* L, fueron efectivos contra las larvas en tercer estadio de *A. aegypti* L.

Palabras clave: Bioensayos, mortalidad, estadio.

ABSTRACT. *Aedes aegypti* L., is a vector of viral diseases, among which dengue stands out, a very common epidemic disease in tropical and subtropical regions, such as the Huasteca. The elimination of breeding sites and vector control are among the measures in the fight against the disease. The objective of this research was to evaluate the effectiveness of plant powders and extracts, based on seeds of *Annona muricata* L and *Annona squamosa* L for the control of the larval stage of the mosquito *Aedes aegypti* L. In all bioassays, distilled water was used as control. The bioassays were carried out under a completely randomized experimental design with three replications, using one-liter flasks as the experimental unit, placing five third-stage larvae per flask; laboratory conditions with temperatures between 28 and 30 °C. The response variable was the mortality of the larvae 24, 48 and 72 hours after the application of the treatments. The data obtained were analyzed in the statistical program SAS, to perform analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($\alpha=0.05$). The results showed that the seed's powder of both species of *Annona*, from concentrations of 5%, achieved 100% mortality of the larvae in the period of 24-48 hours, without observing significant differences between treatments (Tukey $\alpha=0.05$). The extracts of the two species of *Annona*, obtained with the three solvents evaluated at concentrations of 5%, were able to eliminate 100% of the larvae after 72 hours. The extracts obtained with ethyl alcohol reached 100% mortality at 24 hours, although in the final mortality, no significant differences were observed between treatments (Tukey $\alpha=0.05$). Powders and plant extracts based on seeds of *A. muricata* L and *A. squamosa* L were effective against third stage larvae of *A. aegypti* L.

Key words: Bioassays, mortality, stage

INTRODUCCIÓN

México no es el único país donde el dengue es un problema grave de salud pública, al respecto, se estima que existen 50 millones de casos en el planeta, asimismo, una tercera parte de la población mundial se encuentra en riesgo de padecer esta enfermedad, en especial en las regiones tropicales y

subtropicales del mundo¹. Cada año los mosquitos vectores de la enfermedad, como *Aedes aegypti* L, se reproducen de forma abundante durante la temporada de lluvias, en primavera-verano. Esta especie es hematófaga, por tanto, toma su alimento del hombre, aves y otros mamíferos² a través de una

probóscide en forma de estilete; durante este proceso es que dicho insecto contagia el virus del dengue.

El método de control más usado para reducir o evitar epidemias de dengue, consiste en el control químico del insecto vector que involucra pesticidas piretroides y organofosforados, los cuales contaminan el ambiente. Buscando alternativas al respecto, existen trabajos que demuestran que, los extractos de plantas son efectivos en el control larvario de *A. aegypti* L; algunas ventajas de estos extractos o bioinsecticidas, es que son específicos, no persistentes, biodegradables, minimizan el uso de insecticidas químicos, son económicos y ofrecen una opción alterna para el control integrado¹.

Estos bioinsecticidas están elaborados con base en metabolitos secundarios que existen naturalmente en las plantas y que pueden ser usados para controlar/repeler insectos. Algunos de los principales compuestos son: alcaloides, acetogeninas, terpenoides, monoterpenos, esteroides, flavonoides¹. En ese sentido, los metabolitos secundarios de plantas como *Annona muricata* L y *Annona squamosa* L, han sido reportados con alta efectividad contra diferentes especies de insectos, entre ellos *A. aegypti* L. La extracción de éstos, ha sido utilizando diferentes solventes. Sin embargo, su aplicación en polvo, no se encuentra reportado.

Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar, diversas concentraciones en polvo de semillas de *A. muricata* y *A. squamosa*, así como extractos obtenidos con diferentes solventes, en la mortalidad de larvas, del vector del dengue *A. aegypti* en su tercer estadio.

METODOLOGÍA

Área de estudio. La fase de laboratorio, se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico, de la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. La fase de campo, se realizó en la colonia Parque de Poblamiento Solidaridad, que se localiza en el Municipio de Huejutla de Reyes, Hidalgo, México y se encuentra entre las coordenadas GPS: Longitud (dec): -98.386111, Latitud (dec):21.151944 y a una altitud de 120 msnm. Material vegetal³. Se colectaron semillas de *A. muricata* L y *A. squamosa* L, en salidas de campo a

la Comunidad de Los Jobos, Orizatlan y en la Ciudad de Huejutla de Reyes Hidalgo, en la Colonia, General Corona del Rosal, en la calle # 3. En los mercados y Central de abastos de la misma ciudad, se colectaron parte de las semillas de *A. muricata* L.

