

Bioactividad de plantas como un método alternativo para el control de mosquitos

Leyva Silva Maureen¹, Marquetti Fernandez Maria del Carmen¹, Morejón Martínez Gisel¹, Pino Pérez Oriela², Scull Rodríguez Ramón³, Payroll Juan Andres³, Montada Dorta Domingo¹

¹ Instituto medicina Tropical Pedro Kourí/ Departamento Control de Vectores, La Habana Cuba maureen@ipk.sld.cu

² Centro de Sanidad Agropecuaria . Departamento de Sanidad Vegetal, San José de las Lajas, Mayabeque , Cuba oriela@censa.edu.cu

³Instituto de Farmacia y Alimento, Departamento Farmacología La Habana, Cuba vpdrí@ifal.uh.cu

Resumen:

Dentro de nuestra flora se encuentran plantas que por su variedad estructural constituyen una fuente alternativa, ecosostenible y promisorio para el control de mosquitos de importancia médica. Debido a la importancia que posee la búsqueda de alternativas de control, el objetivo de este trabajo fue evaluar la bioactividad insecticida de los aceites esenciales de *Bursera graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Melaleuca quinquenervia*, *Curcuma longa*, *Curcuma aeruginosa*, *Piper aduncum*, *Eucaliptus globulus*, *Citrus sinensis* contra *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*, mosquitos de importancia médica. Se evaluó la actividad larvicida, adulticida, ovicida y repelente a la oviposición utilizando metodologías estandarizadas por la Organización Mundial de la Salud. Al analizar de forma general en las tres especies de mosquitos, todos los aceites evaluados evidencian una significativa actividad larvicida, al presentar CL₅₀ inferiores a 100 mg/mL. En cuanto a la actividad adulticida utilizando botellas y papeles impregnados, los aceites de *O. basilicum*, *C. longa* y *C. aeruginosa* mantuvieron una respuesta homogénea en las tres poblaciones. No se evidencia actividad ovicida al exponer huevos ante soluciones de los aceites utilizados y si repelencia a la oviposición con soluciones de *C. sinensis*, *P. aduncum*, *B. graveolens*. Los conocimientos adquiridos con este tipo de evaluaciones constituyen la base para la selección correcta de especies vegetales como fuente de plaguicidas, lo que permite sentar las bases para la introducción de alternativas naturales sustentables y biodegradables.

Palabras clave: aceites esenciales, actividad larvicida, adulticida, ovicida.

I. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos dentro de la fauna entomológica, constituyen uno de los grupos de mayor importancia médica jugando un papel preponderante en la transmisión de enfermedades tanto al hombre (1) como a los animales (2,3). Arbovirosis como la fiebre amarilla, West Nile (4) Chikungunya (5) , Zika (6) incluyendo el dengue (7) aumentan de forma extraordinaria su incidencia, en los últimos decenios (8).

A pesar de los considerables esfuerzos realizados por el gobierno cubano en las últimas décadas se ha producido la reinfestación de *Aedes aegypti* y la expansión de *Aedes albopictus* en varias provincias del país .El déficit en algunos servicios públicos básicos, como el abasto de agua y la recolección de desechos sólidos, lógicamente ocasionó el aumento del número de criaderos generados por la actividad humana, además del deterioro en las actividades de saneamiento ambiental (9). La ausencia de candidatos vacunales hace, que hasta el presente, el control químico de vectores sea la opción para prevenir o reducir las poblaciones de insectos y de esta forma la incidencia de estas epidemias (10).