Se colectaron ejemplares (hojas, flores y frutos) de las especies a evaluar y posteriormente fueron ingresados al Laboratorio de Control Biológico, del área de Agrobiotecnología de la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense (UTHH) y se identificaron taxonómicamente con una clave botánica.

Las semillas colectadas de *A. muricata* L y *A. squamosa* L, se colocaron sobre papel estraza, para su secado en lugar sombreado y a temperatura ambiente. Al final se colocaron en estufa de secado a 60 °C, por tres días. Posteriormente se molieron mediante un molino de mano. Se pesaron los extractos en polvo, en cantidades de 5,8,12,15 y 20 g, mediante un vidrio de reloj y una Balanza de precisión Marca Ohaus, Modelo Explorer.

Reproducción de larvas de *A. aegypti* L⁴. Se seleccionaron tres manzanas, en la Colonia Parque de Poblamiento Solidaridad. Se eligieron cuatro viviendas al azar, por manzana. En cada vivienda se colocó una ovitrampa para el muestreo. Las ovitrampas, fueron recipientes de botellas de plástico de color negro, con capacidad para un litro de agua. Para la captura de huevecillos, en el interior de la ovitrampa, se colocó tela pellón, de 12 cm de ancho y 35 cm de largo, la cual cubrió por completo la circunferencia o parte interna del recipiente.

Se realizaron registros y etiquetado, con los siguientes datos por ovitrampa: fecha, municipio, colonia, número de ovitrampa y nombre del colector. Se agregó agua limpia a la ovitrampa y se perforó a una altura de 8 cm.

Se ubicaron las 12 ovitrampas entre las plantas, en lugares sombreados y oscuros, a 1.5 metros de altura, evitando los rayos del sol, ya que son condiciones que favorecen la reproducción del insecto. La colocación de las ovitrampas, se realizó con una separación de 50 metros entre las mismas.

Conteo de huevecillos de larvas de *A. aegypti* L. Se realizó el conteo de huevecillos, por pellones y ovitrampa, en el Laboratorio de Control Biológico del área de Agrobiotecnología, de la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense (UTHH).

Se determinó el número de huevecillos viables y eclosionados, mediante círculos y una lupa de 10x. Los huevecillos se colocaron en cámara húmeda para su supervivencia.

Desarrollo de larvas en criaderos⁵. Con los huevecillos colectados y seleccionados, se instalaron cinco criaderos en la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense (UTHH), para la reproducción de larvas. Tres de ellos se instalaron en áreas de la Universidad, a temperatura ambiente. Dos se instalaron dentro del laboratorio de control biológico, en condiciones controladas entre 28 °C y 30 °C de temperatura. La alimentación de las larvas, consistió en raíces de plantas pequeñas y algodón con azúcar. Identificación de larvas⁶. Se identificaron larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L, mediante un microscopio Marca iroscope Modelo BW-2. Para ello se usó una clave ilustrada, sobre larvas de mosquitos de interés sanitario. Las larvas identificadas, se guardaron en frascos con agua, de un litro de capacidad, para realizar los bioensayos.

Primer bioensayo⁷. Los bioensayos se llevaron a cabo, con polvo de semillas de *A. muricata* L y *A. squamosa* L, en porcentajes de 0, 5, 8, 12, 15 y 20 % (p/v), bajo un diseño experimental completamente al azar, la variable evaluada, fue mortalidad de larvas a 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. El bioensayo se desarrolló en condiciones de temperatura entre 28 y 30 °C. Se establecieron 12 tratamientos, con seis repeticiones cada uno, en unidades experimentales consistentes en frascos de vidrio, con 1 L de capacidad, donde se colocaron 300 mL de solución, de acuerdo al tratamiento correspondiente. En cada unidad experimental se colocaron 5 larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L. Observando las larvas con un estereoscopio, se determinó y registró su mortalidad, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos.