Los insecticidas químicos dentro de la lucha integrada para el control de vectores, en muchos casos se complementan con otros métodos de control como el físico, el biológico, las campañas educacionales y la participación de la comunidad. Un método alternativo lo constituye la utilización de plantas, las cuales representan una fuente promisoría, más segura y sostenibles ecológicamente para el control vectorial. En el caso de los aceites esenciales provenientes de plantas, muchos exhiben actividad biológica sobre numerosas especies de mosquitos (11-13)

Nuestro país posee una extensa y variada flora, de la cual se notifica especies de plantas biosintetizadas de sustancias con actividad plaguicida (14). Un gran número de ellas no se conoce su potencial insecticida y debido su variedad estructural constituyen una fuente alternativa, ecosostenible y promisoría para el control de mosquitos de importancia médica. Por lo que nuestro objetivo es evaluar la bioactividad insecticida de los aceites esenciales de *Bursera graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Melaleuca quinquenervia*, *Curcuma longa*, *Curcuma aeruginosa*, *Piper aduncum*, *Eucaliptus globulus*, *Citrus sinensis* contra *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex quinquefasciatus*, mosquitos de importancia médica

II. MÉTODO

A., *Poblaciones de mosquitos utilizadas* :Se utilizaron tres especies de mosquitos distribuidas en cuatro poblaciones **Población Rockefeller**: especie *Ae. aegypti* cepa de referencia de laboratorio susceptible a insecticidas. **Población Marianao 2013** especie *Ae. aegypti* colectada en los estados de larva y pupa, en el municipio Marianao situado en La Habana, Cuba, en el año 2013. **Población Fraga 2012**: especie *Ae. albopictus* colectada en estado de larva y pupa en larvitrapa del reparto Juan de Dios Fraga, La Lisa, La Habana, Cuba año 2012. **Población Baraca 2014**: especie *Cx. quinquefasciatus* colectada en estado de larva y pupa en zanja ubicada en el municipio La Lisa, La Habana, Cuba año 2014.

B., *Especies de plantas utilizadas* :Los aceites esenciales de *Piper aduncum subsp ossanum* (Piperaceae), *Bursera graveolens* (Burseraceae), *Eucaliptus globulus* , *Melaleuca quinquenervia* (Myrtaceae) *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) *Curcuma longa*, *Curcuma aeruginosa* (Zingiberaceae) y *Citrus sinensis* (Rutaceae) fueron extraído por arrastre al vapor y suministrados por el instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de Oriente y el Centro de Sanidad Agropecuaria

C., Bioensayos para determinar la actividad insecticida de los aceites esenciales en tres especies de mosquitos.

Para la evaluación de la actividad larvicida se realizaron los bioensayos según metodología de la OMS (15). La actividad adulticida se realizó utilizando botellas impregnadas según metodología del CDC (16). La actividad repelente a la oviposición se realizó colocando 150 individuos divididos en tres réplicas y dentro jaulas conteniendo tres medios diferentes: agua declorinada, agua declorinada con larvas de mosquitos y de agua declorinada con aceite esencial. A los recipientes se le colocó una tira de papel etiquetada para recoger la ovipuesta. Las tiras de huevos se extrajeron, y posteriormente se colocaron a eclosionar.

D., Analisis estadísticos.

Las concentración letales (CL50 ,CL90) y los tiempos letales (TL50 y TL90) se calcularon usando la prueba Probit implementada en el programa estadístico SPSS (versión 11 para Windows). Para el análisis de la normalidad de los datos se trabajó con la prueba Kolmogorov-Smirnov y el test Shapiro Wilk. Se aplicó la prueba “T de Student” para comparar la media de los huevos puestos y eclosionados para cada especie y un ANOVA Multifactorial para la evaluación de la actividad ovicida utilizando el programa estadístico Statistica 7.0

III. RESULTADOS

Al analizar de forma general en las cuatro poblaciones, todos los aceites evaluados evidencian una significativa actividad larvicida, al presentar CL50 inferiores a 100 mg/mL (Tabla 1). Solo el aceite de *C.aeruginosa* para Marianao 2013 sobrepasa este criterio (126 mg/mL). En la población de *Ae. aegypti* Rockefeller se destaca , que para todos los aceites esenciales, excepto *C longa*, las CL50 calculadas , presentan valores inferiores a 50 mg/mL para corresponderse con criterios de muy alta actividad plaguicida. Las pendientes más altas en este estudio se calcularó para *C aeruginosa* (11,43) en la población Rockefeller. El valor de mayor pendiente calculada para la población Marianao2013 (12,63) corresponde con el aceite de *M. quinquenervia*, para el resto de los aceites en esta población, las pendientes promediaron un valor de 4 indicando una respuesta homogénea ante los aceites evaluados . *O. basilicum* presenta para *Ae albopictus* la CL50 y la pendiente mas baja, para esta población. En el caso de *Cx quinquefasciatus* el aceite de *M quinquenervia* presenta la única CL50 superior a 50 mg/ mL e inferior a 100mg/mL.