Segundo bioensayo⁷. Se realizó, usando extractos de metabolitos secundarios a partir del polvo de semillas de *A. squamosa* L y *A. muricata* L, obtenidos con tres solventes: agua destilada, alcohol etílico y hexano. Por disponibilidad de material, los extractos se prepararon con diferentes cantidades de polvo.

- Semillas de *A. muricata* L, se utilizaron 43.70 g, para cada solvente.
- Semillas de *A. squamosa* L, se utilizaron 84.5 g, para cada solvente.

El polvo de las semillas de cada especie y de acuerdo al solvente, se colocó en frascos de vidrio, de tres litros de capacidad. El solvente se colocó hasta cubrir la muestra; después de 24 h, se decantó y guardó en un frasco ámbar. El proceso se repitió tres veces (72 horas). Las condiciones de extracción fueron temperaturas entre 28 °C y 30 °C. Las muestras obtenidas, se guardaron en lugar fresco y oscuro, para conservar los metabolitos.

La purificación de muestras, se realizó mediante rotavapor, para la separación de solventes y obtener extractos puros. La temperatura utilizada, fue acorde a cada solvente (alcohol etílico entre 60 °C y 64° C, hexano entre 60 °C y 62° C, agua destilada, entre 60 °C y 90 °C).

Los extractos puros, fueron aforados a 100 mililitros con agua destilada y a ello se le consideró como solución madre.

La combinación de solventes y tipo de planta, dio como resultado, seis tratamientos y el testigo. De cada solución madre y por triplicado, se tomaron cinco mililitros (5 %), se colocaron en matraces, los cuales se aforaron a 100 mililitros, con agua destilada. En total se obtuvieron 21 unidades experimentales, consistentes en un frasco de vidrio de un litro de capacidad. Una vez aplicados los tratamientos en los frascos, se colocaron cinco larvas de tercer estadio, en cada uno de ellos. La mortalidad de larvas se registró, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos.

Los datos obtenidos, se analizaron mediante el programa estadístico SAS, para realizar Análisis de Varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

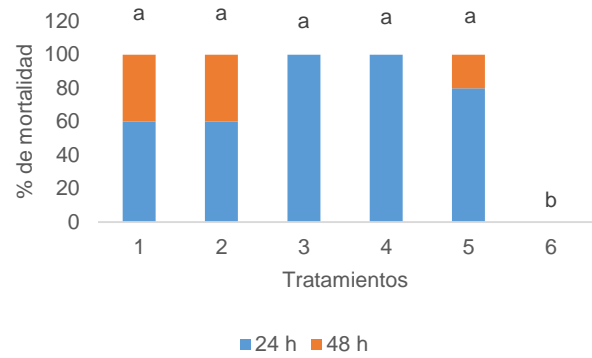
Los resultados obtenidos durante el bioensayo con polvos vegetales, mostraron que los polvos a base de semillas de *A. muricata* L (Figura 1), son efectivos para el control de *A. aegypti* L, en estado inmaduro. En las primeras 24 horas, murió el 60 % de las larvas y a las 48 horas, en todas las concentraciones, todas las larvas habían muerto. Destacar que las concentraciones del 12 y 15 %, mataron el 100 % de las larvas, durante las primeras 24 horas.

Los extractos obtenidos con solventes, a partir de las semillas de *A. muricata* L (Figura 2), fueron efectivos para el control larvario; con los tres solventes, se obtuvo el 100 % de mortalidad, después de 72 horas; pero con el extracto de alcohol etílico, todas las larvas murieron en 24 horas.

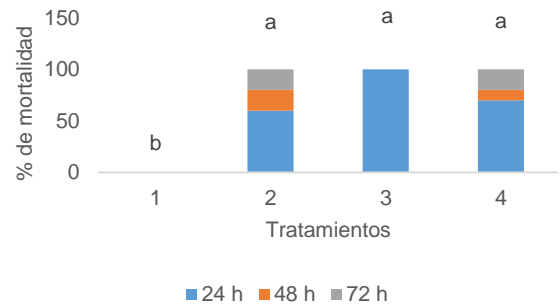
Un gran número de compuestos químicos se han extraído de las semillas de *A. muricata* L, así como en otras partes del árbol de guanábana, entre ellos se encuentran los flavonoides, alcaloides y acetogeninas; se cree que las acetogeninas tienen propiedades anticancerígenas y actualmente se ha obtenido amplia variedad de productos y están disponibles para el tratamiento del cáncer⁸. Los flavonoides y alcaloides contenidos en la corteza, semillas y hojas de varias especies de la familia Annonaceae han demostrado propiedades como insecticidas y antibacterianos⁹.