Para la población Rockefeller, *E. globulus* mostró la mayor actividad adulticida con la dosis de 10 mg/mL seguido de *P.aduncum* con 30 mg/mL utilizando botellas impregnadas. *B. graveoloens*, *O. basilicum*, *M. quiquenervia*, lograron el 100 % de derribo a los 30 minutos con 40 mg/mL . De igual forma *C. longa* y *C.aeruginosa* lograron TD50 a 50 mg/mL (Tabla2). A pesar de que el aceite de *C. sinensis* presentó una de las CL50 mas bajas en larvas, no se encontró derribo ni mortalidad de ninguno de los individuos expuestos durante una hora con ambos métodos utilizados. Para Marianao 2013 (Tabla 2) *E. globulus* presenta la menor dosis adulticida (20 mg/mL) con botellas seguido de *O. basilicum* y *B. graveoloens* con 40 mg/mL. *M. quiquenervia* incrementó a 50 mg/mL con respecto a Rockefeller, *P. aduncum* permanece con el doble de la dosis de Rockefeller . Para *Ae albopictus* (Tabla 3), los aceites de *P aduncum*, *E. globulus* *O. basilicum*, *B. graveoloens* mostraron actividad adulticida a la dosis de 40 mg/mL con botellas impregnadas, seguidos de *C. longa*, *C.aeruginosa*, *M quiquenervia* con 50 mg/mL.

Tabla 1 Actividad larvica de aceites esenciales en las poblaciones de Rock y Marianao 2013 (*Ae aegypti*) Fraga 2012 (*Ae albopictus*) y Baraca 2014 (*Cx quinquefasciatus*) utilizadas en estudio

Aceites	Rock		Marianao 2013		Fraga 2012		Baraca 2014	
	b ±SE	CL ₅₀ (LC)	b ±SE	CL ₅₀ (LC)	b ±SE	CL ₅₀ (LC)	b ±SE	CL ₅₀ (LC)
<i>Bursera graveolens</i>	2,96 (1,1)	10,1 (9,2-18,3)	4,32 (0,39)	32,5 (29,6-37,5)	4,84 (0,54)	31,8 (18,5-38,1)	5,55 (0,43)	31,5 (23,9-38,2)
<i>Ocimun basilicum</i>	4,73 (0,35)	46,9 (23,0-71,7)	4,36 (0,32)	47,5 (22,7-74,6)	2,83 (0,27)	9,5 (4,1-13,9)	6,17 (0,46)	31,4 (25,2-37,1)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	12,85 (1,0)	47,2 (45,0-48,4)	12,63 (0,26)	47,1 (18,7-90,2)	4,92 (0,73)	49,5 (43,7-54,5)	4,39 (0,44)	66,0 (60,3-68,2)
<i>Eucaliptus globulus</i>	5,56 (0,52)	27,6 (23,6-30,6)	5,26 (0,36)	13,1 (12,1-13,9)	8,57 (0,88)	91,2 (42,6-108,7)	4,19 (0,32)	20,9 (14,8-26,6)
<i>Piper aduncum</i>	5,10 (0,67)	35,3 (30,2-39,5)	5,02 (0,60)	36,0 (30,9-40,1)	8,22 (0,61)	57,3 (55,2-63,1)	7,99 (0,59)	59,5 (53,1-66,8)
<i>Citrus sinensis</i>	8,61 (1,0)	13,5 (12,2-14,7)	8,11 (1,0)	15,5 (14,9-16,1)	5,42 (0,44)	30,5 (21,9-40,9)	8,07 (0,83)	14,2 (3,3-17,3)
<i>Curcuma longa</i>	6,60 (0,95)	25,3 (22,3-26,4)	5,57 (0,63)	46,4 (40,2-66,3)	7,63 (0,80)	49,2 (43,2-54,1)	5,48 (0,46)	46,2 (33,6-58,5)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	11,43 (0,81)	53,2 (51,0-54,2)	4,90 (0,65)	126,1 (106,2-220,4)	6,82 (0,08)	40,2 (35,6-44,3)	5,17 (0,42)	43,1 (28,5-56,4)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b(pendiente); CL₅₀ (concentraciones letales que provocan el 50 porciento de mortalidad) LC (limite de confiabilidad 95%)