Las hojas y brotes tiernos de *A. muricata* L, son usados por algunas comunidades como anticancerígenos, antiespasmódicos, sedativos, antimaláricos, vasodilatadores y antidiabéticos. Las hojas de *A. muricata* L, se han utilizado tradicionalmente por el hombre para tratar dolores de cabeza, hipertensión, tos, asma y como sedante en países como Cuba, Brasil y Perú, sin previa validación científica¹⁰. Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con los obtenidos por otros autores^{8,11}, quienes a bajas concentraciones de extractos etanólicos de *A. muricata* L, obtuvieron 95 % de mortalidad del vector del dengue.

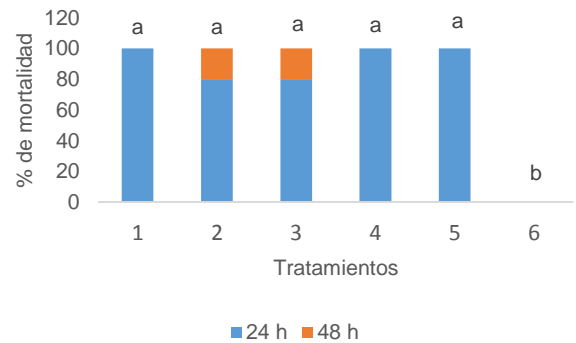
Los polvos a base de semillas de *A. squamosa* L (Figura 3), tuvieron efecto en la mortalidad de larvas.



*Tukey $p \leq 0.05$. T1= 5 %, T2=8 %, T3= 12 %, T4=15 %, T5= 20 % y T6= Testigo.
Figura 1. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L, con polvos a base de semillas de *A. muricata* L, 24 y 48 h después de la aplicación.



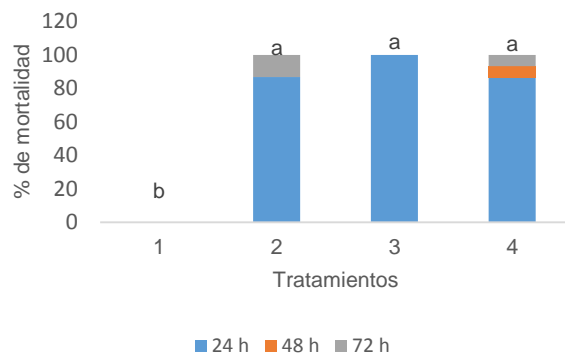
*Tukey $p \leq 0.05$. T1=Testigo, T2=Agua destilada, T3=Alcohol etílico, T4=Hexano
Figura 2. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L, con extractos a base de semillas de *A. muricata* L, 24,48 y 72 h después de la aplicación.



*Tukey $p \leq 0.05$. T1= 5 %, T2=8 %, T3= 12 %, T4=15 %, T5= 20 % y T6= Testigo.
Figura 3. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L, con polvos a base de semillas de *A. squamosa* L, 24 y 48 horas después de la aplicación.

Después de 24 horas, murieron el 80 % de las larvas y después de 48 horas, todas las larvas habían muerto. Las concentraciones superiores al 12 %, eliminaron a las larvas en las primeras 24 horas.

Los extractos con los tres solventes, a base de polvos de semillas de *A. squamosa* L (Figura 4), consiguieron el 100 % de mortalidad de larvas, después de 72 horas, pero la mayor efectividad se tuvo con alcohol etílico como solvente, ya que después de 24 horas, todas las larvas habían muerto.



*Tukey $p \leq 0.05$. T1=Testigo, T2=Agua destilada, T3=Alcohol etílico, T4=Hexano

Figura 4. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *A. aegypti* L, con extractos a base de semillas de *A. squamosa* L, 24,48 y 72 horas, después de la aplicación.

A. squamosa L, contiene el ácido Ent-16b, 17-dihydroxykaurant-19oic, el cual tiene actividad anti-HIV¹². En sus hojas se ha registrado la presencia de: alcanol (1-octacosanol, 1-triacontano, 1-traconsanol); aceite esencial 70.28 % (monoterpenos: α -terpineol 0,09 %; timol); flavonoides (quercetina) y esteroides (β -sitosterol, estigmasterol). Diferentes autores, en el tamizaje fitoquímico, han informado la presencia de alcaloides y leucoantocianinas; así como, ausencia de ácido cianhídrico, quinonas, saponinas y taninos en toda la planta¹³.

Se ha reportado que con sus extractos se pueden controlar, pulgones o áfidos (*Aphis* spp.), gorgojos (*Callodruschus chinensis*), escama verde del café (*Coccus virides*), polilla de la col (*P. xylostella*), mosquitos, moscas, orugas, nemátodos (*Meloidogyne, incognita*) y se han obtenido buenos resultados con extractos acuosos y acetónicos para el control de otro vector, como *Culex quinquefasciatus*¹⁴. Muy similares a los resultados obtenidos en el presente trabajo con larvas de tercer instar de *A. aegypti* L.

CONCLUSIONES

- Los polvos a base de semillas de *A. muricata* L y *A. squamosa* L. en concentraciones superiores al 5 %, son efectivos para el control de larvas de tercer instar de *A. aegypti* L.
- Los extractos vegetales obtenidos con los solventes agua destilada, hexano y alcohol etílico al 5 %, son efectivos para el control de larvas en tercer estadio de *A. aegypti* L. Teniendo mayor efectividad los extractos de alcohol etílico.

REFERENCIAS

1. Báez-Rodríguez, I. (2010). Evaluación de Plantas Medicinales con Potencial en el Control Biológico del Vector Transmisor de Dengue *Aedes aegypti*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. México. 96 p. <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/6942>
2. Thiri6n-Icaza, J. (2003). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. Bayer Environmental Science. México. 137 p.
3. Villavicencio N., M. Á., Pérez E., B. E. y A. J. Gordillo M. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. Polibotánica 30,193-238.
4. Franklin, B. (2014). Guía Metodológica para la Vigilancia Entomológica con Ovitrapas. Secretaria de Salud. México. 32 p.
5. Reyes-Flores, F. G. (1998). Análisis de dos Sistemas de Producción de Plántulas de tres especies de Leguminosas en el Matorral Tamaulipeco, Tesis de maestría. UANL. México. 140 p. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/636>.
6. Gustavo C, R., & Walter R, A. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Fundación Mundo Sano. Argentina. 49 p.
7. Rozo, A., Zapata, C. y F. J. Bello. (2008). Evaluación del efecto t6xico de extractos de *Eupatorium microphyllum* L. F. (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera:culicidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Cienc. Salud. 6 (2), 64-73.
8. Amariles-Barrera, S., García-Paj6n, C. M. y G. Parra-Henao. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. Rev. CES Med. 27 (2), 193-203.
9. Palomino-Flores, C. M. y J. Arroyo-Acevedo (2017). Efecto del extracto etan6licos de las hojas de *Anona muricata* L. (Guanábana) sobre el Síndrome metab6lico inducido en ratas. Rev. Perú Med. Integr. 2(1), 30-37.
10. Mayra-Estefanía, M. P. (2018). Evaluación de la Actividad Antibacteriana de Extracto Alcoh6lico y Extracto Et6reo de *Annona muricata* Frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría. Universidad Regional Aut6noma de los Andes. Ecuador. 110 p.
11. Parra-Henao, G. J., García-Paj6n, C. M. y J. M. Cotes Torres (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) vector del dengue en Colombia. CES Medicina 21 (1), 47-54.
12. Bolívar-Fernández, N., Saucedo-Veloz, C., Solís-Pereira, S., & Sauri-Duch, E. (2009). Maduración de Frutos de Saramuyo

- (*Annona squamosa* L.) Desarrollados en Yucatán, México. *Agrociencia* 43 (2), 133-141.
13. Victoria- Amador, M. D., Morón-Rodríguez, F., Morejón-Rodríguez, Z., Martínez-Guerra, M. J., & López-Barreiro, M. (2006). Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. *Rev. Cubana Plant Med*,11(1), 1-12.
 14. Pérez-Pacheco, R., Rodríguez-Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont, R. y G. Ramírez-Valverde. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* 20 (1), 141-152.