Tabla 2 Actividad aduicida de aceites esenciales en las poblaciones de Rock y Marianao 2013 (*Ae aegypti*) utilizadas en estudio

	Rock			Marianao 2013		
	Dosis (mg/mL)	b ±SE	TD ₅₀ (h) (LC)	Dosis (mg/mL)	b ±SE	TD ₅₀ (h) (LC)
<i>Bursera graveolens</i>	40	4,31 (0,40)	0,21 (0,15-0,27)	40	4,96 (0,45)	0,20 (0,18-0,22)
<i>Ocimun basilicum</i>	40	5,11 (0,46)	0,20 (0,18-0,21)	40	4,80 (0,45)	0,24 (0,19-0,28)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	40	3,86 (0,35)	0,21 (0,15-0,28)	50	4,00 (0,36)	0,22 (0,17-0,27)
<i>Eucaliptus globulus</i>	10	4,95 (0,45)	0,18 (0,14-0,22)	20	4,78 (0,44)	0,20 (0,15-0,25)
<i>Piper aduncum</i>	30	4,59 (0,41)	0,15 (0,14-0,17)	60	3,65 (0,34)	0,19 (0,15-0,23)
<i>Curcuma longa</i>	50	4,33 (0,32)	0,35 (0,30-0,39)	50	4,35 (0,28)	0,39 (0,31-0,47)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,21 (0,22)	0,35 (0,26-0,42)	50	4,48 (0,21)	0,45 (0,43-0,48)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b(pendiente); TD₅₀ (Tiempodiagnostico que provocan el 50 porciento de mortalidad) LC (limite de confiabilidad 95%)

Tabla 3 Actividad adulticida de aceites esenciales en las poblaciones de Fraga 2012 (*Ae albopictus*) y Baraca 2014 (*Cx quinquefasciatus*)

	Fraga 2012			Baraca 2014		
	Dosis (mg/mL)	b ±SE	TD ₅₀ (h) (LC)	Dosis (mg/mL)	b ±SE	TD ₅₀ (h) (LC)
<i>Bursera graveolens</i>	40	4,28 (0,39)	0,19 (0,13-0,25)	50	4,32 (0,24)	0,23 (0,16-0,28)
<i>Ocimum basilicum</i>	40	4,57 (0,31)	0,29 (0,18-0,31)	40	3,2 (0,12)	0,23 (0,20-0,36)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	50	2,13 (0,28)	0,11 (0,008-0,18)	30	3,12 (0,31)	0,16 (0,11-0,21)
<i>Eucaliptus globulus</i>	40	4,79 (0,44)	0,20 (0,15-0,24)	40	4,1 (0,17)	0,21 (0,18-0,26)
<i>Piper aduncum</i>	40	3,81 (0,35)	0,19 (0,17-0,21)	60	4,35 (0,18)	0,17 (0,12-0,19)
<i>Curcuma longa</i>	50	5,11 (0,31)	0,34 (0,32-0,37)	50	4,56 (0,25)	0,26 (0,3-0,43)
<i>Curcuma aeruginosa</i>	50	4,87 (0,20)	0,33 (0,20-0,36)	50	4,23 (0,18)	0,34 (0,29-0,38)

Valores obtenidos mediante Probit SPSS b(pendiente); TD₅₀ (Tiempodiagnostico que provocan el 50 porciento de mortalidad) LC (limite de confiabilidad 95%)

Para *Cx quinquefasciatus* (Tabla 3), el aceite de *M quiquenervia* es el que presenta mayor actividad a 30 mg/mL, seguido de *E. globulus*, *O. basilicum* con 40 mg/mL, *B. graveolens*, *C. longa*, *C. aeruginosa* con 50 mg/mL, *P aduncum*, con 60 mg/mL.

Podemos afirmar que las poblaciones utilizadas prefirieron la puesta de huevos en agua declorinada y en agua declorinada que contenía larvas, antes que colocar la ovipuesta en soluciones de aceites esenciales. La eclosión de los huevos fue alta y en correspondencia con la ovipuesta en todos los casos. En orden creciente *C. sinensis* y *Piper aduncum* presentaron total repelencia a la ovipuesta por parte de las hembras de ambas especies de *Aedes*; seguido de *Bursera graveolens* y *Ocimum basilicum* donde la oviposición ocurrió a porcentos muy bajos mientras que *Melaleuca quinquenervia* y *Eucaliptus globulus* no produjeron un efecto tan marcado en la disociación a la puesta de huevos por parte de las hembras. Al someter huevos de las tres poblaciones de *Ae aegypti* a las CL100 de los aceites, no se encontró diferencia significativa en cuanto a porciento de eclosión de los controles con respecto a los expuestos. Por lo que podemos afirmar que ninguno de los aceites presentó acción ovicida

IV DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no tiene establecido un criterio estándar para la determinación de actividad larvicida de productos naturales. Diversos autores enmarcan la bioactividad teniendo en cuenta los valores de concentraciones letales. Se plantea que los productos con LC₅₀ < 50 mg/L son activos, si 50 mg/L < LC₅₀ < 100 mg/L son moderadamente activos, 100 mg/L < LC₅₀ < 750 mg/L son efectivos, y LC₅₀ > 750 mg /L son inactivos (17) mientras que otros autores consideran compuestos con LC₅₀ < 100 mg/L exhiben un significativo efecto larvicida (18). Por los resultados obtenidos, todos los acei-

tes clasifican con una actividad larvica significativa e inferimos dicha actividad insecticida es atribuible a la variada composición mayoritaria de los mismos. La metodología de las botellas constituye un método barato, sencillo y de fácil aplicabilidad en condiciones de laboratorio. Los aceites esenciales actúan en una fase de vapor, por lo que se infiere que el aceite dentro de la botella actúa como una cámara de vapor provocando un efecto fumigante.

Algunos autores demostraron que los mosquitos pueden detectar varias señales químicas por medio de receptores sensoriales presentes en sus antenas, lo que les permite seleccionar o rechazar el sitio de oviposición(19). Estas variaciones pueden estar moduladas principalmente por la composición química de los aceites y sus componentes mayoritarios y la especie de mosquito evaluada, los cuales pueden influenciar las señales químicas recibidas por los órganos sensoriales de los mosquitos. En cuanto a la actividad ovicida el corión que rodea al huevo tiene como función la protección del embrión, por lo que si esta barrera se permea con sustancias tóxicas, a través de los micrópilos va a ocurrir intercambio de toxinas hacia el interior de los huevos produciendo la muerte o la eclosión y posterior muerte de las larvas por encontrarse dentro de un medio tóxico.

Podemos afirmar que en nuestro contexto tenemos especies vegetales con actividad plaguicida por investigar, con vistas a desarrollar nuevos productos para el control vectorial.

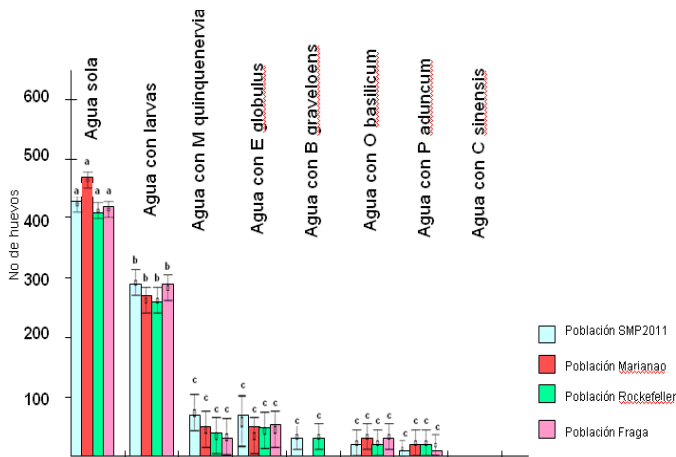


Figura 1 Repelencia a la oviposición de las poblaciones Rock y Mariana 2013 (*Ae aegypti*), Fraga 2012 (*Ae albopictus*) y Baraca 2014 (*Cx quinquefasciatus*) ante diferentes medios de oviposición utilizadas en estudio. Letras iguales no ofrecen diferencias significativas

IV REFERENCIAS

1. WHO: Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases was produced by WHO's Department of Control of Neglected Tropical Diseases. 2017; 278 pp. WHO/HTM/NTD/2017.01
2. O'Meara GL, Evans JR y Gettman A. Reduced mosquito production in cemetery vases with copper liners. J Am Mosq Control Assoc 1992; 8:419-420.
3. De Carvalho G, Trindade R, Nascimento R, Salgueirosa C, Faustino M, Câmara L Evaluation of larval development of *Dirofilaria immitis* in different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Open Journal of Veterinary Medicine, 2013, 3, 277-281

4. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of Dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 200-207
5. Corrales E, Troyo A, Calderón O. Chikunguya: un virus que nos acecha. *Act Méd. Costarricense* 2015; ISSN001-6012/2015/57/1/7-15.
6. Fauci A S, Morens, D M.. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *N Eng J Med* 2016 ;37(4):601-604
7. OPS Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Cuba. June 2016. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016
8. CDC Vector-Borne Diseases - At a Glance. Division of Vector 2014 Disease disponible en <http://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/>
9. Marquetti MC, Bisset J, Suárez S, Pérez O, Leyva M. Bebederos de animales: depósitos a tener en cuenta por el programa de control de *Aedes aegypti* en áreas urbanas de Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2006;58(1):40-3.
10. Bisset J, Rodriguez M, Moya M, Ricardo Y, Montada D, Gato R, Pérez O. Efectividad de formulaciones de insecticidas para el control de adultos de *Aedes aegypti* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011; 63(2)
11. Pitarokili D, Michaelakis A, Koliopoulos G, Giatropoulos A, Tzakou O. Chemical composition, larvicidal evaluation, and adult repellency of endemic Greek Thymus essential oils against the mosquito vector of West Nile virus. *Parasitol. Res.* 2011; 109(2):425-430
12. Noleto Diaz C , Fernandez D. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L (Diptera Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res* 2013 DOI 10.1007/s00436-013-3687-6
13. Noleto Dias C, Lima Alves LP, da Franca Rodrigues KA, Aranha Brito MC, dos Santos C, Mendonça do Amaral FM, dos Santos Monteiro O, de Aguiar Andrade EH, SoaresMaia JG , Fernandes D. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015, Article ID 490765, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/490765>
14. Roig JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tercera Edición Editora del Consejo Nacional de Universidades. 1965:1142pp
15. OMS. Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas en larvas de mosquito. WHO/VBC/81.807
16. CDC. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. In: Brogdon, G. & Chan, B. H. (eds.) 2010;1 ed.: Centers for Disease Control and Prevention.
17. Komalamisra N, Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Apiwathnasorn C Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36:1412–1422
18. Kiran SR, BhavaniK, Devi PS, Rao BRR, Reddy KJ Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour Technol.* 2006;doi:10.1016/j.biortech.2005.10.003
- 19 Davies R.G.. Introducción a la Entomología, Séptima edición. Biología y de las poblaciones de los insectos. Edición Mundi- Prensa. 1975 ;332-340 pp